



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS - UFAM
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - ICB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA - PPGIBA**



**Avaliação etiológica de enterobactérias em pacientes soropositivos (HIV) e marcadores
inflamatórios para disbiose intestinal e translocação microbiana**

DANIELLE FURTADO DA SILVA

Manaus - AM

2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - ICB PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA - PPGIBA

DANIELLE FURTADO DA SILVA

AVALIAÇÃO ETIOLÓGICA DE ENTEROBACTÉRIAS EM PACIENTES SOROPOSITIVOS (HIV) E MARCADORES INFLAMATÓRIOS PARA DISBIOSE INTESTINAL E TRANSLOCAÇÃO MICROBIANA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada da Universidade Federal do Amazonas como parte do pré-requisito para a obtenção do título de Mestre em Imunologia na área de concentração “Biologia de Agentes Patogênicos”.

Orientadora: Dra. Patrícia Puccinelli Orlandi

Co-orientador: Dr. Gemilson Pontes Soares

Manaus- AM

2018

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

S586a Silva, Danielle Furtado da
Avaliação etiológica de enterobactérias em pacientes soropositivos (HIV) e marcadores inflamatórios para disbiose intestinal e translocação microbiana / Danielle Furtado da Silva. 2018
130 f.: il. color; 31 cm.

Orientadora: Patrícia Puccinelli Orlandi
Coorientadora: Gemilson Soares Pontes
Dissertação (Mestrado em Imunologia Básica e Aplicada) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Enterobactérias. 2. Hiv. 3. Translocação microbiana. 4. Disbiose. I. Orlandi, Patrícia Puccinelli II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

A persistência é o caminho do êxito.

Charles Chaplin

RESUMO

Introdução: Mesmo a diarreia sendo considerada uma das principais causas de mortalidade em pacientes com HIV, nosso estudo demonstrou um perfil diferente, apresentando altas incidências de constipação intestinal. A alta frequência de bactérias entéricas com potencial patogênico e a presença do marcador inflamatório sCD14 nestes indivíduos, demonstrou um possível processo de translocação microbiana e disbiose, sendo este cenário responsável por promover um estado de inflamação constante, o que induz a rápida progressão clínica da AIDS. Portanto, neste estudo procuramos verificar a ocorrência de co-infecções bacterianas, com potencial patogênico, e avaliar marcadores imunológicos de inflamação como preditores de translocação microbiana e ativação crônica, em pacientes com HIV/AIDS em Manaus.

Metodologia e Resultados: Foram avaliados 52 pacientes com HIV, cadastrados na Fundação de Medicina Tropical Heitor Vieira Dourado, distribuídos quanto sua carga viral (</ou> 500 cópias de RNA e </ou> 200 CD4+ mm³). Para a identificação dos agentes etiológicos associados à diarreia foi realizado o isolamento por metodologia clássica, onde constatamos uma frequência de (38,46%) de *Escherichia coli*, seguido de *Klebsiella* spp. e *Pseudomonas* spp. (15,38%) respectivamente e em menor frequência *Salmonella* (3,84%) e *Shigella* (1,92%). Os isolados de *Escherichia coli* e *Klebsiella*, foram submetidos a técnica de PCR para verificação dos genes de virulência e resistência sendo obtidas amplificações para os genes *eae*, *uidA*, *astI* e *dAAe* (*E.coli*) e *Kvar*, *blaCTX-M*, *blaKPC*, *blaVIM* e *blaIMP* (*Klebsiella* spp). A avaliação de resistência a antimicrobianos foi realizada por teste de difusão em disco, onde foi observado que a maioria dos isolados testados foram resistentes ao antimicrobianos da classe das Cefalosporinas, o ensaio celular para a verificação dos fenótipos de adesão em *Escherichia coli* detectou maior frequência de adesão difusa (55%) seguido de um fenótipo de adesão atípica (20%), para os isolado de *Klebsiella* spp. verificou-se maior frequência de adesão agregativa (12,5%), ensaio de biofilme constatou que os isolados de *Klebsiella* spp e *Pseudomonas* spp. apresentavam potencial alto para produção do mesmo. A inflamação crônica foi avaliada pela dosagem de citocinas por citometria de fluxo onde foram observadas diferenças significativas entre os níveis de TNF α quando comparados os grupos entre si, com destaque para o grupo 1 e 3 ($p= 0.001$). A avaliação da translocação de produtos microbianos pela busca do marcador CD14 solúvel plasmáticos de ELISA demonstrou diferenças significativas em todos os grupos avaliados quando comparados aos controles Grupo 1: 4953 \pm 4570; Grupo2: 582 \pm 1983; Grupo 3: 3396 \pm 4240; Grupo 4: 3769 \pm 4752. **Conclusão:** Por fim, a presença de patógenos bacterianos na flora de pessoas com HIV bem como a presença de marcadores de inflamação plasmáticos, podem indicar fatores de piora do quadro geral de saúde, bem como a cronicidade de estados inflamatórios.

Palavras-chaves: HIV, Enterobactérias, translocação microbiana, disbiose.

ABSTRACT

Even though diarrhea was considered a major cause of mortality in HIV patients, our study demonstrated a different profile, presenting high incidence of intestinal constipation, but the high frequency of enteric bacteria with pathogenic potential and the presence of the sCD14 inflammatory marker in these individuals, demonstrated a possible process of microbial translocation and dysbiosis, this scenario is responsible for promoting a state of constant inflammation, which induces the rapid clinical progression of AIDS. Therefore, in this study, we sought to verify the occurrence of bacterial co-infections with pathogenic potential and to evaluate immunological markers of inflammation as predictors of microbial translocation and chronic activation in patients with HIV / AIDS in Manaus. 52 HIV patients, registered at the Heitor Vieira Dourado Tropical Medicine Foundation, were distributed, as well as their viral load (<500 copies of RNA and <200 CD4 + mm³). For the identification of the etiological agents associated with diarrhea, isolation was performed by classical methodology, where we found a frequency of (38.46%) of *Escherichia coli*, followed by *Klebsiella spp.* *E. Pseudomonas spp.* (15.38%) respectively and less frequently *Salmonella* (3.84%) and *Shigella* (1.92%). The isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella*, were submitted to PCR for virulence and resistance genes were amplified for the *eae*, *uidA*, *ast1* and *dAAe* (*E. coli*) and *Kvar*, *blaCTX-M*, *blaKPC*, *blaVIM* and *blaIMP* (*Klebsiella spp.*). The antimicrobial resistance evaluation was performed by disc diffusion test, where it was observed that most of the isolates tested were resistant to the antimicrobial class of *Cephalosporins*, the cell assay for the verification of the adhesion phenotypes in *Escherichia coli* detected a higher frequency of diffuse adhesion (55%) followed by an atypical adhesion phenotype (20%) for the isolates of *Klebsiella spp.* (12.5%), a biofilm assay found that the isolates of *Klebsiella spp.* and *Pseudomonas spp.* presented high potential for its production. Chronic inflammation was assessed by cytokine dosing by flow cytometry where significant differences were observed between *TNF α* levels when compared to each other, especially group 1 and 3 (p = 0.001). The evaluation of the translocation of microbial products by search of soluble CD14 ELISA marker demonstrated significant differences in all groups evaluated when compared to the group 1: 4953 \pm 4570; Group 2: 582 \pm 1983; Group 3: 3396 \pm 4240; Group 4: 3769 \pm 4752. Finally, the presence of bacterial pathogens in the flora of people with HIV as well as the presence of markers of plasma inflammation may indicate factors of worsening of the general health picture, as well as the chronicity of inflammatory states

Keywords: HIV, Enterobacteria, microbial translocation, dysbiosis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Desenho esquemático da estrutura do HIV.....	20
Figura 2: Número estimado de pessoas vivendo com HIV em 2017 por região global.....	22
Figura 3: Patogênese da infecção do HIV para AIDS	23
Figura 4. Representação esquemática da translocação microbiana durante a infecção pelo HIV.....	27
Figura 5. Disbiose intestinal.....	29
Figura 6. Consequência da infecção pelo HIV no trato GI.	30
Figura 7. Perfil de adesão das cepas positivas para os patótipos de <i>E.coli</i>	69
Figura 8: Perfil de adesão dos isolados de <i>E.coli</i> do paciente (HIV INT 0002)	69
Figura 9. Perfil de adesão dos isolados de <i>E.coli</i> do paciente (HIV INT 0006).	70
Figura 10. Perfil de adesão dos isolados de <i>E.coli</i> do paciente (HIV INT 0009).	70
Figura 11. Perfil de adesão dos isolados de <i>E.coli</i> do paciente (HIV INT 0044).	70
Figura 12. Perfil de adesão dos isolados de <i>E.coli</i> do paciente (HIV INT 0046)	71
Figura 13: Perfil de adesão dos isolados de <i>E.coli</i> do paciente (HIV INT 0063)	71
Figura 14. Perfil de adesão dos isolados de <i>E.coli</i> do paciente (HIV INT 0064)	71
Figura 15. Perfil de adesão dos isolados de <i>E.coli</i> do paciente (HIV INT 00100)	72
Figura 16. Perfil de adesão do isolado de <i>E.coli</i> do paciente (HIV INT 0002).	73
Figura 17. Perfil de adesão do isolado de <i>E.coli</i> do paciente (HIV INT 0006)	73
Figura 18. Perfil de adesão do isolado de <i>E.coli</i> do paciente (HIV INT 0009)	74
Figura 19. Perfil de adesão dos isolados de <i>E.coli</i> do paciente (HIV INT 0044).	74
Figura 20. Perfil de adesão dos isolados de <i>E.coli</i> do paciente (HIV INT 0046).	74
Figura 21. Perfil de adesão dos isolados de <i>E.coli</i> do paciente (HIV INT 0063).	75
Figura 22. Perfil de adesão do isolado de <i>E.coli</i> do paciente (HIV INT 0064).	75
Figura 23. Perfil de adesão do isolado de <i>E.coli</i> do paciente (HIV INT 00100)	75
Figura 24. Perfil de adesão dos paciente com presença de isolados de <i>Klebsiella</i> spp. 0009).....	76
Figura 25. Perfil de adesão dos paciente com presença de isolados de <i>Klebsiella</i> spp. 0020).....	77
Figura 26. Perfil de adesão dos pacientes com presença de isolados de <i>Klebsiella</i> spp. 0028).....	77
Figura 27. Perfil de adesão dos pacientes com presença de isolados de <i>Klebsiella</i> spp. 0060).....	77
Figura 28. Perfil de adesão dos paciente com presença de isolados de <i>Klebsiella</i> spp. 0009).....	78
Figura 29. Perfil de adesão dos paciente com presença de isolados de <i>Klebsiella</i> spp. 0020).....	78
Figura 30. Perfil de adesão dos pacientes com presença de isolados de <i>Klebsiella</i> spp. 0028).....	78
Figura 31. Perfil de adesão dos pacientes com presença de isolados de <i>Klebsiella</i> spp. 0060).....	79

Figura 32. Amplificação de 1487pb correspondentes ao gene uidA.....	80
Figura 33. Amplificação de 997 pb correspondentes ao gene Kvar.....	83
Figura 34. Amplificação de 1000 pb correspondentes ao gene blaKPC.....	83
Figura 35. Amplificação de 593 pb correspondentes ao gene blaCTX-M.....	84
Figura 36. Figura representativa do teste de invasão dos isolados submetidos	86

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Gráfico comparativo entre escolaridade e renda média	61
Gráfico 2. Gráfico comparativo ao que se refere a moradia e instalação sanitária	62
Gráfico 3. Gráfico comparativo entre o tipo de abastecimento de água e consumo	63
Gráfico 4. Porcentagem de sinais e sintomas	63
Gráfico 5. Frequência de enterobactérias.	64
Gráfico 6. Capacidade de formação de biofilme de <i>Klebsiella</i> spp.....	67
Gráfico 7. Capacidade de formaçã de <i>Pseudomonas</i> spp.....	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Oligonucleotídeos utilizados na PCR para <i>E.coli</i>	51
Tabela 2. Oligonucleotídeos utilizados na PCR para <i>Klebsiella</i>	52
Tabela 3. Características da população de estudo.	60
Tabela 4. Dados quanto a TARV, contagem de carga viral e células TCD4+	60
Tabela 5. Frequência de enterobactérias por grupo experimental.	64
Tabela 6. Resultado dos testes de resistência microbiana	66
Tabela 7. Perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos.....	66
Tabela 8. Fenótipo de adesão dos isolados	68
Tabela 9. Fenótipo de adesão de 6horas, dos isolados de <i>E.coli</i>	72
Tabela 10. Fenótipo de adesão dos isolados de <i>Klebsiella</i> spp.	76
Tabela 11. Fenótipo de invasão dos isolados	86
Tabela 12. Níveis plasmáticos de sCD14.	87
Tabela 13. Níveis de sCD14	87
Tabela 14. Níveis plasmáticos de IL-17	88

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Esquema dos grupos da população de estudo.	49
Quadro 2. Quadro comparativo dos genes de virulência dos isolados de <i>E.coli</i> e seus fenótipos de adesão de 3 horas.	81
Quadro 3. Quadro comparativo dos genes de virulência dos isolados de <i>E.coli</i> e seus fenótipos de adesão de 6 horas.	82
Quadro 4. Quadro comparativo entre os genes de resistência medicamentosa e a susceptibilidade antimicrobiana para os isolados de <i>Klebsiella</i> spp.	85

LISTA DE ABREVIATURAS

μL:	Microlitros
AA:	Adesão agregativa
AD:	Adesão difusa
aEPEC:	<i>E.coli</i> enteropatogênica atípica
AIDS:	Síndrome da imunodeficiência adquirida
AKN:	Amicacina
AL:	Adesão localizada
ALL:	Adesão AI-like
AMC:	Amoxicilina+ ácido clavulânico
AMP:	Ampicilina
APC:	Células apresentadoras de antígenos
ATM:	Aztreonam
CAZ:	Ceftazidima
CBA:	Cytometric Bead Array
CFO:	Cefoxitina
CFZ:	Cefazolina
CHL:	Clorafenicol
CIP:	Ciprofloxacina
CPM:	Cefepime
CRO:	Ceftriaxoma
CRX:	Cefuroxima
CV:	Carga Viral
DAEC:	<i>E.coli</i> de adesão difusa
DC:	Células dendríticas
DO:	Densidade ótica
DP:	Desvio Padrão
<i>E.coli:</i>	<i>Escherichia coli</i>
eDNA:	DNA extracelular
ESBL	β-lactamase de espectro estendido
EHEC:	<i>E.coli</i> enterohemorrágica
EIEC:	<i>E.coli</i> enterotoxigênica

ELISA:	<i>Ezyme Linked Immunosorbent Assay</i>
EPEC:	<i>E.coli</i> enteropatogênica
EPS:	Substâncias poliméricas extracelulares
ETEC:	<i>E.coli</i> enterotoxigênica
FMT-HVD:	Fundação de Medicina Tropical Heitor Vieira Dourado
GALT:	Tecido linfoide associado ao trato gastrointestinal
gp120:	Glicoproteína 120
gp41:	Glicoproteína 41
HIV:	Vírus da imunodeficiência humana
HLG:	Gentamicina
HSH:	Homens que fazem sexo com outros homens
IDO:	indoleamino-2,3-dioxigenase
IFN-γ:	Interferon gama
IgA;	Imunoglobulina A
IL:	Interleucina
IST:	Infecções sexualmente transmissíveis
LPS:	Lipopolissacarídeos
MEM:	Eagle modificado com sais de Eagle
MEM:	Meropenem
MFI:	Intensidade média de imunofluorescência
NIT:	Nitrofurantoína
NK;	Células “ <i>natural killer</i> ”
NXN:	Norfloxacina
O₂:	Oxigênio
OFX:	Ofloxacina
OMS:	Organização mundial da Saúde
PCR:	Reação em cadeia polimerase
POL:	Polimixina B
POP:	Protocolo operacional padrão
PPT:	Piperaciclina+tazobactam
QS:	Sistemas de detecção de quórum
SAM:	Ampicilina + sulbactam
sCD14:	CD14 solúvel

SXT:	Sulfametoxazol+ trimetropim.
TARV:	Terapia Antiretroviral
TCD4+:	Linfócitos T CD4+
TCD8+:	Linfócitos TCD8+
tEPEC:	<i>E.coli</i> enteropatogênica típica
TET:	Tetraciclina.
TGI:	Trato gastrointestinal
TLR-4:	Receptor do tipo “ <i>toll-like</i> ”
TM:	Translocação microbiana
TNF-α:	Fator de necrose tumoral alpha
TOB:	Tobramicina
TOB:	Tobramicina

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
2. REFERENCIAL TEÓRICO	20
2.1. VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA- HIV	20
2.2. EPIDEMIOLOGIA DO HIV E AIDS	21
2.3. PATOGÊNESE DA INFECÇÃO DO HIV	22
2.4. HOMEOSTASE DO TRATO GATROINTESTINAL	24
2.5. TRANSLOCAÇÃO MICROBIANA NA INFECÇÃO PELO HIV	25
2.6. DISBIOSE MICROBIANA NO HIV	28
2.7. DIARREIA E A INFECÇÃO PELO HIV	31
2.8. BACTÉRIAS GRAM-NEGATIVAS E A INFECÇÃO PELO HIV	32
2.8.1. Família <i>Enterobacteriaceae</i> na infecção causada pelo HIV	32
2.8.1.1. <i>Escherichia coli</i> (<i>E.coli</i>).....	33
2.8.1.1.2. <i>E.coli</i> e HIV	35
2.8.2.1. <i>Shigella</i> spp.	35
2.8.2.1.1. <i>Shigella</i> spp. e HIV	37
2.8.1.1.1. <i>Salmonella</i> spp. e HIV	39
2.8.4.1. <i>Klebsiella</i> spp.	40
2.8.4.1.1. <i>Klebsiella</i> spp. e HIV	41
2.8.3.1. <i>Pseudomonas</i> spp. e HIV	43
2.9. BACTÉRIAS FORMADORAS DE BIOFILME	43
2.10. RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA.....	45
3. JUSTIFICATIVA	46
4. OBJETIVO GERAL	47
4.1. Objetivos específicos:	47
5. MATERIAL E MÉTODOS	48
5.1. TIPO DE ESTUDO E LOCAL DE ESTUDO	48
5.2. ASPECTOS ÉTICOS	48
5.2. MÉTODOS COLETA E TIPOS DE AMOSTRAS	48
5.3.1. Amostra de fezes	48
5.3.2. Amostra de sangue.....	48
5.3. POPULAÇÃO DE ESTUDO	49
5.4.1. Critério de inclusão	49
5.4.2. Critérios de exclusão	49

5.4.	COLETA DE DADOS	49
5.5.	IDENTIFICAÇÃO BACTERIANA (TESTE BIOQUÍMICO)	50
5.6.	CARACTERIZAÇÃO DA VIRULÊNCIA POR REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR).....	51
5.7.1.	Extração de DNA	51
5.7.2.	Reação de PCR.....	51
5.8.	TESTES EM CULTURA DE CELULAR	53
2.8.1.	Teste de adesão.....	53
2.8.1.1.	Cultivo das células HEp-2	53
5.8.1.2.	Preparo das amostras bacterianas	54
5.8.1.3.	Realização do teste de adesão em células HEp-2.....	54
5.8.2.	TESTE DE INVASÃO.....	55
5.8.2.1.	Preparo das amostras bacterianas	55
5.8.2.2.	Teste de invasão qualitativo	55
5.9.	TESTES DE SUSCEPTIBILIDADE ANTIMICROBIANA.....	56
5.10.	TESTE DE FORMAÇÃO DE BIOFILME	57
5.11.	DOSAGEM DE CD14 SOLÚVEL (sCD14).....	58
5.12.	DOSAGEM DE CITOCINAS SÉRICAS.....	58
6.	RESULTADOS	60
6.1.	CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO DE ESTUDO, DADOS SOCIOECONÔMICOS.....	60
6.2.	SINAIS E SINTOMAS	63
6.3.	GÊNEROS BACTERIANOS ENCONTRADOS NO ESTUDO	63
6.4.	FREQUÊNCIA DE ENTEROBACTÉRIAS POTENCIALMENTE PATOGÊNICAS E RESISTENTES	64
6.5.	TESTE DE RESISTÊNCIA BACTERIANA (ANTIBIOGRAMA)	65
6.5.1.	Resistência Bacteriana Específica.....	65
6.6.	ENSAIO DE PRODUÇÃO DE BIOFILME	67
6.7.	ENSAIO DE ADESÃO.....	68
6.7.1.	Ensaio de adesão 3H dos isolados de <i>E.coli</i> identificados no estudo.....	69
6.7.2.	Ensaio de adesão 6H com os isolados de <i>E.coli</i> encontrados no estudo.	73
6.7.3.	Ensaio de adesão 3H dos isolados de <i>Klebsiella</i> spp. identificados no estudo. ...	76
6.7.4.	Ensaio de adesão de 6H dos isolados de <i>Klebsiella</i> spp. identificados no estudo.	78
6.8.	REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)	79
6.9.	ENSAIO DE INVASÃO	86

6.8.1. Ensaio de invasão com os isolados identificados no estudo.....	86
6.10. DOSAGEM DE MARCADORES PLASMÁTICOS (sCD14 E CITOCINAS PLASMÁTICAS).....	87
7. DISCUSSÃO	89
População do estudo e dados sócio-epidemiológicos.....	89
8. LIMITAÇÕES DO ESTUDO.....	99
9. CONCLUSÃO	100
REFERÊNCIAS	101
ANEXO	119

1. INTRODUÇÃO

A doença diarreica, quando se apresenta como sintoma recorrente, pode ser identificada como a segunda principal causa de progressão de doença e consequente óbito entre indivíduos infectados pelo HIV, e por vezes a etiologia relacionada pode não ser identificada. Porém, em sua grande maioria, os patógenos diagnosticados, são de origem entérica. Os danos de mucosa que ocorrem durante o episódio diarreico, além dos danos promovidos pela exposição do HIV nos epitélios da mucosa intestinal, levam a uma diminuição da capacidade de absorção de nutrientes e atrasos cognitivos, como maior risco de desnutrição severa e aumento na morbidade e mortalidade nesses indivíduos (CLAY et al., 2014; PAVLINAC et al., 2014).

As comunidades bacterianas encontradas no intestino de indivíduos infectados pelo HIV diferem daquelas encontradas em indivíduos não infectados, pois em indivíduos soronegativos bactérias intestinais comensais e probióticos ajudam a controlar a colonização de agentes patogênicos, promovendo a homeostase e o desenvolvimento do sistema imunológico. Durante o decorrer da infecção pelo HIV, diversos agentes bacterianos podem provocar a diminuição desse equilíbrio, podendo estar associados à inúmeras patologias como: distúrbios metabólicos, desnutrição crônica, aterosclerose, susceptibilidade a infecções oportunistas e, principalmente, o desenvolvimento de uma inflamação sistêmica crônica (LOZUPONE et al., 2013; PINTO-CARDOSO et al., 2017).

Já na infecção primária do HIV, os efeitos diretos na mucosa, incluem a perda de respostas imunorreguladoras normais, a depleção de células TCD4+ e a destruição das barreiras de mucosa permitindo a translocação de produtos microbianos intestinais, como o lipopolissacarídeo (LPS) para circulação sistêmica. O que culmina em consequente ativação imune crônica e exacerbação do estado inflamatório nesses indivíduos (TENÓRIO et al., 2015).

Os elevados níveis de LPS no plasma aumentam a atividade inflamatória, contribuindo para a presença de marcadores inflamatórios abundantes na circulação sistêmica de indivíduos infectados pelo vírus. Dentre estes, o CD14 solúvel (sCD14) destaca-se devido à sua capacidade de ligar-se ao LPS exposto na circulação sistêmica, e induzir a ativação sistêmica que persiste durante toda a fase da doença, caracterizando-se como um potencial indutor da

progressão precoce para síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) (NWOSU et al., 2014).

A evidência do aumento da ativação imunológica sistêmica devido à translocação microbiana em indivíduos infectados pelo HIV está associada à persistência da replicação do vírus, o que pode contribuir para patogênese e progressão precoce da infecção para a AIDS (SINHA et al., 2014; PIERRE et al., 2015).

Se juntarmos a isso um quadro de coinfeção por patógenos microbianos associados ou não ao HIV, e se estes patógenos ainda estiverem estimulando respostas inflamatórias, podemos concluir que a exacerbação de produtos inflamatórios, bem como daqueles que exercem papel regulador, podem inexoravelmente contribuir para o agravamento da saúde geral destes pacientes. Aliado a este quadro, também temos que levar em consideração o perfil destes possíveis patobiontes em relação à sua resistência microbiana, e perfil de interação celular com o hospedeiro.

Portanto, é coerente que a identificação de possíveis patógenos presentes na flora destes pacientes seja de extrema necessidade, visto que, além de demonstrar a perda da homeostase local, também podem estar atuando como contribuidores *sine qua non* para o agravamento da infecção primária pelo HIV, com provável desfecho clínico desfavorável ao paciente. Neste estudo foram priorizados os principais patógenos bacterianos comumente relacionados à doença diarreica ou relacionado à infecção hospitalar. Afinal, tratam-se de organismos que representam risco elevado à pacientes soropositivos, dificultando inclusive a manutenção do tratamento antirretroviral, pois a sintomatologia associada a estas doenças pode ser facilmente confundida com efeitos colaterais da medicação utilizada.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA- HIV

O Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) pertence à família Retroviridae, subfamília Lentivirinae, e gênero Lentivírus (SUNDQUIST et al., 2012). A partícula viral é esférica, composta por um nucleopsideo viral, contendo duas fitas simples de RNA, e três enzimas essenciais denominadas: protease, integrase e transcriptase reversa. O envelope viral apresenta uma bicamada lipídica, proveniente do próprio hospedeiro, contendo 72 glicoproteínas. Dentre estas, destacam-se a gp120, que auxilia na ligação do vírus na célula hospedeira que apresentam receptores CD4, e a gp41, responsável por ligar a gp120 na célula-alvo (Figura 1) (ORENSTEIN et al., 2002; SIERRA et al., 2005; CARLSON et al., 2008).

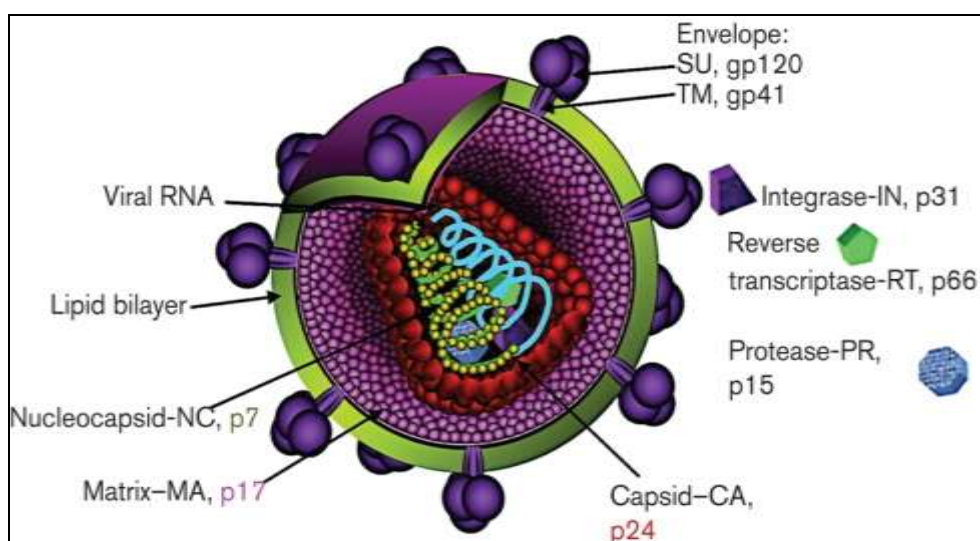


Figura 1. Desenho esquemático da estrutura do HIV (Fonte: STECKBECK et al., 2013).

O genoma do HIV assemelha-se aos demais retrovírus, possuindo cerca de 9200 nucleotídeos, e três genes indispensáveis para sobrevivência viral – *gag*, *pol* e *env* -, responsáveis por codificar componentes estruturais e funcionais do HIV, incluindo proteínas do envelope e a enzima transcriptase reversa. Os componentes estruturais codificados pelo *env* incluem a glicoproteína do envelope externo gp120 e a transmembrana gp41; o *gag* codifica proteínas do nucleocapsídeo e da matriz como a p17; o gene *pol* codifica proteínas como a transcriptase reversa, protease e integrase. O vírus também apresenta genes não-estruturais, tais como *tat*, *rev*, *nef*, *vif*, *vpr*, e *vpu*, que auxiliam o vírus nas funções biológicas como o ciclo replicativo e sobrevivência no hospedeiro (SIERRA et al., 2005; LEVY, 2009; SUNDQUIST et al., 2012).

São descritos dois sorotipos de HIV, o HIV-1 e HIV-2, que se diferenciam por parâmetros de dispersão, patogenicidade, transmissibilidade e evolução clínica. O sorotipo HIV-1 é distribuído

amplamente no mundo, sendo responsável pela grande pandemia atual, enquanto o HIV-2 é mais endêmico na África Ocidental, sendo considerado menos virulento e transmissível do que o HIV-1, estando associado a um longo período de latência, levando ao desenvolvimento tardio da doença (ROSA et al., 2016).

2.2. EPIDEMIOLOGIA DO HIV E AIDS

Desde sua descoberta em 1980, a epidemia causada pelo HIV tem se tornado um grave problema de saúde pública, com taxas elevadas de novas infecções (BEYRER et al., 2013). Mundialmente, no ano de 2017, foram registradas um total de 36,9 milhões de pessoas vivendo com HIV, 1,8 milhões de novas infecções pelo vírus, e 940.000 [670.000–1,3 milhão] óbitos em consequência da AIDS, desde o ano de 2004 os casos de mortes pela doença caíram mais de 51% no mundo (UNIAIDS, 2018).

Estima-se que no mundo, aproximadamente 7.000 pessoas são infectadas diariamente pelo HIV, colocando a AIDS como a 5º causa de morte entre adultos e a principal causa entre mulheres com faixa etária entre 15 a 24 anos. A África subsaariana é a região mais afetada pelo vírus, onde de três a cada quatro novas infecções estão entre meninas com faixa etária entre 15 a 19 anos, correspondendo a 60% dos casos de infecções por HIV no mundo, totalizando cerca de 58% do total (Figura 2) (MEIRELES et al., 2016; UNIADS 2018).

A epidemia de HIV/AIDS é concentrada em alguns segmentos populacionais, e por isso a Organização Mundial de Saúde (OMS) (2016) passou a classificar como populações-chaves aquelas que apresentam comportamento de alto risco e vulnerabilidade social, com maior probabilidade de contrair o HIV e outras infecções sexualmente transmissíveis (IST). Essas populações são: homossexuais masculinos e homens que fazem sexo com homens (HSH); pessoas trans.; pessoas adictas; e trabalhadores (as) sexuais. Visto isso, o risco de infecção pelo HIV é 27 vezes maior entre HSH, 23 vezes entre pessoas que usam drogas injetáveis, 13 vezes maior entre profissionais do sexo, e 12 vezes maior entre mulheres trans (UNIADS, 2018).

No Brasil, a infecção pelo HIV e sua evolução para AIDS apresentam taxas elevadas de detecção. A distribuição dos casos de AIDS no ano de 2017 demonstra elevada concentração nas regiões Sul com 40.275 (20,7%) e Sudeste com 30.297 (15,6%), em comparação com as demais regiões, Nordeste 14.275 (7,4%) na região Norte e 12.931 (6,7%). De 2014 à 2017 tem sido registrado anualmente, uma média de 40 mil casos de AIDS no território brasileiro, sendo que 4,2 mil destes casos notificados pela região Norte do país (ABREU et al., 2016; SILVA et al., 2016; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

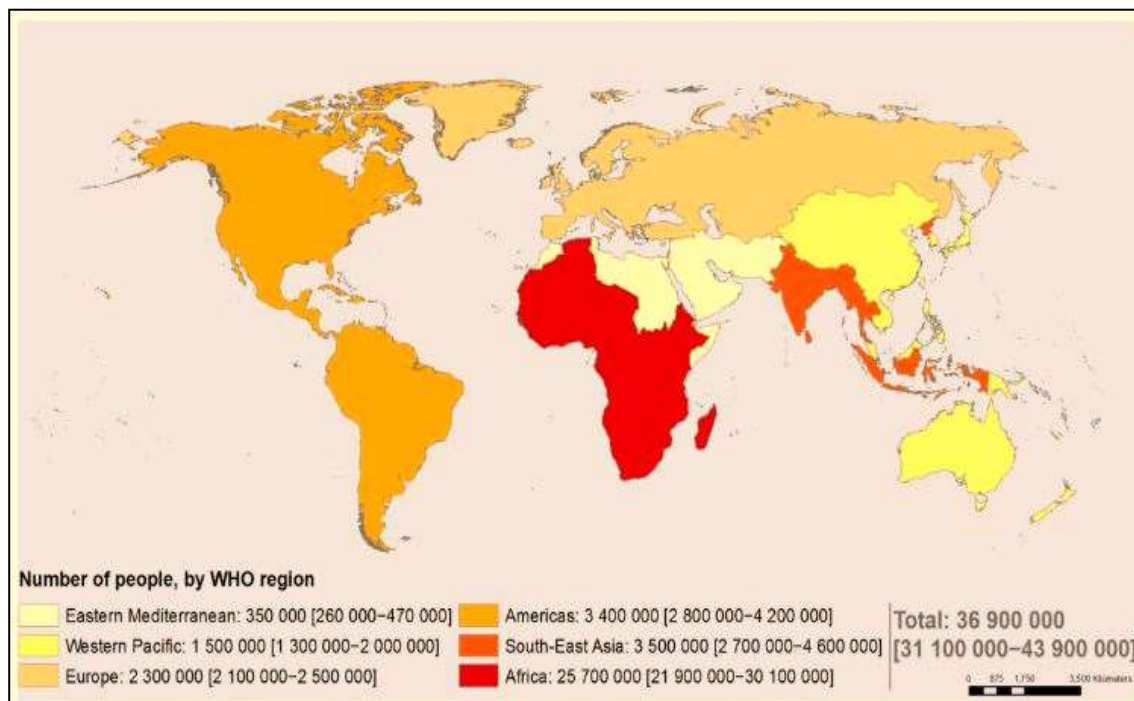


Figura 2: Número estimado de pessoas vivendo com HIV em 2017 por região global (Fonte: WHO, 2018).

A região Norte do Brasil apresenta tendência crescente nas taxas de AIDS, esse crescimento ocorre principalmente em municípios com mais de 500.000 habitantes (ABATI et al., 2015). No Amazonas, são retratadas as maiores notificações dos casos de AIDS da região Norte, com taxas elevadas na capital Manaus, correspondendo a 90% dos casos da doença no estado. No ano de 2012, Manaus concentrou 53,85% dos casos de AIDS, estando caracterizada como a segunda capital com casos de AIDS no Brasil (SILVA et al., 2009; SECRETARIA MUNICIPAL DE SAÚDE DE MANAUS, 2017). Em Manaus, no ano de 2015, foram registradas 947 novas infecções por HIV, 536 casos de AIDS e 223 óbitos decorrentes de complicações da doença (MINISTERIO DA SAÚDE, 2015; OLIVEIRA et al., 2014).

2.3. PATOGÊNESE DA INFECÇÃO DO HIV

A infecção causada pelo HIV inicia-se com o vírus infectando uma célula alvo do hospedeiro, principalmente os linfócitos T CD4+ residentes do tecido linfóide associado ao trato gastrointestinal (GALT). Durante o curso da infecção, o vírus apresenta tropismo principalmente por essas células mesmo que a maioria não esteja ativada, o que auxilia na infecção provocada pelo HIV (SWANSTROM et al., 2011). A infecção persistente pelo HIV, está relacionada com rápido declínio nas contagens de células T CD4+, o que caracteriza a fase aguda da infecção. Durante essa etapa, embora o indivíduo pareça saudável, o vírus continua a se replicar ativamente nos linfonodos e na corrente sanguínea, e como consequência, o sistema imunológico permanece danificado devido ao aumento da carga viral (NAIF, 2013).

A fase aguda da infecção é caracterizada pelos altos níveis de replicação viral, levando ao aumento da viremia. Esta fase quase sempre é acompanhada de sintomas não característicos da infecção, como sintomas gripais, que incluem febre e aumento dos glândlios linfáticos. Como resultado do pico de viremia, a resposta imunológica surge a partir da presença de células TCD8+ contra os antígenos virais. Durante esse período, o número de células T CD4+ aumenta como consequência do controle parcial da infecção viral, caracterizando o final da fase aguda, no qual ocorre o aumento na ativação do sistema imunológico diminuindo significativamente os níveis de viremia, e início da fase crônica da doença (COFFIN et al., 2013).

A fase crônica da doença, é caracterizada pelo período de “latência clínica” na qual a viremia é parcialmente controlada. Nesta fase, os indivíduos infectados são assintomáticos. Apesar da latência, o vírus continua a se replicar lentamente, o que leva a depleção de um grande número de células T CD4+ diariamente. Este ciclo de multiplicação viral e redução de células TCD4+ compromete a eficiência da resposta imune e consequentemente favorece o surgimento de infecções oportunistas. A ausência de mecanismos que controlem a replicação viral pelo hospedeiro leva, novamente, ao aumento da viremia e a progressão clínica da infecção por HIV, denominada Síndrome da Imunodeficiência Humana (AIDS) (LACKNER et al., 2012; COFFIN et al., 2013) (Figura 3).

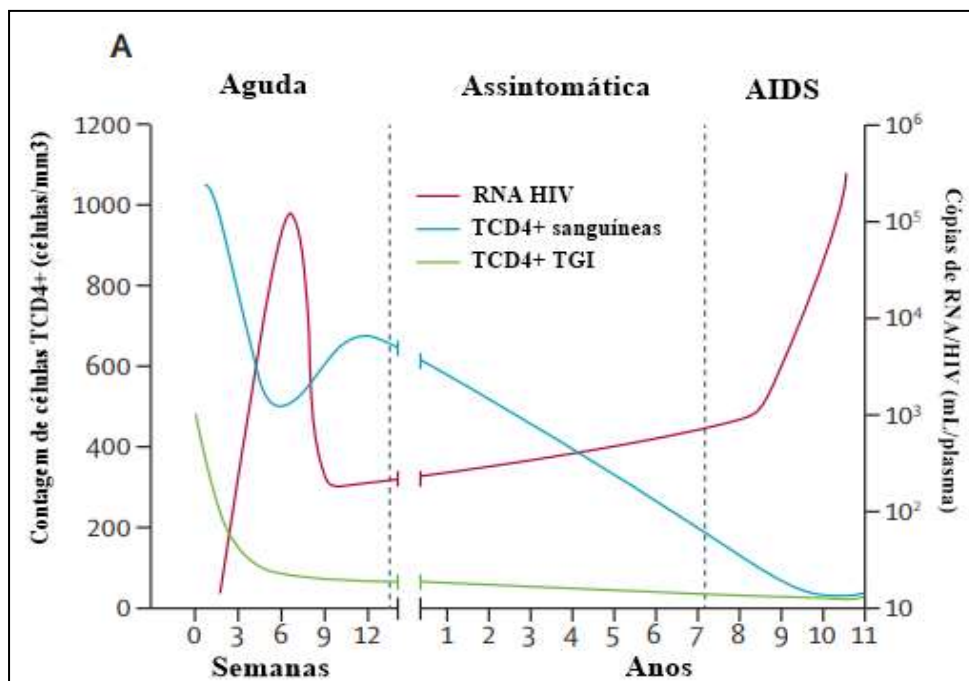


Figura 3: Patogênese da infecção do HIV para AIDS (PETERSEN & ROUND et al., 2014).

