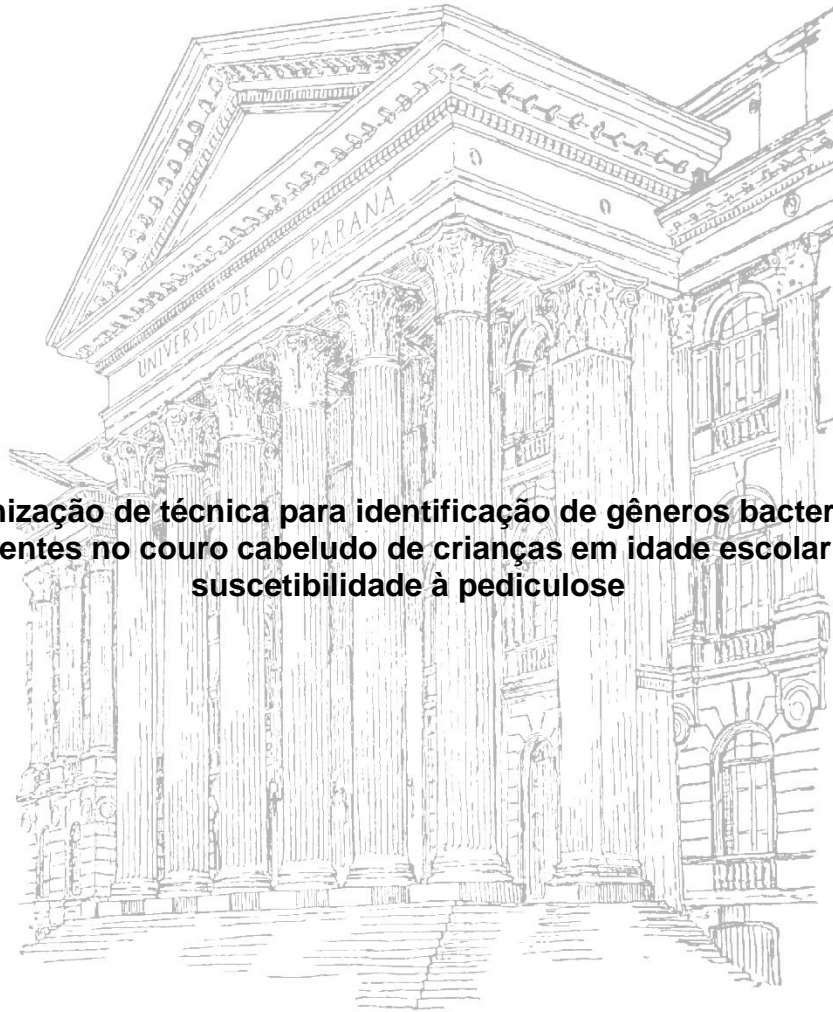


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

BRUNA JACOMEL FAVORETO DE SOUZA

Padronização de técnica para identificação de gêneros bacterianos presentes no couro cabeludo de crianças em idade escolar e a suscetibilidade à pediculose



CURITIBA

2015

BRUNA JACOMEL FAVORETO DE SOUZA

Padronização de técnica para identificação de gêneros bacterianos presentes no couro cabeludo de crianças em idade escolar e a suscetibilidade à pediculose

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Coordenação do Curso de Biomedicina da Universidade Federal do Paraná como requisito à conclusão do Curso de Biomedicina, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Profa. Dra. Débora do Rocio Klisiowicz

Co-orientadora: Me. Juciliane Haidamak

CURITIBA

2015

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida, por seu amor e pela salvação.

A meus pais, Oziel e Rosangela, por todo o amor, carinho e compreensão que dedicaram a mim ao longo da vida.

A minha irmã, Taynan, por sempre me alegrar e estar presente quando precisei.

Ao meu noivo, Diego Lima, por todo o suporte e compreensão, sempre me apoiando, me motivando e dando forças para continuar.