Ao longo da patogênese da doença, o trato gastrointestinal sofre uma grande ruptura imunológica e estrutural, no qual incluem a depleção de células TCD4+ e danos epiteliais, como a apoptose de enterócitos e ruptura da elasticidade da barreira epitelial. Essas alterações

favorecem a passagem de produtos microbianos intestinais para circulação sistêmica, indivíduos infectados pelo HIV em estágios avançados da doença exibem níveis elevados de LPS circulantes, levando a uma ativação imunológica sistêmica e influenciando na hiperativação de células TCD4+, o que propicia o aumento da replicação viral e rápida progressão da infecção do HIV para AIDS (MARCHETTI et al., 2013).

2.4. HOMEOSTASE DO TRATO GATROINTESTINAL

O trato gastrointestinal (TGI) naturalmente é colonizado por inúmeros microrganismos no qual incluem vírus, fungos e principalmente bactérias. A interação patógeno/hospedeiro é de extrema importância para a manutenção e homeostase intestinal. A composição bacteriana da biota fecal indica que a microbiota intestinal é vastamente diversificada e pode variar de acordo aos fatores genéticos e ambientais do próprio hospedeiro (MUDD & BRENCHLEY, 2016).

As bactérias comensais do intestino são separadas da circulação sistêmica por uma camada extensa de células epiteliais de subtipo microfoldes (Células M), que formam uma barreira física e química, em grande parte pelas proteínas E-caderinas e claudinas, responsáveis por reforçar a integridade da barreira formando “junções apertadas” entre as células M. Essas células, apresentam papel fundamental na interação microbiota-hospedeiro, pois são responsáveis por secretar peptídeos antimicrobianos, como as defensinas e lisozimas, além de também administrar partículas estranhas até as células apresentadoras de antígenos (APC's), como macrófagos, induzido assim uma resposta para a microbiota intestinal (TURNER et al., 2009; MOWAT & AGACE, 2014; SOMMER & BACKHED, 2014).

Em adição, a integridade da barreira intestinal é mantida por subgrupos de linfócitos como as células T CD4+ que residem em sua grande maioria no GI, além de grandes quantidades de células Th17, que possuem papel importante contra infecções causadas por microrganismos extracelulares, essas células produzem citocinas IL-17, IL-22 e IL-26 que são potentes indutoras de inflamação, capazes de estimular a infiltração celular e a produção de outras citocinas pró-inflamatórias, além de ativar mecanismos de apoptose em células potencialmente infectadas (CHEN & O'SHEA, 2008; SMITH et al., 2012). Outra subpopulação de linfócitos TCD4+ são as células T reguladoras (Treg), secretoras de IL-10 e TGF- β que estão envolvidas na supressão da resposta imune, afim de evitar danos teciduais irreversíveis gerados por respostas imunes exacerbadas (GOSSELIN et al., 2010).

Outra estratégia da imunidade de mucosa são as células do sistema imune inato, no qual incluem as células assassinas naturais (NK), que são caracterizadas pela produção de citocinas do tipo Th1, interferão- γ (IFN γ) e fator de necrose tumoral (TNF) em resposta à IL-12 ou IL-15. Essas células possuem capacidade de eliminar células infectadas através dos seus efeitos citotóxicos (PETERSON & ARTIS, 2014). Outro tipo são as respostas robustas de células B através da expressão da imunoglobulina A (IgA), que são componentes essenciais na proteção do hospedeiro, pois se ligam diretamente as bactérias impedindo que esses micróbios se liguem ao epitélio. Esses conjuntos celulares estão associados à manutenção da barreira do trato gastrointestinal (AUJLA et al., 2009; KLATT et al., 2012; REEVES et al., 2014).

Em indivíduos saudáveis, as bactérias gram-negativas constituem grande maioria da microbiota fecal, e em menor abundância Proteobacteria, Tenericutes e Fusobacteria, já em indivíduos infectados pelo HIV constata-se que a microbiota é fortemente enriquecida por bactérias gram-negativas como as Bacteróides e Proteobactérias ambas associadas a inflamação exarcebada podendo causar enterite, diarreia e até mesmo a formação de abscessos (VUJKOVIC-CVIJIN et al., 2013; DILLON et al., 2014; MUTLU et al., 2014).

2.5. TRANSLOCAÇÃO MICROBIANA NA INFECÇÃO PELO HIV

A translocação microbiana (TM) é definida como a passagem não fisiológica da microflora gastrointestinal através da barreira epitelial intestinal, possivelmente, para nódulos mesentéricos linfáticos, e assim, para locais extra nodais. Em um organismo normal, a TM ou até mesmo produtos da mesma origem, é fagocitado dentro da lâmina própria e dos linfonodos mesentéricos, porém, quando o sistema imunológico da mucosa é comprometido, tais mecanismos de defesas tornam-se defasados, permitindo então a saída e sobrevivência das bactérias em locais extraintestinais (MARCHETTI et al., 2013).

A hipótese de que a TM é um mecanismo chave na disfunção imunológica de mucosa e na ativação sistêmica crônica, mostra tal mecanismo como um fator importante na progressão da doença causada pela infecção do HIV (BRENCHLEY et al., 2011). Embora a expectativa de vida de indivíduos infectados pelo HIV tenha aumentado consideravelmente desde o surgimento da terapia anti-retroviral combinada (TARV), ainda não corresponde aos indivíduos não infectados pelo vírus. Outras doenças não transmissíveis e não relacionadas à AIDS, como doença cardiovascular, distúrbios neurocognitivos e metabólicos, permanecem sendo uma séria preocupação na infecção pelo HIV tratada essas doenças têm sido

relacionadas a diferenças no microbioma intestinal, sugerindo que a TM possa ter um papel importante nas complicações não relacionadas à AIDS que ocorrem em incidência aumentada nos indivíduos infectados pelo HIV em TARV (KLATT et al., 2013; LEDERMAN et al., 2013; PINTO-CARDOSO et al., 2017).

Os tecidos linfoides associados à mucosa, como o tecido linfóide associado ao intestino (GALT), abrigam aproximadamente de 40% a 60% dos linfócitos no corpo humano, sendo o maior sítio de reservatório e replicação do HIV (XIUQIONG et al., 2016). Na fase inicial da infecção aguda causada pelo HIV, e durante todo o curso da doença para fase crônica, o trato gastrointestinal sofre ruptura de caráter imunológico e estrutural, no qual leva à depleção de células TCD4+, e à perda considerável da subpopulação de células Th17, responsáveis pela expressão de IL- 22. Outras células locais, como células inatas e células NK, que produzem IL- 17 e IL- 22, também estão diminuídas, após a infecção pelo HIV. Além disso, ocorre a diminuição do IgA, assim levando a baixa no controle de produtos microbianos (KLATT et al., 2012).

Os danos epiteliais a perda de citocinas homeostáticas como IL-17 e IL-22 e a replicação viral exagerada, resultam na ativação inflamatória exacerbada e contínua promovida em resposta da grande produção de citocinas inflamatórias que induzem a apoptose das células M, assim causando a quebra da barreira epitelial, facilitando assim o processo da TM (Figura 4) (KLATT et al., 2012; REEVES et al., 2014).

As alterações causadas pela TM parecem resultar em inúmeras e complexas interações vírus- hospedeiro, levando a uma intensa ativação crônica do sistema imunológico e uma consequente interrupção da homeostase das células T circulantes, esgotamento da função fagocitária de macrófagos intestinais e danos epiteliais, essas alterações resultam no aumento da passagem da microbiota intestinal e produtos microbianos, como o lipopolissacarídeos (LPS) e diversas substâncias inflamatórias, como CD14 solúveis (sCD14) no plasma de pacientes com HIV e podem estar associadas à progressão da doença (MARCHETTI et al., 2013; ROBAKIS et al., 2016; TENORIO et al., 2015).

Os altos níveis de LPS presentes no plasma de indivíduos infectados pelo HIV estão associados a níveis elevados de marcadores de inflamação, e diversas substâncias inflamatórias como CD14 solúveis (sCD14) no plasma de pacientes com HIV (TENORIO et al., 2015; WILLIAMS et al., 2016). Essas substâncias refletem na ativação de monócitos induzidos por LPS, correlacionando-se com vários marcadores de ativação imunológica,

como interferons do tipo 1 e células TCD8+ ativadas. A translocação microbiana também foi associada à fribrose do tecido linfóide, sendo assim, prejudicial para a recuperação de células T CD4+ em indivíduos infectados pelo vírus, mesmo em TARV (SANDLER & DOUEK, 2012).

Translocação microbiana no HIV

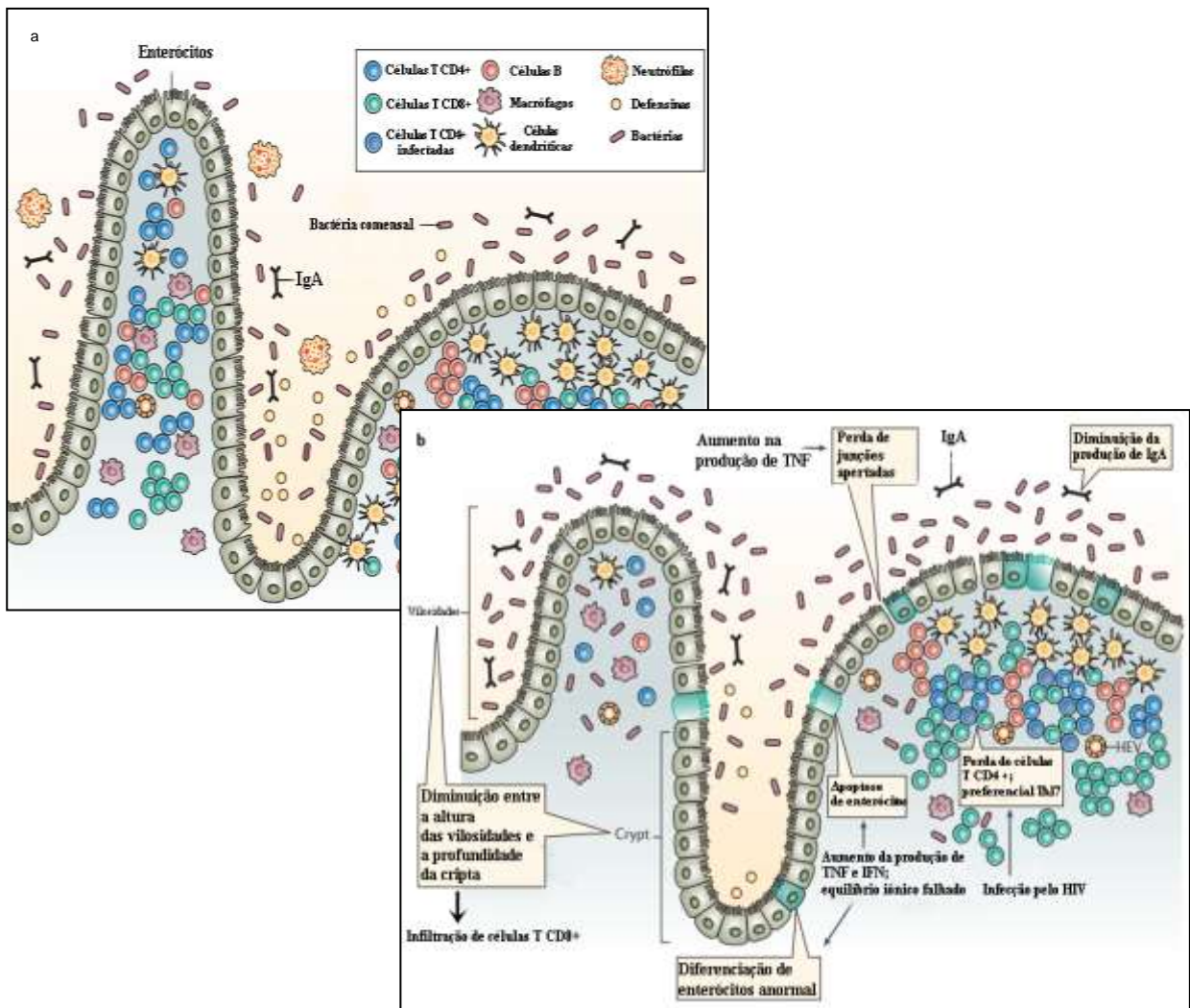


Figura 4. Representação esquemática da translocação microbiana durante a infecção pelo HIV. **a)** Epitélio intestinal normal. Sem danos, com a barreira epitelial intacta, impedindo a translocação das bactérias comensais do lúmen intestinal. **b)** Epitélio intestinal com a presença do HIV. Redução dos genes de junção, aumento da permeabilidade intestinal, disfunção nas células B, diminuição da secreção de IgA. Perda das células Th17, consequente aumento do crescimento excessivo bacteriano, aumento da translocação microbiana (Adaptado de Sandler et al., 2012).

O sCD14 é um biomarcador de ativação de monócitos e macrófagos, que atua como importante preditor de translocação microbiana. Este marcador plasmático permite a medição em larga escala dos danos no trato GI bem como a TM. Em nível celular, o LPS exposto no plasma, liga-se a proteína de ligação de lipídios (LBP), e através da ligação adicional com o MD-2 o LPS se liga ao receptor primário sCD14. O complexo formado, interage com o receptor Toll-like 4 (TLR-4), e inicia assim a cascata de sinais necessários para ativação das imunidades inatas e adquiridas, em resposta ao LPS. Em indivíduos infectados pelo HIV, mesmo tratados com TAR, o aumento de sCD14 plasmático pode estar relacionado ao aumento do risco de morte, além de também estar associado à redução dos níveis de células T CD4+ (MARCHETTI et al., 2013; PERKINS et al., 2015).

O aumento sistêmico desses marcadores em indivíduos com HIV, tende a diminuir com o uso da TAR, porém a ativação persistente do sistema imunológico causado pela translocação microbiana leva à incapacidade do hospedeiro em regular adequadamente o microbioma, por sua vez, pode resultar na disbiose intestinal, aumentando assim o ciclo de inflamação no indivíduo infectado pelo vírus (SANDLER et al., 2011; ZEVIN et al., 2016).

2.6. DISBIOSE MICROBIANA NO HIV

A disbiose é definida como a composição alterada da microbiota intestinal, podendo estar associada a alterações funcionais no transcriptoma, proteoma ou metaboloma microbiano (ZENG et al., 2017). Este evento é resultado de alterações bacterianas, causadas por mudanças na dieta, inflamação, imunodeficiência, infecção, exposição a antibióticos ou toxinas. Essas desordens na microbiota podem promover “crescimento” de bactérias nocivas que contribuem para a patogênese de diversas doenças (Figura 05) (KAMADA et al., 2013).

Torna-se extremamente evidente que as bactérias comensais do trato GI e seus metabolitos são necessários para manter a homeostase do sistema imunológico. A perturbação dessas comunidades microbianas pode ter impactos irreversíveis para a saúde do hospedeiro, e estão associadas a muitos estados da doença (THAISS et al., 2014; DILLON et al., 2014; LI et al., 2016).

A AIDS surgiu como uma doença inflamatória crônica, responsável pela disfunção imunológica que leva a uma inflamação exacerbada, contribuindo para a rápida progressão clínica da doença. A infecção causada pelo HIV ativa a imunidade de mucosa e sistêmica,

estimulando assim a inflamação nos sítios de infecção, além, de promover um descontrole na microbiota intestinal, estimulando a colonização de bactérias potencialmente patogênicas (ZENG et al., 2017).

A perda das bactérias no intestino reduz a capacidade de controlar a inflamação do trato GI em indivíduos infectados pelo HIV, o que resulta na diminuição maciça de subconjuntos de células T, já reduzidas inicialmente após primeiro contato com o vírus, além de alterar o processo de degradação de gorduras e glicanos derivados de animais na dieta de indivíduos infectados pelo vírus, levando à manifestação de inúmeras doenças metabólicas (WU et al., 2011; LOZUPONE et al., 2014).

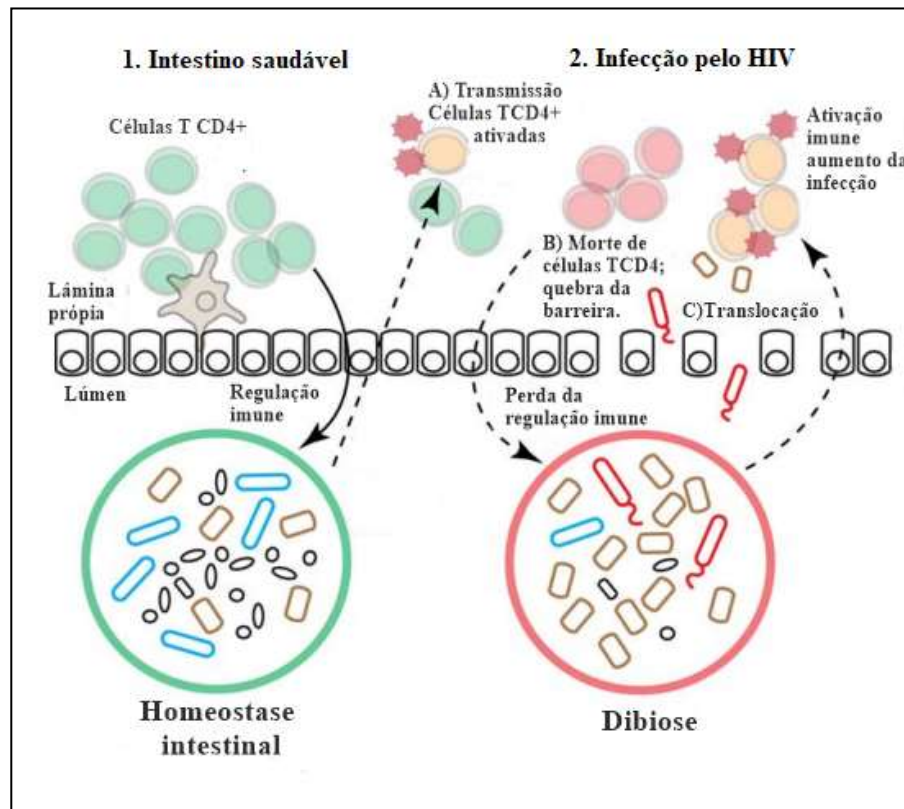


Figura 5. Disbiose intestinal. A Microbiota saudável apresenta estrutura tipicamente diversa e executa uma ampla gama de funções, mantendo assim uma relação metabólica mutualista com o hospedeiro. Durante a disbiose induzida por inflamação mediada por patógenos ou perturbação antibiótica, a microbiota é reduzida tanto na diversidade e função, como na resistência à colonização, podendo exacerbar a patologia e melhorar a transmissão do hospedeiro para o hospedeiro (Adaptada de LI et al., 2014).

O aumento de bactérias patogênicas no trato GI de indivíduos com HIV, resultam no aumento de bactérias aderentes ao epitélio de mucosa, podendo ser um mecanismo para danos ainda maiores ao intestino, outra grande complicação causada pela disbiose é o aumento da ativação de células T periféricas alteradas, e dos níveis de mediadores inflamatórios solúveis plasmáticos, que estão associados à patogênese da doença (VUJKOVIC-CVIJIN et al., 2013). Outro mecanismo associado a disbiose, consiste no aumento da quinurenina: triptofano, e o aumento da atividade indoleamino-2,3-dioxigenase (IDO), que foram revelados como importantes na perda de células produtoras de IL-17 na mucosa, durante a infecção pelo HIV (KLATT et al., 2012).

A disbiose gerada durante a patogênese do HIV contribui para a diminuição de células inatas como as Células NK, importantes na eliminação de células infectadas, a disbiose também está associada positivamente com a ativação de marcadores de monócitos, ativação maciça de células TCD4+ com consequente aumento da inflamação sistêmica pela indução de citocinas plasmáticas inclusive aquelas associadas à mortalidade, como IL-6, TNF α , IL-10, IFN γ , IL-1 β e diminuição da ativação de células dendríticas (DC) levando ao aumento da carga viral do HIV (DILLON et al., 2017; KOAY et al., 2017) (Figura 6).

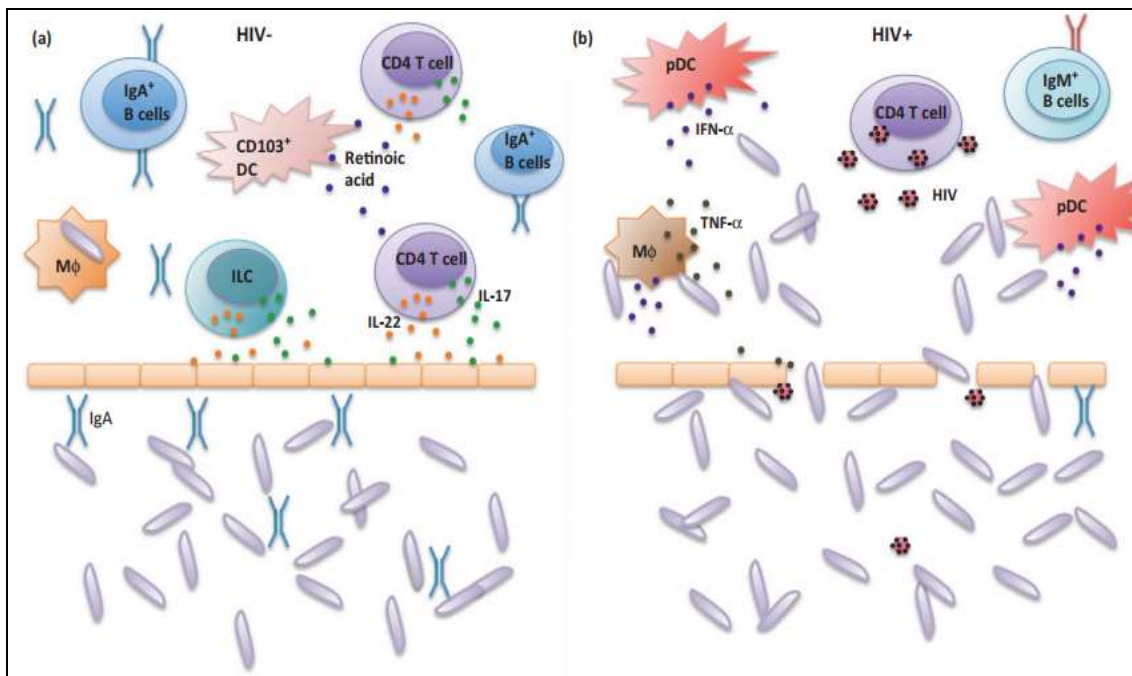


Figura 6. Consequência da infecção pelo HIV no trato GI. Na ausência do HIV, as células imunológicas locais ajudam na manutenção do trato GI, atuando em conjunto para manter tal homeostase **B)** Frente a infecção pelo HIV, o sistema imunológico torna-se defasado, promovendo a liberação de citocinas e substâncias pró-inflamatórias, que promovem a inflamação local, com consequente quebra na barreira epitelial promovendo a translocação de produtos microbianos para circulação sistêmica (Fonte: KLATT et al., 2013).

Desse modo, a disbiose induzida pelo HIV parece ser caracterizada pela diminuição da abundância de bactérias que são consideradas comensais, acompanhada da expansão de bactérias potencialmente patogênicas, o que contribui para o fenótipo geral da inflamação da mucosa durante a infecção pelo vírus, tornando a disbiose microbiana como um importante fator de risco para uma série de patologias intestinais, como a síndrome do intestino irritável, desnutrição, diarreia aguda e crônica em indivíduos infectados pelo HIV (ZEVIN et al., 2016; PUTIGNANI et al., 2016).

2.7. DIARREIA E A INFECÇÃO PELO HIV

Define-se como diarreia a dejeção de fezes (líquidas ou semilíquidas) com frequência de evacuação para mais de 3 vezes em 24 horas, e pode ser acompanhada de febre ou vômito. Habitualmente a diarreia pode ter a duração menor que 7 dias embora possa se prolongar por mais de 14 dias, esta última sendo designada diarreia persistente (LIMA et al., 2010). As doenças diarreicas estão entre as principais causas de morbidade e mortalidade nos países em desenvolvimento, e estima-se que no mundo aproximadamente 1,9 milhões de pessoas morrem anualmente, sendo que cerca de 40% desses óbitos ocorrem na região africana (EIJK et al., 2010).

A diarreia afeta negativamente a qualidade de vida de indivíduos infectados pelo HIV, sendo considerada uma das maiores causas de morbidade entre pessoas infectadas pelo vírus. Apesar da Terapia Anti-Retroviral (TAR), desde seu surgimento, reduzir significativamente a prevalência de diarreia em indivíduos com AIDS, as doenças diarreicas ainda continuam a ser uma queixa muito comum entre esses pacientes. Acredita-se que cerca de 2,1 milhões de indivíduos infectados pelo HIV apresentem diarreia destes, 90,5% dos casos encontram-se na África subsaariana (EIJK et al., 2010; MACARTHUR et al., 2012). A diarreia está presente em 30 a 60% de pacientes com AIDS, sendo considerada o segundo sintoma responsável por mortalidade em indivíduos infectados pelo HIV (NSAGHA et al., 2016).

A diarreia pode apresentar múltiplas etiologias, sendo causada por parasitas, fungos, protozoários e bactérias, sendo esta última os agentes patogênicos responsáveis por mais de 20% dos episódios de diarreia grave em indivíduos infectados pelo HIV (WANYIRI et al., 2013; DIKMAN et al., 2015).

As infecções bacterianas resultam do crescimento anormal da flora intestinal, decorrentes da necrose, abscessos, erosões, ulcerações e hemorragia epiteliais. Nesses

indivíduos, as bactérias da família *Enterobacteriaceae* são responsáveis em grande parte pelas infecções gastrointestinais (IYAMBA et al., 2014). A gravidade da imunodeficiência causada pelo HIV em conjunto com as infecções bacterianas determina o grau de dano na mucosa. Como consequências, ocorre a má absorção de nutrientes, infiltrados de células de defesas no lúmen intestinal e posterior a diarreia grave em indivíduos com HIV (BHAJEE et al., 2011).

2.8. BACTÉRIAS GRAM-NEGATIVAS E A INFECÇÃO PELO HIV

2.8.1. Família *Enterobacteriaceae* na infecção causada pelo HIV

A família *Enterobacteriaceae* é composta de bacilos gram-negativos, muitas vezes entéricos, amplamente distribuídos na natureza, podendo ser encontrada em solo, água, vegetais ou no trato intestinal de seres humanos e animais vertebrados, podendo ser responsáveis por cerca de 70% das infecções bacterianas no mundo. Os gêneros dessa família mais comumente isolados em seres humanos incluem: *Escherichia coli*, *Shigella* spp., *Edwardsiella* spp., *Salmonella* spp., *Citrobacter* spp., *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Serratia* spp., *Proteus* spp., *Providencia* spp., *Erwinia* spp., *Yersinia* spp. (WALSH et al., 2011).

A capacidade de regular e adquirir genes e mecanismos de resistência aos antibióticos favorece positivamente a prevalência de infecções causadas por estes microrganismos (PELEG et al., 2011). Níveis elevados de LPS provenientes da família *Enterobacteriaceae* exacerbam a lesão e aumentam a permeabilidade intestinal na doença celíaca, levando a processos inflamatórios que podem contribuir para a patogênese de várias doenças (WALLACE et al., 2011; CINOVA et al., 2011).

Indivíduos com HIV/AIDS apresentam maior risco de desenvolverem tais infecções em decorrência do comprometimento do sistema imunológico, repetidas hospitalizações, procedimentos invasivos e frequentes tratamentos com antibióticos. Um importante fator de risco decorrente da colonização patológica bacteriana em indivíduos infectados pelo HIV é, como dito anteriormente, a ativação imunológica exacerbada, aumentando o grau de infecção bacteriana, e conferindo maior probabilidade de progressão da doença e óbito nesses indivíduos (PEROVIC et al., 2011).

Os membros da família *Enterobacteriaceae* isolados em pacientes com HIV podem estar relacionados com a baixa contagem de células TCD4+ e progressão clínica para a AIDS (LOPES et al., 2015; WILMORE et al., 2016). As enterobactérias como a *Escherichia coli* (*E.coli*), *Salmonella* spp., *Shigella* spp., e *Klebsiella* spp., estando entre as principais bactérias isoladas em pacientes acometidos pela AIDS (MUGWERU et al., 2016).

2.8.1.1. *Escherichia coli* (*E.coli*)

A *E.coli* é uma bactéria gram-negativa, em forma de haste, pertencente da família *Enterobacteriaceae*, apresentando capacidade de crescer em forma aeróbia ou anaeróbica, podendo ser móvel ou não, com flagelos peritricos. Esta espécie é conhecida como um organismo comensal do trato gastrointestinal de seres humanos e animais (CROXEN et al., 2013).

A capacidade que a *E.coli* apresenta em ganhar e perder genes permite que ela se torne um patógeno altamente eficiente, causando uma gama de doenças no trato gastrointestinal e outros locais extraintestinais, como o trato urinário, corrente sanguínea e sistema nervoso central (CROXEN et al., 2010).

Dentre as doenças que podem ser associadas a esta bactéria, a diarreia é uma das mais comuns, sendo as cepas de *E.coli* diarreiogênicas (DEC) as principais responsáveis pelos surtos registrados no mundo. A aquisição e a perda de genes permitem diferentes traços patogênicos para as cepas de *E.coli* (CROXEN et al., 2013). Atualmente são conhecidos seis patótipos de DEC, diferenciados com base em seus perfis de patogenicidade: *E.coli* enteroinvasiva (EIEC); *E.coli* enterotoxigênica (ETEC); *E.coli* enteropatogênica (EPEC) que pode ser dividida em EPEC típica (tEPEC) e EPEC atípica (aEPEC); *E.coli* enteroagregativa (EAEC), *E.coli* de aderência difusa (DAEC) e *E.coli* enterohemorrágica (EHEC) (CLEMENTS et al., 2012; COURA et al., 2014; ROCHA et al., 2017).

Como outros patógenos de mucosa, os traços de patogenicidade da *E.coli* seguem um plano de infecção que se inicia a partir de: a) colonização da mucosa, que ocorre por meio de adesinas, que podem ser fimbrias ou não; b) evasão das defesas do hospedeiro a partir da produção de diversas toxinas que interagem com os enterócitos de diferentes maneiras; e c) multiplicação e danos na mucosa intestinal, decorrentes da interação com o citoesqueleto das

células intestinais, alterando as estruturas das microvilosidades dos enterócitos (SHELDON et al., 2010; COURA et al., 2014).

O mecanismo de patogênese das cepas de EPEC é a lesão *attaching and effacing* (A/E) mediada pelo envolvimento de genes localizados na região LEE (*locus for enterocyte effacement*). Os sorotipos de EPEC típica e atípica são diferenciados pela presença de genes específicos de cada sorotipo: enquanto as cepas típicas apresentam ambos o gene *eae* (*attaching and effacing*) e o plasmídeo *eaf* (*adherence factor*); as cepas atípicas apresentam *eae*, no entanto, são desprovidas do plasmídeo *eaf*. Os três estágios de interação entre as cepas de EPEC com as células do hospedeiro são: aderência localizada, mediada pela fímbria *bfp* (*bundle-forming pilus*) e pelo gene plasmidial *eaf*; sinais de transdução; e aderência total promovida pela intimina *eae*, esses estágios são essenciais para o desenvolvimento da diarreia persistente, característica das EPEC (CLEMENTS et al., 2012; SOUZA et al., 2016).

O mecanismo de patogenicidade das cepas de EHEC são semelhantes aos da EPEC, uma vez que também carrega a região LEE, porém diferem-se pela capacidade da mesma em produzir a toxina Shiga (Stx-1 e Stx-2), que podem atuar sozinhas ou em conjunto. A diarreia causada por essa cepa é grave e mais epidêmica, suas toxinas podem ser absorvidas pela mucosa, entrar na circulação e ser internalizadas pelas células endoteliais. Durante este processo, ocorre a interrupção da síntese proteica, ocasionando a morte celular e a presença de sangue nas fezes, e podendo, também, levar a insuficiência renal (CALDORNI et al., 2013).

Os isolados de ETEC apresentam enterotoxinas termolábeis (LT) ou termoestáveis (ST). Essa cepa possui a característica de aderir-se às mucosas, mediados por plasmídeos de colonização específicas (CFs), sem a necessidade de invasão, apenas produzindo toxinas que agem nas células epiteliais de mucosa (CROXEN et al., 2010; CLEMENTS et al., 2012; ABBASI et al., 2015).

Os genes de patogenicidade das DAEC, denominados *Afa-Dr*, sendo genes codificadores de fimbrias, que melhoram a adesão dessa cepa (CLEMENTS et al., 2012).

A cepa EAEC está associada à presença de plasmídeos adesão agregativa (pAA), responsáveis por codificar as fimbrias AAF (*aggregative adherence fimbriae*) e citotoxinas denominadas EAST 1 (*enteroaggregative E.coli heat-stable enterotoxin*) e Pet (*EAEC plasmid-encoded toxin*). Além disso, essa cepa é responsável por causar diarreia persistente

com ou sem presença de sangue, decorrentes dos danos causados na mucosa a partir de sua colonização (ABBASI et al., 2015).

A EIEC apresenta capacidade de invadir enterócitos e assemelha-se patogenicamente as cepas de *Shigella* spp. Sua capacidade invasiva ocorre devido a presença do plasmídeo de invasão (pINV) e das proteínas Ipa's, responsáveis por regular sua entrada nos enterócitos. A EIEC invade o epitélio da mucosa intestinal, disseminando-se célula-a-célula, causando colite inflamatória invasiva e conseqüentemente a disenteria. Como características, a diarreia causada por este patógeno apresenta-se de forma aquosa, com presença de sangue e muco. Além disso, a presença desta bactéria no lúmen intestinal pode levar a uma resposta inflamatória local exacerbada formando, então, úlceras intestinais (ABBASI et al., 2014; MAKVANA et al., 2015).

2.8.1.1.2. *E.coli* e HIV

A presença das cepas de *E.coli* já foi associada com a diarreia em pacientes com HIV, tanto na diarreia persistente, quanto na crônica (KRONES et al., 2012). Os patótipos de *E.coli* estão relacionados a 50% das taxas de mortalidade em pacientes com o vírus, tornando-a uma grande preocupação para saúde desses indivíduos (GARCIA et al., 2010).

A elevada taxa de disseminação sistemática dessas bactérias, em associação com o estado imunodeprimido dos indivíduos com AIDS, aumenta a probabilidade de desenvolvimento de abscessos esplênicos e hepáticos. Além disso, a desnutrição proteica causada pela diarreia persistente e severa decorrentes da infecção por *E.coli* facilita a translocação de bactérias através da mucosa intestinal, o que contribui para o aumento de coinfeções, agravando o quadro clínico de indivíduos acometidos pela AIDS com o conseqüente aumento da mortalidade (KESSLER et al., 2013).

2.8.2.1. *Shigella* spp.

O gênero *Shigella* pertence à família *Enterobacteriaceae*, são bactérias gram-negativas, imóveis, anaeróbicos facultativos e não formadoras de esporos. O gênero foi isolado pela primeira vez por Kiyoshi Shiga, a partir de surtos de disenteria ocorridos no ano de 1898 no Japão. A *Shigella* apresenta o fenótipo de invasão semelhante ao patótipo de

E.coli enteroinvasiva, diferindo-se, porém, em algumas características bioquímicas, motilidade, perfil metabólico e manifestações clínicas (BELD et al., 2012).

O gênero *Shigella* inclui quatro espécies: *S. dysenteriae* (sorogrupo A), *S. flexneri* (sorogrupo B), *S. boydii* (sorogrupo C) e *S. sonnei* (sorogrupo D). Tal classificação baseia-se pela presença do antígeno O localizado na parede externa das bactérias. As espécies de *S. flexneri* e *S. sonnei* são as espécies mais endêmicas e responsáveis pela maioria das infecções atribuídas a este gênero. A *S. dysenteriae* está associada à forma mais grave da doença, apresentando alta taxa de mortalidade, porém, desde sua descoberta, tem sido isolada apenas em casos esporádicos (JAKHETIA et al., 2013; GORDIENKO et al., 2013).

A *Shigella* spp. é responsável por causar uma doença gastrointestinal grave, denominada shigelose, caracterizada pela presença de diarreia severa e muco-sanguinolenta, acompanhada de febre e tenesmo. As implicações clínicas da doença incluem o comprometimento do desenvolvimento infantil devido à desnutrição grave, bem como o aumento dos índices de mortalidade, sendo responsável por 90% dos óbitos em países subdesenvolvidos (MARTINEZ-BECERRA et al., 2013).

A transmissão da *Shigella* spp. ocorre principalmente via fecal-oral, entre pessoas doentes ou convalescentes e até mesmo portadores assintomáticos. Uma pequena dose infecciosa é necessária para o início da shigelose, podendo variar entre 10 a 10³ células bacterianas. A patogenicidade da infecção causada pela *Shigella* é mediada pelos genes de virulência transportados pelo plasmídeo *Inv*, que incluem os genes *IpaA*, *IpaB*, *IpaC*, *IpaD* e genes *HAPi*, implicados no mecanismo de invasão celular característico da doença (BASSA et al., 2010).

Depois da adesão e invasão no intestino pelas células M, a *Shigella* spp. é fagocitada por macrófagos. A *Shigella*, porém, possui um mecanismo de escape, induzindo a apoptose dos fagócitos mediada pelo gene *IpaB*. Uma vez no lúmen intestinal, as bactérias realizam uma invasão basolateral com a formação de poros mediados pelas proteínas *IpaB*, *IpaC* e *IpaD*. As proteínas *Ipas*, além de apresentar funções efetoras como manter a sobrevivência da *Shigella* spp no meio intracelular, controlam a secreção e translocação de proteínas efetoras para o citoplasma das células hospedeiras (MARTINEZ-BECERRA et al., 2013). Uma vez no enterócito, a *Shigella*, que é imóvel, adquire uma motilidade baseada na polimerização da actina, garantindo sua disseminação célula-célula. O mediador desse processo é a proteína

IcsA presente no pólo da bactéria. Esse complexo catalisa um alongamento de actina, direcionando uma cauda na *Shigella* spp. o que permite sua movimentação de citoplasma à citoplasma (SCHROEDER et al., 2008).

A destruição grave do tecido causado pela *Shigella* spp. tem como consequência a adsorção de água, nutrientes e solutos que causam diarreias aquosa com presença de sangue e muco, características da shigelose. Outro fator que confere a diarreia aquosa pela *Shigella* é a secreção de enterotoxinas denominadas ShET1 e ShET2, capazes de induzir a secreção de fluidos intestinais. Além destas enterotoxinas, a toxina Shiga (Stx-1 e Stx-2) também pode ser encontrada em algumas espécies de *Shigella* e é responsável pelo desenvolvimento de lesões vasculares no intestino e nos órgãos adjacentes, como o rim e o sistema nervoso central (SCHROEDER et al., 2008; KOH et al., 2012).

2.8.2.1.1. *Shigella* spp. e HIV

A shigelose vem sendo descrita com a doença oportunista mais predominante em indivíduos infectados pelo HIV, presente em 79% desses pacientes, estando envolvidas com as baixas contagens de células T CD4+ e imunossupressão grave nesses indivíduos (OLADOSU et al., 2016). A infecção pelo HIV foi descrita como um importante contribuinte para o desenvolvimento da shigelose, e esta, por sua vez, aumenta a susceptibilidade do hospedeiro à desenvolver infecções oportunistas (GILBART et al., 2017).

As manifestações clínicas da shigelose inicialmente incluem a eliminação de fezes aquosas e volumosas, com rápida evolução para eliminação frequente de fezes sanguinolentas e pouco volumosas, que podem ser acompanhadas de forte dor abdominal e febre. Devido à natureza agressiva do processo infeccioso e à baixa resposta imunológica, em pacientes com HIV, esses sintomas tendem a se manifestar de forma mais atenuada, acompanhados de descamação do epitélio, formação de úlceras devido a intensa resposta inflamatória causada pelo processo de invasão desse patógeno, má-absorção com consequente liberação de fluidos inflamatórios e sangue, contribuindo então, para diarreia severa (BARDHAN et al., 2010; NUNES et al., 2012).

A infecção por *Shigella* spp. em indivíduos com HIV/AIDS podem ser atribuídas a inúmeras comorbidades devido a intensa resposta inflamatória local no que resulta na obstrução intestinal, perfuração do colón principalmente em pacientes com desnutrição

severa, manifestações sistêmicas, como bacteremia, hiponatremia e reação leucêmica. Além de manifestações neurológicas que variam entre encefalopatia e edema cerebral, devido à presença da toxina Shiga circulante, tais comorbidades tem sido associadas diretamente para a rápida progressão clínica da AIDS (OOI et al., 2015).

2.8.3.1. *Salmonella* spp.

A *Salmonella* spp. é uma bactéria gram-negativa, pertencente da família *Enterobacteriaceae*, anaeróbica facultativa, movél a partir de flagelos peritríqueos, sendo considerada o principal microrganismo causador de infecções transmitidas por alimentos contaminados em humanos e animais, promovendo um grave impacto na saúde e indústria (ALBINO et al., 2014; ZHUANG et al., 2014; CAI et al., 2016).

O gênero *Salmonella* spp. pode ser dividido em duas espécies *Salmonella enterica* subdividida em seis subespécies: *S. enterica*, *S. salamae*, *S. arizonae*, *S. diarizonae*, *S. houtenae* e *S. indica* e a espécie *Salmonella bongori*. Em cada subespécie são reconhecidas diferentes sorotipos, caracterizados com bases nos antígenos somáticos (O) e flagelares (H) e de acordo com a espécie e subespécie, distribuídas em: *Salmonella enterica subsp. entérica*; *Salmonella enterica subsp. salamae*; *Salmonella enterica subsp. arizonae*; *Salmonella enterica subsp. diarizonae*; *Salmonella enterica subsp. houtenae*; *Salmonella enterica subsp. indica*; e *Salmonella bongori* (FOLEY et al., 2010; GUIBOURDENCHE et al., 2010).

Estima-se que existam 80,3 milhões de casos anuais de doenças de origem alimentar relacionadas à *Salmonella* spp. no mundo, causando infecções em seres humanos e animais, e principalmente em aves. A salmonelose é responsável por 85% dos casos de infecções no mundo, essa porcentagem tende a crescer devido à rápida capacidade de disseminação no ambiente e nos alimentos (CARDOSO et al., 2013).

Os mecanismos de patogenicidade da *Salmonella* spp. incluem vários fatores de virulência que garantem a invasão, colonização, sobrevivência e multiplicação no interior das células do hospedeiro (OLIVEIRA et al., 2013). Para que ocorra a invasão nas células do epitélio intestinal é necessária, primeiramente, a adesão da bactéria nas células do hospedeiro, essa ação é mediada pelo gene *AgF*, responsável por conferir a aderência e formação de biofilmes característicos que conferem maior fixação da bactéria nas células M, dificultando, assim, sua remoção (YOO et al., 2013; MILAN et al., 2015).

Durante a invasão da *Salmonella* spp. nas células do epitélio do hospedeiro é necessária a atuação da ilha de patogenicidade SP-1, responsável pelas proteínas denominadas *inv* e *spa*, que possibilitam a translocação de proteínas efetoras que fornecem à bactéria capacidade de invasão nas células do hospedeiro (OLIVEIRA et al., 2015). A capacidade da *Salmonella* spp. em sobreviver no interior dos fagócitos após sua invasão no lúmen intestinal, além de se replicar dentro das vesículas formadas pelo seu englobamento, requer a ação do gene SP-2 que é essencial para a proliferação em meio extra-intestinal causando infecções sistêmicas (ZIU et al., 2014; SHIZHONG et al., 2015).

A ilha de patogenicidade SP-3 é responsável por garantir a sobrevivência da bactéria no interior de macrófagos, além de promover a captação e transporte de magnésio (Mg²⁺). Esse sistema é importante por garantir a adaptação nutricional da *Salmonella* spp. no interior do fagossomo. A SP-4 codifica o Sistema de Secreção Tipo I (TISS), que transloca proteínas necessárias para a colonização da bactéria no epitélio intestinal, além de estar envolvida na secreção de citotoxinas que induzem a apoptose dos macrófagos (OLIVEIRA et al., 2015).

A interação da bactéria com o epitélio de mucosa resulta na produção de moléculas sinalizadoras pelas células epiteliais, além das moléculas quimioatratórias produzidas pelo patógeno, estimulando propositalmente a inflamação e migração de leucócitos, que produzem prostaglandinas que atuam inibindo a absorção do sódio (Na⁺) e aumentam a secreção de cloro (Cl⁻). Esse mecanismo, em conjunto com as enterotoxinas produzidas pela *Salmonella* spp. contribuem para o estabelecimento do quadro clínico diarreico, característico da salmonelose (OLIVEIRA et al., 2015).

2.8.1.1.1. *Salmonella* spp. e HIV

A salmonelose é uma das causas mais comuns de infecção de corrente sanguínea em adultos e crianças em toda a África subsaariana, onde a infecção pelo HIV é prevalente. Diversos estudos demonstram uma taxa de mortalidade de 22-47% entre adultos com HIV que apresentam salmonelose, estando presente em mais de 95% dos casos, com uma taxa de 20-40% de recaídas entre os sobreviventes. Apesar do tratamento antibiótico a mortalidade é bem superior em pacientes imunocomprometidos (SCHREIBER et al., 2011).

As infecções por *Salmonella* spp. são responsáveis por causar doenças diarreicas graves, deteriorando a qualidade de vida desses indivíduos em países de baixa renda, devido à

presença dos quadros de desnutrição severa das crianças e adultos infectados pelo HIV (CRUMP et al., 2015). Um estudo realizado por Tompson et al. (2015) demonstrou que as cepas de *Samonella* são responsáveis pela mortalidade de pelo menos 4% de crianças infectadas pelo HIV, relacionando a presença desta bactéria com a baixa contagem de células T CD4+ , bem como um importante precursor do aumento de replicação do HIV.

A infecção causada por *Samonella* spp. em pacientes com HIV aumenta a susceptibilidade do desenvolvimento de comorbidade nesses indivíduos. A presença desta bactéria está associada a falência crônica de órgãos, desnutrição grave e diminuição dos sistemas de defesa dos hospedeiros aumentando a predisposição a infecções graves por outros patógenos entericos oportunistas. A salmonelose também está associada com hemorragia gastrointestinal, perfuração intestinal, inquietação, hipotensão arterial e taquicardia, sintomas esses que levam à agravos no quadro clínico da AIDS (CRUMP et al., 2015; KEDDY et al., 2017).

2.8.4.1. *Klebsiella* spp.

Klebsiella spp. são bacilos gram-negativos pertencentes a família Enterobacteriaceae que podem ser encontrados comumente em solo ou água e como parte da microbiota intestinal da maioria dos animais, incluindo os seres humanos (TENÓRIO et al., 2010). Atualmente estão incluídas seis espécies: *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *K. variicola*, *K. granulomatis*, *K. singaporensis* e *K. michiganensis* (RAMOS et al., 2014). Recentemente, uma nova espécie relacionada a *K. pneumoniae*, a *K. quasipneumoniae* foi descrita contendo duas subespécies: subsp. *quasipneumoniae* e subsp. *similipneumoniae* (BRISSE et al., 2014; BREUREC et al., 2016).

Apesar da espécie *K. pneumoniae* ser encontrada em aproximadamente 30% dos indivíduos saudáveis, esta espécie é de extrema relevância clínica, sendo responsável pelo crescente número de casos de infecção hospitalar como um patógeno oportunista, estando frequentemente presente em pacientes imunocomprometidos (KONEMAM et al., 2008).

Sua patogenicidade pode ser atribuída à produção de diversas enterotoxinas estáveis ao calor, à habilidade de metabolização de lactose, à presença de cápsula ou lipopolissacarídeo, bem como adesinas com ou sem fimbrias, favorecem sua adesão às mucosas. A maioria dessas bactérias são encapsuladas, e aderem às células intestinais a partir do padrão agregativo.

Estudos mostram a *K. pneumoniae* como produtora de beta-lactamases de espectro estendido (ESBL), classe de enzimas que conferem sua resistência essa função pode ser responsável pela capacidade de escapar das atividades fagocíticas dos neutrófilos polimorfonucleares, sendo esse o grande responsável pelo seu potencial patogênico (LI et al., 2014).

A *Klebsiella* é um patógeno com potencial de ocasionar infecções do trato urinário, pneumonia, bacteremia e infecções supurativas focais, incluindo abscesso hepático e suas graves complicações, como meningite e endoftalmite (KONEMAM et al., 2008). A *K. pneumoniae* tem diversos mecanismos de virulência, pois é capaz de produzir adesinas fimbriais, sideróforos, antígenos O e K ou capsulares, sendo conhecidas, juntamente com a *K. oxytoca*, como patógenos relacionados a infecções nosocomiais, causando infecções na corrente sanguínea, trato respiratório baixo, intra-abdominais, trato biliar, meningite neonatal e infecção de ferida operatória (WINN et al. 2006).

Como a maioria dos microrganismos hospitalares, os isolados de *Klebsiella* spp podem ser multirresistentes, representando uma importante fonte de disseminação de resistência bacteriana no ambiente hospitalar e sua principal característica de virulência (YU et al., 2016). Um importante mecanismo de resistência atribuído às espécies de *Klebsiella* é proporcionado pelas betalactamases de amplo espectro (ESBL). Essas enzimas, codificadas por plasmídeos e amplamente distribuídas entre as enterobactérias, são resultantes da mutação do gene da betalactamase comum, como TEM-1, TEM-2 e SHV-1, e têm capacidade de hidrolisar uma ampla variedade de penicilinas e cefalosporinas de terceira geração, as quais foram originalmente desenvolvidas como drogas capazes de vencer a resistência bacteriana conferida pelas betalactamases comuns (CHENG et al., 2016).

2.8.4.1.1. *Klebsiella* spp. e HIV

Embora a espécies de *Klebsiella* vivam muitas vezes como comensais no intestino, esta bactéria ocasionalmente pode causar episódios de diarreia em pessoas infectadas pelo HIV. Algumas dessas cepas diarreiogênicas são capazes de codificar toxinas termostáticas ou termolábeis, causando diarreia sanguinolenta nos pacientes infectados pelo vírus, mesmo naqueles com uso de antibióticos (HOGENAUER et al., 2006).

Em um estudo realizado por Amabali et al (2016), a *Klebsiella* foi o segundo agente mais frequentemente isolado em pacientes com HIV, atrás somente das espécies de *E.coli*. Diversas cepas de *Klebsiella* podem estar presentes em indivíduos com o HIV, tais bactérias podem estar relacionadas tanto ao desenvolvimento de diarreia persistente e crônica, quanto a doenças extraintestinais como a pneumonia, sendo a *K. pneumoniae* o patógeno mais associado a esta comorbidade em pacientes com HIV (AGARWALL et al., 2015).

2.8.3. Família *Pseudomonadaceae* na infecção causada pelo HIV

Os membros da família *Pseudomonadaceae* são bactérias gram-negativas em forma de bastonetes, ligeiramente curvas embora possam se apresentar retas, possuem em sua estrutura flagelos polares e alguns dos seus gêneros são capazes de fixar nitrogênio. Podem ser comumente encontrados em água doce e salgadas, solo, plantas e meio ambiente (ANZAI et al., 2001).

Atualmente estão classificados em 13 gêneros distintos: *Azomonas*, *Azomonotrichon*, *Azorhizophilus*, *Azotobacter*, *Cellvibrio*, *Chryseomonas*, *Flavimonas*, *Mesophilobacter*, *Pseudomonas*, *Rhizobacter*, *Rugamonas*, *Serpens* e *Thiopseudomonas* (TAN et al., 2015). O gênero *Pseudomonas* é considerado um patógeno de grande importância clínica e constitui um grave problema de saúde pública, devido sua frequência em infecções de corrente sanguínea e sua multirresistência aos antimicrobianos (FERNANDES et al., 2010).

A virulência da *P. aeruginosa* é amplamente definida em termos de infecção aguda, a expressão de genes que conferem virulência a esta bactéria é controlada por circuitos reguladores extremamente complexos e múltiplos sistemas de sinalização. Este patógeno considerado oportunista, produz uma série de fatores de virulência, utilizando sistema de secreção do tipo III, responsável por secretar várias exotoxinas (ExoS, ExoU, ExoT e ExoY), e sistemas de detecção de quórum (QS) encarregados de controlar a secreção de importantes toxinas nas quais incluem pirocianina, elastase, cianeto e ramnolípido, que estão associadas a capacidade de motilidade, além da capacidade de formação de biofilme que são importantes nas infecções crônicas (BRAGONZI et al., 2010; JIMENEZ et al., 2012; BALASUBRAMANIAN et al., 2013; LEE et al., 2015).

2.8.3.1. *Pseudomonas* spp. e HIV

A *P. aeruginosa* é importante por sua resistência múltipla a antibióticos e reconhecida como um dos patógenos que mais causam infecções associadas à saúde. A *P. aeruginosa* tem sido associada com infecções do trato urinário, respiratório, infecções de tecidos moles, e apesar de não muito comum, tem se observado o potencial dessa bactéria como causadora de infecções gastrointestinais (ADEYEMI et al., 2015).

Essa bactéria é capaz de causar doenças em qualquer parte do TGI, e em indivíduos imunocomprometidos a *P. aeruginosa* foi implicada como causa de infecções perirretais, diarreia aguda, gastroenterite típica e enterocolite necrosante. Sua patogênese baseada em endotoxinas, exotoxinas e enzimas aumenta o risco de sepse e choque séptico, e diferente das outras gram-negativas essa bactéria segrega um grande número de proteínas que desempenham papéis importantes durante infecções, resultando na piora do quadro clínico nesses pacientes (MOBARAK-QAMSARI et al., 2011).

2.9. BACTÉRIAS FORMADORAS DE BIOFILME

O grupo de bactérias produtoras de biofilme é de extrema importância médica, pois esse fator apresenta um papel essencial em doenças crônicas, tolerância a antibióticos e bioincrustação. A produção do biofilme bacteriano revela mecanismos genéticos, bioquímicos e são extremamente variáveis entre as cepas e condições de crescimento (ELLIOTT et al., 2010; ROLING et al., 2014).

A formação do biofilme é um ciclo interminável, no qual as bactérias são envolvidas por uma matriz de substâncias poliméricas extracelulares (EPS), composta principalmente por biomoléculas, exopolissacarídeos, DNA extracelular (eDNA) e polipeptídeos, formando uma mistura polar altamente hidratada que mantém essas células juntas a um determinado local. E este evento é considerado determinante entre 65 à 80% de todas as infecções microbianas (FLEMMING & WINGENDER, 2010).

Há uma necessidade crescente do desenvolvimento de agentes antimicrobianos que apresentem propriedades para o controle e o manejo eficiente, no que se refere à inibição da virulência bacteriana e a formação de biofilme (KALIA et al., 2011; BLACKLEDGE et al., 2013; SHARMA et al., 2014). Estudos revelam que em determinadas doses, alguns antibióticos são capazes de induzir uma série de alterações fisiológicas, podendo não atuar de maneira eficaz para a patogênese de algumas cepas. Sugerindo que esses antibióticos possam cooperar com a homeostase das comunidades bacterianas aumentando assim formação de biofilme (KAPLAN et al., 2011; ANDERSSON et al., 2014; REN et al., 2014).

Entre as bactérias patogênicas oportunistas, a *Klebsiella spp* e a *P. aeruginosa*, são conhecidas por serem importantes patógenos responsáveis por várias infecções, particularmente em pessoas imunocomprometidas (DEEP et al., 2011). A *Klebsiella* é um importante patógeno nosocomial envolvido em diversos processos patológicos como infecções do trato urinário, pneumonia hospitalar, infecção de feridas operatórias, bacteremia e septicemia, e pode ser encontrada com alta frequência (NITZAN et al., 2015; LI et al., 2015; TAI et al., 2015).

A resposta do biofilme de *Klebsiella* a diferentes agentes antimicrobianos tem sido investigada em diversos estudos. Como no realizado por Anderl et al, (2000), que avaliou o efeito da ampicilina e da ciprofloxacina sobre o biofilme de *K. pneumoniae*, e onde foi constatado que os biofilmes resistiram à morte durante a exposição prolongada a ambos os antibióticos. A ampicilina foi capaz de penetrar nos isolados de *K pneumoniae*, não havendo eliminação da bactéria, demonstrando assim uma resistência microbiana aumentada devido a formação de biofilme (ANDERL et al., 2000).

Outra bactéria com grande capacidade de formar biofilmes em muitos ambientes é a *P. aeruginosa*, tornando os tratamentos com antibióticos ineficientes e, portanto, promovendo doenças infecciosas que podem ser tornar crônicas. Estas infecções podem variar de complicadas à graves, e a capacidade de produção de biofilme torna essa bactéria tolerante a antibióticos, como observado por Kolpen et al., (2016), que detectou que essa capacidade pode levar à ineficácia de alguns antibióticos, particularmente a ciprofloxacina, que pareceu estimular a respiração aeróbia nesse patógeno, aumentando sua sobrevivência no ambiente e consequente tolerância medicamentosa. Tais evidências suportam a hipótese de que a formação de biofilme contribui de maneira direta para sobrevivência e aquisição de resistência (BROCHMANN et al., 2014).

2.10. RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA

As doenças hospitalares são o resultado de uma interação complexa de vários fatores dinâmicos do microrganismo infectante no paciente hospedeiro e do ambiente hospitalar, no qual incluem: patogenicidade, resistência a medicamentos, persistência ambiental do micróbio; estado de imunidade e a composição da microflora do hospedeiro; intervenções nosocomiais, como terapias antimicrobianas. Na medida em que esses fatores interagem, essas bactérias com potencial patogênico, evoluem continuamente, promovendo o aumento de organismos intratáveis e resistentes a múltiplas drogas (ANDERSSON et al.,2010).

Os testes de sensibilidade são indicados para qualquer microrganismo responsável por causar processos infecciosos que requeira uma terapia antimicrobiana. Esses testes são realizados com maior frequência, quando se acredita que o organismo pertence a uma espécie capaz de apresentar resistência aos agentes antimicrobianos normalmente utilizados (NCCLS, 2003). De acordo com o perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos, os isolados bacterianos podem ser classificados como sensíveis, ou resistentes aos antimicrobianos testados (MAGIORAKOS et al., 2012; GERMAN et al., 2016).

A resistência das bactérias aos antibióticos constitui uma das principais causas de morbidade e mortalidade em pessoas com HIV/AIDS no mundo todo. Como a AIDS é de caráter progressivo, as doenças oportunistas são observadas quando a contagem de células CD4 cai para menos de 200 células/ μL de sangue. O alto consumo de antibióticos administrado pode levar ao desenvolvimento da resistência a eles, colocando em risco o prognóstico favorável da doença. A desordem do estado imunológico causado pelo HIV promove a colonização de bactérias e o consequente aumento da resistência bacteriana, resultando em altas taxas de infecções entéricas (MARBOU & KUETE, 2017).

Devido ao comprometimento do sistema imunológico, repetidas hospitalizações e frequentes tratamentos prolongados com antibióticos, as bactérias gram-negativas vêm apresentando destaque como principais causadores de doenças. A multirresistência dessas bactérias torna-as capazes de regular e adquirir genes que lhe conferem mecanismos de alta resistência, aumentando a prevalência de infecções causadas por esses microrganismos, com consequente imunossupressão em indivíduos infectados pelo HIV exacerbando a ativação

imunológica e aumentando o grau da infecção, conferindo uma maior probabilidade de morte a esses indivíduos (BASSETTI et al., 2011; PELEG et al., 2011; PEROVIC et al., 2011).

3. JUSTIFICATIVA

A diarreia, independente da forma que se apresenta (sintoma ou doença) é um fator comumente encontrado em pacientes com HIV, e que pode levar a complicações clínicas associadas à AIDS. Cerca de 90% dos indivíduos com HIV/AIDS no mundo, apresentam diarreia que pode variar de leve a grave, com variações crônicas ou de repetição. Os agentes etiológicos e infecciosos mais isolados em pacientes com HIV/AIDS são as bactérias, que podem causar doenças gastrointestinais frequentes tanto graves e agudas, quanto mais brandas e prolongadas (SHAH e al., 2016).

A ativação imunológica é uma característica da infecção causada pelo HIV e está fortemente associada à comorbidades e mortalidade em indivíduos com AIDS. As alterações na mucosa causada pela infecção do HIV promovem fissuras na barreira epitelial e consequente translocação de produtos microbianos para circulação sistêmica, o que tem sido implicado com a replicação contínua do HIV, além de ativar inúmeras vias de inflamação com a elevada secreção de citocinas pró-inflamatórias, responsáveis pelo desenvolvimento de respostas imunológicas persistentes e a rápida progressão para AIDS (PETERS et al., 2014; ZEN et al., 2016).

Apesar do Amazonas ser considerado a segunda capital em casos de AIDS no Brasil (SILVA et al., 2009; SECRETARIA MUNICIPAL DE SAÚDE DE MANAUS, 2013), estudos visando a frequência do quadro diarreico e sua etiologia nestes casos, são escassos. E os índices precários de saneamento básico na região eleva as taxas de circulação de agentes infecciosos, o que pode influenciar no declínio do quadro clínico dos pacientes com HIV, já que a maioria da população soropositiva, está enquadrada nas categorias populacionais de risco, quando se trata de diarreia. E com a alta frequência de AIDS, e consequentes óbitos registrados na população, possuem grande chance de estarem relacionados a estes cenários de co-infecções bacterianas.

Identificar coinfeções provocadas por enterobactérias, e avaliar a presença de marcadores de inflamação em pacientes com HIV, auxiliará no desenvolvimento de estratégias diagnósticas que se adequem de forma individual ao paciente, levando em consideração não

só a atenção aos patógenos prevalentes na região, mas também à sintomatologia e sinais clínicos e imunológicos correlatos. Permitindo assim, a elaboração de medidas de controle e prevenção, contribuindo para a manutenção da saúde geral destes pacientes, e consequente redução do agravamento da doença e da mortalidade.

4. OBJETIVO GERAL

Verificar a ocorrência de co-infecções bacterianas, com potencial patogênico, e avaliar marcadores imunológicos de inflamação como preditores de translocação microbiana e ativação crônica, em pacientes com HIV/AIDS em Manaus.

4.1. Objetivos específicos:

- Diagnosticar a presença de bactérias potencialmente patogênicas em pacientes HIV;
- Mensurar a patogenicidade das bactérias isoladas de acordo com sua resistência antimicrobiana, genes de virulência e sua capacidade de interação celular danosa (adesão, invasão e citotoxicidade) *in vitro*.
- Avaliar os níveis de marcadores imunológicos presentes nos pacientes com HIV, para a determinação de futuros preditores de translocação microbiana e progressão da doença.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. TIPO DE ESTUDO E LOCAL DE ESTUDO

Trata-se de um estudo transversal observacional, analítico e etiológico englobando pacientes atendidos na Fundação de Medicina Tropical - Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD), localizado na cidade de Manaus –AM, com soropositividade para HIV.

5.2. ASPECTOS ÉTICOS

Este projeto integra um projeto principal intitulado: “Diarreia em pacientes HIV e HIV-AIDS na Amazônia ocidental: Avaliação da etiologia dos enteropatógenos e dos mediadores inflamatórios associados a inflamação sistêmica”, aprovado pelo Comitê de Ética do FMT- HDV, sob o número de parecer 1753402 e CAAE 57330116.6.40000.0005 de 2016 (Anexo 1).

5.2. MÉTODOS COLETA E TIPOS DE AMOSTRAS

5.3.1. Amostra de fezes

Foram realizadas coletas de amostras fezes dos pacientes diagnosticados com HIV/AIDS atendidos no FMT-HDV e que concordaram participar do estudo por livre demanda. As fezes foram coletadas a partir da evacuação espontânea e transportadas em caixa de transporte, à temperatura ambiente, e acondicionadas em estantes para que não haja atrito e colisão entre as amostras coletadas o material foi processado em até 4 horas a partir do seu recebimento.

5.3.2. Amostra de sangue

O sangue venoso foi coletado a vácuo, utilizando uma agulha bipolar, adaptada em um dispositivo específico para coleta. Para a punção venosa foi realizada a assepsia local com algodão umedecido em álcool 70%. A agulha foi introduzida na veia do paciente, e em seguida o tubo vácuo, foi inserido do dispositivo de coleta para que o sangue fosse colhido.

Todo material coletado foi transportado em caixa de transporte, em temperatura ambiente e acondicionados em estantes para que não houvesse atrito e colisão entre as amostras coletadas, o material foi processado em até 1 hora a partir do recebimento do mesmo.

5.3. POPULAÇÃO DE ESTUDO

Para este estudo, foram incluídos inicialmente o total de 100 participantes, sendo o grupo experimental composto por pacientes divididos a partir da quantidade de carga viral e contagem de células CD4, de acordo com as diretrizes do ministério da saúde (MINISTERIO DA SAÚDE, 2016). Sendo assim, os participantes foram divididos nos seguintes grupos:

Grupo 1: >500 cópias RNA viral < 200 CD4/mm³ (n=25);

Grupo 2: <500 cópias RNA viral < 200 CD4/mm³ (N=25);

Grupo 3: >500 cópias RNA viral > 200 CD4/mm³ (n=25);

Grupo 4: < 500 cópias RNA viral > 200 CD4/mm³ (N=25).

Quadro 1. Esquema dos grupos da população de estudo.

5.4.1. Critério de inclusão

Foram elegíveis indivíduos de ambos os sexos, atendidos na FMT- HVD, com faixa etária compreendida entre 12 anos - 70 anos. Todos com diagnóstico positivo para HIV.

5.4.2. Critérios de exclusão

Foram excluídos deste estudo, aqueles pacientes que optaram por não participar, em qualquer etapa do processo, ou qualquer tempo de desenvolvimento do estudo, pacientes que não se enquadrem nos perfis estipulados pelo estudo, e pacientes que não puderam assinar o termo de consentimento, ou que o responsável não estivesse presente no momento da coleta.

5.4. COLETA DE DADOS

A coleta de dados foi realizada na Fundação de Medicina Tropical, no período de fevereiro de 2017 a junho de 2018, onde os indivíduos foram convidados a participar da pesquisa. Aqueles que aceitaram foram informados dos termos do estudo, e após o aceite, foi aplicado um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE (Anexo X), onde foi devidamente assinado pelo paciente.

Posteriormente, foi aplicado questionário estruturado com dados de identificação como: número de identificação determinado a partir da coleta de dados, nome do paciente, sexo, idade, local de nascimento; e dados sobre a sintomatologia da doença, como tipos de infecções oportunistas, uso de medicamentos (Anexo 3). As informações obtidas nos questionários foram armazenadas em planilha de dados tipo Microsoft Excel, para realização das análises.

5.5. IDENTIFICAÇÃO BACTERIANA (TESTE BIOQUÍMICO)

Foram realizadas à busca das enterobactérias *E.coli*, *Klebsiella* spp, *Salmonella* spp, *Shigella* spp e *Pseudomonas* spp, diretamente das fezes frescas em até, no máximo, 4 horas após a aquisição da amostra. Aproximadamente 50 µL das fezes foram inoculadas em 3 mL de meio de enriquecimento Lura Bertani (LB; Difco) e incubadas a 37°C, por um período superior a 12 horas, e inferior a 24 horas.

Após o crescimento, realizou-se a técnica de semeadura em placa de petri contendo meios seletivos: ágar Salmonella-Shigella (Merck), ágar Xilose Lisina Desoxicolato (XLD) (Difco, Detroit), e ágar MacConkey (Becton Dickinson, Galoeyville, MD) PIA (Difco, Detroit). Posteriormente, as placas foram incubadas a 37°C, overnight.

As colônias puras foram selecionadas e aplicadas a testes bioquímicos clássicos, para análise da produção de gás, H₂S, glicose, capacidade de motilidade e produção de indol, utilização de citrato como única fonte de carbono, metabolização de uréia, e presença de enzimas arginina e ornitina. A identificação bioquímica ocorreu seguindo os parâmetros utilizados pela plataforma de identificação bacteriana online ABBIS, disponível em <http://www.tgw1916.net/intro.html>.

As colônias isoladas e caracterizadas bioquimicamente como bactérias de interesse do estudo, foram armazenadas sob duas alíquotas diferenciadas: a primeira utilizando meio

mínimo sob temperatura ambiente; e a segunda sendo mantida em glicerol 50% e submetida a preservação criogênica sob temperatura de -80°C.

5.6. CARACTERIZAÇÃO DA VIRULÊNCIA POR REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

Para a avaliação da presença de genes de virulência destas amostras, foram realizados a amplificação de genes específicos através de metodologia de PCR *uniplex* para cada gênero bacteriano alvo – *Shigella* spp, *Salmonella* spp, *E.coli*, *Klebsiella* spp, *Pseudomonas* spp.

5.7.1. Extração de DNA

O DNA bacteriano foi extraído a partir da metodologia de Extração de DNA cromossomial por choque térmico, seguindo as orientações descritas no Protocolo Operacional padrão (POP) (Anexo 6). Após o processo de extração, as amostras foram quantificadas e tiveram sua integridade analisada em gel de agarose 0,8%. Posteriormente as amostras foram armazenadas em -20°C até o uso.

5.7.2. Reação de PCR

Foi realizada a técnica de Reação em Cadeia Polimerase (PCR) para a detecção dos genes relacionados à virulência, utilizando iniciadores específicos para os gêneros *E.coli* (*ent*, *eaf*, *stx2*, *invE*, *uidA*, *eae*, *bfpb*, *escV*, *stx1*, *dAAe*, *ast1*) (Tabela 1) (Anexo 7), *Klebsiella* spp (*blaCTX-M*, *blaCTX-M-15*, *blaSHV*, *blaTEM*, *blaKPC*, *blaVIM*, *blaIMP*, *blaSPM*) e (Tabela 2) (Anexo 8). As reações foram padronizadas por nosso grupo de pesquisa em estudos anteriores (DA CRUZ et al., 2014; SANTA-RITA, 2014).

Tabela 1. Oligonucleotídeos utilizados na PCR para *E.coli* e seus respectivos alvos e produtos de amplificação.

Fatores de Virulência	Iniciador	Sequência (5'-3')	DEC	Produto	Referência
Adesão	<i>daae-F</i>	CACTGTGGGCTCCGCGCAAGC	DAEC	420	Campos <i>et al.</i> , 1999
	<i>daae_R</i>	CGGTGAGTTCAGTGTGTAT			

Invasão	<i>invE-F</i>	CGATAGATGGCGAGAAATTATATCCCG	EIEC	766	Daniel Muller, 2007
	<i>inv-R</i>	GATCAAGAATCCCTAACAGAAGAATCAC			
Enterotoxina	<i>ent-F</i>	TGGGCTAAAAGAAGACACACTG	EHEC	518	Daniel Muller, 2007
	<i>ent-R</i>	CAAGCATCCTGATTATCTCACC			
Fator de aderência	<i>EAF-F</i>	CAGGGTAAAAGAAAGATGATAA	EPEC	397	Franke, J. et al. 1994
	<i>EAF-R</i>	TATGGGGACCATGTATTATCA			
Pilin	<i>bfpB-F</i>	GACACCTCATTGCTGAAGTCG	EPEC Típica	910	Daniel Muller, 2007
	<i>bfpB-R</i>	CCAGAACACCTCCGTTATGC			
Região Lee	<i>escV-F</i>	ATTCTGGCTCTCTTCTTTATGGCTG	EPEC, ATEC e STEC	544	Daniel Muller, 2007
	<i>escV-R</i>	CGTCCCCTTTTACAAACTTCATCGC			
Shiga toxina	<i>stx1-F</i>	CGATGTTACGGTTTGTACTGTGACAGC	STEC	244	Daniel Muller, 2007
	<i>stx1-R</i>	AATGCCACGCTTCCCAGAATTG			
Shiga toxina	<i>stx2-F</i>	GTTTTGACCATCTTCGTCTGATTATTGAG	STEC	324	Daniel Muller, 2007
	<i>stx2-R</i>	AGCGTAAGGCTTCTGCTGTGAC			
	<i>estB-R</i>	CGGTACAAGCAGGATTACAACAC			
Enterotoxina	<i>ast1-F</i>	CCATCAACACAGTATATCCGA	EAEC	102	Daniel Muller, 2007
	<i>ast1-R</i>	GGTCGCGAGTGACGGCTTTGT			
Beta-glucosidase	<i>uidA-F</i>	ATGCCAGTCCAGCGTTTTTGC	<i>E.coli</i>	1487	Daniel Muller, 2007
	<i>uidA-R</i>	AAAGTGTGGGTCAATAATCAGGAAGTG			
Intimina	<i>eae-f</i>	CTGAACGGCGATTACGCGAA	EHEC e EPEC	917	Gomes-Duarte et al. 2009
	<i>eae-r</i>	CGAGACGATACGATCCAG AATACAGAATCGTCAGCATCAGC			

Tabela 2. Oligonucleotídeos utilizados na PCR para *Klebsiella* e seus respectivos alvos e produtos de amplificação.

Fatores de Virulência	Iniciador	Sequência (5'-3')	DEC	Produto	Referência
<i>Kvar</i>	<i>Kvar- R</i>	GCTGAGGCTGGGCTAAATAT	<i>Klebsiella</i>	997	Ramos, 2014
	<i>Kvar- F</i>	CCCCTGATGAGAACAAGGTT			
<i>blaCTX-M</i>	<i>blaCTX-M-F</i>	ATGTGCAGYAACCAGTAARGTKATGGC	<i>Klebsiella</i>	593	Mulvey et al. 2016
	<i>blaCTX-M-R</i>	TGGGTRAARTARGTSACCAGAAAYCAGCGG			
<i>blaSHV</i>	SHV-F	TTATCTCCCTGTTAGCCACC	<i>Klebsiella</i>	797	Hasman et al. 2005
	SHV-R	GATTGCTGATTTCGCTCGG			
<i>blaTEM</i>	TEM-F	GCGGAACCCCTATTTG	<i>Klebsiella</i>	859	Hasman et al. 2005
	TEM-R	ACCAATGCTTAATCAGTGAG			
<i>BlaKPC</i>	KPC-1A	TGTCACTGTATCGCCGTC	<i>Klebsiella</i>	1000	Yigit et al. 2001
	KPC-1B	CTCAGTGCTCTACAGAAAACC			
<i>blaIMP</i>	VIM-F	CAGATTGCCGATGGTGTTTGG	<i>Klebsiella</i>	500	Dong et al. 2008
	VIM-R	AGGTGGGCCATTCAGCCAGA			
<i>blaIMP</i>	IMP-F	GGAATAGAGTGGCTTAATTCTC	<i>Klebsiella</i>	448	Dong et al. 2008
	IMP-R	GTGATGCGTCYCCAAYTCACT			
<i>BlaSPM</i>	SPM-F	CCTACAATCTAACGGCGACC	<i>Klebsiella</i>	801	Dong et al. 2008
	SPM-R	TCGCCGTGTCCAGGTATAAC			

5.8. TESTES EM CULTURA CELULAR

Foram realizados testes de adesão para os isolados de *E.coli* e *Klebsiella* spp. e invasão para os isolados de *Klebsiella* spp. *Shigella* spp e *Salmonella* spp, em células Hep-2. Os experimentos foram realizados de acordo com condições estabelecidas em estudos anteriores.

2.8.1. Teste de adesão

Para a capacidade de adesão das amostras foram utilizadas as células HEp2, originárias de carcinoma de laringe humana, e realizada a técnica de acordo com a descrita por CRAVIOTO et al (1979).

2.8.1.1. Cultivo das células HEp-2

As células HEp-2 foram cultivadas em frascos de plástico de 25 cm² de superfície de crescimento (Corning), contendo 6,5 ml de meio mínimo essencial de Eagle modificado com sais de Eagle (MEM) (Anexo 4), acrescido de 10% Soro Fetal Bovino (Cultilab); MEM - SFB 10%, e mantidos em estufa a 37 °C, sob atmosfera de 5% de CO₂, por três a quatro dias. Após este período, o meio de cultivo foi removido e a monocamada celular lavada com 2,5 ml de solução de tripsina a 0,25%. Em seguida, mais 2,5 ml desta solução dispersante foram adicionados e deixados em contato com a monocamada celular por dois a quatro minutos, à temperatura ambiente. Tendo se iniciado o desprendimento celular, todo o volume de tripsina foi retirado (a fim de se evitar o seu efeito tóxico). Para as células se desprenderem por completo, o frasco foi manual e levemente agitado, e 5 ml de MEM - SFB 10% foram adicionados. Através de repetidas e vigorosas pipetagens, com o devido cuidado, para não haver formação de bolhas de ar, obteve-se uma suspensão celular homogênea.

Posteriormente, procedeu-se à contagem do número de células viáveis dessa ressuspensão celular, utilizando-se do método de exclusão pelo corante Azul Tripán

(SCHREK, 1936), quando finalmente foi feita diluição apropriada em MEM – SFB 10% (v/v), de modo a ser obtido uma concentração de 10^5 células por/ml.

Para a realização dos testes de adesão alíquotas de um ml dessa ressuspensão celular, foram distribuídas em cada uma das lamínulas colocadas em cada orifício das placas de cultura de células de 24 orifícios (Costar). Em seguida, os cultivos celulares foram incubados em estufa a 37° C, sob atmosfera de 5% de CO₂, por 24 horas.

5.8.1.2. Preparo das amostras bacterianas

A partir do estoque em ágar nutriente, as amostras bacterianas foram semeadas em 3 ml de Caldo Tripto Caseína de Soja e incubadas a 37° C por 16/18 horas.

5.8.1.3. Realização do teste de adesão em células HEp-2

Inicialmente, o meio de cultivo MEM - SFB 10% (v/v) foi retirado dos orifícios de cultura contendo a monocamada incompleta de células HEp-2, realizando-se, em seguida, três lavagens com solução tampão salina – fosfato de Dulbecco - Vogt, pH 7.4 (PBS - D - V).

Posteriormente, foram acrescentados: 0,96ml de novo meio MEM, contendo 2% de soro fetal bovino (MEM - SFB 2%) e 1% (v/v) de D – Manose, para inibir a adesão bacteriana devido à fímbria tipo I, e 40µl de crescimento bacteriano em TSB.