A Professora Débora do Rocio Klisiowicz e a Mestre Juciliane Haidamak, pela confiança e por terem se disposto a me auxiliar no desenvolvimento deste trabalho.

As amigas, Valéria Mendes, Ludiana Cardoso, Melyssa Kmecick e Letícia Macohin, por estarem presentes durante os anos de graduação, sempre apoiando e tornando os dias mais felizes.

A Camila Oishi e demais colegas do projeto de extensão, pelas conversas e conselhos para o trabalho e também para a vida.

A todos os integrantes da MOBAP, por serem quem são e trazerem mais um pouco de alegria para os meus dias.

Aos integrantes do LabMicro, pela atenção e paciência que me dedicaram, possibilitando que este estudo fosse executado.

“Entrega o teu caminho ao Senhor; confia nele, e Ele tudo fará.”

Salmos 37.5

RESUMO

A pediculose, doença causada pelo artrópode *Pediculus humanus capitis*, é considerada um problema de saúde pública, pois afeta milhões de pessoas em todo o mundo, principalmente crianças na faixa etária de 3 a 11 anos. A infestação por esse artrópode pode causar constrangimento social, desconforto, ansiedade, ausência no ambiente escolar e de trabalho, e até mesmo feridas, decorrentes do ato de coçar o couro cabeludo. Acredita-se que diversos fatores podem estar relacionados com a escolha do hospedeiro, sendo um desses a microbiota do couro cabeludo. O objetivo deste trabalho foi padronizar a técnica para identificação morfológica e bioquímica de bactérias isoladas do couro cabeludo de crianças, visto que existem indícios de que a flora microbiológica tem influência na atratividade aos insetos. A coleta e o transporte da microbiota do couro cabeludo foi feita em meio de transporte stuart e sabouraud líquido, o isolamento foi feito em ágar sangue e ágar chocolate, seguido de purificação em ágar simples. A identificação morfológica das bactérias isoladas foi realizada por coloração de Gram e a identificação bioquímica por testes bioquímicos. Foram coletadas amostras de oito crianças, sendo que o meio de transporte stuart e o sabouraud líquido apresentaram crescimento semelhantes, assim como quando semeados em ágar sangue e ágar chocolate. Através da coloração de Gram foi possível classificar os isolados bacterianos em três grupos: 6,13% bacilos gram positivos (BGP), 10,20% bacilos gram negativos (BGN) e 83,67% cocos gram positivos (CGP). Foram selecionadas provas bioquímicas específicas para a identificação de BGP, BGN e CGP. Quanto aos resultados obtidos para a identificação de bactérias do couro cabeludo indica-se o uso de meio de transporte stuart, isolamento em ágar sangue e purificação em ágar simples. Para a identificação morfológica a coloração de Gram foi eficaz. Para a identificação bioquímica os testes para bacilos gram negativos (BGN) e cocos gram positivos (CGP) foram suficientes, contudo não foi possível identificar todos os bacilos gram positivo (BGP) apenas com os testes selecionados. Sendo assim foi concluído que a padronização desta técnica possibilitará o desenvolvimento de estudos futuros que buscam analisar as bactérias do couro cabeludo a fim de relacionar tais micro-organismos com a prevalência de pediculose, já que bactérias transformam compostos não voláteis em voláteis e dessa forma podem ser um fator importante no processo de escolha do hospedeiro.