Após incubação desse sistema durante 3 horas em estufa a 37° C, o meio de cultivo foi removido e a monocamada celular lavada por cinco vezes com PBS, a fim de se retirarem às bactérias que não se aderiram às células em cultivo.

Em seguida, as células foram fixadas com uma solução de ácido pícrico 1,22%, formaldeído 40% e ácido acético glacial por 10 minutos. Após esse período as células foram lavadas por duas vezes e coradas com soluções do Kit de coloração Panótico Rápido (Laboclin) por um minuto.

Decorrido esse tempo, as preparações foram lavadas, secas à temperatura ambiente ou a 37° C e observadas ao microscópio óptico, com os aumentos de 400 e 1000 vezes. Como controle das células HEp-2, reservou-se uma lamínula de células HEp-2 sem bactérias.

As amostras bacterianas que não apresentaram um padrão de adesão claramente definido após 3 horas de incubação foram submetidas a novo teste, estendendo-se o período de incubação para 6 horas. Neste caso, posteriormente à incubação inicial de 3 horas a 37° C, as monocamadas celulares foram lavadas três vezes com PBS e incubadas por um período adicional de 3 horas após ter sido adicionado novo meio MEM --SFB 2% (v/v).

Na leitura dos resultados, foram considerados os seguintes padrões de adesão:

Adesão localizada (AL): caracterizada pela formação de microcolônias de bactérias aderidas a sítios localizados da célula;

Adesão difusa (AD): com bactérias aderidas ao acaso, por toda a superfície celular;

Adesão agregativa (AA): quando as bactérias se aderem sobre a célula e nos espaços intercelulares, lembrando a disposição de tijolos empilhados (“stacked bricks”);

Adesão AL - like (ALL): quando as bactérias aderidas aparecem em microcolônias muito pequenas em menos de 1% das células, com apenas 3 horas de incubação, e quando esse período de incubação é prolongado para 6 horas essas microcolônias aparecem em agrupamentos mais frouxos, aderidos a menos de 10% das células.

5.8.2. TESTE DE INVASÃO

Os testes de invasão qualitativo e quantitativo foram realizados baseando-se na técnica descrita por Francis *et al* (1991) com algumas modificações. Para a realização destes testes, as amostras foram testadas quanto à sensibilidade à gentamicina pelo teste de difusão de disco pela técnica de Bauer *et al.* (1966).

5.8.2.1. Preparo das amostras bacterianas

As amostras de *E.coli* foram cultivadas como descrito no item 3.10.2. Para o teste de invasão quantitativo, as amostras foram diluídas em solução salina 0,85% estéril para a obtenção de uma concentração de aproximadamente $3,0 \times 10^8$ bactérias/ml.

5.8.2.2. Teste de invasão qualitativo

O teste foi realizado sob as mesmas condições descritas para o teste de adesão com a diferença que as células HEp-2 foram inoculadas com 100 µl das culturas bacterianas. Após o período de incubação a 37°C por 3 horas as células foram lavadas 4 vezes com PBS. Em seguida, 1 ml de meio MEM-SFB 10% acrescido de 100µg/ml de uma solução de gentamicina foi adicionado aos tubos que foram incubados a 37°C por mais uma hora. Após este período, o meio de cultivo foi desprezado, sendo as células lavadas por mais 4 vezes com PBS. A fixação e coloração das células foram realizadas seguindo-se a mesma metodologia do teste de adesão. Como resultado observou-se bactérias internalizadas nas células utilizadas neste estudo. Foram utilizados como controles as amostras M90T.

5.9. TESTES DE SUSCEPTIBILIDADE ANTIMICROBIANA

Os Testes de susceptibilidade antimicrobiana foram realizados pelo método de difusão em disco, em ágar de Mueller Hinton (Becton Dickinson) com discos antimicrobianos comerciais (Sanofi Diagnostics Pasteur) (Bauer et al. 1996). Os antibióticos utilizados serão aqueles recomendados para o tratamento de *Shigella*, *Salmonella*, *E.coli* e *Klebsiella* e *Pseudomonas* em conformidade com as diretrizes do Manual Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2016).

Os discos utilizados foram obtidos comercialmente (Sanofi Diagnostics Pasteur) no quantitativo de 13, compostos pelos seguintes fármacos antimicrobianos: - Aminoglicosídeos (30µg/Amicacina, 10µg/Gentamicina e 30µg/Tobramicina); - Penicilinas (10µg/Ampicilina, 10µg/Amoxicilina e piperacilicina 10µg/Piperacilina associado ao Tazobactam); - Cefalosporinas (30µg/Cefepima; 30µg/Cefazolina, 30µg/Cefepime, 30µg/Cefuroxima); - Carbapenêmicos (10µg/Iminpinem, 10µg/Meropenem); - Monobactâmicos (30µg/Aztreonam); - Fluoroquinolonas (10µg/Norfloxacino e 5µg/Ciprofloxacino/5µg/Levofloxacino) e grupo das Polimixinas (300un/Polimixina B).

Para realização desse teste, inicialmente foi feita uma suspensão bacteriana, transferindo-se os isolados para tubo contendo caldo LB, e então incubados a 37°C durante 18h a 24h para alcançar a concentração de $1,5 \times 10^8$ bactérias/mL, lidas em espectrofotômetro com absorvância de 625 nm e confirmadas através da turvação do tubo 0,5 da escala nefelométrica de McFarland. Posteriormente, uma alçada da suspensão foi transferida para placas de petri contendo meio Agar Mueller Hinton (AMH) e, com o auxílio de um carimbo

para antibiograma, foram adicionados discos impregnados com antibióticos, que então foram incubados por 37°C em estufa, por um período de 24 horas. Decorrido esse período, foram analisados os diâmetros formados ao redor dos discos, e então interpretados utilizando tabela padrão para classificar o nível de suscetibilidade aos antibióticos testados, como sensibilidade (S), ou resistência (R).

5.10. TESTE DE FORMAÇÃO DE BIOFILME

Os isolados de *Klebsiella* spp e *Pseudomonas* spp. foram inicialmente inoculados em 3mL de meio Luria (LB) e incubados em estufa a 37°C por um período de 24 horas. Em seguida 200 µL da suspensão bacteriana foi inoculada em placas de poliestireno de 96 poços, e realizados micro diluições, e lidas em espectrômetro com absorvância de 650nm, afim de se obter uma suspensão de 1×10^8 UFC/µL. Realizada as micro diluições, 200 µL da suspensão bacteriana foi inoculada em triplicada, em uma nova placa de poliestireno de 96 poços, então incubadas a 37°C durante 24 horas.

Transcorrido esse período, as suspensões bacterianas foram aspiradas e cada poço foi lavado por 3 vezes, com 200 µL de solução fisiológica estéril. Após, foi realizada a fixação com 200 µL de metanol e incubados em temperatura ambiente por 30 minutos. O metanol foi removido, a placa seca em temperatura ambiente, posteriormente foi corada com 200 µL de solução cristal violeta a 2% e incubadas a temperatura ambiente, por 30 min. A seguir as placas foram lavadas em água corrente, e secas em temperatura ambiente, acrescentado 200 µL de ácido acético.

Após esse período, foi realizada a leitura da absorvância em leitor de ELISA (MultiScan EX, LabSystem, Uniscience) a 650nm. Na leitura, foi utilizado um controle positivo (*Stafilococcus mutans* - ATCC 35668) e controle negativo (*Stafilococcus epidermidis* - ATCC 35984). O valor da absorvância de cada amostra (DOa) foi obtido da média aritmética dos valores dos 3 poços. Esse valor foi comparado com a absorvância da densidade ótica (DO controle negativo), e para determinar o grau de aderência foi utilizada a seguinte classificação:

- Não aderente: $DO_{\text{isolado}} \leq DO_{\text{c-}}$
- Fracamente aderente $DO_{\text{isolado}} < DO_{\text{c-}} \leq DO_{\text{c-}}^2$
- Moderadamente aderente: $DO_{\text{isolado}} < DO_{\text{c-}}^2 \leq DO_{\text{c-}}^4$

- Altamente aderente $DOc^{-4} \leq DOisolado$

DOc-: Densidade ótica do controle negativo.

5.11. DOSAGEM DE CD14 SOLÚVEL (sCD14).

As concentrações de sCD14 foram determinados pelo método de *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) em placas de 96 poços (*Cell Sciences e R & D Systems*). Inicialmente a placa foi sensibilizada com o anticorpo primário (*anti-human CD14 Antibody; Cat N° MAB3833; Lot. AW1091610A; R&D Systems*), diluído em tampão de carbonato-bicarbonato (0,05M; pH 9,6). Posteriormente a sensibilização, foi feito o bloqueio com tampão PBS/BSA (PBS pH 7,4; albumina bovina a 3%). Em seguida, os soros (diluídos 5,0% em PBS/BSA), dos pacientes e dos controles e o anticorpo recombinante (*Recombinant Human CD14; Cat. N°384-CD; Lot. BCS1716091; R&D Systems*) foram adicionados em cada poço da placa. Na sequência adicionou-se o anticorpo secundário (*anti-human CD14 Biotinylated Antibody; Cat N° BAR0714031; R&D Systems*). Posteriormente foi adicionado a estreptavidina e a reação foi revelada com tampão de revelação (tampão citrato-fosfato + TMB + H₂O₂ 30%) e cessada com H₂O₄ (2,0M). A leitura foi feita por meio colorimétrico (densidade óptica – DO), utilizando espectrofotômetro para leitora de placas de ELISA (*BIO-RAD Microplate Reader iMark™*) na absorvância de 450 nM.

5.12. DOSAGEM DE CITOCINAS SÉRICAS

A dosagem de citocinas foi realizada a partir das amostras de plasma dos pacientes, pela técnica de Citometria de Fluxo CBA (Cytometric Bead Array), seguindo as recomendações descritas pelo fabricante, com o Kit BD™ Human TH1/TH2/TH17 Cytokine (*Cat. N° 560484, Lot.:7184746, BD® Biosciences, San Diego, CA, USA*), onde as citocinas quantificadas foram: IL-2, IL-4, **IL-6**, **IL-10**, TNF α , IFN-g, **IL-17**. Foi utilizado também o Kit BDTM Human Inflammatory Cytokine (*Cat. N° 551811, Lot: 7216799, BD® Biosciences, San Diego, CA, USA*), onde as citocinas quantificadas foram: **IL-8**, **IL-1 β** , IL-6, IL-10, TNF e IL-12. Para o cálculo das concentrações de pg/mL e Intensidade Média de Fluorescência (MFI) de cada citocina foi utilizado o software *FCAP-Array™* (v3.0.1). Para este estudo, foram utilizadas as citocinas destacadas em negrito.

5.13. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos no decorrer do projeto foram tabelados em planilha do programa Microsoft Excel e os resultados analisados no software GraphPad Prism versão 5.0 com as variações calculadas por χ^2 . Entre múltiplas de grupos foi realizada Teste utilizado foi teste de Kruskal-Wallis juntamente com o teste de comparações multiplas de hommel, As diferenças significativas foram consideradas quando os valores de p foram menores ou iguais a 0,05.

As diferenças encontradas nas comparações múltiplas foram diferenciadas em (a) ou (b). Os resultados considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$ e intervalo de confiança (IC) de 95%. O grau de significância classificado na forma de asterisco (*) indicará $p < 0,05$; (**) $p < 0,005$ e (***) $p < 0,0005$. Em todas as análises de comparações, os testes utilizados assumiram o desvio da hipótese nula em um só sentido.

6. RESULTADOS

6.1. CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO DE ESTUDO, DADOS SOCIOECONÔMICOS.

O estudo contou com 52 pacientes de ambos os sexos, provenientes do setor de internação da FMT-HVD, tiveram as fezes coletas, material biológico necessário para realização deste estudo. Portanto, os resultados descritos a seguir serão referentes a esses pacientes.

A frequência relativa aos pacientes é de 36 (69,23%) do sexo masculino e 16 (30,76%) do sexo feminino, com média de idade de $34,8 \pm 45,7$ para os homens e $34 \pm 12,54$ para mulheres, todos com HIV/AIDS (Tabela 3).

Tabela 3. Características da população de estudo.

Características da população	(N=52)	%
Idade (média \pm DP)	$34,7 \pm 15,53$	
Sexo		
Sexo masculino	36	69,23
Sexo feminino	16	30,76

Ao que se refere ao uso da terapia antirretroviral (TARV), 50% fazem uso da terapia, destes 5,76% são mulheres e a maioria dos participantes homens com 44,23%. Em relação a contagem de carga viral (CV) e células TCD4+ a maioria dos pacientes 53,84% apresentaram >500 cópias RNA viral <200 CD4/mm³, sendo destes a maioria homens 36,53% e cerca de 17,3% mulheres, para o grupo 2 foram distribuídos 13,46% homens e 3,84% mulheres, para o grupo 3 foram observados cerca de 7,69% são homens e 5,76% são participantes mulheres, o grupo 4 é composto em grande maioria de homens 11,53% e cerca de 3,84% são mulheres (Tabela 04).

Tabela 4. Dados quanto a TARV, contagem de carga viral e células TCD4+ dos pacientes incluídos no estudo.

TARV (+)	TARV (-)	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4
n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)

Mulheres	3 (5,76)	13 (25)	9 (17,30)	2 (3,84)	3 (5,76)	2 (3,84)
Homens	23 (44,23)	13 (25)	19 (36,53)	7 (13,46)	4 (7,69)	6 (11,53)

(+) Pacientes que fazem uso de TARV; (-) Pacientes que não fazem o uso de TARV.

Grupo 1: >500cópiasRNAviral <200CD4mm³; **Grupo 2:** <500cópiasRNAviral_<200CD4mm³; **Grupo 3:** >500cópiasRNAviral_>200CD4mm³; **Grupo 4:** <500cópiasRNAviral_>200CD4mm³.

Quanto aos dados socioeconômicos a maioria dos pacientes do estudo 36,61% relatam ensino médio completo, 17,30% dos pacientes relataram ensino fundamental completo, ensino médio completo e ensino superior completo respectivamente, a minoria dos pacientes 5,76% relataram ser analfabetos e cerca de 3,34% relataram nível superior incompleto. Ao que se refere a renda cerca de 26,92% dos pacientes relataram não possuir renda, a maioria dos pacientes 34,61% relataram possuir mais que um salário mínimo, 21,15% relataram possuir dois ou mais salários mínimos, e 17,30% dos pacientes possuem salário mínimo (Gráfico 1).

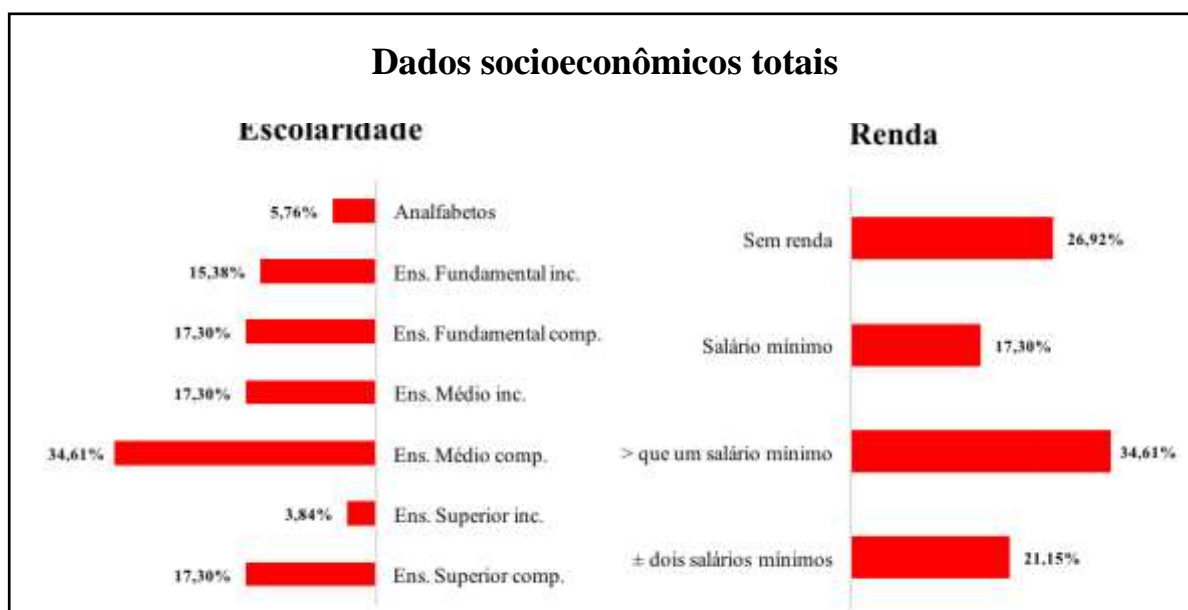


Gráfico 1. Gráfico comparativo entre escolaridade e renda média dos participantes do estudo.

Em relação aos dados sociodemográficos ao que se refere a moradia a maioria dos participantes do estudo relatam residir em casas de alvenaria o que corresponde a 71,15% do total, 19,28% relatam residir em casas mistas uma pequena parte dos participantes moram em palafitas e cerca de 3,84% dos participantes não souberam informar o tipo de moradia, isso se deve provavelmente ao fato de que a maioria desses participantes não teriam moradia fixa na cidade de Manaus. Os dados de saneamento básico demonstram que a maioria dos participantes relatam fazer uso de rede de esgoto (48,07%) e cerca de 38,46% fazem uso de

fossa séptica e 11,53% fazem uso de fossa asséptica como meio de instalação sanitária (Gráfico 2).

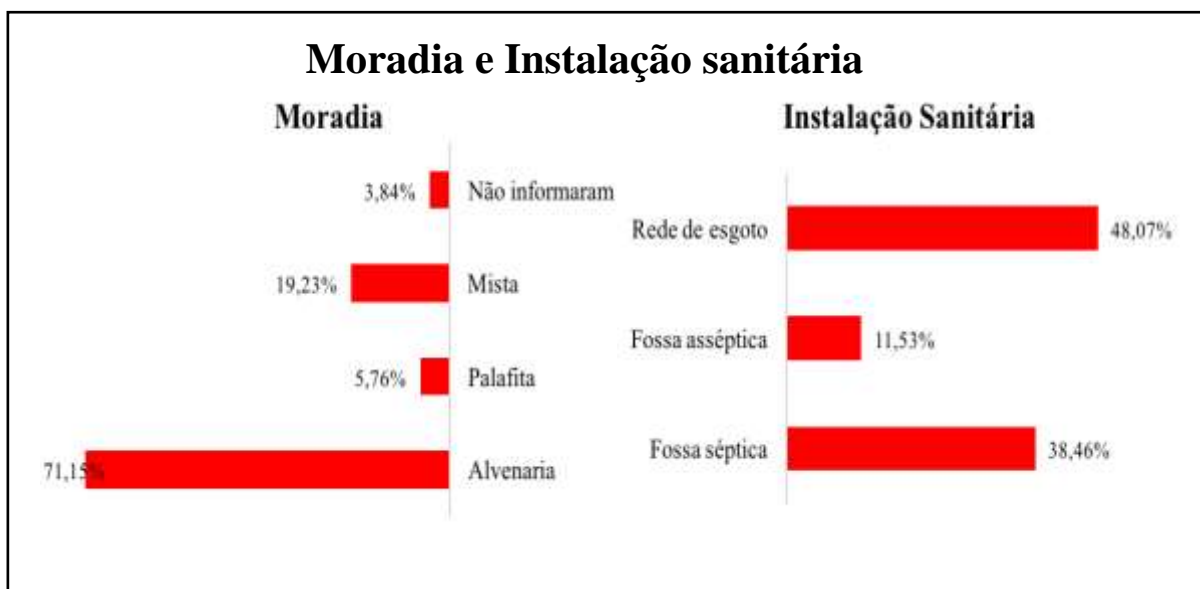


Gráfico 2. Gráfico comparativo ao que se refere a moradia e instalação sanitária dos pacientes do estudo.

Quanto ao abastecimento de água encanada 69,23% dos participantes relatam o uso, seguido de 23,07% para o uso de água de poço, 1,92% dos participantes alegaram o uso de água de rio ou igarapé respectivamente, e cerca de 3,84% dos participantes não souberam informar o abastecimento de água ao qual utilizavam. Cerca de 36,53% dos participantes relatam consumir água sem tratamento, seguido de 26,92% de consumo de água filtrada e cerca de 17,30% relatam o uso de água mineral, cerca de 7,69% fazem uso de água clorada, e 3,84% dos participantes relataram uso de água fervida ou não souberam informar qual o tipo de água consumida (Gráfico 3).

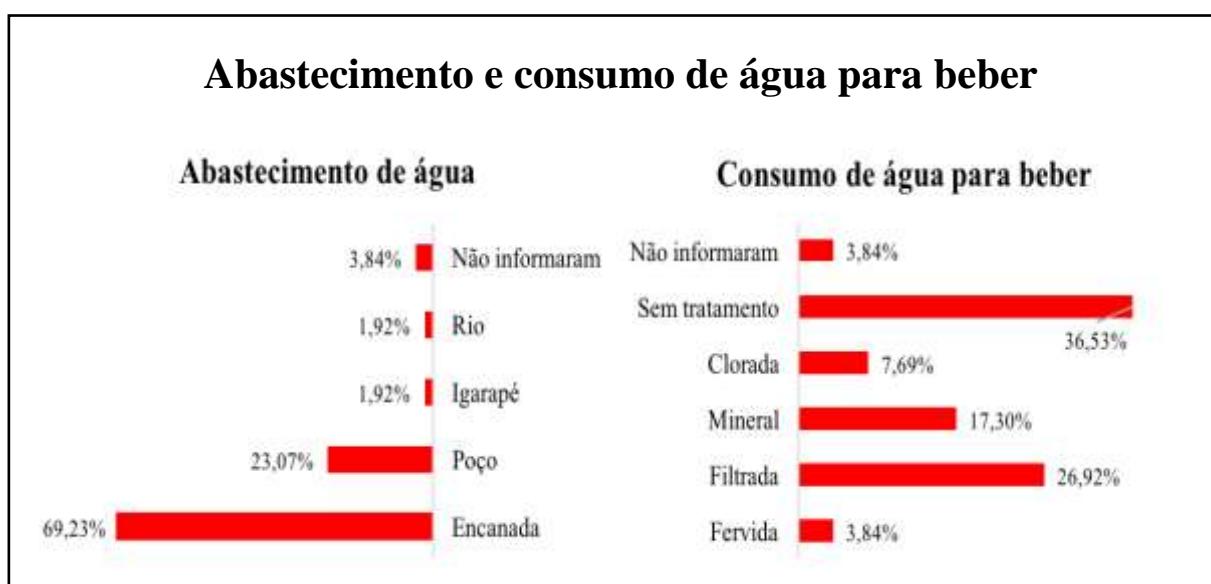


Gráfico 3. Gráfico comparativo entre o tipo de abastecimento de água e consumo de água para beber entre os participantes do estudo.

6.2. SINAIS E SINTOMAS

Os dados referentes aos sinais e a sintomatologia clínica, a maioria dos participantes apresentou algum sintoma em alguma fase da doença, 26,92% dos participantes apresentam episódios de diarreia, a maioria dos participantes do estudo 38,46% apresentam desidratação, 17,30% relatam febre, 11,53% dos pacientes apresentaram vômito, e apesar de menos frequente, 9,61% declararam a presença de sangue visível nas fezes (Gráfico 4).

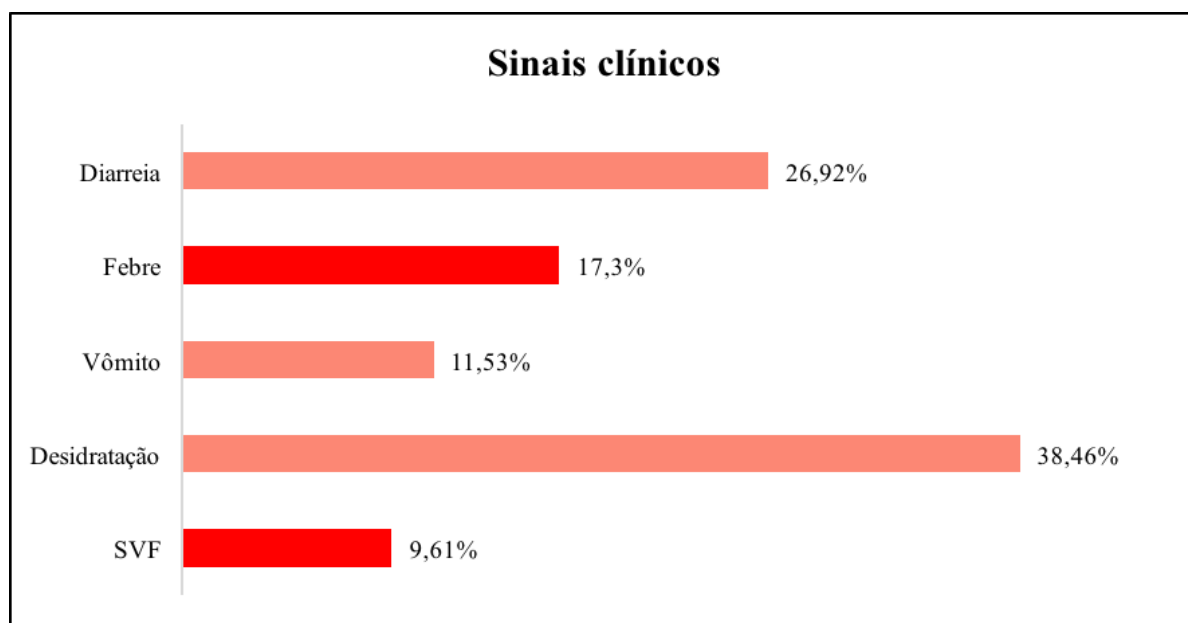


Gráfico 4. Porcentagem de sinais e sintomas nos pacientes incluídos no estudo.

*SVF: Sangue visível nas fezes; *Em vermelho claro: sinais (diagnosticados clinicamente); Vermelho escuro: sintomas relatados pelos pacientes.

6.3. GÊNEROS BACTERIANOS ENCONTRADOS NO ESTUDO

Das 52 amostras de fezes coletas, 78,84% (n= 41) das amostras foram positivas para o crescimento bacteriano, nos 21,15% (n= 11) das amostras restantes, não houve crescimento bacteriano em nenhum dos meios utilizados no estudo.

Quanto ao crescimento bacteriano, foi verificado através do teste bioquímico, predomínio dos gêneros de *E.coli* (38,46%), seguido de *Klebsiella* (15,38%), *Pseudomonas* (15,38%), *Salmonella* (3,84%), *Shigella* (1,92%), e nos 23,07% estão presentes outros gêneros bacterianos (Gráfico 5).

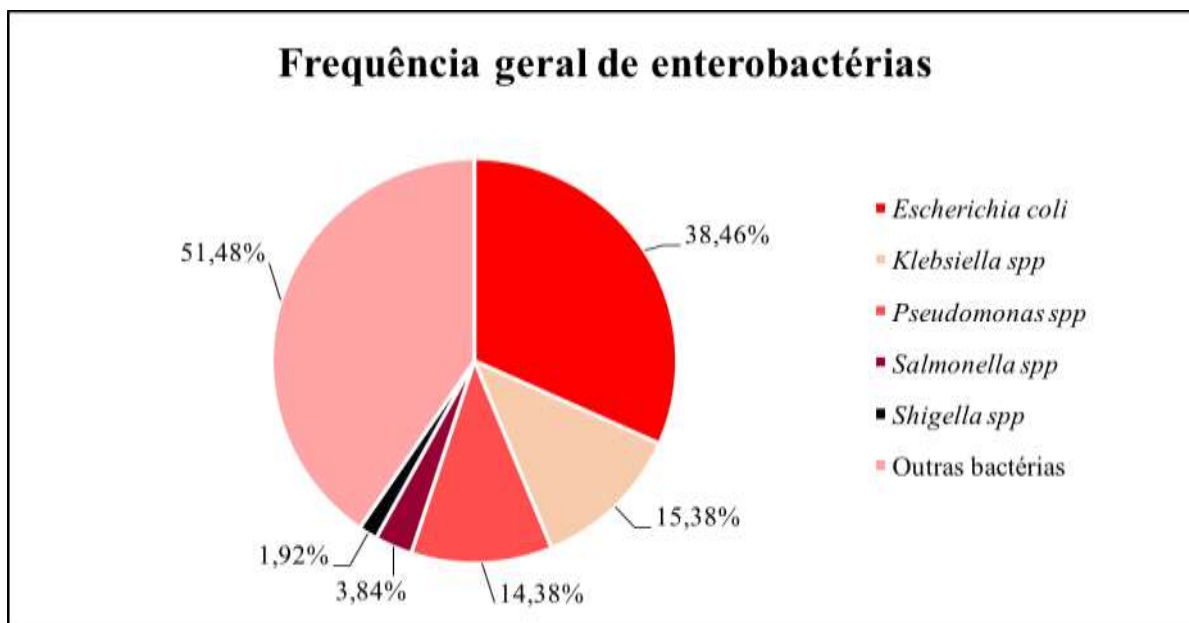


Gráfico 5. Frequência de enterobactérias nas fezes dos pacientes HIV/AIDS do estudo.

6.4. FREQUÊNCIA DE ENTEROBACTÉRIAS POTENCIALMENTE PATOGENICAS E RESISTENTES

Quanto a presença de bactérias potencialmente patogênicas e resistentes por grupo, a maioria dos participantes apresentaram mais de uma bactéria com potencial patogênico, do total de participantes do grupo 1 apresentaram *E.coli* (62,5%), *Klebsiella spp.* (42,85%) e *Salmonella spp.* (28,57%) como bactérias patogênicas. De (66,66%) o grupo 2 apresentou maior frequência de *E.coli* (33,33%), 10% do grupo 3 apresentou *Klebsiella spp* (100%) e *Pseudomonas spp* (100%) como bactérias de predominância, quanto ao grupo 4, cerca de 44,44% dos participantes, apresentaram todos os gêneros bacterianos do estudo *E.coli* (75%), *Klebsiella spp.* (25%), *Shigella spp.* (25%) e *Pseudomonas spp.* (25%). Todas as bactérias registradas na tabela foram selecionadas quanto seu perfil de resistência a mais de 3 antibióticos testados no estudo (Tabela 5).

Tabela 5. Frequência de enterobactérias por grupo experimental. Dados de resistência expressos em porcentagem, e por bactérias resistentes a mais de 1 antibiótico cada.

Grupos	Frequência de BPP* por paciente n (%)	Frequência de BPPR* (%)				
		<i>E.coli</i>	<i>Kleb spp.</i>	<i>Salm spp.</i>	<i>Shig spp.</i>	<i>Pseud spp.</i>
Grupo 1	7 (29,16)	62,5	42,85	28,57	---	---
Grupo 2	6 (66,66)	33,33	---	---	---	---
Grupo 3	2 (10)	---	100	---	---	100
Grupo 4	4 (44,44)	75	25	---	25	25

*BPP: Bactérias com potencial patogênico. *BPPR: Bactérias com potencial patogênico e resistentes aos antibióticos testados no estudo.

Grupo 1: >500cópiasRNAviral <200CD4mm³; **Grupo 2:** <500cópiasRNAviral_<200CD4mm³; **Grupo 3:** >500cópiasRNAviral_>200CD4mm³; **Grupo 4:** <500cópiasRNAviral_>200CD4mm³.

6.5. TESTE DE RESISTÊNCIA BACTERIANA (ANTIBIOGRAMA)

Devido à frequência de isolados, foram realizados um total de 40 antibiogramas. A partir dos dados referentes à sensibilidade e resistências dos isolados antimicrobianos, obteve-se os resultados de sensibilidade e resistência para 21 isolados de *E.coli*, 8 isolados de *Klebsiella* spp., 8 isolados de *Pseudomonas* spp., 2 isolados de *Salmonella* spp., 1 isolado de *Shigella* spp.

6.5.1. Resistência Bacteriana Específica

Os 20 isolados de *Escherichia coli*, apresentaram maior resistência para Cefazolina (85%), Tobramicina (90%), Ceftazidima (60%), Cefepime (60%), Nitrofuratoína (50%), Tetraciclina (55%), Cefuroxima (55%). Os isolados apresentaram maior sensibilidade para Ceftriaxona (85%), Aztreonam (90%), Clorafenicol (75%), Gentamicina (70%), Ciprofloxacina (60%) Ampicilina associado ao sulbactam (70%), Amoxicilina associado ao ácido clavulânico (55%) (Tabela 06).

Dos 8 isolados de *Klebsiella* spp., submetidos ao estudo, todos apresentaram resistência natural a Ampicilina (100%), porém todos os isolados apresentaram também resistência a Ceftazidima (100%), (50%) dos isolados apresentaram resistência a Sulfametoxazol associado ao trimetropim. Em contrapartida, os isolados (100%) foram sensíveis a Gentamicina, (87,5%) Ciprofloxacina, e (75%) foram sensíveis à Aztreonam, Meropenem, Norfloxacin e Amicacina respectivamente (Tabela 06).

Dos 8 isolados de *Pseudomonas* spp. analisados, (75%) mostrou-se resistente a Cefepime, (50%) a Ceftazidima e (25%) foi resistente a Impinmem, Ciprofloxacina e Norfloxacin respectivamente. A maioria dos isolados se apresentaram sensíveis ao demais antimicrobianos testados (Tabela 06).

Tabela 6. Resultado dos testes de resistência microbiana para os isolados de *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp. e *Pseudomonas* spp.

		<i>Escherichia coli</i>						
	Resistência	Cefazolina	Ceftazidima	Cefepime	Cefuroxima	Nitrofuratoína	Tetraciclina	Tobramicina
	Sensibilidade	Aztreonam	AMC	Ceftriaxona	Ciprofloxacina	Clorafenicol	Gentamicina	SAM
		85	60	60	55	50	55	90
		90	55	85	60	75	55	70
		<i>Klebsiella</i> spp.						
	Resistência	Ampicilina	Ceftazidima	SXT				
	Sensibilidade	Aztreonam	Amicacina	Ciprofloxacina	Gentamicina	Meropenem	Norfloxacina	
		100	100	50				
		75	75	100	87	75	75	
		<i>Pseudomonas</i> spp.						
	Resistência	Cefepime	Ceftazidima	Ciprofloxacina	Impinemem	Norfloxacina		
	Sensibilidade	Amicacina	Aztreonam	Gentamicina	Levofloxacina	Meropenem	PPT	Polimixina B Tobramicina
		75	50	25	25	25		
		100	100	100	100	100	100	100

Dados expressos em porcentagem. **AMC:** Amoxicilina+ácido clavulânico; **SAM:** Ampicilina+sulbactam; **SXT:** Sulfametoxazol associado ao trimetropim; **PPT:** Piperaciclina+ tazobactam.

Os 2 isolados de *Salmonella* spp. analisados, foram resistentes a Cefepime, Ceftazidima e Tobramicina respectivamente. Tais apresentaram-se sensíveis aos antimicrobianos testados, os isolados foram sensíveis a Amicacina, Ciprofloxacina, Gentamicina, Meropenem, Norfloxacina, Piperaciclina associado ao Tazobactam e Polimixina B respectivamente. O isolado de *Shigella* spp, demonstrou resistencia a Cefepime, Ceftazidima, Ciprofloxacina, Meropenem, Norfloxacina e Tobramicina respectivamente. Quanto a sensibilidade, foi observado que esse isolado foi sensível a Amicacina, Gentamicina, Piperaciclina associado a Tazobactam e Polimixina B respectivamente (Tabela 7).

Tabela 7. Perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos nos isolados de *Salmonella* spp. e *Shigella* spp.

Antibióticos	<i>Salmonella</i> spp.	<i>Shigella</i> spp.
Amicacina	Sensíveis	Sensível
Cefepime	Resistente	Resistente
Ceftazidima	Resistente	Resistente
Ciprofloxacina	Sensíveis	Resistente
Gentamicina	Sensíveis	Sensível
Meropenem	Sensíveis	Resistente
Norfloxacina	Sensíveis	Resistente
Piperaciclina+ tazobactam	Sensíveis	Sensível
Polimixina B	Sensíveis	Sensível
Tobramicina	Resistente	Resistente

6.6. ENSAIO DE PRODUÇÃO DE BIOFILME

Os isolados de *Klebsiella spp.* testadas para a produção de biofilme, mostraram potenciais diferentes para a formação de biofilme sob as mesmas condições de experimentação. A maior produção de biofilme entre as amostras testadas, foi do isolado K0013, seguido pelo K0009, K0020 e K0028 respectivamente. Os isolados K0020B, K0060, K0063 e K0041 apresentaram capacidade moderada para a produção de biofilme, se comparado com a cepa controle. Os isolados de *Klebsiella spp.* positivas para a formação de biofilme, foram aquelas que produziram $DO \geq 0,200$ (Gráfico 6).

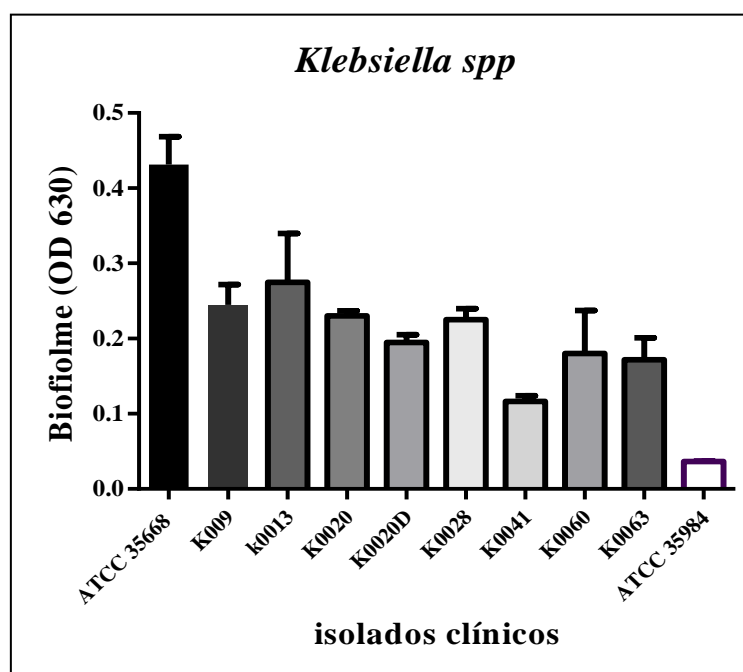


Gráfico 6. Capacidade de formação de biofilme para as cepas de *Klebsiella spp.*

Legenda: *CP: Controle positivo (*S. mutans* ATCC 35668); *CN: Controle negativo (*S. epidermidis* ATCC 35984).

Para os isolados de *Pseudomonas spp.*, foi observado diferentes potenciais para a formação de biofilme. Os resultados demonstram que os isolados clínicos P0009, P0028 e P0030 apresentaram alta capacidade de formar biofilme. Outro isolado P0009 apresentou capacidade fraca para a produção de biofilme. Outro dois isolados P0030B e P0030C mostrou-se com capacidade moderada e fraca, respectivamente. Os isolados P0010B e P0010 apresentaram capacidade moderada para a produção de biofilme se comparados com a cepa controle. Os isolados de *Pseudomonas* capazes de formar biofilme forte, são aqueles que produzem $OD \geq 0,200$ (Gráfico 7).

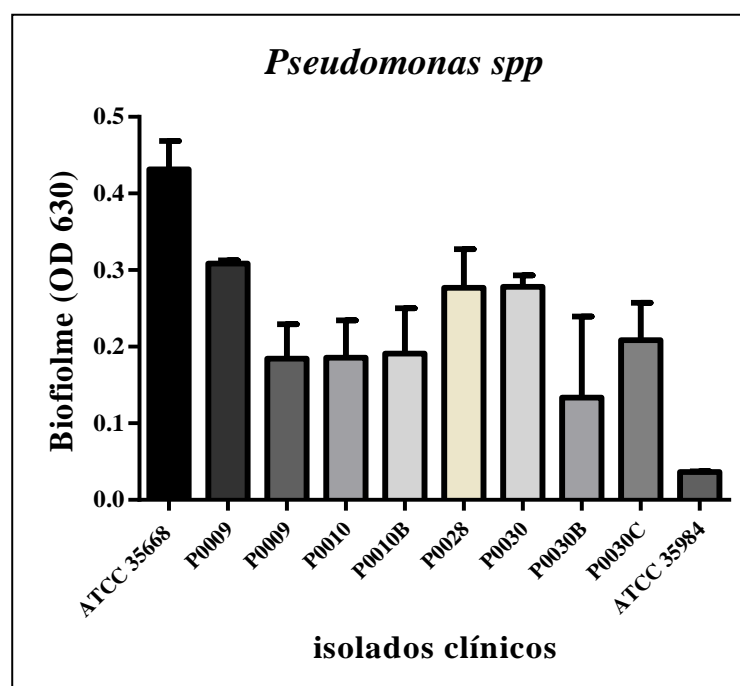


Gráfico 7. Capacidade de formação de biofilme para as cepas de *Pseudomonas* spp.

Legenda: *CP: Controle positivo (*S. mutans* ATCC 35668); *CN: Controle negativo (*S. epidermidis* ATCC 35984).

6.7. ENSAIO DE ADESÃO

Foi avaliado o perfil de adesão dos 20 isolados de *E.coli*, durante ensaios de 3h e 6h de incubação para cada isolado. Os dados demonstram que dos 20 isolados de *E.coli*, durante os testes de 3h, (30%) apresentou perfil de adesão indetectável, (20%) apresentou perfil de adesão atípico (não comum ao gênero), (30%) apresentaram perfil de adesão difusa, (10%) dos isolados de *E.coli*, apresentou nenhuma célula na lamínula e (10%) não apresentou nenhum perfil de adesão (Tabela 8).

Tabela 8. Fenótipo de adesão dos isolados de *E.coli* identificados em cada paciente.

Amostra	Gênero bacteriano	Ensaio	Tempo	Perfil	Figura
HIV INT 0002a	<i>E.coli</i>	Adesão	3h	perfil de adesão indetectável	08
HIV INT 0002b	<i>E.coli</i>	Adesão	3h	perfil de adesão atípico	08
HIV INT 0002c	<i>E.coli</i>	Adesão	3h	perfil de adesão atípico	08
HIV INT 0002d	<i>E.coli</i>	Adesão	3h	perfil de adesão atípico	08
HIV INT 0002e	<i>E.coli</i>	Adesão	3h	sem célula	08
HIV INT 0006a	<i>E.coli</i>	Adesão	3h	adesão difusa	09
HIV INT 0006b	<i>E.coli</i>	Adesão	3h	perfil de adesão indetectável	09
HIV INT 0006c	<i>E.coli</i>	Adesão	3h	adesão difusa	09
HIV INT 0006d	<i>E.coli</i>	Adesão	3h	perfil de adesão indetectável	09
HIV INT 0009	<i>E.coli</i>	Adesão	3h	adesão difusa	10

HIV INT 0032	<i>E.coli</i>	Adesão	3h	sem célula	/
HIV INT 0044a	<i>E.coli</i>	Adesão	3h	adesão difusa	11
HIV INT 0044b	<i>E.coli</i>	Adesão	3h	adesão difusa	11
HIV INT 0046a	<i>E.coli</i>	Adesão	3h	perfil de adesão atípico	12
HIV INT 0046b	<i>E.coli</i>	Adesão	3h	perfil de adesão indetectável	12
HIV INT 0046c	<i>E.coli</i>	Adesão	3h	perfil de adesão indetectável	12
HIV INT 0063a	<i>E.coli</i>	Adesão	3h	perfil de adesão atípico	13
HIV INT 0063b	<i>E.coli</i>	Adesão	3h	adesão difusa	13
HIV INT 0064	<i>E.coli</i>	Adesão	3h	sem adesão	14
HIV INT 00101	<i>E.coli</i>	Adesão	3h	sem adesão	15

6.7.1. Ensaio de adesão 3H dos isolados de *E.coli* identificados no estudo.

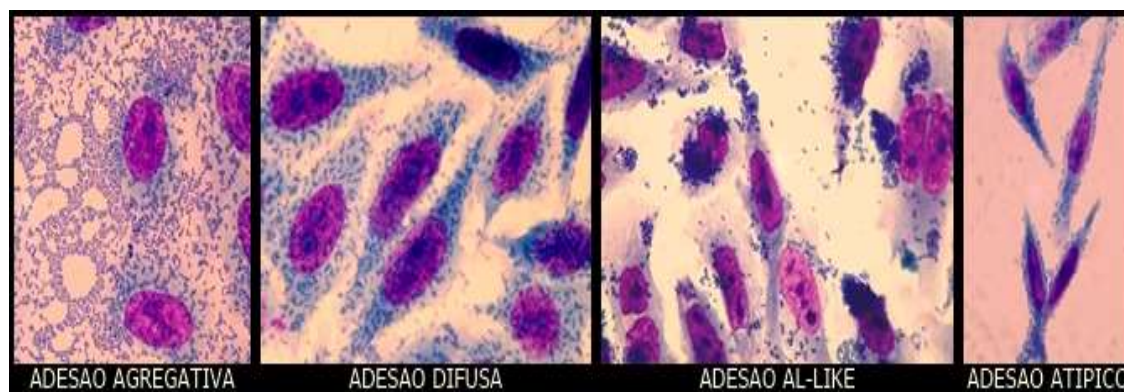


Figura 7. Perfil de adesão das cepas positivas para os patótipos de *E.coli*. a) Adesão difusa; b) Perfil de adesão atípico; c). Sem células; d) Perfil de adesão atípico; 0002e) Adesão difusa. Células Hep-2 cultivadas foram incubadas com bactérias por 3 horas com Meio MEM-SFB. Após, as células foram lavadas e fixadas com Ac. Pírico, Ac. Acético glacial. Após foram coradas pelo Kit Panótico (Laboclin).

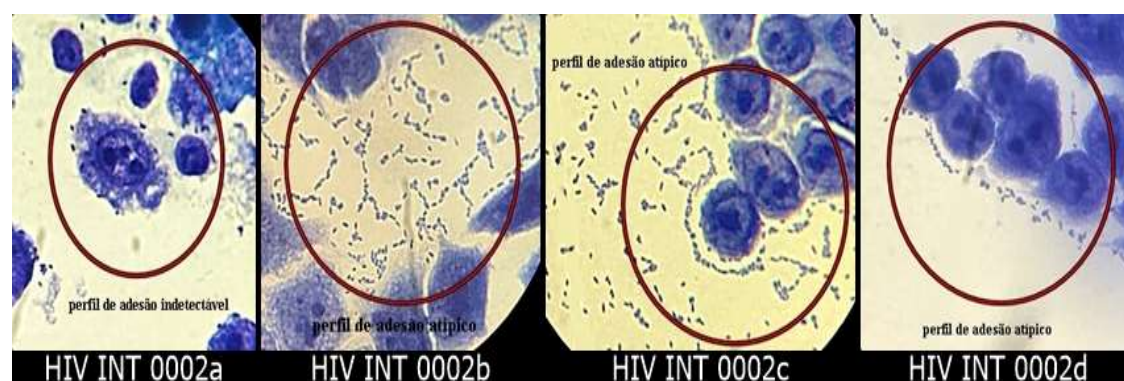


Figura 8: Perfil de adesão dos isolados de *E.coli* do paciente (HIV INT 0002). 0002a) Adesão indetectável; 0002b) Perfil de adesão atípico; 0002c) perfil de adesão indetectável; 0002d) Perfil de adesão atípico. Células Hep-2 cultivadas foram incubadas com bactérias por 3 horas com Meio MEM-SFB. Após, as células foram lavadas e fixadas com Ac. Pírico, Ac. Acético glacial. Após foram coradas pelo Kit Panótico (Laboclin).

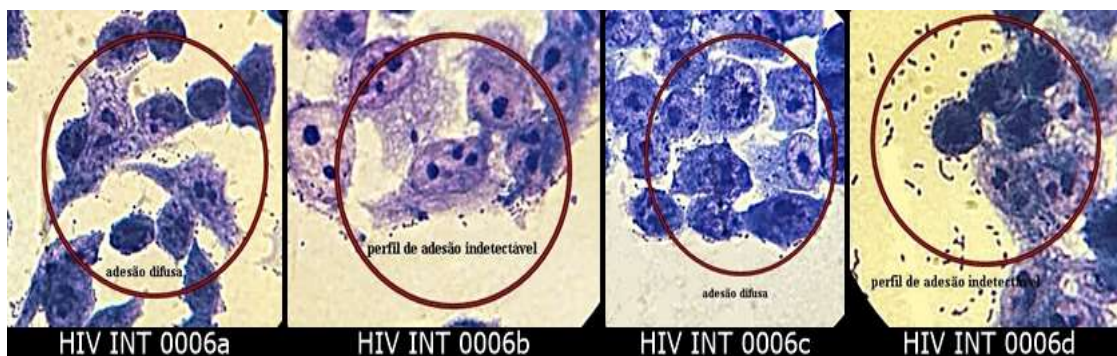


Figura 9. Perfil de adesão dos isolados de *E.coli* do paciente (HIV INT 0006). 0006a) Adesão difusa; 0006b) Perfil de adesão indetectável; 0006c) perfil de adesão difusa; 0006d) Perfil de adesão indetectável. Células Hep-2 cultivadas foram incubadas com bactérias por 3 horas com Meio MEM-SFB. Após, as células foram lavadas e fixadas com Ac. Pícrico, Ac. Acético glacial. Após foram coradas pelo Kit Panótico (Laboclin).

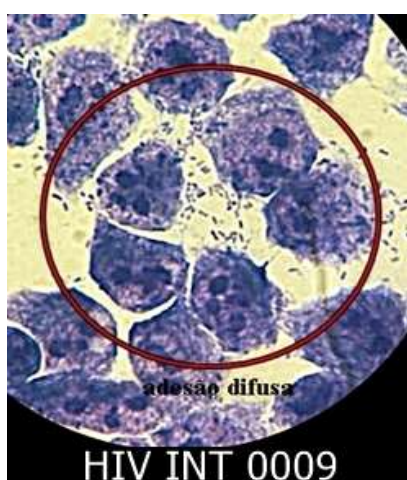


Figura 10. Perfil de adesão dos isolados de *E.coli* do paciente (HIV INT 0009). **0009**) Perfil de adesão difusa. Células Hep-2 cultivadas foram incubadas com bactérias por 3 horas com Meio MEM-SFB. Após, as células foram lavadas e fixadas com Ac. Pícrico, Ac. Acético glacial. Após foram coradas pelo Kit Panótico (Laboclin).

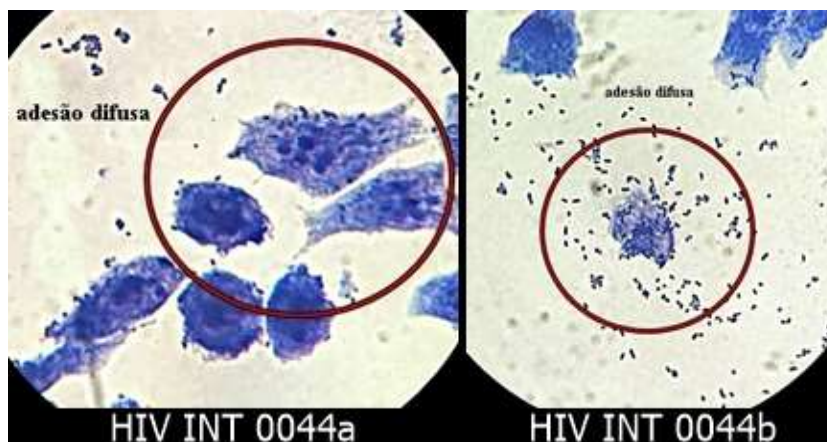


Figura 11. Perfil de adesão dos isolados de *E.coli* do paciente (HIV INT 0044).0044a) Perfil de adesão difusa; 0044b) Perfil de adesão difusa. Células Hep-2 cultivadas foram incubadas com bactérias por 3 horas com Meio MEM-SFB. Após, as células foram lavadas e fixadas com Ac. Pícrico, Ac. Acético glacial. Após foram coradas pelo Kit Panótico (Laboclin).

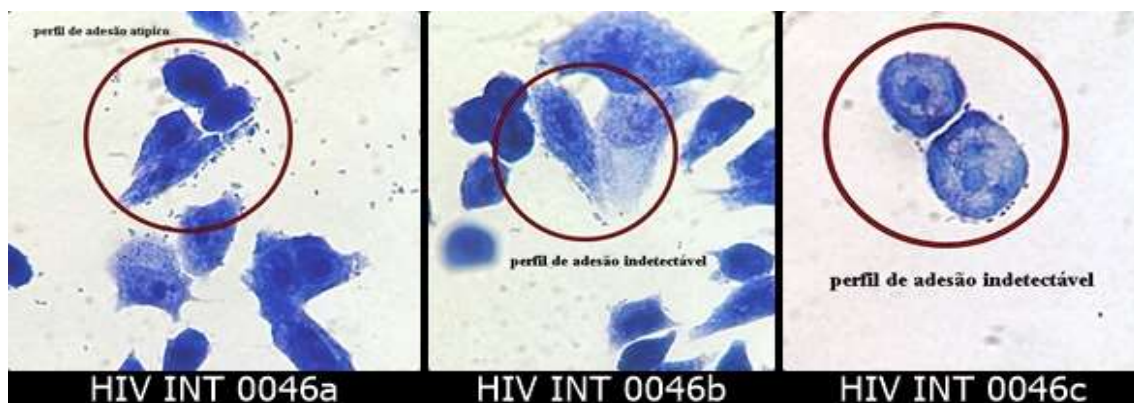


Figura 12. Perfil de adesão dos isolados de *E.coli* do paciente (HIV INT 0046). 0046a) Perfil de adesão atípico; 0046b) Perfil de adesão indetectável; 0046c) Perfil de adesão indetectável. Células Hep-2 cultivadas foram incubadas com bactérias por 3 horas com Meio MEM-SFB. Após, as células foram lavadas e fixadas com Ac. Pícrico, Ac. Acético glacial. Após foram coradas pelo Kit Panótico (Laboclin).

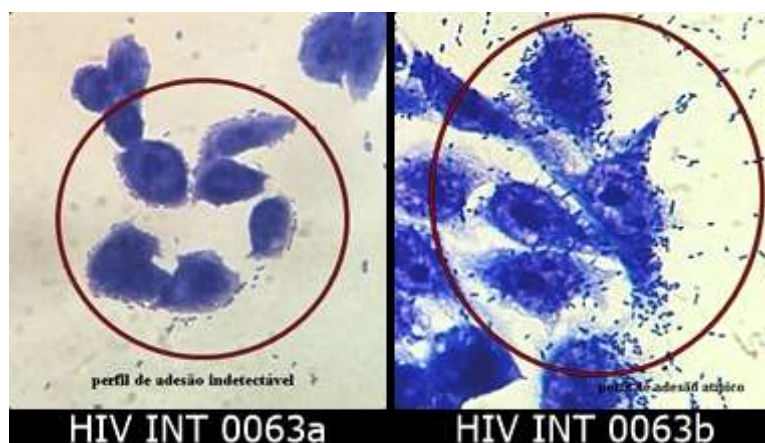


Figura 13: Perfil de adesão dos isolados de *E.coli* do paciente (HIV INT 0063). 0063a) Perfil de adesão indetectável; 0044b) Perfil de adesão atípico. Células Hep-2 cultivadas foram incubadas com bactérias por 3 horas com Meio MEM-SFB. Após, as células foram lavadas e fixadas com Ac. Pícrico, Ac. Acético glacial. Após foram coradas pelo Kit Panótico (Laboclin).



Figura 14. Perfil de adesão dos isolados de *E.coli* do paciente (HIV INT 0064). 0044a) Sem perfil de adesão. Células Hep-2 cultivadas foram incubadas com bactérias por 3 horas com Meio MEM-SFB. Após, as células foram lavadas e fixadas com Ac. Pícrico, Ac. Acético glacial. Após foram coradas pelo Kit Panótico (Laboclin).

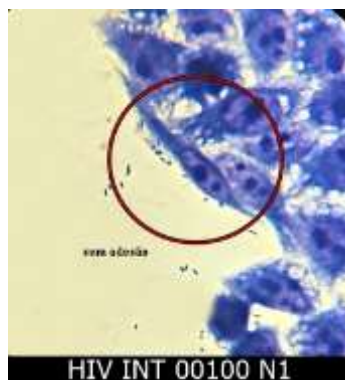


Figura 15. Perfil de adesão dos isolados de *E.coli* do paciente (HIV INT 00100). 00100) sem perfil de adesão. Células Hep-2 cultivadas foram incubadas com bactérias por 3 horas com Meio MEM-SFB. Após, as células foram lavadas e fixadas com Ac. Pícrico, Ac. Acético glacial. Após foram coradas pelo Kit Panótico (Laboclin).

Os 20 isolados de *E.coli* foram submetidos ao teste de 6H de adesão, os resultados demonstram que a maioria (60%) apresentou mudança no perfil de adesão, (55%) apresentou perfil de adesão difuso, cerca de (15%) apresentou um perfil de adesão atípico, (5%) apresentou perfil de adesão agregativo, (20%) apresentou nenhuma células presentes na lâmina, (5%) não apresentou perfil de adesão, e 1 amostra apresentou um perfil inconclusivo no teste, possivelmente por estresse celular causado pelo tempo de exposição da célula ao teste (Tabela 9).

Tabela 9. Fenótipo de adesão de 6horas, dos isolados de *E.coli* identificados em cada paciente.

Amostra	Gênero bacteriano	Ensaio	Tempo	Perfil	Figura
HIV INT 0002a	<i>E.coli</i>	Adesão	6h	adesão difusa	16
HIV INT 0002b	<i>E.coli</i>	Adesão	6h	perfil de adesão atípico	16
HIV INT 0002c	<i>E.coli</i>	Adesão	6h	sem células	/
HIV INT 0002d	<i>E.coli</i>	Adesão	6h	Inconclusiva	16
HIV INT 0002e	<i>E.coli</i>	Adesão	6h	sem célula	/
HIV INT 0006a	<i>E.coli</i>	Adesão	6h	perfil de adesão atípica	17
HIV INT 0006b	<i>E.coli</i>	Adesão	6h	adesão difusa	17
HIV INT 0006c	<i>E.coli</i>	Adesão	6h	adesão difusa	17
HIV INT 0006d	<i>E.coli</i>	Adesão	6h	adesão agregativa	17
HIV INT 0009	<i>E.coli</i>	Adesão	6h	perfil de adesão atípico	18
HIV INT 0032	<i>E.coli</i>	Adesão	6h	sem células	/
HIV INT 0044a	<i>E.coli</i>	Adesão	6h	adesão difusa	19
HIV INT 0044b	<i>E.coli</i>	Adesão	6h	adesão difusa	19
HIV INT 0046a	<i>E.coli</i>	Adesão	6h	sem células	20
HIV INT 0046b	<i>E.coli</i>	Adesão	6h	adesão difusa	20
HIV INT 0046c	<i>E.coli</i>	Adesão	6h	adesão difusa	20
HIV INT 0063a	<i>E.coli</i>	Adesão	6h	adesão difusa	21
HIV INT 0063b	<i>E.coli</i>	Adesão	6h	adesão difusa	21

HIV INT 0064	<i>E.coli</i>	Adesão	6h	adesão difusa	22
HIV INT 00101	<i>E.coli</i>	Adesão	6h	adesão difusa	23

6.7.2. Ensaio de adesão 6H com os isolados de *E.coli* encontrados no estudo.

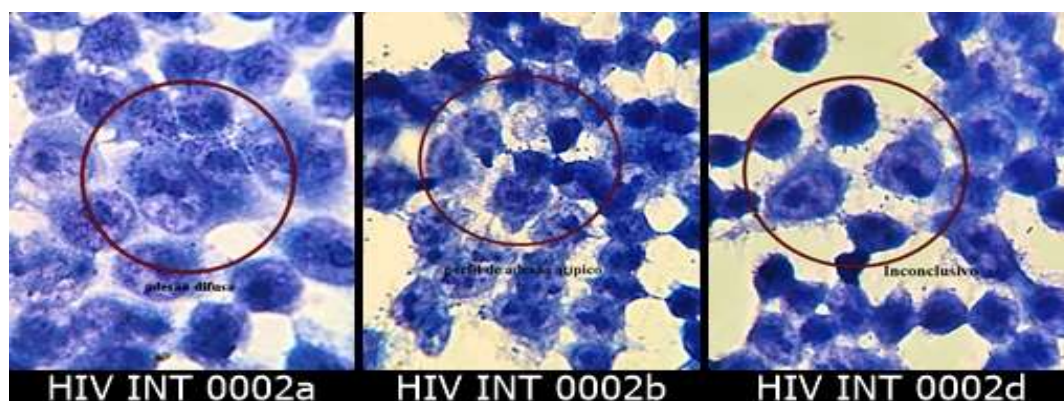


Figura 16. Perfil de adesão do isolado de *E.coli* do paciente (HIV INT 0002). 0002a) Adesão difusa; 0002b) Perfil de adesão atípico; 0002c). Sem células; 0002d) Perfil de adesão inconclusivo. Células Hep-2 cultivadas foram incubadas com bactérias por 6 horas com Meio MEM-SFB. Após, as células foram lavadas e fixadas com Ac. Pícrico, Ac. Acético glacial. Após foram coradas pelo Kit Panótico (Laboclin).

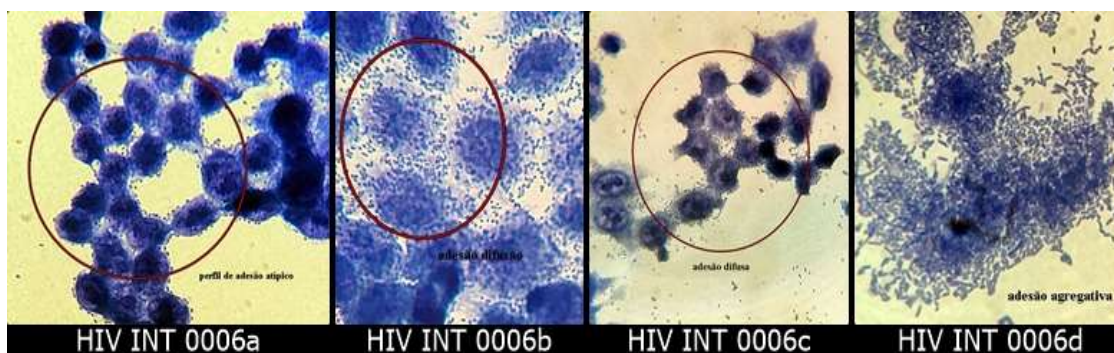


Figura 17. Perfil de adesão do isolado de *E.coli* do paciente (HIV INT 0006). 0006a) Perfil de adesão atípico. 0006b) Perfil de adesão difusa 0006c) Perfil de adesão difusa. 0002d) Perfil de adesão agregativa. Células Hep-2 cultivadas foram incubadas com bactérias por 6 horas com Meio MEM-SFB. Após, as células foram lavadas e fixadas com Ac. Pícrico, Ac. Acético glacial. Após foram coradas pelo Kit Panótico (Laboclin).

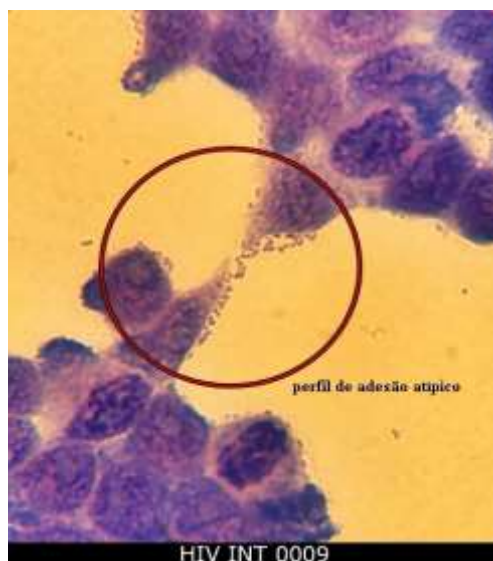


Figura 18. Perfil de adesão do isolado de *E.coli* do paciente (HIV INT 0009). 0009) Perfil de adesão atípico. Células Hep-2 cultivadas foram incubadas com bactérias por 6 horas com Meio MEM-SFB. Após, as células foram lavadas e fixadas com Ac. Pícrico, Ac. Acético glacial. Após foram coradas pelo Kit Panótico (Laboclin).

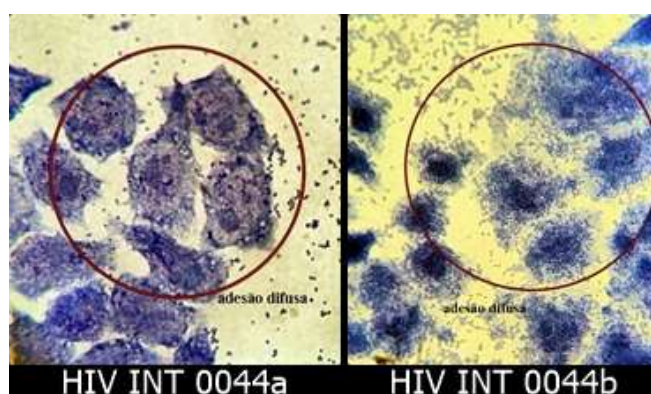


Figura 19. Perfil de adesão dos isolados de *E.coli* do paciente (HIV INT 0044). 00044a) Perfil de adesão difusa. 0044b) Perfil de adesão difusa. Células Hep-2 cultivadas foram incubadas com bactérias por 6 horas com Meio MEM-SFB. Após, as células foram lavadas e fixadas com Ac. Pícrico, Ac. Acético glacial. Após foram coradas pelo Kit Panótico (Laboclin).

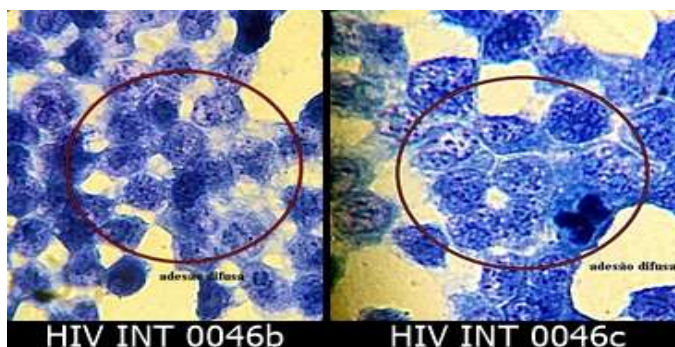


Figura 20. Perfil de adesão dos isolados de *E.coli* do paciente (HIV INT 0046). 0046a) Adesão difusa. 0046b) sem células na lamínula 00046c) Perfil de adesão difusa. Células Hep-2 cultivadas foram incubadas com bactérias por 6 horas com Meio MEM-SFB. Após, as células foram lavadas e fixadas com Ac. Pícrico, Ac. Acético glacial. Após foram coradas pelo Kit Panótico (Laboclin).

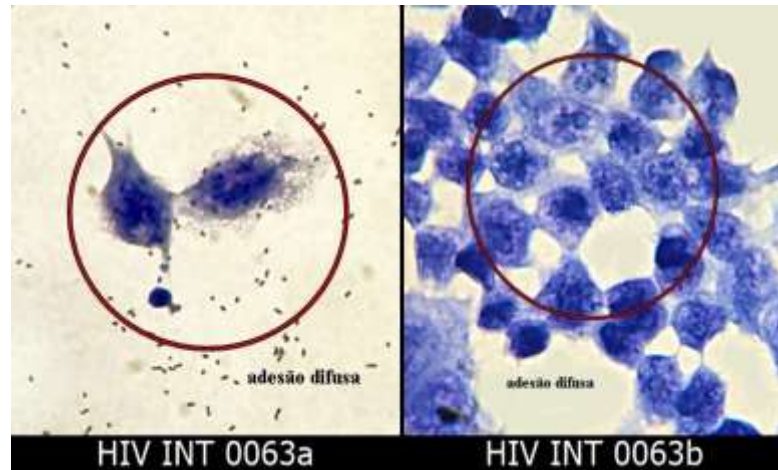


Figura 21. Perfil de adesão dos isolados de *E.coli* do paciente (HIV INT 0063). 0063a) Perfil de adesão difusa. 0063b) Perfil de adesão difusa. Células Hep-2 cultivadas foram incubadas com bactérias por 3 horas com Meio MEM-SFB. Após, as células foram lavadas e fixadas com Ac. Pírico, Ac. Acético glacial. Após foram coradas pelo Kit Panótico (Laboclin).

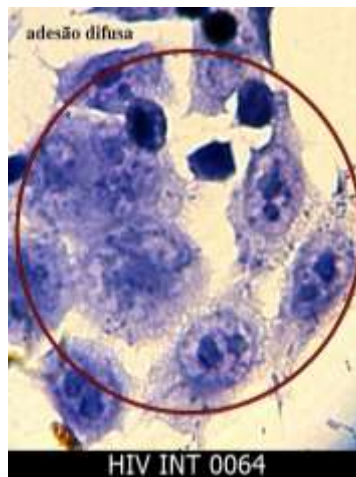


Figura 22. Perfil de adesão do isolado de *E.coli* do paciente (HIV INT 0064). 0064a) Adesão difusa. Células Hep-2 cultivadas foram incubadas com bactérias por 6 horas com Meio MEM-SFB. Após, as células foram lavadas e fixadas com Ac. Pírico, Ac. Acético glacial. Após foram coradas pelo Kit Panótico (Laboclin).

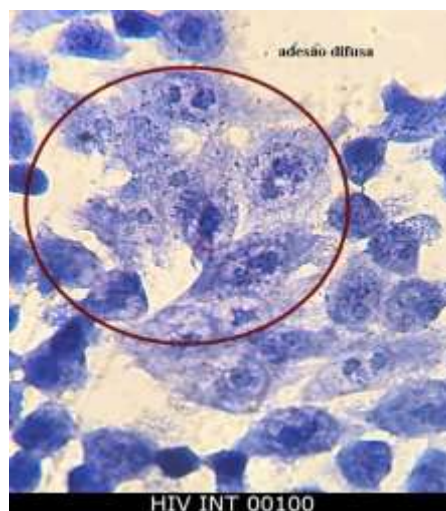


Figura 23. Perfil de adesão do isolado de *E.coli* do paciente (HIV INT 00100). 00100a) Adesão difusa. Células Hep-2 cultivadas foram incubadas com bactérias por 6 horas com Meio MEM-SFB. Após, as células foram lavadas e fixadas com Ac. Pírico, Ac. Acético glacial. Após foram coradas pelo Kit Panótico (Laboclin).

Os 8 isolados de *Klebsiella* spp submetidos ao experimento, durante 3h de teste, a maioria (62,5%) apresentou perfil padrão de adesão agregativo, (12,5%) apresentou perfil de adesão difusa, em (12,5%) não houve presença de células na lamínula. Durante os experimentos de 6 horas de incubação, (50%) não apresentou células na lamínula, apenas (10%) dos isolado de *Klebsiella* spp. apresentaram capacidade de adesão agregativa, cerca de (10%) apresentou adesão difusa (Tabela 10).

Tabela 10. Fenótipo de adesão dos isolados de *Klebsiella* spp. identificados em cada paciente.

Amostra	Gênero bacteriano	Ensaio	Período de incubação	Perfil de Adesão	Figura
HIV INT 0009	<i>Klebsiella</i> spp	Adesão	3h	adesão agregativo	24
HIV INT 0013	<i>Klebsiella</i> spp	Adesão	3h	adesão agregativo	24
HIV INT 0020D	<i>Klebsiella</i> spp	Adesão	3h	adesão agregativa	25
HIV INT 0020	<i>Klebsiella</i> spp	Adesão	3h	adesão agregativa	25
HIV INT 0028	<i>Klebsiella</i> spp	Adesão	3h	sem células	26
HIV INT 0041	<i>Klebsiella</i> spp	Adesão	3h	adesão difusa	26
HIV INT 0060	<i>Klebsiella</i> spp	Adesão	3h	adesão agregativa	27
HIV INT 0063	<i>Klebsiella</i> spp	Adesão	3h	perfil de adesão atípico	27
HIV INT 0009	<i>Klebsiella</i> spp	Adesão	6h	sem célula	28
HIV INT 0013	<i>Klebsiella</i> spp	Adesão	6h	adesão agregativa	28
HIV INT 0020D	<i>Klebsiella</i> spp	Adesão	6h	sem célula	29
HIV INT 0020	<i>Klebsiella</i> spp	Adesão	6h	adesão agregativa	29
HIV INT 0028	<i>Klebsiella</i> spp	Adesão	6h	sem células	30
HIV INT 0041	<i>Klebsiella</i> spp	Adesão	6h	adesão difusa	30
HIV INT 0060	<i>Klebsiella</i> spp	Adesão	6h	sem células	31
HIV INT 0063	<i>Klebsiella</i> spp	Adesão	6h	adesão difusa	31

6.7.3. Ensaio de adesão 3H dos isolados de *Klebsiella* spp. identificados no estudo.

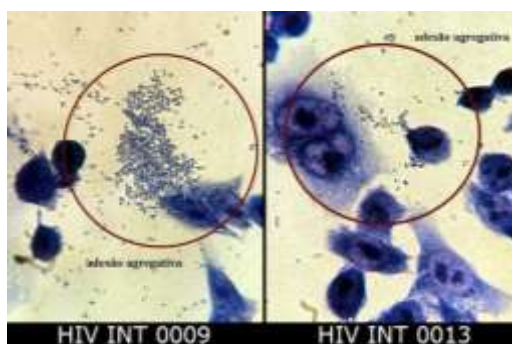


Figura 24. Perfil de adesão dos paciente com presença de isolados de *Klebsiella* spp. 0009) Adesão Agregativa; 0013) Adesão Agregativa. Células Hep-2 cultivadas foram incubadas com bactérias por 3 horas com Meio MEM-SFB. Após, as células foram lavadas e fixadas com Ac. Pícrico, Ac. Acético glacial. Após foram coradas pelo Kit Panótico (Laboclin).

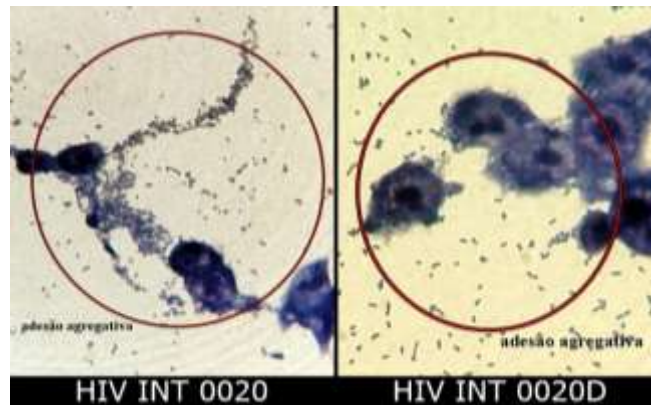


Figura 25. Perfil de adesão dos paciente com presença de isolados de *Klebsiella* spp. 0020) Adesão Agregativa; 0020D) Adesão Agregativa. Células Hep-2 cultivadas foram incubadas com bactérias por 3 horas com Meio MEM-SFB. Após, as células foram lavadas e fixadas com Ac. Pícrico, Ac. Acético glacial. Após foram coradas pelo Kit Panótico (Laboclin).

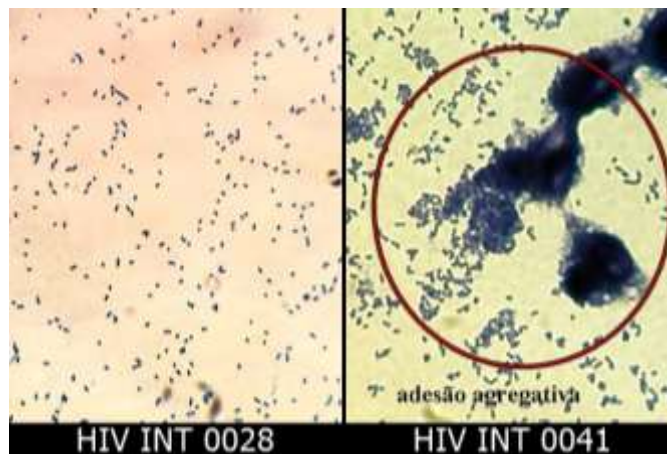


Figura 26. Perfil de adesão dos pacientes com presença de isolados de *Klebsiella* spp. 0028) Sem célula na lamínula; 0041) Adesão Agregativa; Hep-2 cultivadas foram incubadas com bactérias por 3 horas com Meio MEM-SFB. Após, as células foram lavadas e fixadas com Ac. Pícrico, Ac. Acético glacial. Após foram coradas pelo Kit Panótico (Laboclin).

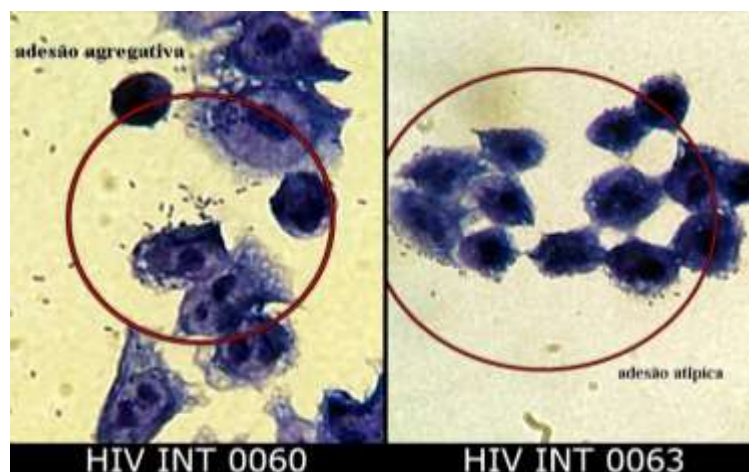


Figura 27. Perfil de adesão dos pacientes com presença de isolados de *Klebsiella* spp. 0060) Adesão Agregativa; 0063) Perfil de adesão atípica. Células Hep-2 cultivadas foram incubadas com bactérias por 3 horas com Meio MEM-SFB. Após, as células foram lavadas e fixadas com Ac. Pícrico, Ac. Acético glacial. Após foram coradas pelo Kit Panótico (Laboclin).