Palavras-chave: Pediculose. Criança. Microbiota

ABSTRACT

Pediculosis, disease caused by an ectoparasite *Pediculus humanus capitis*, is considered a public health problem because affects millions of people in the world, especially children at the age of 3 to 11 years old. Lice infestation can cause social embarrassment, discomfort, anxiety, absence from school and work until scalp lesion caused by scratching. Is believed that many factors are involved in the process of choosing the host, and one of these is the microbiota of the scalp. The aim of this work was to establish the technique for morphological and biochemical identification of the bacterial microbiota isolated from scalp of children which present indications that microbiological flora may affect attractiveness for insects. The collection and transport of scalp microbiota was made in sterile swabs in stuart medium and liquid sabouraud, the isolation was in blood agar and in chocolate agar, followed by purification in simple agar. The morphological identification of the isolated bacteria was made with gram stain and the biochemical identification was made using biochemical tests. Eight children samples were collected, wherein stuart medium and liquid sabouraud presented similar growth, as when plated on blood agar and chocolate agar. There was abundant bacteria growth in blood agar and chocolate agar. The isolates were separated in three groups based on gram stain: 6,13% bacilli gram positive (BGP), 10,20% bacilli gram negative and 83,67% gram positive cocci (CGP). Specific biochemical tests were selected for BGP, BGN and CGP groups identification. About the obtained results for identification of scalp bacteria it's indicated the use of stuart medium for transport, isolation in blood agar and purification in simple agar. To morphological identification the gram stain was effective. To biochemical identification of BGN and CGP the select tests were enough however it wasn't possible to identify all BGP with only the selected tests. Therefore it was concluded that the standardization of this technique will be able the development of future studies that seek to analyze the bacteria of the scalp in order to relate these micro-organisms with the prevalence of pediculosis, since bacteria converts non-volatile compounds into volatile and thus can be an important factor in the selection of the host process.

Key words: Pediculosis. Children. Microbiota.

Sumário

1. INTRODUÇÃO	8
2. REVISÃO DE LITERATURA	9
2.1. <i>Pediculus humanus capitis</i>	9
2.1.1. Posição sistemática	9
2.1.2. Morfologia	10
2.1.3. Biologia.....	11
2.2. PEDICULOSE	12
2.2.1. Epidemiologia	12
2.2.2. Fatores de suscetibilidade	13
2.2.3. Microbiota da pele	14
2.2.4. Micro-organismos abundantes na pele	14
2.2.5. Relação entre micro-organismos e odor.....	15
3. HIPÓTESE	16
4. JUSTIFICATIVA	16
5. OBJETIVOS	17
5.1. OBJETIVO GERAL.....	17
5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
6. METODOLOGIA	18
6.1. PÚBLICO ALVO	18
6.2. CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO E GRUPOS.....	18
6.3. IDENTIFICAÇÃO BACTERIANA.....	18
6.3.1. Coleta e transporte	18
6.3.2. Isolamento	18
6.3.3. Purificação das culturas.....	19
6.3.4. Coloração de Gram	19
6.3.5. Divisão dos grupos	19
6.3.6. Provas Bioquímicas	20
6.3.6.1. Bacilos Gram Positivos.....	20
6.3.6.2. Bacilos Gram Negativos	21
6.3.6.3. Cocos Gram Positivos	22
7. RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
7.1. IDENTIFICAÇÃO DOS PARTICIPANTES.....	24
7.2. COLETA E TRANSPORTE	24

7.3. ISOLAMENTO	26
7.4. PURIFICAÇÃO	27
7.5. COLORAÇÃO DE GRAM	27
7.6. MORFOLOGIA BACTERIANA	28
7.7. PROVAS BIOQUÍMICAS.....	31
7.7.1. Bacilos Gram Positivos	31
7.7.2. Bacilos Gram Negativos	33
7.7.3. Cocos Gram Positivos	36
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS	42
REFERÊNCIAS.....	44
Anexos	47

1. Introdução

A pediculose, doença causada pelo artrópode *Pediculus humanus capitis*, é considerada um problema de saúde pública pois afeta milhões de pessoas em todo o mundo. A principal forma de transmissão da doença é pelo contato direto, sendo que a faixa etária mais suscetível é entre 3 e 11 anos. O diagnóstico dessa doença é feito a partir da visualização de piolhos adultos, ninfas e/ou lêndeas no cabelo e/ou couro cabeludo do indivíduo parasitado (KO; ELSTON, 2004; BURKHART; BURKHART, 2005).