6.7.4. Ensaio de adesão de 6H dos isolados de *Klebsiella* spp. identificados no estudo.

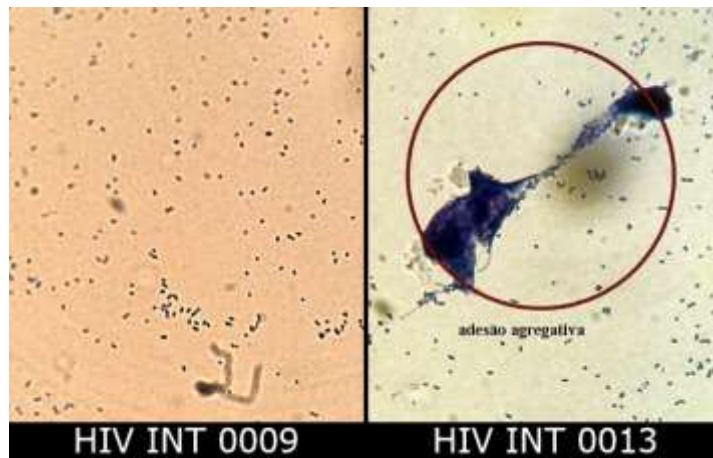


Figura 28. Perfil de adesão dos paciente com presença de isolados de *Klebsiella* spp. 0009) Sem células na lâmina; 0013) Adesão Agregativa. Células Hep-2 cultivadas foram incubadas com bactérias por 3 horas com Meio MEM-SFB. Após, as células foram lavadas e fixadas com Ac. Pícrico, Ac. Acético glacial. Após foram coradas pelo Kit Panótico (Laboclin).

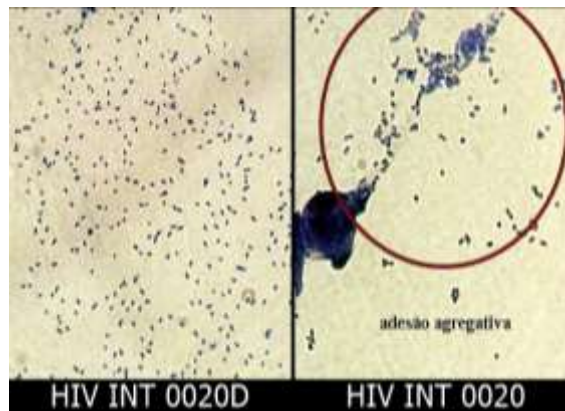


Figura 29. Perfil de adesão dos paciente com presença de isolados de *Klebsiella* spp. 0020) Adesão Agregativa; 0020D) sem células na lâmina. Células Hep-2 cultivadas foram incubadas com bactérias por 3 horas com Meio MEM-SFB. Após, as células foram lavadas e fixadas com Ac. Pícrico, Ac. Acético glacial. Após foram coradas pelo Kit Panótico (Laboclin).

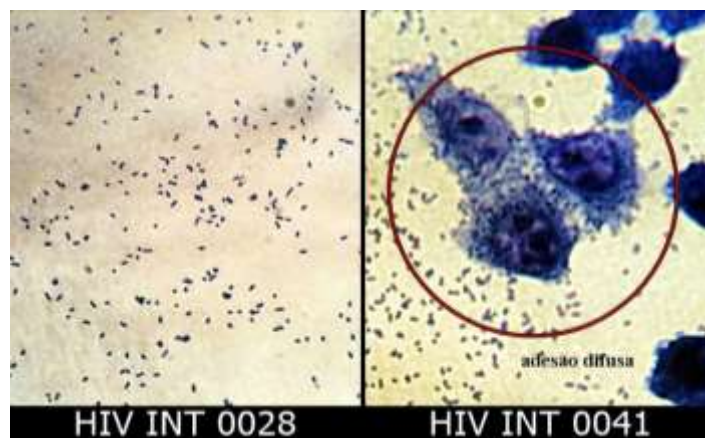


Figura 30. Perfil de adesão dos pacientes com presença de isolados de *Klebsiella* spp. 0028) Sem célula na lamínula; 0041) Adesão Agregativa; Hep-2 cultivadas foram incubadas com bactérias por 3 horas com Meio MEM-SFB. Após, as células foram lavadas e fixadas com Ac. Pícrico, Ac. Acético glacial. Após foram coradas pelo Kit Panótico (Laboclin).

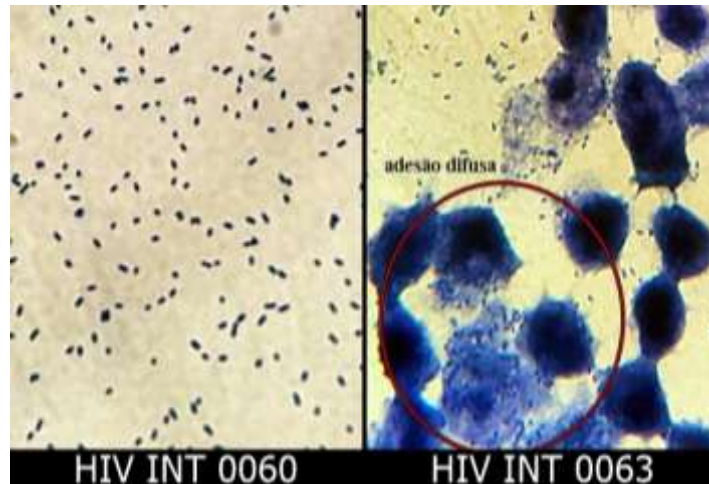


Figura 31. Perfil de adesão dos pacientes com presença de isolados de *Klebsiella* spp. 0060) Sem células na lâmina; 0063) Perfil de adesão difusa. Células Hep-2 cultivadas foram incubadas com bactérias por 3 horas com Meio MEM-SFB. Após, as células foram lavadas e fixadas com Ac. Pírico, Ac. Acético glacial. Após foram coradas pelo Kit Panótico (Laboclin).

6.8. REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

Os 21 isolados de *E.coli* identificados fenotipicamente por testes bioquímicos, foram submetidos à técnica de PCR para verificação de genes de virulência, uma de nossas amostras identificada como (HIV INT 00101) foi perdida durante os demais experimentos realizados. Nossos dados demonstram que 19/21 isolados de *E.coli* apresentaram ampliações de 1487 pb previstas para os iniciadores *uidA* “forward” e “reverse”, referentes a β -glucosidase (Fig. 33).

Dos 20 isolados de *E.coli*, apenas 1 apresentou amplificação correspondente ao gene *invE* (766 bp), mostrando, possível capacidade de invasão (Figura 32). Onze (55%) de nossas amostras amplificaram para o gene *astI* (102 pb) (dados não mostrados) o que se refere à presença de enterotoxinas. Destes mesmos isolados, 12 (60%) apresentou amplificação para o gene *dAAe* (420 pb) referente ao patótipo de DAAEC, caracterizada pelo fenótipo de adesão difusa. Outro gene amplificado para duas de nossas amostras de *E.coli* foi o *eae* (917 pb) (dados não mostrados). Nenhum de nossos isolados de *E.coli* apresentou amplificação para os genes *bfpB*, *stx1*, *stx2*, *eaf* e *escV* (Quadro 2).

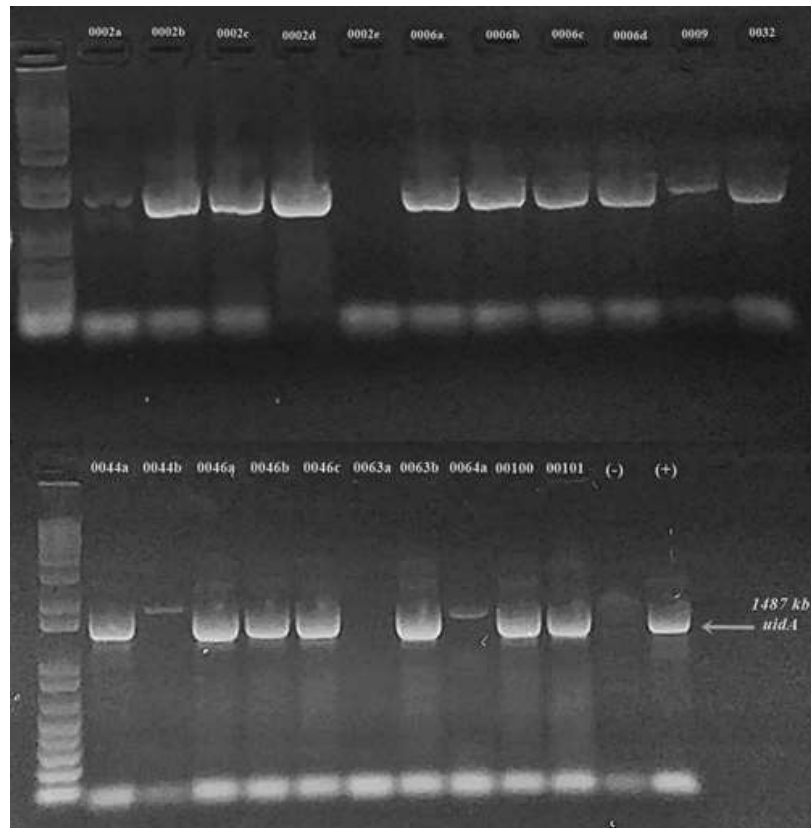


Figura 32. Amplificação de 1487pb correspondentes ao gene *uidA*.

Legenda. Gel de agarose a 1% demonstrando amplificações geradas com os iniciadores *uidA* (forward e reverse) referente ao gene *uidA*. Isolados de *E.coli* representando as amplificações para esse gene; C(-): Controle negativo; e (+) Controle positivo. Marcador de 1kb da invitrogen.

Quadro 2. Quadro comparativo dos genes de virulência dos isolados de *E.coli* e seus fenótipos de adesão de 3 horas.

		Adesão 3 horas																	
		Genes de virulência										Fenótipo de adesão							
Amostras	Bactéria	<i>uidA</i>	<i>ast1</i>	<i>bfpB</i>	<i>dAAe</i>	<i>eae</i>	<i>eaf</i>	<i>escV</i>	<i>invE</i>	<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	AL	AD	AA	ALL	AATP	SC	ID	S/AD
HIV INT 0002a	<i>E. coli</i>																		
HIV INT 0002b	<i>E. coli</i>																		
HIV INT 0002c	<i>E. coli</i>																		
HIV INT 0002d	<i>E. coli</i>																		
HIV INT 0002e	<i>E. coli</i>																		
HIV INT 0006a	<i>E. coli</i>																		
HIV INT 0006b	<i>E. coli</i>																		
HIV INT 0006c	<i>E. coli</i>																		
HIV INT 0006d	<i>E. coli</i>																		
HIV INT 0009	<i>E. coli</i>																		
HIV INT 0032	<i>E. coli</i>																		
HIV INT 0044a	<i>E. coli</i>																		
HIV INT 0044b	<i>E. coli</i>																		
HIV INT 0046a	<i>E. coli</i>																		
HIV INT 0046b	<i>E. coli</i>																		
HIV INT 0046c	<i>E. coli</i>																		
HIV INT 0063a	<i>E. coli</i>																		
HIV INT 0063b	<i>E. coli</i>																		
HIV INT 0064	<i>E. coli</i>																		
HIV INT 00100	<i>E. coli</i>																		

Preto: Amostras positivas; **Cinza:** Amostras negativas.

AL: Adesão localizada; **AD:** Adesão Difusa; **AA:** Adesão agregativa; **ALL:** Adesão AI-like; **AATP:** Adesão atípica; **SC:** Sem célula; **ID:** Indetectável; **S/AD:** Sem adesão.

Quadro 3. Quadro comparativo dos genes de virulência dos isolados de *E.coli* e seus fenótipos de adesão de 6 horas.

		Adesão 6 horas																	
Amostras	Bactéria	Genes de virulência										Fenótipo de adesão							
		<i>uidA</i>	<i>astI</i>	<i>bfpB</i>	<i>dAAe</i>	<i>eae</i>	<i>eaf</i>	<i>escV</i>	<i>invE</i>	<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	AL	AD	AA	ALL	AATP	SC	IC	S/AD
HIV INT 0002a	<i>E. coli</i>	■	■																
HIV INT 0002b	<i>E. coli</i>	■	■		■										■				
HIV INT 0002c	<i>E. coli</i>	■	■													■			
HIV INT 0002d	<i>E. coli</i>	■	■														■		■
HIV INT 0002e	<i>E. coli</i>	■	■												■				
HIV INT 0006a	<i>E. coli</i>	■	■		■														
HIV INT 0006b	<i>E. coli</i>	■	■										■						
HIV INT 0006c	<i>E. coli</i>	■	■		■								■						
HIV INT 0006d	<i>E. coli</i>	■	■										■	■					
HIV INT 0009	<i>E. coli</i>	■	■										■						
HIV INT 0032	<i>E. coli</i>	■	■										■				■		
HIV INT 0044a	<i>E. coli</i>	■	■		■								■						
HIV INT 0044b	<i>E. coli</i>	■	■		■								■						
HIV INT 0046a	<i>E. coli</i>	■	■										■				■		
HIV INT 0046b	<i>E. coli</i>	■	■										■						
HIV INT 0046c	<i>E. coli</i>	■	■										■						
HIV INT 0063a	<i>E. coli</i>	■	■				■												
HIV INT 0063b	<i>E. coli</i>	■	■				■												
HIV INT 0064	<i>E. coli</i>	■	■		■														
HIV INT 00100	<i>E. coli</i>	■	■						■										

Preto: Amostras positivas; **Cinza:** Amostras negativas.

AL: Adesão localizada; **AD:** Adesão Difusa; **AA:** Adesão agregativa; **ALL:** Adesão Al- like; **AATP:** Adesão atípica; **SC:** Sem célula; **IC:** Adesão inconclusiva; **S/AD:** Sem adesão.

Para a verificação genotípica de *Klebsiella*, os isolados foram submetidos à amplificação dos iniciadores *Kvar* “forward” e “reverse” (997 pb) no qual é refere ao gênero bacteriano (Figura 33). Outros iniciadores foram testados para esta bactéria, como *blaKPC* (1000 pb), onde 3 de nossas amostras amplificaram para o referido gene (Figura 34). Todas as 8 amostras amplificaram para o iniciador *blaCTX-M* (583 pb) (Figura 35). Dois dos isolados amplificaram para *blaSHV* (797 bp), *blaTEM* (859 pb). Ao que se refere ao gene *blaIMP* (448 pb) foi obtido a amplificação de três de nossas amostras, para o *blaVIM* (500 pb) apenas uma amostra apresentou amplificação, apenas uma amostra apresentou amplificação para o gene *blaVIM* (Dados não mostrados, respectivamente) (Quadro 4).

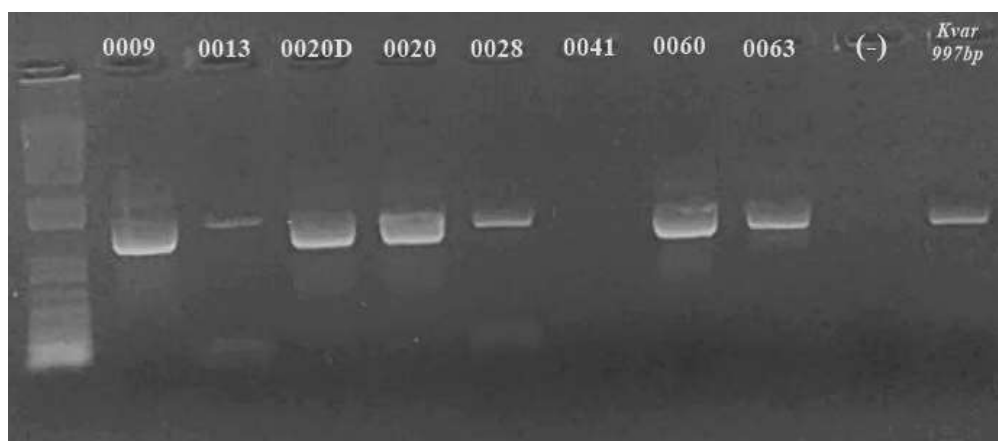


Figura 33. Amplificação de 997 pb correspondentes ao gene *Kvar*.

Legenda. Gel de agarose a 1% demonstrando amplificações geradas com os iniciadores *Kvar* (forward e reverse) referente ao gene *Kvar*. Isolados de *Klebsiella* representando as amplificações para esse gene; C(-): Controle negativo; e (+) Controle positivo. Marcador de 1kb da invitrogen.



Figura 34. Amplificação de 1000 pb correspondentes ao gene *blaKPC*.

Legenda. Gel de agarose a 1% demonstrando amplificações geradas com os iniciadores *blaKPC* (forward e reverse) referente ao gene *blaKPC*. Isolados de *Klebsiella* representando as amplificações para esse gene; C(-): Controle negativo; e (+) Controle positivo. Marcador de 1kb da invitrogen.

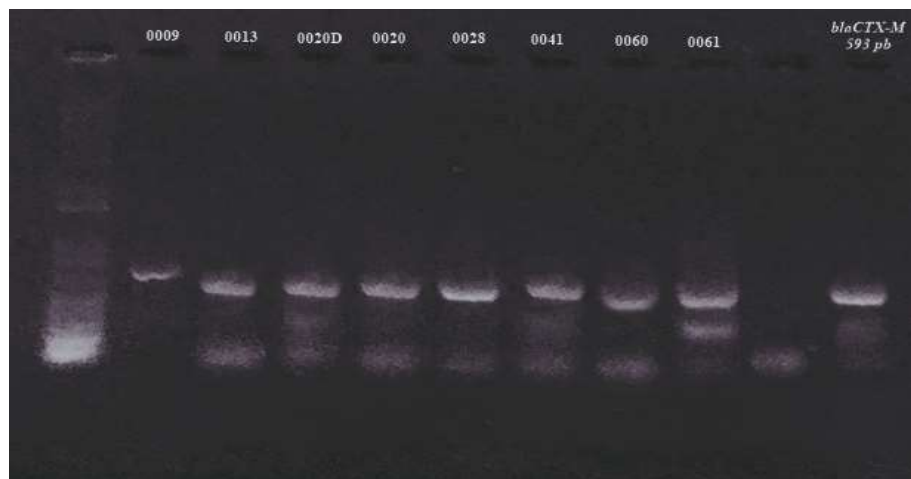


Figura 35. Amplificação de 593 pb correspondentes ao gene *blaCTX-M*.

Legenda. Gel de agarose a 1% demonstrando amplificações geradas com os iniciadores *blaCTX-M* (forward e reverse) referente ao gene *blaCTX-M*. Isolados de *Klebsiella* representando as amplificações para esse gene; C(-): Controle negativo; e (+) Controle positivo. Marcador de 1kb da invitrogen.

Quadro 4. Quadro comparativo entre os genes de resistência medicamentosa e a susceptibilidade antimicrobiana para os isolados de *Klebsiella* spp.

Amostras	Bactéria	Genes de resistencia								Antibióticos								
		<i>Kvar</i>	<i>blaCTX-M</i>	<i>blaSHV</i>	<i>blaTEM</i>	<i>blaKPC</i>	<i>blaIMP</i>	<i>blaVIM</i>	<i>BlaSPM</i>	AKN	AMP	ATM	CAZ	CIP	HLG	MEM	NXN	SXT
HIV INT 0009	<i>klebsiella</i> spp.																	
HIV INT 0013	<i>klebsiella</i> spp.																	
HIV INT 0020D	<i>klebsiella</i> spp.																	
HIV INT 0020	<i>klebsiella</i> spp.																	
HIV INT 0028	<i>klebsiella</i> spp.																	
HIV INT 0041	<i>klebsiella</i> spp.																	
HIV INT 0060	<i>klebsiella</i> spp.																	
HIV INT 0063	<i>klebsiella</i> spp.																	

AKN: Amicacina; **AMP:** Ampicilina; **ATM:** Aztreonam; **CAZ:** Ceftazidima; **CIP:** Ciprofloxacina; **HLG:** Gentamicina; **MEM:** Meropenem; **NXN:** Norfloxacina; **SXT:** Sulfametoxazol+ trimetropim.

6.9. ENSAIO DE INVASÃO

Para o experimento, foram avaliados os perfis de invasão de *Klebsiella* spp. *Salmonella* spp e *Shigella* spp, submetidos a 1h de teste. Nossos resultados demonstram que nenhum dos isolados de *Klebsiella* spp. (100%) apresentou perfil de invasão. Os outros isolados avaliados no experimento 2 *Salmonella* spp e 1 *Shigella* spp, também não apresentaram perfis de invasão durante o experimento, respectivamente (Tabela 11).

Tabela 11. Fenótipo de invasão dos isolados de *Klebsiella* spp, *Salmonella* spp, *Shigella* spp. identificados em cada paciente.

Amostra	Tipo de "bac"	Ensaio	Tempo de incubação	Perfil
HIV INT 0009	<i>Klebsiella</i> spp	Invasão	1h	sem invasão
HIV INT 0013	<i>Klebsiella</i> spp	Invasão	1h	sem invasão
HIV INT 0020	<i>Klebsiella</i> spp	Invasão	1h	sem invasão
HIV INT 0020B	<i>Klebsiella</i> spp	Invasão	1h	sem invasão
HIV INT 0028	<i>Klebsiella</i> spp	Invasão	1h	sem invasão
HIV INT 0041	<i>Klebsiella</i> spp	Invasão	1h	sem invasão
HIV INT 0063	<i>Klebsiella</i> spp	Invasão	1h	sem invasão
HIV INT 0060	<i>Klebsiella</i> spp	Invasão	1h	sem invasão
HIV INT 0015	<i>Salmonella</i> spp	Invasão	1h	sem invasão
HIV INT 0028	<i>Salmonella</i> spp.	Invasão	1h	sem invasão
HIV INT 0032	<i>Shigella</i> spp	Invasão	1h	sem invasão

6.9.1. Ensaio de invasão com os isolados identificados no estudo.

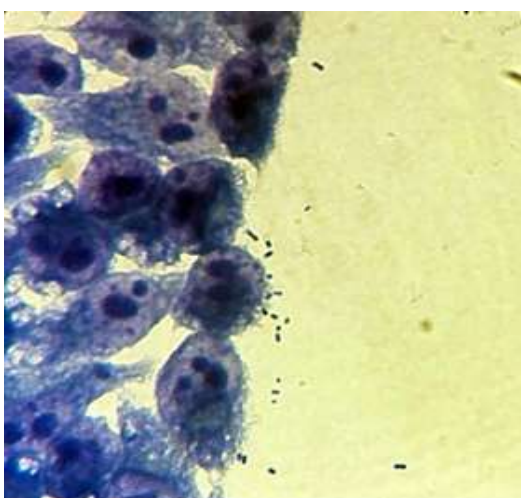


Figura 36. Figura representativa do teste de invasão dos isolados submetidos, não houve invasão de nenhuma bactéria testada. Hep-2 cultivadas foram incubadas com bactérias por 1 horas com Meio MEM-SFB. Após, as células foram tratadas com gentamicina, lavadas e fixadas com Ac. pícrico. Após foram coradas pelo Kit Panótico (Laboclin).

6.10. DOSAGEM DE MARCADORES PLASMÁTICOS (sCD14 E CITOCINAS PLASMÁTICAS).

Os participantes do estudo tiveram a avaliação da translocação microbiana e do perfil inflamatório. Quanto às dosagens plasmáticas de sCD14, houve diferença estatística em todos os grupos do estudo quando comparados ao grupo controle, valor de $p=0,05$ (Tabela 12).

Tabela 12. Níveis plasmáticos de sCD14 dos participantes do estudo comparados ao grupo controle (Pacientes sem HIV).

Grupo	Média	DP	Média controle	P valor
Grupo 1	4953	± 4570	1,3255	0.0182
Grupo 2	2582	± 1983	1,3255	0.0137
Grupo 3	3396	± 4240	1,3255	0.0008
Grupo 4	3769	± 4752	1,3255	0.0446

*Teste T para uma amostra.; *DP: Desvio Padrão.

Grupo 1: >500cópiasRNAviral<200CD4mm³; **Grupo 2:** <500cópiasRNAviral<200CD4mm³; **Grupo 3:** >500cópiasRNAviral_>200CD4mm³; **Grupo 4:** <500cópiasRNAviral_>200CD4mm³.

Ao que se refere aos valores de sCD14 entre os grupos não houve diferenças significativa, quanto às dosagens de citocinas, houve diferença estatística apenas com a TNF- α analisada no estudo, com maior significância para o grupo 1 e 3, entre as outras citocinas não houve significância em nenhuma das analisadas, valor de $p=0,05$ (Tabela 13).

Tabela 13. Níveis de sCD14 e citocinas entre os grupos experimentais do estudo.

Variáveis	Grupo				P valor
	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	
CD14ng/l mediana (IQR)	3370.5 (1746,7542.8)	1780 (1417,3233)	1886 (907.5,3228.5)	1943 (1415,2179)	0.767
IL.17 mediana (IQR)	3.7 (1.5,10.5)	3.1 (0,8.8)	1.6 (0.2,7.5)	1.6 (0.2,2.3)	0.829
IL.6 mediana (IQR)	10.4 (6.4,19.8)	6.5 (4.6,10.9)	8.4 (4,27.5)	1.6 (0.7,5.4)	0.233
IL.10 mediana (IQR)	3.9 (1.9,5.8)	2.2 (0.6,4.4)	3.8 (1.4,7.4)	0.9 (0.5,1.1)	0.121
TNF α mediana (IQR)	B 0.4 (0,4.8)	c 0 (0,0)	a 10.6 (10.6,10.6)	b 1.1 (1.1,1.1)	< 0.001
IL.12p70 mediana (IQR)	0.6 (0.1,18.3)	0.8 (0.2,1.5)	0.5 (0.2,1.3)	0.5 (0,0.6)	0.451

IL.1 β mediana (IQR)	0 (0,17.3)	2 (0.9,5.9)	0.7 (0,7.1)	0.1 (0,0.7)	0.42
IL.8 mediana (IQR)	105.8 (45.2,260.3)	105.8 (64.7,188.8)	57.9 (19.8,132.7)	103 (20,328.5)	0.671

Grupo 1: >500cópiasRNAviral <200CD4mm³; **Grupo 2:** <500cópiasRNAviral_<200CD4mm³; **Grupo 3:** >500cópiasRNAviral_>200CD4mm³; **Grupo 4:** <500cópiasRNAviral_>200CD4mm³.

*IQR = intervalo interquartilico (valores do Primeiro e do Terceiro Quartil).

*Teste de Kruskal-Wallis e teste de comparações múltiplas de hommel.

*Letras distintas diferem ao nível de 0,05.

Quando comparamos os resultados da análise bacteriana, frente aos resultados avaliativos de citocinas inflamatórias e marcadores de disbiose intestinal e translocação microbiana, podemos verificar há diferenças entre os grupos de pacientes portadores de bactérias patogênicas (BP), o grupo de pacientes sem crescimento bacteriano (SCB) e o grupo onde não houve crescimento de bactérias patogênicas (BNP). Mesmo não apresentando significância estatística, podemos notar que há sim uma diferença entre os grupos, com destaque para o grupo SCB e o grupo BP (Tabela 14).

Tabela 14. Níveis plasmáticos de IL-17 dos participantes do estudo comparados ao grupo controle (Pacientes sem HIV).

Grupos	Média	Desvio padrão	Controle	valor de p
BP	115,9 ±	10,66	248,7 ± 109	0,1801
BNP	128,9 ±	12,3	248,7 ± 109	0,1931
SCB	104,2 ±	5,285	248,7 ± 109	0,2564

BP: Bactérias patogênicas; **BNP:** Bactérias não patogênicas; **SCB:** Sem crescimento bacteriano.

7. DISCUSSÃO

Mesmo a diarreia sendo considerada uma das principais causas de mortalidade em pacientes com HIV no mundo todo (SUGANDHI et al., 2015), nosso estudo demonstrou um perfil diferente de pacientes, onde as altas incidências de constipação intestinal reduziram o n amostral inicialmente previsto. Dos 100 pacientes voluntários ao estudo, um pouco mais de 50% conseguiram “entregar” as amostras biológicas de fezes, firmando assim nosso universo amostral em 52 pacientes.

Isto não destoia da literatura vigente, onde o n amostral quase sempre é composto por universos semelhantes. Como o estudo conduzido Marbou & Kuete (2017), onde foram avaliados 68 pacientes com HIV, que demonstraram que a prevalência de bactérias entéricas, bem como o fenótipo de resistência, foi a principal causa da diminuição da imunidade e a progressão clínica da doença (MARBOU et al., 2017).

População do estudo e dados sócio-epidemiológicos

O público de maior frequência no atendimento oferecido pelo Hospital de Medicina Tropical de Manaus (FMT) abrange majoritariamente aqueles que necessitam de atendimento custeado pelo SUS, embora seja reconhecidamente o centro para diagnóstico e tratamento de doenças denominadas tropicais e/ou negligenciadas, além de centralizar não só o diagnóstico para o HIV, mas também ser centro de referência para o tratamento e prevenção desta infecção.

O estrato populacional que atingimos neste estudo representa sem dúvidas o esperado para a Região Norte, o que se comunica como os demais estados da região em contínuo desenvolvimento, seja pela precariedade nos serviços de saneamento básico e índices de desenvolvimento humano, seja pela qualidade de vida (acesso à educação, saúde, renda, etc.) das populações que aqui residem.

Identificação bacteriana e patogenicidade

Os testes de identificação clássica utilizados demonstraram um predomínio do gênero de *Escherichia* (38,46%), seguido por de *Klebsiella* spp. e *Pseudomonas* spp. (15,38%), e em menor quantidade *Salmonella* (3,84%) e *Shigella* (1,92%). O que, conforme Vujkovic-Cvijin

et al. (2014) corrobora com o fato de que a microbiota intestinal de indivíduos infectados pelo HIV é composta em grande parte por gêneros bacterianos pertencentes da família das Enterobacteriaceae, onde estão inseridos as bactérias supracitadas, sugerindo que esses patógenos podem estar altamente associados à inflamação crônica e rápida progressão do HIV para AIDS (VUJKOVIC-CVINJIN et al., 2014).

A verificação da patogenicidade destes isolados, a partir da avaliação gênica de diagnóstico (caracterização gênero/espécie) e fatores de virulência, além de conferirem robustez aos resultados obtidos na análise clássica, permite a comparação fenotípica e genotípica desses isolados. Como por exemplo, na caracterização de gênero/espécie de *E.coli* (gene *uidA*), onde das duas amostras negativadas para esta triagem, uma apresentou positividade característica no ensaio celular.

Muitos dados na literatura demonstram que a presença deste gene em isolados de *E. coli*, (responsável por codificar a β -D-glucuronidase), apesar de comum entre bactérias do gênero *Shigella*, a atividade enzimática é limitada apenas a *E.coli*. Isolados fecais dessa bactéria podem demonstrar negatividade para esta atividade, embora os genes sejam regiões conservadas nesses isolados (LASALD et al., 2005). Uma pesquisa realizada por Farnleitner et al (2015), demonstrou que o gene *uidA* por não apresentar regiões polimórficas, foi o mais preciso na identificação dos 49 isolados de *E.coli* analisados em seu estudo (FARNLEITNER et al., 2015).

Para os demais isolados, a pesquisa para a tipagem molecular, também confirmou os testes em meios diferenciais e provas bioquímicas. E podemos notar que embora a triagem molecular tenha identificado poucas cepas com genes específicos para fatores de virulência classicamente atribuídos aos patógenos identificados.

Mas, nossos dados mostram que os indivíduos incluídos no grupo de maior carga viral, e menor contagem de células CD4+ (Grupo1) apresentavam o maior número de bactérias patogênicas e com resistência antibiótica importante. Assim como Marbou & Kuete, que observaram em seu estudo que a partir da progressão da imunodeficiência devido ao aumento da carga viral do HIV, as doenças oportunistas bacterianas são observadas em grande maioria quando as contagens de CD4 caem para menos de 200 células/ μ L de sangue. E a alta administração de antibióticos durante esse período, parece contribuir para o desenvolvimento de resistência bacteriana nestes pacientes, colocando em risco o prognóstico favorável (MARBOU & KUETE, 2017).

Resistência microbiana

Novamente vemos aqui, que os isolados de *E.coli* destacaram-se dos demais, pois foram os mais resistentes à maioria dos antibióticos testados, com maior resistência para a classe das cefalosporinas, principalmente à cefazolina (85%), cefepime (60%) e cefuroxima (55%). O mesmo perfil de sensibilidade tem sido descrito na literatura, onde cada vez mais se destaca a resistência aos antibióticos de linha de frente, no qual as cefalosporinas estão incluídas. O que se deve ao desenvolvimento da resistência à β -lactamase de espectro estendido (ESBL) que possui a capacidade de hidrolisar as cefalosporinas, e esta resistência têm sido cada vez mais relatada entre *E. coli* isoladas de indivíduos com HIV (LAMPRI et al., 2012; PADMAVATHY et al., 2013).

Os gêneros de *Klebsiella*, *Salmonella*, *Shigella* e *Pseudomonas*, demonstraram que todos os gêneros encontrados foram resistentes a mais de um antibiótico da classe das cefalosporinas, e alto nível de resistência a múltiplas drogas, o que também condiz com os resultados encontrados em outras populações de pessoas vivendo com HIV (PVHIV). Nos últimos anos, a frequência de *Enterobacteriaceae* resistentes aos antibióticos derivados da classe das cefalosporinas, tem aumentado consideravelmente, e se disseminado do ambiente hospitalar até locais externos aos hospitais (DEMIRDAG & HOSOGLU, 2010; ASENSIO et al., 2011), tornando a resistência microbiana um fator de preocupação mundial.

Já para os aminoglicosídeos, 54,05% dos isolados testados para Tobramicina, exceto os isolados de *Pseudomonas* spp, apresentaram resistência. E para as demais classes da família (gentamicina e amicanina), sensibilidade, embora a ação desses antibióticos no tratamento de infecções tem se tornado cada vez mais ineficaz (BLAIR et al., 2015; POTRON et al., 2015).

Na classe das quinolonas principalmente para ciprofloxacina e norfloxacina, as taxas de sensibilidade para o gênero de *E.coli* foram de 60% para ciprofloxacina, para os isolados de *Klebsiella* spp., 75% para norfloxacina e 87,5% para ciprofloxacina. E no gênero *Salmonella* spp., os isolados encontrados no estudo foram sensíveis para norfloxacina e ciprofloxacina respectivamente. Para o gênero *Pseudomonas* spp., a sensibilidade na família das quinolonas se ateve somente à ciprofloxacina e levofloxacina , o que conforme descrito por Bernard et al (2016), em pacientes ambulatoriais submetidos a uma curta exposição aos antibióticos desta classe, como a levofloxacina, foi suficiente para promover a eliminação de bactérias patogênicas nos pacientes (BERNARD et al.,2016).

No entanto, o único isolado de *Shigella* spp. mostrou-se resistente aos antimicrobianos da classe das quinolonas como a ciprofloxacina e norfloxacina respectivamente. Dados similares foram demonstrados por Rajpara et al (2018), onde dos 95 isolados de *Shigella*, 85% do total de bactérias, foram resistentes à ciprofloxacina e norfloxacina (RAJPARA et al., 2018).

Os carbapenêmicos são os agentes antimicrobianos, mais eficazes contra bactérias gram-negativas, pois possuem um amplo espectro de atividade antibacteriana contra os membros da família *Enterobacteriaceae* e *Pseudomonadaceae*. Esses antimicrobianos são usados geralmente como drogas de último recurso para o tratamento de infecções causadas por bactérias multirresistentes (GARG et al., 2011). Nossos achados revelam que para a grande parte dos gêneros isolados, exceto o gênero *Shigella* spp, a maioria dos antimicrobianos testados para essa classe foram eficazes, sendo 90% de sensibilidade ao aztreonam em *E.coli*, 75% em *Klebsiella* incluindo meropenem, os isolados de *Salmonella* spp. foram sensíveis a meropenem, e apenas 25% dos isolados de *Pseudomonas* foram sensíveis ao imipenem. Rahimzadeh et al (2011), observou uma predominância de isolados de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes ao imipenem, compreendendo 51,4% das infecções causadas por essa bactéria nas enfermarias clínicas, comprovando que os hospitais são áreas onde os problemas de resistência estão preocupantemente elevados (RAHIMZADEH et al., 2011).

Frente aos β -lactâmicos, como ampicilina associado ao sulbactam, amoxicilina associado ao ácido clavulânico, e piperaciclina associado ao tazobactam, todos os isolados apresentaram sensibilidade significativa. O que era esperado, pois embora Martins e Abreu (2010), tenha demonstrado que os isolados de *Escherichia coli*, *Klebsiella* e *Pseudomonas* apresentaram alta resistência às penicilinas (ampicilina, amoxicilina e piperaciclina) quando utilizadas isoladamente, quando o uso é associado à antimicrobianos inibidores das enzimas de β -lactamase, a eficiência no tratamento de infecções causadas por estas bactérias, é de resolução eficiente (MARTINS & ABREU, 2010).

Bactérias formadoras de Biofilme

A capacidade de formar biofilme em bactérias Gram-negativas é um importante fator de virulência a ser considerado, pois é através dele, que vários mecanismos “adaptativos” das bactérias podem ser adquiridos e transmitidos a outras cepas bacterianas. Aqui, foram

avaliados a capacidade da formação de biofilme para os isolados de *Klebsiella* spp e *Pseudomonas* spp, e segundo os resultados, ambos isolados bacterianos submetidos ao teste, foram capazes de formar biofilme de alta intensidade (50% e 37,5% respectivamente). O que diferente do reportado pela literatura vigente, onde as *Pseudomonas* sempre são atribuídas mais comumente à essa característica, como no estudo realizado por Lima et al (2017) utilizando 20 isolados de *Pseudomonas*, provenientes de pacientes com diferentes infecções causadas por esta bactéria, que apresentou 75% de isolados produtores de biofilme, e destes, 10% com alta capacidade de formação do biofilme. E no estudo de Sanchez et al (2013) com 126 isolados clínicos de *Klebsiella* spp., que demonstrou que 61,4% dos isolados eram produtores de biofilme, ilustrando assim a diferença entre estas cepas.

Dos isolados de *Klebsiella* spp produtores de biofilme, 25% apresentaram resistência bacteriana e 75% apresentaram sensibilidade a múltiplos antibióticos. E para os isolados de *Pseudomonas* spp, 37,5% foram positivos para formação de biofilme, e destes, 33,33% mostram-se resistentes a múltiplos antibióticos contra 66,6% de sensibilidade. Sugerindo assim uma origem ambiental (ou “selvagem”) para estas bactérias e não, clínica e/ou hospitalar.

Em nossos achados a formação de biofilme apesar do que se espera em relação à resistência microbiana, se mostrou controversa, visto que a maioria dos isolados que apresentaram produção significativa de biofilme demonstraram sensibilidade à múltiplos antimicrobianos. Este resultado sugere que a produção do biofilme atue mais como um mecanismo de sobrevivência bacteriana, do que um sistema de virulência, ao menos nestes pacientes.

Ensaio celulares

O processo de adesão de microrganismos às superfícies celulares é considerado multifatorial, e associado a diferentes interações específicas e não específicas, no qual envolvem as interações eletrostáticas e hidrofóbicas de superfície celular, exopolissacarídeos, peptídeoglicanos, glicosaminoglicanos e as fímbrias (MENG et al., 2014).

Nos ensaios de 3h, a maioria dos isolados (30%) apresentou perfil de adesão indetectável, ou seja, o tempo de ensaio mostrou-se ineficaz para que esses isolados apresentassem fenótipo de aderência celular, porém, durante o ensaio de 6 horas, 60% de nossas amostras apresentaram algum perfil de adesão característico ou não, ao gênero. Como

no estudo realizado por Schultsz et al., (1997), onde os isolados de *E.coli* só apresentaram algum perfil adesivo, após o período de 6h, e com variações do perfil de adesão característico (SCHULTSZ et al., 1997).