O principal indicativo de infestação por *P. h. capitis* é o prurido no couro cabeludo, causado pela liberação de substâncias anticoagulantes no momento da picada e pelos antígenos presentes no material fecal do inseto. Apesar de não existirem indicativos de que *P. h. capitis* seja vetor de doenças, a infestação pode causar constrangimento social, desconforto, ansiedade, ausência no ambiente escolar e de trabalho, bem como as feridas decorrentes do ato de coçar o couro cabeludo podem ser porta de entrada de micro-organismos patogênicos (LEUNG *et al.*, 2005; NUTANSON *et al.*, 2008; TAPPEH *et al.*, 2012; VAHABI *et al.*, 2012).

Segundo Catalá *et al.* (2004) a prevalência mundial é bastante variável, como por exemplo, 6,8% na Turquia, 5,8% na Coréia, 21,8% no Egito e 56,7% em Israel. Conforme Nunes *et al.* (2014) as taxas de infestação em crianças no Brasil variam de 7,7% a 35%, contudo afirmam existir restrição nos estudos sobre a epidemiologia da pediculose no Brasil. De acordo com Heukelbach *et al.* (2003), 43,3% dos indivíduos analisados foram diagnosticados com pediculose, já Borges *et al.* (2007) identificou 20,6% dos voluntários analisados como infestados por *P. h. capitis*. Borges & Mendes (2002) observaram que 35% das crianças analisadas em 11 instituições estavam parasitadas. Segundo Wilke *et al.* (2002) *apud* Paula (2013) as taxas de prevalência no Brasil podem atingir 40% em comunidades carentes (MARTINS; FIORENTIN, 2008; PAULA, 2013).

Tendo em vista que o uso de pediculicidas não é indicado para todos os casos de infestação, já que essa classe de medicamento atua somente nos adultos, não tendo efeito sobre as lêndeas, a principal forma de controle da pediculose é a

utilização frequente de pente fino e a inspeção visual, porém devido à falta de conhecimento da população a cerca dessa parasitose, e até mesmo por não a considerarem uma doença, os familiares não dispõem a atenção necessária para o controle da infestação, visto que é um trabalho que demanda tempo e paciência (SMITH; GOLDMAN, 2012).

Os fatores que levam os piolhos adultos a escolherem seus hospedeiros ainda não são bem esclarecidos, contudo é de conhecimento popular que alguns indivíduos apresentam maior suscetibilidade à pediculose do que outros apesar de estarem sob as mesmas condições. Estudos com *Anopheles gambiae*, vetor da malária, indicam que um dos fatores que podem estar relacionados com a escolha do hospedeiro é o odor (CATALÁ *et al.*, 2005; VERHULST *et al.*, 2011).

Cada indivíduo possui um odor característico, que é relacionado com a flora bacteriana residente presente na pele. Essas bactérias são capazes de converter compostos não voláteis em voláteis, de forma a possibilitar o estabelecimento de uma relação entre determinado gênero bacteriano e um odor específico (VERHULST *et al.*, 2011; DAVIS *et al.*, 2013).

Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi padronizar uma técnica para isolamento e identificação de bactérias do couro cabeludo de crianças em idade escolar, a fim de facilitar o estudo dos fatores que podem influenciar o *P. h. capitis* na escolha do hospedeiro.

2. Revisão de Literatura

2.1. *Pediculus humanus capitis*

2.1.1. Posição sistemática

Os piolhos são ectoparasitos pertencentes ao filo Arthropoda, classe Insecta, ordem Pthiraptera, subordem Anoplura, família Pediculidae ou família Pthiridae. Existem três espécies que parasitam os humanos, sendo elas *Pediculus humanus capitis*, *Pediculus humanus humanos* e *Pthirus pubis*. Sabe-se que o *P. h. capitis* parasita o couro cabeludo, enquanto que o corpo pode ser parasitado por *P. h. humanus* e a região pubiana pelo *P. pubis* (KO; ELSTON, 2004).