O predomínio de isolados com capacidade de adesão difusa (50%), característica principal dos patótipo de *E.coli* de adesão difusa (DAEC), concorda com a literatura descrita em estudos direcionados à diferentes populações. Assim como Garcia et al (2010), onde em 184 pacientes soropositivos com e sem diarreia, em Lima no Peru, houve a prevalência de 10,1% de DAEC apenas no grupo de pacientes infectados com HIV e com presença de diarreia. Em contrapartida, Ochoa et al (2009), demonstrou em seu estudo, que a frequência de DAEC em crianças imunodeprimidas com diarreia, foi igual ao grupo controle (pacientes sem diarreia). Evidenciando, portanto que, a taxa de isolamento de DAEC é verificada mais alta em pacientes infectados com HIV (GARCIA et al., 2010; OCHOA et al., 2010).

A frequência de 15% de isolados de *E.coli* com fenótipo de adesão atípico, é interessante do ponto de vista fenotípico, que pode estar havendo alguma mudança ou evolução na interação destas bactérias com o hospedeiro, ou ainda que as condições do TGI do hospedeiro influenciem de alguma forma nesta relação. E a literatura atual não nos fornece suporte a respeito desta característica que parece ser uma nova tendência de adesão bacteriana, pois Benevides et al. (2015), atestou esse padrão adesivo de *E.coli* em crianças menores de 6 anos, com diarreia.

Os dados do teste de adesão apresentam ainda uma frequência de 5% de isolados de *E.coli* com fenótipo de adesão agregativa, característica do patótipo de EAEC. O que, como na literatura, apresenta baixas frequências em pessoas vivendo com HIV (PVH). Porém, um estudo realizado por Dillingham et al., (2014), demonstrou uma alta frequência de EAEC em pacientes com AIDS, no Haiti, e esse patótipo estaria sendo relacionado com a perda abrupta de peso, durante a primeira semana de tratamento com a TARV, o que pode, de forma empírica, ser entendido como um possível preditor de mortalidade nesses indivíduos (DILLINGHAM et al., 2014).

Já nos ensaios celulares de 6 horas, houve 20% de lamínulas sem células, o que no ensaio de 3 horas ocorreu em apenas 10% dos testes, o que poderia estar associado a um fenótipo invasivo ou citotóxico. Mas os testes genéticos, não apontaram a presença destes genes nos isolados, descartando essa hipótese. Mas, foram identificados 65,5% do fenótipo de adesão agregativo entre os isolados de *Klebsiella* spp., o que é típico da espécie *pneumoniae*. Assim como descrito por Weiss et al., 2017, que verificou fenótipos de aderência de isolados

de *Klebsiella* spp. de pacientes com HIV com e sem diarreia, observando que a grande maioria dos isolados apresentavam um perfil de aderência semelhante ao de *E.coli* enteroagregativa, e que isto poderia estar relacionado a manifestação de diarreia aquosa crônica nesses indivíduos (WEISS et al., 2018).

Repetiu-se nos ensaios celulares de 6 horas para *Klebsiella*, a presença de 50% lamínulas “limpas”, gerando novamente, mas agora para este gênero, a hipótese de perfil invasivo. Que já foi demonstrado por Weiss et al., (2017), onde os isolados de *Klebsiella* apresentavam genótipos e fenótipos de invasão com capacidade de se ligar às células HEp-2 e promover modificações no citoesqueleto, invadir e produzir inúmeras enterotoxinas e citotoxinas, e todos os 27 pacientes envolvidos neste estudo, apresentaram diarreia crônica aquosa ou leve (WEISS et al., 2018).

A hipótese da invasão de *Klebsiella* não pode ser descartada muito prontamente, mesmo que nos nossos ensaios de invasão realizados (com somente 1 hora de duração), não pudemos detectar a presença de um perfil invasivo, sendo necessário no futuro a repetição destes testes, com parâmetros mais assertivos. Os isolados de *Salmonella* spp. e *Shigella* spp. identificados no estudo, também foram submetidos ao teste de invasão, no período de 1 hora, e foi constatado que nenhum dos isolados apresentaram capacidade de invasão celular.

Marcadores moleculares, fenótipos de adesão e formação de biofilme

Quando analisamos conjuntamente os resultados da triagem molecular de *E.coli* e os padrões fenotípicos de adesão celular, notamos que algumas cepas no ensaio de 3 horas, apresentaram adesão difusa (6) e adesão atípica (5). Porém, somente 2 isolados obtiveram positividade para o gene *daae* que caracteriza a DAEC, correspondente para o primeiro fenótipo adesivo, e 3 para o fenótipo atípico, e 3 isolados, que apesar de possuírem o gene específico, não expressaram o comportamento esperado.

A explicação para tal fenômeno pode estar obscura, mas podemos hipotetizar que ou essas bactérias realmente apresentam esses genes não funcionais, ou que devido a alterações do epitélio intestinal (característico de pacientes HIV) do hospedeiro, interajam de forma diferenciada, por não obterem os estímulos necessários à ativação dessa característica. Pois no ensaio de seis horas, notamos que 2 isolados que antes se comportavam de forma atípica, passaram a apresentar o padrão difuso de aderência, em células cultivadas e com confluência e características morfológicas “normais”. Além do aumento no número de isolados que

aparentemente “estabilizaram o seu padrão de adesão difusa, frente ao tempo de contato com a camada celular.

Então se em condições “ótimas” e favoráveis (para a bactéria) os padrões de adesão se apresentam com ou sem a positividade para o gene específico, pode significar que o equilíbrio da flora, do tecido, e das condições necessárias ao estabelecimento do patógeno no TGI, é importante para o estabelecimento da infecção.

Já para os resultados comparativos de *Klebsiella* e resistência microbiana, também podemos notar que alguns isolados apresentam alguns genes característicos sem apresentar a resistência propriamente dita, ou o contrário disso. Que pode ser devido à origem da resistência, quanto à ativação do gene específico. Além do que sabem que algumas resistências a antimicrobianos podem ser fornecidas via plasmidial, sem necessariamente integrar o genoma principal da bactéria.

Marcadores inflamatórios

Nossas avaliações imunológicas trouxeram resultados interessantes. Como por exemplo, quanto às dosagens de sCD14 plasmáticos, que revelaram que todos os grupos analisados no estudo apresentaram valores significativos quando comparados com o grupo controle dos testes, com destaque para o grupo 1, mostrando que os níveis mais altos de RNA viral, podem estar relacionados ao aumento de marcadores plasmáticos associados a inflamação. Esses dados compactuam com aqueles descritos na literatura, e So-Armah et al (2017) também verificou que os níveis de marcadores inflamatórios em indivíduos com HIV com carga viral aumentada, apresentavam níveis de sCD14 e outros biomarcadores como IL-6 e D-dímero, elevados em comparação ao grupo controle (SO-ARMAH et al., 2017). Outro estudo avaliativo similar realizado por Sandler et al (2011), no qual os níveis de marcadores plasmáticos em pacientes com HIV com carga viral aumentada, mas que apresentavam um maior número de células CD4+, bem como os pacientes que foram a óbito, apresentaram níveis mais elevados de sCD14 (SANDLER et al., 2011). Caracterizando assim esse marcador que é reconhecidamente um ótimo preditor da presença de LPS na corrente sanguínea, como um preditor competente para a presença de quadro de translocação microbiana com possível disbiose intestinal. Podendo estar envolvido no estado de inflamação constante com elevação do risco de progressão do HIV para a AIDS.

Neste estudo também foram avaliados os níveis plasmáticos de citocinas inflamatórias e anti-inflamatórias, onde se observou a diferença significativa apenas nos níveis de TNF- α

entre os grupos analisados, com ênfase entre os grupos grupo 1, grupo3, sugerindo que mesmo com o uso da TARV, os níveis de inflamação em indivíduos infectados com HIV não diminuem. Como descrito por Keating et al (2012), que avaliou o perfil inflamatório de 48 pacientes com HIV, e constatou que a maioria dos pacientes com carga viral elevada e células CD4+ diminuídas, com o uso de TARV, apresentaram maiores níveis plasmáticos de TNF α (KEATING et al., 2012). Os estudos sugerem que pacientes com HIV, apresentam perfis inflamatórios constantes, o que pode também estar associado ao aumento da replicação viral, bem como a diminuição de células T CD4+, mesmo com o uso da TARV, o que pode contribuir para a patogênese e piora do quadro clínico na AIDS.

A presença desta citocina, principalmente em níveis elevados, sugere a instalação de cronicidade inflamatória, que é característica da infecção pelo HIV, principalmente através do desbalanço homeostático intestinal, com extravasamento de microorganismos para além da barreira epitelial. Estimula ininterruptamente o sistema imune a produzir respostas inflamatórias locais e sistêmicas, causando a piora destes pacientes. Que mesmo sob a ministração da TARV, não conseguem obter a resolução do dano intestinal devido à depleção considerável de células protetoras presentes no tecido.

Quanto à avaliação dos níveis de IL-17 no plasma, as análises ofereceram resultados não significativos frente aos controles soronegativos. O que provavelmente se deve ao fato, de que em situações de normalidade imunológica (sem desafio), esta citocina não estaria elevada. Levantando o questionamento da funcionalidade desta citocina como marcador para a perda celular da população TH17, como descrito por inúmeros autores na atualidade. Como por exemplo, Mattapallil, et al., (2013), que como muitos, associa os níveis diminuídos desta citocina à baixa produção e presença destas células. Logicamente não estamos descartando a importância da população TH17, nem da IL-17, mas acreditamos que para esta afirmativa, seria necessária a verificação de outros marcadores não só de dano celular (uma vez que a IL-17 promove a homeostase do TGI), mas também de marcadores de superfície celular ou de imunofenotipagem para a população TH17.

Mas ao mesmo tempo, se observarmos os pacientes que apresentaram positividade na presença de patógenos importantes (desafio imunológico), além do vírus HIV, é importante notar que os níveis de IL-17 não aumentam representativamente, o que pode apenas sugerir que há alguma deficiência em sua produção por parte das células imunológicas. Como não existem parâmetros pré-definidos para a avaliação destes marcadores, essa é uma discussão que necessita maior aprofundamento nas análises investigativas, e a adição de outros

marcadores e preditores que nos ajudem a mapear a atuação desta citocina, e das populações celulares responsáveis pela sua liberação.

8. PERSPECTIVAS FUTURAS

- A ampliação do n amostral, e a diversificação dos participantes do estudo para futuros estudos, poderão impactar positivamente os resultados obtidos. Desde o número de patógenos isolados, até a averiguação fenotípica de interação, que poderá se confirmar estatisticamente.
- Faz-se necessário um maior aprofundamento não só nas características genéticas dos patógenos isolados de pacientes HIV, frente a sua virulência e capacidade adaptativa. Pois o estabelecimento dessa relação, poderá trazer novas perspectivas não só para o diagnóstico desses patógenos, como no tratamento para sua erradicação.

9. LIMITAÇÕES DO ESTUDO

Este estudo encontrou algumas limitações ao decorrer de seu desenvolvimento, sendo estes:

- A baixa adesão dos pacientes à participação no estudo, no qual se deve em parte ao quadro clínico geral do paciente, muitos apresentavam indisposição física, mental ou até mesmo emocional o que tornou dificultosa o contato da equipe de pesquisa com o indivíduo. Outro fator que colabora para esta limitação é a necessidade da coleta de sangue realizada pela equipe, e muito necessária a este estudo, muitos dos pacientes negavam-se a participar devido ao grande número de procedimentos invasivos que estes, são submetidos no seu cotidiano hospitalar, além, a maioria dos pacientes se sentiam tímidos em responder o questionário epidemiológico (independente de estar com acompanhante ou não, ou do leito compartilhado). Outro ocorrido, foi a desconfiança na importância do estudo ou até da equipe, presença do cônjuge ou dos filhos no leito, negação ou irritabilidade.
- Obtenção da amostra fecal: Muitos pacientes alegaram não conseguir realizar a coleta do material biológico devido a problemas de constipação intestinal que podem ser tanto de origem medicamentosa ou alimentar. Algumas de nossas amostras foram extravidadas, ou apresentavam quantidade inadequada para a realização dos procedimentos laboratoriais, armazenamento inadequado e a alta médica que os pacientes previamente entrevistados recebiam.
- Desistência de participação: Alguns pacientes desistiram de participar do estudo, muita das vezes por aconselhamento de outros pacientes, medo, ou até mesmo, em maioria a proibição do cônjuge ou acompanhante. Outro fato, foi o agravamento do estado de saúde desses pacientes e alterações bruscas de humor.

No entanto, mesmo com as limitações pretextadas, acreditamos na relevância do estudo para a população com HIV/AIDS, onde mudanças ainda estão sendo realizadas para contornar tais situações, ou até minimizá-los a ponto de não promover interferência impactantes de caráter estatístico, e em análises futuramente realizadas.

10. CONCLUSÃO

- Levando em consideração as frequências de patógenos isolados, notamos que apesar da população de estudo estar fragilizada imunologicamente, o nível de coinfeções de origem bacteriana foi relativamente baixo. Embora as interações detectadas tragam novas perspectivas a respeito da fisiologia da interação patógeno/hospedeiro. Principalmente àqueles que com carga viral do HIV aumentada e contagem de células CD4+ diminuída.
- O comportamento fenotípico das bactérias isoladas se apresenta de forma atípica. Sejam em ensaios celulares, moleculares, e até mesmo nas provas iniciais de identificação clássica. Tornando esses espécimes elegíveis para o aprofundamento na investigação de seus mecanismos de virulência.
- A presença de patógenos bacterianos na flora de pessoas vivendo com HIV, podem ser fatores de piora do quadro geral de saúde, bem como se constituírem como alvos de amplificação de resistência microbiana, devido à exposição prolongada de tratamentos com antibióticos, devido a cronicidade de estados inflamatórios, e sintomas correlatos.
- Os três marcadores inflamatórios utilizados neste estudo, confirmam a presença de disbiose e translocação microbiana, através da verificação de seus níveis aumentados e/ou diminuídos. Se estabelecendo assim como ótimos preditores de progressão da doença, e de cronicidade imunológica.

REFERÊNCIAS

Abati PAM, Segurado AC. Testagem anti-HIV e estágio clínico na admissão de indivíduos em serviço de saúde especializado. Pará, Brasil. *Rev. Saúde Pública*. 2015; 49(27).

Abbasi P, Kargar M, Doosti A, Mardaneh J, Dalini SG, Dehyadegari MA. Real Time PCR for Characterization of Enteroinvasive *E.coli* (EIEC) in Children with Diarrhea in Shiraz. *Ann Colorectal Res*. 2015; 2(3).

Abbasi P, Kargar M, Doosti A, Mardaneh J, Ghorbani-Dalini S, Dehyadegari MA. Enteraggregative *Escherichia coli* (EAEC): An Emerging Enteric Pathogen in South of Iran. *J Med Bacteriol*. 2014; 3(3):40-46.

Abidi SH, Sherwani SK, Siddiqui TR, Bashir A, Kazmil SU. Drug resistance profile and biofilm forming potential of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from contact lenses in Karachi-Pakistan. *BMC Ophthalmol*. 13: 57, 2013.

Abreu S R, Pereira B M, Silva N M, Moura L R P, Brito C M S, Câmara J T. Estudo epidemiológico de pacientes com infecção pelo vírus da imunodeficiência humana/síndrome da imunodeficiência adquirida (HIV/AIDS), Caxias-MA. *R. Interd*. 2016; 9(4):132-141.

Adeyemi AI, Sulaiman AA, Solomon BB, Chinedu OA, Victor IA. Bacterial bloodstream infection in hiv-infected adults attending a lagos teaching hospital. *J Health Popul Nutr*. 28(4):318-26, 2010.

Agarwal SG, Powar RM, Tankhiwale S, Rukadikar A. Study of Opportunistic Infections in HIV-AIDS Patients and their Co-Relation with CD4+ Cell Count. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci*, 2015; 4(6): 848-861.

Albino LAA, Rostagno MH, Hungaro HM, Mendonca RCS. Isolation, Characterization, and Application of Bacteriophages for *Salmonella* spp. Biocontrol in Pigs. *Foodborne Pathogens And Disease*. 2014.

Ambali AP, Murthy S, Mulimani MS. Identification of bacteria causing diarrhoea in HIV/AIDS patients and its correlation with CD4 count. *J Evid Based Med Healthc*, 2016; 3, 2165-8.

Anvisa. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. M100S, 26 ed, 2016.

Asensio A, Alvarez-Espejo T, Fernandez-Crehuet JAR, et al. Trends in yearly prevalence of third-generation cephalosporin and fluoroquinolone resistant Enterobacteriaceae infections and antimicrobial use in Spanish hospitals, Spain, 1999 to 2011. *Euro Surveill.*16:19983, 2011.

Aujla SJ, Kolls JK. IL-22: a critical mediator in mucosal host defense. *J Mol Med.* 87:451–4, 2009.

Bardhan P, Faruque ASG, Naheed A, A D. Sack. Decrease in Shigellosis-related Deaths without *Shigella* spp–specific Interventions, Asia. *Emerging Infectious Diseases.* 2010; 16(11).

Bassa A, Dadie A, Guessennd N, Gbonon V, Dako E, Dje M, Dosso M. Virulence Factors and Resistance Profile of *Shigella* Isolated During Infectious Diarrhea in Abidjan, Côte D'Ivoire. *Journal of Applied Sciences Research.* 2010; 6(6):594-599.

Beld MJCVD, Reubsaet FAG. Differentiation between *Shigella*, enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC) and noninvasive *Escherichia coli*. *European. Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases.*2012; 31(6): p899–904.

Benevides-Matos N, Pieri FA, Penatti M, Orlandi PP. Adherence and virulence genes of *Escherichia coli* from children diarrhoea in the Brazilian Amazon. *Brazilian Journal of Microbiology.* 2015;46(1):131-137.

Bernard CL, Brandeau ML, Humphreys K, Bendavid E, Holodniy M, Weyant C, Owens DK, Goldhaber-Fiebert JD. Cost-Effectiveness of HIV Preexposure Prophylaxis for People Who Inject Drugs in the United States. *Ann Intern Med.* 26, 2016.

Bhaijee F, Subramony C, Tang S, Pepper DJ. Human Immunodeficiency Virus-Associated Gastrointestinal Disease: Common Endoscopic Biopsy Diagnoses. *Patholog Res Int.* 20(11): 247- 249, 2011.

BLAIR, JMA et al. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nature Reviews Microbiology*, v. 13, n. 1, p. 42-51, 2015.

Blanc-Potard AB, Groisman EA. The Salmonella selC locus contains a pathogenicity island mediating intramacrophage survival. *The EMBO Journal* 1997; 16(17):5376–5385,.

Brenchley JM. Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection. *Retrovirology*, 3:1, 2011.

Breurec S, Melot, B, Hoen B, Passet, V, Schepers K, Bastian S, Brisse S. Liver abscess caused by infection with community-acquired *Klebsiella quasipneumoniae* subsp. *quasipneumoniae*. *Emerging infectious diseases*, 2016; 22(3): 529.

Brisse S, Passet V, Grimont PA. Description of *Klebsiella quasipneumoniae* sp. nov., isolated from human infections, with two subspecies, *Klebsiella quasipneumoniae* subsp. *quasipneumoniae* subsp. nov. and *Klebsiella quasipneumoniae* subsp. *similipneumoniae* subsp. nov., and demonstration that *Klebsiella singaporensis* is a junior heterotypic synonym of *Klebsiella variicola*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 64(9): 3146-3152, 2014.

Bixler SL, Mattapallil JJ. Loss and Dysregulation of Th17 Cells during HIV Infection. *Clinical and Developmental Immunology*, vol 9, 2013.

Baral SD, Griensven FV, Goodreau SM, Chariyalertsak S, Wirtz AL, Brookmeyer R. Global epidemiology of HIV infection in men who have sex with men. *Lancet*. 2012; 28(39): 367–377.

Cai Y, Tao J, Jiao Y, Fei X, Zhou L, Wang Y, Zheng H, Pan Z, Xinan Jiao. Phenotypic characteristics and genotypic correlation between Salmonella isolates from a slaughterhouse and retail markets in Yangzhou, China. *International Journal of Food Microbiology*. 2016; 222: 56–64.

Caldorin M, Almeida TAZC, Peresi JTM, Alves EC. Ocorrência de *Escherichia coli* produtora de toxina Shiga (STEC) no Brasil e sua importância em Saúde Pública. *BEPA*. 2013;10(10):4-20.

Cardoso ALSP, Tessari ENC. *Salmonella enteritidis* em Aves e na Saúde Pública: Revisão de Literatura. *Rev. Cient. Eletr. Med. Vet.* 2013; 21(9).

Carlson LA, JAG, Glass B, Riches JD, Simon MN, Johnson MC, Müller B, Grünewald K, Kräusslich HG. Three-Dimensional Analysis of Budding Sites and Released Virus Suggests a Revised Model for HIV-1 Morphogenesis. *Cell Host Microbe*. 2008;11(6):592–599.

Cheng L, Cao XL, Zhang ZF, Ning MZ, Xu XJ, Zhou W, Zhang K. Clonal dissemination of KPC-2 producing *Klebsiella pneumoniae* ST11 clone with high prevalence of *oqxAB* and *rmtB* in a tertiary hospital in China: results from a 3-year period. *Annals of clinical microbiology and antimicrobials*, 2016; 15(1): 1.

Clay PG, Crutchley RD. Noninfectious Diarrhea in HIV Seropositive Individuals: a Review of Prevalence Rates, Etiology, and Management in the Era of Combination Antiretroviral Therapy. *Infect Dis Ther*. 2014; 3:103–122. DOI 10.1007/s40121-014-0047-5.

Clements A, Young JC, Constantinou N, Frankel G. Infection strategies of enteric pathogenic *Escherichia coli*. *Gut Microbes*. 2012; 3(2):71–87.

Coffin J, Swanstrom R. HIV Pathogenesis: Dynamics and Genetics of Viral Populations and Infected Cells. *Cold Spring Harb Perspect Med*. DOI: 3:a012526, 2013.

Collinson SK, Emody L, Trust TJ, Kay WW. Thin aggregative fimbriae from Diarrheagenic *Escherichia coli*. *J. Bact*. 1992; 174(13):4490-4495.

Conceicao T, Brizio A, Duarte A, Lito LM, Cristino JM, Salgado MJ. First description of CTX-M-15-producing *Klebsiella pneumoniae* in Portugal. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 2005; 49(1): 477-478.

Coura FM, Lage AP, Heinemann MB. Patotipos de *Escherichia coli* causadores de diarreia: uma atualização. *Pesq. Vet. Bras*. 2014; 34(9):811-818.

Croxen MA, Finlay BB. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Microbiology*. 2010 8(7).

Croxen MA, Law RJ, Scholz R, Keeney KM, Wlodarska M, Finlay BB. Recent Advances in Understanding Enteric Pathogenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*.2013; 26(4):822– 880.

Crump JA, Sjölund-Karlsson M, Gordon MA, Parrye CM. Epidemiology, Clinical Presentation, Laboratory Diagnosis, Antimicrobial Resistance, and Antimicrobial Management of Invasive *Salmonella* Infections. 2015; 28(4).

Dantas PIS. Variabilidade Genética dos Principais Fatores de Virulência em amostras clínicas de *Shigella flexneri*. Universidade Federal do Amazonas. Instituto de Ciências Biológicas. Programa Multi-Institucional de Pós-graduação em Biotecnologia, 2016.

Deiwick J, Nikolaus T, Erdogan S, Hensel M. Environmental regulation of *Salmonella* pathogenicity island 2 gene expression. *Molecular Microbiology*. 1999; 31(6):1759–1773.

Demirdag K, Hosoglu S. Epidemiology and risk factors for ESBL-producing *Klebsiella pneumoniae*: a case control study. *J Infect Dev Ctries*. 24;4(11):717-22, 2010.

Dikman AE, Schonfeld Srisarajivakul NC, Pols EMA. Human Immunodeficiency Virus-Associated Diarrhea: Still an Issue in the Era of Antiretroviral Therapy. *Dig Dis Sci*. 2015; 60(8):2236–2245.

Dillon SM, Lee EJ, Kotter CV, Austin GL, Dong Z, Hecht DK, Gianella S, Siewe B, Smith DM, Landay AL, Robertson CE, Frank DN, Wilson CC. An altered intestinal mucosal microbiome in HIV-1 infection is associated with mucosal and systemic immune activation and endotoxemia. *Mucosal Immunol*. 7:983–94. 69, 2014.

Dong F, Xu XW, Song WQ, Lü P, Yu SJ, Yang YH, Shen XZ. Characterization of multidrug-resistant and metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates from a pediatric clinic in China. *Chin. Med. J.*, 2008;121:1611-1616.

Donnenberg MS, Whittam TS. Pathogenesis and evolution of virulence in enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *J Clin Invest*. 2001; 1(107): 539–548.

Duffau P, Wittkop L, Lazaro E, le Marec F, Cognet C, Blanco P, Moreau JF, Dauchy FAⁱ, Cazanave C, Vandenhende MA, Bonnet F, Thiebaut R, Pellegrin I. Association of immune-activation and senescence markers with non-AIDS-defining comorbidities in HIV-suppressed patients. *Clinical Science AIDS*. 2015; 29(16):2099–2108. doi: 10.1097/QAD.0000000000000807.

Ehrbar K, Friebel A, Miller SI, Hardt WD. Role of the Salmonella Pathogenicity Island 1 (SPI-1) Protein InvB in Type III Secretion of SopE and SopE2, Two Salmonella Effector Proteins Encoded Outside of SPI-1. *J. Bacteriol.* 2007; 185(23):6950-6967,. doi: 10.1128/JB.185.23.6950-6967.2003.

Eijk AM, Brooks JT, Adcock PM, Garrett V, Eberhard M, Rosen DH, Ayisi JG, Ochieng JB, Kumar L, Gentsch JR, Nahlen BL, Mintz ED, Slutsker L. Diarrhea in children less than two years of age with known HIV status in Kisumu, Kenya. *International Journal of Infectious Diseases.* 2010; 14: 220–225.

Ellermeier JR, Slauch JM. Adaptation to the host environment: regulation of the SPII type III secretion system in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Curr Opin Microbiol.* 2007; 10, 24–29.

Foley SL, Lynne AM. Food animal-associated *Salmonella* challenges, pathogenicity and antimicrobial resistance. *Journal of Animal Science, Champaign.* 2008; 86: 173–187.

Garcia C, Chinchá O, Leon M, Iglesias D, Barletta F, Mercado E, Ochoa T. Short Report: High Frequency of Diarrheagenic *Escherichia coli* in Human Immunodeficiency Virus (HIV) Patients with and without Diarrhea in Lima, Perú. *Am J Trop Med Hyg.* 2010; 82(6):1118–1120.

Garcia MC, Lee JT, Ramsook CB, Alsteens D, Dufrêne YF, Lipke PN. A role for amyloid in cell aggregation and biofilm formation. *PLoS One.* v6:17632, 2011.

Garg H, Mohl J, Joshi A. HIV-1 induced bystander apoptosis. *Viruses.* 4:3020–3043, 2012.

Gilbart VL, Simms I, Jenkins C, Furegato M, Gobin M, Oliver I, Hart G, Gill O N, Hughes G. Sex, drugs and smart phone applications: findings from semistructured interviews with men who have sex with men diagnosed with *Shigella flexneri* a in England and Wales. *Sex Transm Infect.* 2015; 91: 598–602.

Gordienko EN, Kazanov MD, Gelfandb MS. Evolution of Pan-Genomes of *Escherichia coli*, *Shigella* spp., and *Salmonella enterica*. *Journal of Bacteriology.* 2013; 195(12):2786–2792.

Gosselin A, Monteiro P, Chomont N, Diaz-Griffero F, Said EA, Fonseca S, Wacleche V, El-Far M, Boulassel MR, Routy JP, Sekaly RP, Ancuta P. Peripheral blood CCR4+CCR6+ and

CXCR3+CCR6+CD4+ T cells are highly permissive to HIV-1 infection. *Journal of Immunology*, 184 (3), 1604–16, 2010.

Goto Y, Panea C, Nakato G, Cebula A, Lee C, Diez M G, Laufer TM, Ignatowicz L, Ivanov I I. Segmented Filamentous Bacteria Antigens Presented by Intestinal Dendritic Cells Drive Mucosal Th17 Cell Differentiation. *Immunity*. 2014; 40: 594–607

Guibourdenche M, Roggentin P, Mikoleit M, Fields PI, Bockemuhl J, Grimont P AD, Weill FX. Supplement 2003-2007 (N°47) to the White-Kauffmann – Le Minor scheme. *Research in Microbiology*. 2010; 161:26-29.

Hajishengallisa G, Lambrisb JD. Complement and dysbiosis in periodontal disease. *Immunobiology*. 217(11): 1111–1116, 2012.

Hasman H, Mevius D, Veldman KI, Olesen FM. Beta-Lactamases among extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-resistant *Salmonella* from poultry, poultry products and human patients in The Netherlands J. *Antimicrob. Chemother*, 2005; 56:115-121.

Högenauer C, Langner C, Beubler E, Lippe I, Schicho R, Gorkiewicz G, Krause R, Gerstgrasser N, Krejs G, Hinterleitner TA. *Klebsiella oxytoca* as a Causative Organism of Antibiotic-Associated Hemorrhagic Colitis. *N Engl J Med*. 2006; 355:2418-2426.

Iyamba JL, Wambale JM, Takaisi-Kikuni NB. Antimicrobial susceptibility patterns of enterobacteriaceae isolated from HIV-infected patients in Kinshasa. *Pan Afr Med J*. 2014; 17(179).

Jakhetia R, Talukder KA, Verma NK. Isolation, characterization and comparative genomics of bacteriophage SfIV: a novel serotype converting phage from *Shigella flexneri*. *BMC Genomics*. 2013; 14(677).

Jensen BH, Olsen KEP, Struve C, Krogfelt KA, Petersena AM. Epidemiology and Clinical Manifestations of Enteroaggregative *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*. 2014; 27(3): 614 – 630.

Kamada N, Chen GY, Inohara N, Nunez G. Control of pathogens and pathobionts by the gut microbiota. *Nat Immunol*. 14,685–690, 2013.

Keating SM, Jacobs ES, Norris PJ. Soluble mediators of inflammation in HIV and their implications for therapeutics and vaccine development. *Cytokine Growth Factor Rev.* 23(4-5):193-206, 2012.

Kessler R, Nisa S, Hazen TH, Horneman A, Amoroso A, Rasko DA, Donnenberg MS. Diarrhea, bacteremia and multiorgan dysfunction due to an extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strain with enteropathogenic *E.coli* genes. *FEMS Pathogens and Disease.* 2015; 73(8).

Kiss T, Morgan E, Nagy G. Contribution of SPI-4 genes to the virulence of *Salmonella enterica*. *FEMS Microbiol Lett.* 2007; 275:153–159.

Klatt, N. R., Funderburg, N. T. & Brenchley, J. M. *Microbial translocation, immune activation, and HIV disease.* *Trends in microbiology* 21, 6–13, 2013.

Koh XP, Chiou CS, Ajam N, Watanabe H, Ahmad N, Thong KL. Characterization of *Shigella sonnei* in Malaysia, an increasingly prevalent etiologic agent of local shigellosis cases. *BMC Infectious Diseases.* 2012; 12(122).

Koneman EW, Allen SD, Janda WM. *Diagnóstico Microbiológico.* MEDSI, 2008; 1465.

Krones E, Högenauer C. Diarrhea in the Immunocompromised Patient. *Gastroenterol Clin N Am.* 2012; 41:677–701.

Lackner AA, Lederman MM, Rodriguez B. HIV pathogenesis—The host. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2012; v2:a007005.

Lederman, M. M., Funderburg, N. T., Sekaly, R. P., Klatt, N. R. & Hunt, P. W. *Residual immune dysregulation syndrome in treated HIV infection.* *Advances in immunology* 119, 51–83, 2013.

Levy JA. HIV pathogenesis: 25 years of progress and persistent challenges. *JAIDS Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes.* 2009, 23:147-160.

Li, B., Zhao, Y., Liu, C., Chen, Z., & Zhou, D. Molecular pathogenesis of *Klebsiella pneumoniae*. *Future microbiology,* 2014; 9(9): 1071-1081.

Lima JLC, Alves LR, Paz JNP, Rabelo MA, Maciel MAV, Morais MMC. Análise da produção de biofilme por isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* de pacientes com pneumonia associada à ventilação mecânica. *Rev. Bras. Ter. Intensiva.* v.29, n3, 2017.

Lima RM, Dias JA. Gastroenterite Aguda. *Revista do Hospital de Criança.* 2010; 19(2).

Liu Z, Que F, Liao L, Zhou M, You L, Zhao Q, Li Y, Niu H, Wu S, Huang R. Study on the Promotion of Bacterial Biofilm Formation by a *Salmonella* Conjugative Plasmid and the Underlying Mechanism. *Plos One.* 2014; 9(10).

Lopes AER., Canini SRMS, Reinato LAF, Lopes LP, Gir E. Prevalência de bactérias gramnegativas em portadores de HIV internados em serviço especializado. *Acta Paul Enferm.* 2015; 28(3): 281-286.

Lozupone CA, Li M, Campbell TB, Flores SC, Linderman D, Gebert MJ, Knight R, Fontenot AP, Palmer BE. Alterations in the Gut Microbiota Associated with HIV-1 Infection. *Cell Host & Microbe.* 2013; 14(11):329–339.

Maartens G, Celum C, Lewin SR. HIV infection: epidemiology, pathogenesis, treatment, and prevention. *Lancet.* Published online June 5, 2014.

MacArthur RD, DuPont HL. Etiology and Pharmacologic Management of Noninfectious Diarrhea in HIV-Infected Individuals in the Highly Active Antiretroviral Therapy Era. *Clinical Infectious Diseases.* v55, n6, p860–7. 2012.

Makvana S, Krilov LR. *Escherichia coli* Infections. *Pediatrics in Review.* 2015;36(4).

Marbou WJT, Kuete V. Bacterial resistance and immunological profiles in HIV-infected and non-infected patients at Mbouda AD LUCEM Hospital in Cameroon. *J Infect Public Health.* 10(3):269-276, 2017.

Marchetti G, Tincati C, Silvestrib G. Microbial Translocation in the Pathogenesis of HIV Infection and AIDS. *Clinical Microbiology Reviews.* 2013; 26(1):2–18.

Martinez-Becerra FJ, Chen X, Dickenson NE, Choudhari SP, Harrison K, Clements JD, Picking WD, Verg LLVD, Walker RI, Picking WL. Characterization of a Novel Fusion Protein from IpaB and IpaD of *Shigella* spp. and Its Potential as a Pan-*Shigella* Vaccine. *Infection and Immunity.* 2013; 81(12):4470 – 4477.

Martins TA, Kerr LRFS, Kendall C, Mota RMS. Cenário Epidemiológico da Infecção pelo HIV e AIDS no Mundo. Rev Fisioter S Fun, 2014, 3(1):4-7.

Meng H, Cencer M1, Liu Y, Winter A, Murley M, Lee BP. Effect of pH on the rate of curing and bioadhesive properties of dopamine functionalized poly(ethylene glycol) hydrogels. Biomacromolecules. 11;15(8):2861-9, 2014.

Milan C, Timm CD. Fatores de virulência associados a formação de biofilme por *Salmonella Enterica*: Minirrevisão. 2015; 3(1): 94-102.

Ministério da saúde - SVS. Boletim Epidemiológico. 2015.

Mojtaba M, Mohammad R. Molecular detection of metallo- β -lactamase genes, blaIMP-1, blaVIM-2 and blaSPM-1 in imipenem resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from clinical specimens in teaching hospitals of Ahvaz, Iran. Iran J Microbiol. 7(1): 2–6, 2015.

Mowat AM, Agace WW. Regional specialization within the intestinal immune system. Nature Reviews Immunology. 2014. doi:10.1038/nri3738

Mudd JC, Brenchley JM. Gut Mucosal Barrier Dysfunction, Microbial Dysbiosis,

Mugweru FG, Nyamai DW, Arika MW, Ngugi MP, Gathumbi PK, Njagi ENM, Ngeranwa JJN. Antimicrobial Activity of Aqueous Extracts of *Maytemus putterlickoides*, *Senna spectabilis* and *Olinia usambarensis* on Selected Diarrhea-Causing Bacteria. J Bacteriol Parasitol. 7(270). doi: 10.4172/2155-9597.1000270.

Muller D, Greune L, Heusipp G, Karch H, Fruth A, Tschape H, Schmidt A. Identification of Unconventional Intestinal Pathogenic *Escherichia coli* Isolates Expressing Intermediate Virulence Factor Profiles by Using a Novel Single-Step Multiplex PCR. Applied and Environmental Microbiology. 2007; 73(10): 3380–3390.

Mulvey MR, Haraoui LP, Longtin Y. Multiple Variants of *Klebsiella pneumoniae* Producing Carbapenemase in One Patient. New England Journal of Medicine, 2016; 375(24): 2408-2410.

Mutlu EA, Keshavarzian A, Losurdo J, Swanson G, Siewe B, Forsyth C, French A, DeMarais P, Sun Y, Koenig L, Cox S, Engen P, Chakradeo P, Abbasi R, Gorenz A, Burns C, Landay A.

A compositional look at the human gastrointestinal microbiome and immune activation parameters in HIV infected subjects. *PLoS Pathog.* 10:e1003829, 2014.

Naif H M. Pathogenesis of HIV infection. *Infectious Disease Reports* v5, s1, e6, 2013.

NEVES, P. R. et al. Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: an endemic problem in Brazil. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, v. 47, n. 4, p. 409–420, 2011.

Nixon DE, Landayb AL. Biomarkers of immune dysfunction in HIV. *Curr Opin HIV AIDS.* 5(6): 498–503, 2010.

Nsagha DS., Njunda AL., Clement NAJ., Wenze AC., Tanue EA., Dzemo O, Kwenti TE. Intestinal parasitic infections in relation to CD4+ T cell counts and diarrhea in HIV/AIDS patients with or without antiretroviral therapy in Cameroon. *BMC Infectious Diseases.* 16(9), 2016.

Nunes MRCM, Magalhães PP, Penna FJ, Nunes JMM, Mendes EN. Diarreia associada a *Shigella* em crianças e sensibilidade a antimicrobianos. *J Pediatr.* 88(2), 2012.

Nwosu FC, Avershina E, Wilson R, Rudi K. Gut Microbiota in HIV Infection: Implication for Disease Progression and Management. *Gastroenterology Research and Practice.* 6, 2014.

O'Toole GA, Kotler R. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Molecular Microbiol*, v. 30, p. 295-304, 1998.

Ochoa TJ, Rivera FP, Bernal M, Meza R, Ecker L, Gil AI, Cepeda D, Mosquito S, Mercado E, Maves RC, Hall ER, Svennerholm AM, McVeigh A, Savarino S, Lanata CF. Detection of the CS20 colonization factor antigen in diffuse-adhering *E.coli* strains. *FEMS Immunology Medical Microbiology.* 60(2):186-189, 2010.

Oladosu TO, Adebolu TT, Oladunmoye MK. CD4 Profile and Relationship with Bacterial Isolates from the Blood of HIV-1 Patients attending art Clinic at a Tertiary Healthcare Institution in Southwest, Nigeria. *HIV Curr Res.* 1(109), 2016.

Oliveira AP, Sola MC, Feistel JC, Moreira NM, Oliveira JJ. *Salmonella Enterica*: Genes de virulência e Ilhas de Patogenicidade. *Enciclopédia Biosfera.* 2013; 9,(16):1942-1968.

- Oliveira RSM, Benzaken AS, Saraceni V, Sabidó M. HIV/AIDS epidemic in the State of Amazonas: characteristics and trends from 2001 to 2012. *Rev Soc Bras Med Trop.* (48):70-78, 2015.
- Ooi SMS. Fulminant Shigellosis in a HIV Patient. *Case Reports in Infectious Diseases.* 128104, 2015.
- Orenstein JM. Ultrastructure of HIV/AIDS. *Ultrastruct Pathol.*26:245-250. 2002.
- Padmavathy K, Padma K, Rajasekaran S. Multidrug Resistant CTX-M-Producing *Escherichia coli*: A Growing Threat among HIV Patients in India. *J Pathog.* 2016: 4152704. 2016.
- Paiardini M, Trutwin MM. HIV-associated chronic immune activation. *Immunological Reviews.* (254): 78–101, 2013.
- Pavlinac Pb, John-Stewart Gc, Naulikha Jm, Onchiri Fm, Denno Dm, Odundo Ea, Singa Bo, Richardson Ba, Walson Jl. High-Risk Enteric Pathogens Associated with HIV-Infection and HIV-Exposure In Kenyan Children with acute diarrhea. *AIDS.* 24(28):2287–2296, 2014.
- Peleg AY, Hooper C. Hospital-Acquired Infections Due to Gram-Negative Bacteria. *N Engl J Med.* 362:1804-1813, 2010.
- Perkins MR, Bartha I, Timmer JK, Liebner JC, Wolinsky D, Günthard HF, Hauser C, Bernasconi E, Hoffmann M, Calmy A, Battegay M, Telenti A, Douek DC, Fellay J. The Interplay Between Host Genetic Variation, Viral Replication, and Microbial Translocation in Untreated HIV-Infected Individuals. *J Infect Dis.* 15;212(4):578-84, 2015.
- Perovic O, Singh A.. Nosocomial Infections in Patients with Human Immunodeficiency Virus (HIV). *Intech.* 2011.
- Peterson LW, Artis D. Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis. *Nature Reviews.* 2014.
- Pinto-Cardoso S, Lozupone C, Briceño O, Alva-Hernández S, Téllez N, Adriana A, Murakami-Ogasawara A, Reyes-Terán G. Fecal Bacterial Communities in treated HIV infected individuals on two antiretroviral regimens. *Scientific Reports.* (7):41-43, 2017.

Potron A, Poirel L, Nordmann, P. Emerging broad-spectrum resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology. *International journal of antimicrobial agents*, v. 45, n. 6, p. 568-585, 2015.

Rajpara N, Nair M; Chowdhury G, Mukhopadhyay A, Ramamurthy T, Niyogi S, Bhardwaj A. Molecular analysis of multidrug resistance in clinical isolates of *Shigella* spp. From 2001–2010 in Kolkata, India: Role of integrons, plasmids, and topoisomerase mutatio. *Infection and Drug Resistancens*. v11, 87:102, 2010.

Ramos NV. Caracterização genética da resistência aos β lactamicos e taxonomia de isolados do gênero *Klebsiella*. *Dissertação de mestrado*. Fundação Oswaldo Cruz Instituto Oswaldo Cruz. pags. 73, 2015.

Reeves RK, Gillis J, Wong FE, Yu Y, Connole M, Johnson RP. CD16-natural killer cells: enrichment in mucosal and secondary lymphoid tissues and altered function during chronic SIV infection. *Blood*. 115:4439–4446, 2014.

Robakis TK, Williams KE, Crowe S, Kenna H, Gannon J, Rasgon NL. Optimistic outlook regarding maternity protects against depressive symptoms post-partum. *Arch. Womens Ment. Health*. 18:197–208, 2015.

Rocha DCC, Marinho ANR, Santos SD, Loureiro ECB. Caracterização molecular de *Escherichia coli* enteropatogênica atípica em animais silvestres capturados na Região Amazônica. *Rev Pan-Amaz Saude*. 2017; 8(1):9-16.

Rodrigues C, Machado E, Ramos H, Peixe L, Novais Â. Expansion of ESBL-producing *Klebsiella pneumoniae* in hospitalized patients: A successful story of international clones (ST15, ST147, ST336) and epidemic plasmids (IncR, IncFII K). *International Journal of Medical Microbiology*, 2014; 304(8): 1100-1108.

Rosa M C N, Silva M O, Hora V P. Patogênese do HIV – características do vírus e transmissão materno-infantil. *RBAC*. 2016; 48(4):301-6.

Sanchez CJJ, Mende K, Beckius ML, Akers KS, Romano DR, Wenke JC, Murray CK. Biofilm formation by clinical isolates and the implications in chronic infections. *BMC Infect Dis*. 29, 13:47, 2013.

Sandler NG & Douek DC. Microbial translocation in HIV infection: causes, consequences and treatment opportunities. *Nature Reviews Microbiology*. v10, p655–666, 2012.

Sandler NG, Wand H, Roque A, Law M, Nason MC, Nixon DE, Pedersen C, Ruxrungtham K, Lewin SR, Emery S, Neaton JD, Brenchley JM, Deeks SG, Sereti I, Douek DC Plasma levels of soluble CD14 independently predict mortality in HIV infection. *J Infect Dis*. 15;203(6):780-90, 2011.

Schroeder GN, Hilbi H. Molecular Pathogenesis of *Shigella spp.*: Controlling Host Cell Signaling, Invasion, and Death by Type III Secretion. *Clinical Microbiology Reviews*. 2008; 21(1):134–156.

Schultz M. Clinical use of *E.coli* Nissle 1917 in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*. 14:1012–1018, 2008.

Secretaria Municipal de Saúde de Manaus. Situação de saúde no município de Manaus – Relatório Executivo. 2013.

Seddon J, Bhagani S. Antimicrobial therapy for the treatment of opportunistic infections in HIV/AIDS patients: a critical appraisal. *HIV AIDS-Res Pal Care*. 3:19–33, 2014.

Serra PT. Análise investigativa dos fatores de virulência de cepas selvagens de *Shigella spp.* in vivo e seu potencial inflamatório. Universidade Federal do Amazonas. Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada, 2013.

Shah S, Kongre V, Kumar V, Bharadwaj R. A Study of Parasitic and Bacterial Pathogens Associated with Diarrhea in HIVPositive Patients. A Study of Parasitic and Bacterial Pathogens Associated with Diarrhea in HIV-Positive Patients. *Cureus*. 2016;8(9). DOI 10.7759/cureus.807.

Shan L, Siliciano RF. Unraveling the relationship between microbial translocation and systemic immune activation in HIV infection. *The Journal of Clinical Investigation*. 2014; 124(6).

Sheldon M, Rycroft AN, Dogan B, Craven M, Bromfield JJ, Chandler A, Roberts MH, Price SB, Gilbert RO, Simpson KW. Specific Strains of *Escherichia coli* are Pathogenic for the

Endometrium of Cattle and Cause Pelvic Inflammatory Disease in Cattle and Mice. PLoS ONE. 2010; 5(2):91- 92.

Sierra S, Kupfer B, Kaiser R. Basics of the virology of HIV-1 and its replication. J Clin Virol. 2005; 34:233-244.

Silva L R, Visgueira A F, Oliveira N L, Rocha M E M O. Variáveis epidemiológicas da infecção pelo HIV em gestantes. Rev Enferm UFPI. 2016; 5(1):34-39.

Silva LCF, Santos EM, Neto ALS, Miranda AE, Talhari S, Toledo LM. Padrão da infecção pelo HIV/AIDS em Manaus, Estado do Amazonas, no período de 1986 a 2000. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 2009; 42(5).

Silva RAR, Silva RTS, Nascimento EGC, Gonçalves OP, Reis MM, Silva BCO. Clinical-epidemiological profile of HIV-positive adults attended in a hospital from Natal/RN. Rev Fund Care Online. 2016; 8(3):4689-4696.

Sinha B, Rubens M. Systemic immune activation in HIV and potential therapeutic options. Immunopharmacology and Immunotoxicology. 2014; 36(22).

So-Armah KA, Tate JP, Chang CCH, Butt AA, Gerschenson M, Gibert CL, Leaf, D, Rimland D, Rodriguez-Barradas MC, Budoff MJ, Samet JH., Kuller LH, Deeks SG, Crothers K, Tracy RP, Crane HM, Sajadi MM, Tindle HA, Justice AC, Freiberg MS. Do Biomarkers of Inflammation, Monocyte Activation, and Altered Coagulation Explain Excess Mortality Between HIV Infected and Uninfected People? J Acquir Immune Defic Syndr. 1; 72(2): 206–213, 2013.

Sommer F, Backhed F. Know your neighbor: Microbiota and host epithelial cells interact locally to control intestinal function and physiology. Prospects & Overviews. 38: 455–464, 2016.

Souza CO, Barros TR, Barros CS, Menezes EM, Carvalho AC, Monteiro LCR. Escherichia coli enteropatogênica: uma categoria diarreioagênicas versátil. Rev Pan-Amaz Saude.2016; 7(2):79-91.

- Steckbeck JD, Kuhlmann AS, Montelaro RC. C-terminal tail of human immunodeficiency virus gp41: Functionally rich and structurally enigmatic. *Journal of General Virology*. 2013; (94)1–19.
- Sugandhi N, Rodrigues J, Kim M, Ahmed S, Amzel A, Tolle M, Dzubien E, Rivadeneira E, Kellerman S. HIV Exposed Infants: Rethinking care for a lifelong condition. *AIDS*. 7(02), S187-S195. 2013.
- Sundquist WI, Kräusslich HG. HIV-1 Assembly, Budding, and Maturation. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2012; 2(7).
- Swanstrom R, Coffin J. HIV-1 Pathogenesis: The Virus. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2012; (2): 007443.
- Tenorio A, Chan E, Bosch RJ, Macatangay BJC, Read SW, Yesmin S, Taiwo B, Margolis DM, Jacobson JM, Landay AL, Wilson CC. Rifaximin has a Marginal Impact on Microbial Translocation, T-cell Activation and Inflammation in HIV-Positive Immune Non-responders to Antiretroviral Therapy – ACTG A5286. *J Infect Dis*. 2015; 211(5):780–790.
- Thompson CN, Phan MV, Hoang NV, Minh PV, Vinh NT, Thuy CT, Nga TT, Rabaa MA, Duy PT, Dung TT, Phat VV, Nga TV, Tu le TP, Tuyen HT, Yoshihara K, Jenkins C, Duong VT, Phuc HL, Tuyet PT, Ngoc NM, Vinh H, Chinh NT, Thuong TC, Tuan HM, Hien TT, Campbell JI, Chau NV, Thwaites G, Baker S. A prospective multi-center observational study of children hospitalized with diarrhea in Ho Chi Minh City, Vietnam. *Am J Trop Med Hyg*. 2015; 92(5):1045-52.
- Trevisol F S, Pucci P, Justino A Z, Pucci N, Silva A C B. Perfil epidemiológico dos pacientes com HIV atendidos no sul do Estado de Santa Catarina, Brasil, em 2010. *Epidemiol. Serv. Saúde*. 2013; 22(1).
- Turner JR. Intestinal mucosal barrier function in health and disease. *Nat Rev Immunol*. 9:799–809. 14, 2009.
- UNAIDS. Review of data from People Living with HIV Stigma Index surveys conducted in more than 65 countries, 2016.

Vujkovic-Cvijin I, Dunham RM, Iwai S, Maher MC, Albright RG, Broadhurst MJ, Hernandez RD, Lederman MM, Huang Y, Somsouk M, Deeks SG, Hunt PW, Lynch SV, McCune JM. Dysbiosis of the gut microbiota is associated with HIV disease progression and tryptophan catabolism. *Sci Transl Med* 2013; 5:193ra91.

Vujkovic-Cvijin I, Dunham RM, Iwai S, Maher MC, Albright RG, Broadhurst MJ, Hernandez RD, Lederman MM, Huang Y, Somsouk M, Deeks SG, Hunt PW, Lynch SV, McCune JM. Dysbiosis of the gut microbiota is associated with HIV disease progression and tryptophan catabolism. *Sci Transl Med.* 10;5(193):91, 2013.

Walsh TR, Weeks J, Livermore DM, Toleman MA. Dissemination of NDM-1 positive bacteria in the New Delhi environment and its implications for human health: an environmental point prevalence study. *The Lancet infectious diseases.* 2011;11(5):355–62.

Wanyiri JW, Kanyi H, Maina S, Wang DE, Ngugi P, O'Connor R, Kamau T, Waithera T, Kimani G, Wamae CN, Mwamburi M, Ward HD. Infectious diarrhoea in antiretroviral therapy-naïve HIV/AIDS patients in Kenya. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2013; 107(10):631-8.

Weiss LAU, Yassibanda AS, Aidara A, Le BC, Germani Y. Enteropathogenic *Klebsiella pneumoniae* HIV-Infected Adults, Africa. *Emerging infectious diseases.* 135:7. 2018.

Wilmore SMS, Kranzer K, Williams A, Makamure B, Nhidza AF, Mayini J, Bandason T, Metcalfe J, Nicol MP, Balakrishnan I, Ellington MJ, Woodford N, Hopkins S, McHugh TD, Ferrand RA. Carriage of extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in HIV-infected children in Zimbabwe. *J Med Microbiol.* 2017;66(5):609-615.

Winn MD, Ballard CC, Cowtan KD, Dodson EJ, Emsley P, Evans PR, Keegan RM, Krissinel EB, Leslie AG, McCoy A, McNicholas SJ, Murshudov GN, Pannu NS, Potterton EA, Powell HR, Read RJ, Vagin A, Wilson KS. Overview of the CCP4 suite and current developments. *Biological Crystallography.* 2011;67:235–242.

Xiuqiong B , Azumi I, Lam VN , Kazunori M, Hung VP, Chung TTP, Kiyohito O, Thuy TTG, Thuy TBP, Tuyen TN , Masaharu T , Um NP, Dung TKK, Hiroshi I. Impact of HIV

Infection and Anti-Retroviral Therapy on the Immune Profile of and Microbial Translocation in HIV-Infected Children in Vietnam. *Int J Mol Sci.*17(8): 1245, 2016.

Yang Y, Torchinsky MB, Gobert M, Xiong H, Xu M, Linehan JL, Alonzo F, Ng C, Chen A, Lin X, czesnak A, Liao JJ, Torres VJ, Jenkins MK, Lafaille JJ, Littman DR. Focused specificity of intestinal TH17 cells towards commensal bacterial antigens. *Letter Research Nature*. DOI:10.1038/nature13279, 2014.

Yigit H, Queenan A M, Anderson GJ, Domenech-Sanchez A, Biddle JW, Steward CD, Tenover FC. Novel carbapenem-hydrolyzing β -lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 2001; 45(4): 1151-1161.

Yoo AY, Yu JE, Yoo H, Lee TH, Lee WH, Oh J, Kang HY. Role of sigma factor E in regulation of *Salmonella* Agf expression. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2013; (430):131–136.

Yu J, Tan K, Rong Z, Wang Y, Chen Z, Zhu X, Chen L. Nosocomial outbreak of KPC-2-and NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* in a neonatal ward: a retrospective study. *BMC infectious diseases*, 2016; 16(1): 563.

Zeng MY, Inohara N, Nunez G. Mechanisms of inflammation-driven bacterial dysbiosis in the gut. *Mucosal Immunology*.v10, n1, 2017.

Zevin AS, Mckinnon L, Burgener A, Klatt NR. Microbial Translocation and microbiome dysbiosis in HIV-associated immune activation. *Curr Opin HIV AIDS*. 2016; (11) 2.

Zhuang L, Gong J, Li Q, Zhu C, Yu Y, Dou X, Liu X, Xu B. Wang C. Detection of *Salmonella* spp. by a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method targeting *bcfD* gene. *Letters in Applied Microbiology*. 2014;59:658—664.

ANEXO 1

FUNDAÇÃO DE MEDICINA
TROPICAL DR. HEITOR VIEIRA
DOURADO ((FMT-HVD))



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Etiologia da diarreia e avaliação da inflamação sistêmica em pacientes HIV e HIV-AIDS na Amazônia ocidental.

Pesquisador: Patricia Puccinelli Orlandi Nogueira

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 57330116.6.0000.0005

Instituição Proponente: CENTRO DE PESQUISAS LEONIDAS E MARIA DEANE - FUNDACAO

Patrocinador Principal: CENTRO DE PESQUISAS LEONIDAS E MARIA DEANE - FUNDACAO OSWALDO CRUZ

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.753.402

SMJ

Aprovado

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_DO_PROJETO_700157.pdf	27/08/2016 17:05:03		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLCompleto.docx	27/08/2016 17:04:38	Patricia Puccinelli Orlandi Nogueira	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projetodef.doc	27/08/2016 16:55:44	Patricia Puccinelli Orlandi Nogueira	Aceito
Folha de Rosto	Plataforma.pdf	07/06/2016 11:36:59	Patricia Puccinelli Orlandi Nogueira	Aceito
Declaração de Pesquisadores	AnuenciaFMT.pdf	05/06/2016 11:51:04	Patricia Puccinelli Orlandi Nogueira	Aceito
Outros	anuenciaFMT2.pdf	05/06/2016	Patricia Puccinelli	Aceito
Outros	anuenciaFMT2.pdf	11:50:38	Orlandi Nogueira	Aceito
Declaração do Patrocinador	anuenciaFiocruz.pdf	05/06/2016 11:49:44	Patricia Puccinelli Orlandi Nogueira	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

MANAUS, 22 de Setembro de 2016

Assinado por:
Maria das Graças Gomes Saraiva
(Coordenador)

ANEXO 2



QUESTIONÁRIO PARA ESTUDO DE DI-HIV



Código: _____ n° _____

Critério de Inclusão: Pacientes HIV e/ou HIV/AIDS com idade a partir de 12 anos - 70 anos com ou sem diarreia e que, por solicitação médica, serão submetidos à coleta de sangue e fezes para realização de exames.

A) - DADOS PESSOAIS

Nome: _____

Idade: _____ Data de Nascimento: ____/____/____ Sexo: F () M ()

Endereço: _____

Bairro _____ Tel.: Residencial: _____ Celular: _____

B) - DADOS DO RESPONSÁVEL*

*Pacientes não autônomos, que não possam responder ao questionário serão representados por um responsável, mediante permissão prévia do próprio paciente ou responsável.

Nome: _____

Idade: _____ Data de Nascimento: ____/____/____ Sexo: F () M ()

Endereço: _____

Complemento _____ Tel.: Residencial: _____ Celular: _____

Grau de parentesco com o paciente: _____

C) - DADOS EPIDEMIOLÓGICOS

Grau de instrução: _____ Renda familiar: _____ Situação

empregatória: _____ Situação Conjugal: _____ Nº de

Filhos: _____ Sorpositividade na Família: () Sim () Não Parentesco: _____

Orientação Sexual: () Transsexual () Travesti () Homossexual () Bissexual ()

Heterossexual _____ Início da atividade sexual (anos): _____ Nº

parceiros (anos): _____ Forma de Contágio: ()sexual ()sangue

() outra: _____ Utiliza algum tipo de droga () Sim () Não Quais: _____

O paciente foi hospitalizado nos últimos 30 dias que antecederam esta coleta: Sim () Não ()

Desconhece (). Há em casa outra pessoa não hospitalizada que teve diarreia nas duas semanas antes

desta coleta? Sim () Não () Desconhece ()

Qual o tipo de abastecimento de água: () poço () Cachimba () Encanada () Outro: _____

Qual o tipo de água utilizado para beber: () sem tratamento () Fervida () Clorada () Filtrada

() Coadá () Mineral () Chuva () Rio () Igarapé () Outra: _____

Qual o tipo de casa: () Alvenaria () Palafita () Mista () Outra: _____

Quantos cômodos tem a casa: _____ Quantas pessoas residem no mesmo local _____

Qual o tipo de instalação sanitária: () Fossa séptica () Fossa asséptica () Rede de esgoto

Após você usar o sanitário você lava as suas mãos? Sempre () habitualmente () as vezes ()
nunca () desconhece ().

Antes de preparar os alimentos você lava as mãos? Sempre () habitualmente () as vezes ()
nunca () desconhece ().

D) - INFORMAÇÕES CLÍNICAS/LABORATÓRIAS*

*Essas informações poderão ser obtidas através da consulta dos profissionais responsáveis ou através da consulta do prontuário do paciente mediante prévia autorização.

Tipo de Paciente: () Ambulatorial () Internação () UTI

Ano de conhecimento do Diagnóstico: _____

Número de Internações anteriores associadas ao HIV: _____ Diagnóstico: _____

Doenças infecciosas Oportunistas anteriores () Sim () Não Quais: _____

Faz uso de Medicação anti-retroviral () Sim () Não Qual esquema utilizado:

Fez interrupção por conta própria da terapia anti-retroviral () Sim () Não Motivo: _____

Toma algum medicamento além dos que são preconizados pela terapia anti-retroviral () Sim () Não
Quais: _____

Possui efeito colateral à terapia anti-retroviral () Sim () Não Quais: _____

Teve episódios de diarreia após o diagnóstico de HIV: () Sim () Não Quantos: _____

Está com diarreia atualmente: () Sim () Não. Há quanto tempo: _____

Presença de sinais clínicos

Sintomas sim () não () Quais: _____

Febre sim () não () Quanto: _____

Vômito sim () não () Quantas vezes por dia: _____

Desidratação sim () não ()

Presença de sangue nas fezes sim () não ()

Presença de parasitas visíveis () Sim () Não

Dor abdominal () Sim () Não

Uso de Dispositivos invasivos? () Não () Sim

() Cateter Urinário/Vesical Quanto tempo? _____

- () Cateter Central (acesso venoso) Quanto tempo? _____
() Ventilação Mecânica (Respirador) Quanto tempo? _____

Hemograma:

Contagem de LT-CD4: _____

Contagem da carga viral do HIV: _____

Tem outras doenças associadas ao HIV: () Sim () Não Quais: _____

Outras informações pertinentes:

Data: __/__/__

Assinatura do participante
ou responsável

ou


Impressão do dedo polegar
do participante ou responsável

Assinatura do Pesquisador Responsável
ou membro da equipe

Assinatura do profissional responsável pelo
Fornecimento de dados clínicos laboratoriais

Anexo 4

NOME: _____ Nº _____



Olá criança! Você é muito importante para nós, e por isso estamos te convidado para participar da pesquisa "Diarreia em pacientes HIV e HIV-AIDS na Amazônia ocidental: Avaliação da etiologia dos enteropatógenos e dos mediadores inflamatórios associados à inflamação sistêmica". Que é feita por cientistas e médicos que trabalham na Fundação de Medicina tropical e na Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ.



A FIOCRUZ e a FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL são lugares onde se estudam as doenças que afetam as pessoas.

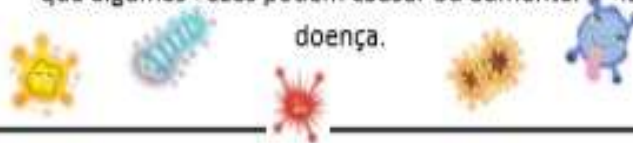
Aqui trabalham cientistas e médicos muito inteligentes, que estudam para ajudar essas pessoas a melhorarem.



Uma pesquisa é quando os cientistas procuram o que está causando a doença, ou o que faz com que a pessoa doente não melhore. Isso é feito testando o sangue e o cocô (fezes) dos pacientes pra ver se tem algum "bichinho" que não deveria estar ali.



Esses "bichinhos", também conhecidos como germes podem ser vírus e bactérias que existem na natureza, mas que algumas vezes podem causar ou aumentar uma doença.



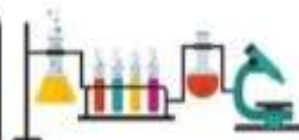
Eles podem estar escondidos no intestino e no sangue das pessoas, por isso o laboratório precisa recolher amostras para ver se eles estão lá. E se estiverem, os médicos podem dar remédios que matam esses germes, fazendo com que a pessoa se sinta melhor.





A coleta das amostras de sangue e fezes será feita por um enfermeiro(a) ou técnico(a) do laboratório, mas não se preocupe, essas pessoas são treinadas e estudaram bastante para fazer isso com toda a segurança e para você não se sentir desconfortável.

Essas amostras serão levadas para o laboratório, onde os cientistas vão investigar se existem germes ruins que podem estar fazendo algum mal a você.



Se a resposta for sim, o médico vai lhe dar remédios para que você se sinta melhor.



Não se preocupe só quem vai saber dos resultados, serão você, seus pais e os médicos. O seu nome e outras informações a seu respeito não serão divulgadas de jeito nenhum!

Então, se você aceita participar da pesquisa, e permite que a gente veja se existem germes ruins atrapalhando sua saúde, você só precisa marcar sim e assinar seu nome. Você também precisa dizer aos seus pais ou responsáveis que você tem vontade de participar, por que eles também precisam assinar.



VOCÊ DESEJA PARTICIPAR DESTA PESQUISA?



Eu, _____ aceito participar da pesquisa, pois sei do que se trata e fui informado(a) de todas as etapas e dos procedimentos que serão realizados. As mesmas informações também foram passadas a meus pais (ou responsáveis), e eles também sabem de tudo o que vai acontecer.

Data: ____/____/____

ou

Assinatura do Pesquisador
Responsável ou membro da equipe
de pesquisa

Assinatura do paciente participante

Impressão do dedo
polegar do
participante

Assinatura do responsável

ou

Impressão do dedo
polegar do responsável

Anexo 5



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE) (Paciente Participante)



Convidamos o(a) Sr(a) para participar da pesquisa “Diarreia em pacientes HIV e HIV-AIDS na Amazônia ocidental: Avaliação da etiologia dos enteropatógenos e dos mediadores inflamatórios associados a inflamação sistêmica”, sob a responsabilidade da pesquisadora Dra. Patricia Puccinelli Orlandi.

JUSTIFICATIVA DA PESQUISA

A pesquisa se justifica pela epidemia HIV-AIDS no Amazonas. Junto com a presença de diarreia vista em muitos pacientes que são HIV, muitas vezes com origem em infecções sem diagnóstico, e a falta de saneamento básico na região, que pode aumentar a quantidade de vírus, bactérias e parasitas transmitidos por contaminação fecal-oral. Essa pesquisa pretende identificar nos pacientes HIV e HIV-AIDS de Manaus, se existe a presença desses micro-organismos que causam a diarreia; relacionando as informações de saneamento e moradia e o estado clínico destes pacientes, para identificar as possíveis causas dessas infecções e micro-organismos mais comuns. Esta abordagem epidemiológica é de suma importância, visto que não há nenhum trabalho anterior que tenha investigado a prevalência a origem e diversidade de vírus e bactérias causadores de diarreia em pacientes HIV e HIV-AIDS nesta região, que apresentam características únicas. Vale ressaltar que essa proposta não somente identificará os possíveis causadores de diarreia presentes nesses pacientes, como possibilitará o desenvolvimento de estratégias de diagnóstico ao SUS que sejam eficientes para identificar esses micro-organismos que circulam na região; além de permitir a elaboração de medidas de controle e prevenção, o que deverá contribuir para a redução do agravamento da doença e dos custos ao SUS provocados por essas infecções.

Um outro ponto alto da proposta é a caracterização do perfil de resistência aos antibióticos das bactérias circulantes nestes pacientes, permitindo o auxílio na conduta de tratamento a ser administrada, reduzindo a o adoecimento por diarreia nos pacientes HIV.

OBJETIVOS DA PESQUISA

Investigar os micro-organismos causadores de diarreia em pacientes com HIV e HIV-AIDS e determinar associações com a situação da imunidade e da progressão da doença.

PROCEDIMENTOS UTILIZADOS NA PESQUISA

Para participar, você deve responder, ou auxiliar o paciente participante a responder uma entrevista e a fornecer amostras biológicas (sangue e fezes). Durante a entrevista o Sr.(a) será questionado sobre os dados pessoais do paciente (nome completo, data de nascimento, endereço, contato de telefone, grau de instrução, renda familiar, quantas pessoas residem com o paciente e informações clínicas (vistas no prontuário), qual foi o motivo da internação, se há presença de sintomas, se o paciente está usando algum medicamento) e outras informações que forem importantes para a pesquisa. Caso o Sr.(a) não saiba de alguma dessas informações, os seus familiares ou o prontuário do paciente será consultado.

As amostras serão coletadas quando o médico responsável solicitar exames que envolvam as amostras relacionadas. A coleta desses materiais sempre será realizada por profissionais do Hospital de Medicina Tropical, devidamente treinados e capacitados.

Para que a amostra seja suficiente para a realização do exame e do projeto de pesquisa será necessário colher um volume maior de amostra. Mas só será colhido um volume maior de amostra se o médico e o responsável da coleta julgar que seja necessário e que não irá trazer nenhum dano ou desconforto a mais para o Sr.(a). Mas senão for necessário, o laboratório do hospital fornecerá uma pequena parte para a pesquisa e dessa forma a realização do exame que o médico solicitou não será prejudicada.

No caso do paciente não autônomo se tratar de uma criança, um médico pediatra estará à frente da solicitação dos exames e coleta de amostras, além do atendimento e auxílio no esclarecimento de quaisquer dúvidas que possam surgir durante a realização desta pesquisa.

Coleta de Sangue: A coleta de sangue poderá ser realizada de maneiras distintas, o que irá depender do uso de cateter venoso:

- Caso o Sr/a. não utilize cateter será colhido 1(uma) amostra de sangue, a partir de punção venosa, utilizando agulha e seringa ou escalpe descartáveis.
- Caso o Sr/a use cateter venoso, será colhida 1(uma) amostra de sangue, através do cateter.

De preferência será colhido 10 mL de sangue, que será fracionado igualmente entre o laboratório do hospital e o projeto de pesquisa. Se não for possível obter esse volume, deverá ser colhido no mínimo de 4 a 5 mL, que então será encaminhado ao laboratório do hospital, que então fornecerá uma alíquota suficiente para a pesquisa.

Coleta de Fezes: O coletor vai ser fornecido pelo hospital ou pela equipe de pesquisa. Na amostra não pode conter urina ou água. Esta amostra deve ser entregue em no máximo 3 horas, senão acondicionar na geladeira por no máximo 24 horas.

ARMAZENAMENTO E DISPOSIÇÃO FINAL DAS AMOSTRAS BIOLÓGICAS

As suas amostras biológicas serão armazenadas durante o período de realização deste projeto. Podendo ser necessário o armazenamento das mesmas por um período mais longo, para a pesquisa de novos enteropatógenos.

ARMAZENAMENTO DE DADOS PESSOAIS, INFORMAÇÕES CLÍNICAS E DE CEPAS BACTERIANAS

Como esse projeto de pesquisa pretende relatar as infecções por vírus, bactérias, fungos e por parasitas intestinais, pretendemos identificar todas estas e guardá-los sob refrigeração em freezers a -80°C. Sendo assim, o Sr.(a) está de acordo com o armazenamento dos dados pessoais do paciente, das suas informações clínicas, do seu sangue e fezes e dos microorganismos encontrados para estudos e divulgações posteriores?

SIM

NAO

Caso o Sr.(a) esteja de acordo, declaramos que quando formos realizar esses estudos, o projeto será novamente submetido para aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) e, quando for o caso, da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP). E ainda, garantimos que o Sr.(a) como responsável legal do paciente participante, será informado(a) sobre todo andamento desses outros estudos, onde a qualquer momento o(a) Sr.(a) poderá desistir ou recusar-se a prosseguir com sua participação nessas pesquisas. E ainda garantimos que todos os seus dados e do paciente sempre serão mantidos em em segurança e sigilo.

BENEFÍCIOS DECORRENTES DA PARTICIPAÇÃO DA PESQUISA

O paciente participante será beneficiado pelo retorno dos resultados das análises da pesquisa, pois será indicado a equipe médica o melhor remédio a ser utilizado, resultando em um tratamento médico mais adequado.

Além disso, o Sr.(a) estará contribuindo para geração de conhecimento para entender, prevenir ou aliviar as infecções correlacionadas, assim como possibilitará a adoção de novas medidas de controle das infecções e possivelmente até mesmo gerar novas condutas terapêuticas.

DESCONFORTOS E RISCOS DECORRENTES DA PARTICIPAÇÃO DA PESQUISA

Os riscos decorrentes da participação nesta pesquisa são basicamente o desconforto durante a coleta, onde algumas vezes, durante ou após colher o sangue do braço, ele pode doer um pouco na região da picada da agulha e pode ficar com uma mancha roxa no local (hematoma), ou pode ocorrer punção acidental de uma artéria ou infecção.

As condições da coleta de fezes podem gerar desconforto e até mesmo um certo constrangimento.

MEDIDAS DE SEGURANÇA PARA EVITAR DANOS

Os riscos que envolvem dor, formação de hematomas, punção em local errado poderão ser reduzidos ou evitados pela execução correta dos procedimentos de coleta, que sempre será realizada por profissional capacitado, que fará todos os procedimentos com muita cautela e seguindo-se corretamente todas as etapas.

Os riscos relacionados a aquisição de infecção no momento da coleta serão evitados pela correta assepsia do local, que será realizado utilizando-se etanol ou isopropanol a 70%, clorexidina ou solução de iodo, além da utilização de material descartável.

As situações constrangedoras serão minimizadas através de orientações para tranquilizar o paciente. As amostras serão coletadas, preferencialmente em locais isolados e com privacidade, caso não seja possível serão utilizados recursos como uso de vestimentas (bata) para não expor o paciente durante a coleta.

PARTICIPAÇÃO NA PESQUISA

O Sr.(a) tem autonomia de recusar-se a participar do projeto de pesquisa ou retirar seu consentimento, em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma, sendo garantido que não haverá nenhum tipo de prejuízo, seja pessoal ou em relação a atendimento na unidade de saúde.

SIGILO E PRIVACIDADE DOS PARTICIPANTES DA PESQUISA

Os resultados da pesquisa serão analisados e publicados, mas sua identidade não será divulgada, sendo guardada em sigilo durante e depois de todas as fases da pesquisa.

DESPESAS E REMUNERAÇÃO DECORRENTES DA PARTICIPAÇÃO NA PESQUISA

O(a) Sr(a) não terá nenhuma despesa e também não receberá nenhuma remuneração.

ASSISTÊNCIA E INDENIZAÇÃO

É garantido ao (a) Sr.(a) direito de assistência integral e gratuita devido a danos diretos ou indiretos e imediatos ou tardios decorrentes da participação no estudo, pelo tempo que for necessário. Também é garantindo indenização diante de eventuais danos decorrentes da pesquisa.

Caso ocorra algum tipo de prejuízo a saúde do paciente ao qual o Sr. (Sra) é responsável, seja físico ou psicológico durante a coleta das amostras, ou dos outros procedimentos da pesquisa. O (a) Sr. (Sra.), será ressarcido ou compensado da forma que for mais conveniente, seja através de compensação material, financeira ou de transporte e alimentação, tanto para quem participa da pesquisa, como para seus acompanhantes ou responsáveis legais.

ACOMPANHAMENTO APÓS ENCERRAMENTO DA PESQUISA

Após o encerramento da pesquisa, o Sr.(a) receberá informações quanto as descobertas realizadas através do projeto de pesquisa, assim como os benefícios gerados a partir da sua participação.

A qualquer momento o Sr.(a) também poderá entrar em contato para informações relativas ao projeto de pesquisa.

Assinatura do pesquisador
responsável ou membro da
equipe de pesquisa

Assinatura participante ou
responsável



Impressão do dedo polegar
do participante ou
responsável

ANEXO 6

Extração de DNA cromossomial de Choque Térmico

1. Cultivar cepa bacteriana em meio LB por 24 horas a 37°C;
2. Centrifugar 1,5/2,0 mL em eppendorff por 10 minutos 12.000rpm à 4° C;
3. Descartar o sobrenadante;
4. Ressuspender o pellet com 500 µL de H₂O miliq autoclavada;
5. Ressuspender vigorosamente em vortex;
6. Centrifugar a suspensão a 12.000rpm à 4°C;
7. Descartar o sobrenadante;
8. Ressuspender o pellet em 200 µL de H₂O miliq;
9. Ressuspender vigorosamente em vortéx;
10. Aquecer a suspensão a 100°C por 10 minutos em banho seco;

CHOQUE TÉRMICO:

11. Submeter a suspensão à temperatura de 4° C 10 minutos;
12. Centrifugar por 10 minutos à 12.000rpm à 4°C;
13. Transferir sobrenadante (DNA) para um novo eppendorff;
14. Adicionar 500 µL de etanol 70% (gelado), homogeneizar por inversão;
15. Centrifugar a suspensão a 12.000rpm à 4°C;
16. Descartar o sobrenadante;
17. (Secar o DNA em banho-seco por 10 minutos ou em speed vac).
18. Ressuspender em 200 µL de TE 1x;
19. Congelar à -20°C.

ANEXO 7

A pesquisa dos genes de virulência foi realizada através de reação de PCR. Para cada reação de amplificação foram empregados:

1U da enzima *Taq* polimerase;

01 mM de dNTPs (dATP, dCTP, dGTP e dTTP);

Tampão de amostra (10mM Tris HCL, pH 8,3; 50mM KCL);

10pMol de cada primer

1,5 – 3,0 mM de $MgCl^2$

2,5 μ l da solução de DNA, diluídos em tampão adequado.

As reações foram realizadas em aparelho termociclador (BioRad), em um volume final de 25 μ em tubos de 0,5 ml.

As condições empregadas na amplificação dos genes *eae*, *inv*, *stx 2*, *daaE* e *eaf* e foram: 1 ciclo [94° C/ 5min]; 35 ciclos [94°C 2 min, 56°C 1 min, 72°C 2min]; 1 ciclo [72°C 5 min]. Para amplificação dos genes *uidA*, *escV*, *stx1*, *ast 1*, *bfpb* foi empregada as condições: 1 ciclo [94°C 5min]; 30 ciclos [94°C 1 min, 58°C 2 min, 72°C 1min]; 1 ciclo [72°C 5 min], e para o gene *ast1* empregou-se as condições: 1 ciclo [94° C/ 5min]; 30 ciclos [94°C 1 min, 58°C 1 min., 72°C 30 seg.; 1 ciclo [72° C 5 min].

ANEXO 8

A pesquisa dos genes de virulência foi realizada através de reação de PCR. Para cada reação de amplificação foram empregados:

1U da enzima *Taq* polimerase;

01 mM de dNTPs (dATP, dCTP, dGTP e dTTP);

Tampão de amostra (10mM Tris HCL, pH 8,3; 50mM KCL);

10pMol de cada primer;

1,5 – 3,0 mM de MgCl²;

2,5 µl da solução de DNA, diluídos em tampão adequado.

As reações foram realizadas em aparelho termociclador (BioRad), em um volume final de 25µ em tubos de 0,5 ml.

As condições empregadas na amplificação dos genes *kvar*, *blaCTX-M*, *blaSHV*, *blaTEM*, *blaKPC*, *blaVIM*, *blaIMP*, *blaSPM* e foram: 1 ciclo [94° C/ 5min]; 35 ciclos [94°C 2 min, 62°C 1 min, 72°C 2min]; 1 ciclo [72°C 5 min].