2.1.2. Morfologia

Os insetos da subordem Anoplura são ectoparasitos obrigatórios, hematófagos e ápteros em todos os estágios evolutivos. Têm o corpo alongado e achatado dorsoventralmente, sendo dividido em cabeça, tórax e abdome. A cabeça é pequena e ovóide, com um par de olhos laterais, antenas com cinco segmentos e aparelho bucal picador-sugador. O tórax possui três segmentos, sendo que em cada um está inserido um par de pernas e um par de orifícios respiratórios, chamados de espiráculos. Cada perna é formada por coxa, trocanter, fêmur, tíbia e tarso ou garra tarsal, que possibilita ao inseto ficar firmemente aderido ao pelo. O abdome é constituído de nove segmentos, sendo que os dois primeiros são fundidos e o último é arredondado nos machos e bilobado nas fêmeas (Figura 1). Lateralmente a cada segmento existe um par de placas espiraculares (LINARDI; MARCONDES, 2001; LEUNG *et al.*, 2005).



FIGURA 1 - *Pediculus humanus capitis*. Fêmea (à esquerda) e macho (à direita).

FONTE: DPDx - Laboratory Identification of Parasitic Diseases of Public Health Concern (09/2014).

Quanto ao tamanho, os adultos têm entre 2 e 3 mm de comprimento, sendo as fêmeas maiores que os machos. Os machos medem, em média, de 2,1 a 3 mm, enquanto que as fêmeas medem de 2,4 a 3,6 mm (LINARDI; MARCONDES, 2001; LEUNG *et al.*, 2005).

Os ovos, chamados de lêndeas, têm formato elíptico, são branco-amarelados, operculados e medem aproximadamente 0,8 mm de comprimento por 0,3 mm de largura. As lêndeas de *P. h. capitis* e de *P. pubis* são ovipositadas no cabelo e/ou pelo, já as de *P. h. humanus* são depositadas nas fibras ou dobras de

roupas (KO; ELSTON, 2004; LEUNG *et al.*, 2005; NUTANSON *et al.*, 2008; CDC, 2013).

Segundo Burkhart & Burkhart (2005) os ovos de *P. h. capitis* são fixados, em média, a 1,0 cm do couro cabeludo e são firmemente aderidos ao fio de cabelo, o que dificulta sua remoção. As lêndeas viáveis são caracterizadas pela coloração castanha da cápsula que as envolve, sendo que para os autores apenas lêndeas localizadas em até 2,5 cm da base do fio podem permanecer não eclodidas.

2.1.3. Biologia

Os piolhos, machos e fêmeas, em todos os estágios evolutivos, com exceção dos ovos, são hematófagos obrigatórios, portanto se alimentam diversas vezes ao dia, a cada três a seis horas, e sobrevivem um a dois dias quando fora do seu habitat, porém em condições favoráveis podem sobreviver por até quatro dias, sendo que as lêndeas podem resistir por até dez dias (KO; ELSTON, 2004; LEUNG *et al.*, 2005; NASH, 2003; TEBRUEGGE *et al.*, 2011).

Insetos da subordem Anoplura apresentam metamorfose incompleta em três fases: ovo, ninfa e adulto, portanto são hemimetábolos, ou seja, as ninfas são morfologicamente semelhantes aos adultos e passam por três ecdises até atingirem a fase adulta, o que ocorre em aproximadamente sete dias após a eclosão do ovo (Figura 2) (NUTANSON *et al.*, 2008; TEBRUEGGE *et al.*, 2011).

As lêndeas fixadas próximas ao couro cabeludo eclodem entre seis a nove dias, liberando então as ninfas de primeiro estágio. Com isso a casca da lêndea torna-se mais amarelada, o que facilita a visualização (CDC, 2013).

O tempo de vida do *P. h. capitis* é de três a quatro semanas, sendo que durante sua vida adulta, as fêmeas depositam de 3 a 6 ovos por dia, um total de 50 a 150 ovos durante a vida adulta (TEBRUEGGE *et al.*, 2011).

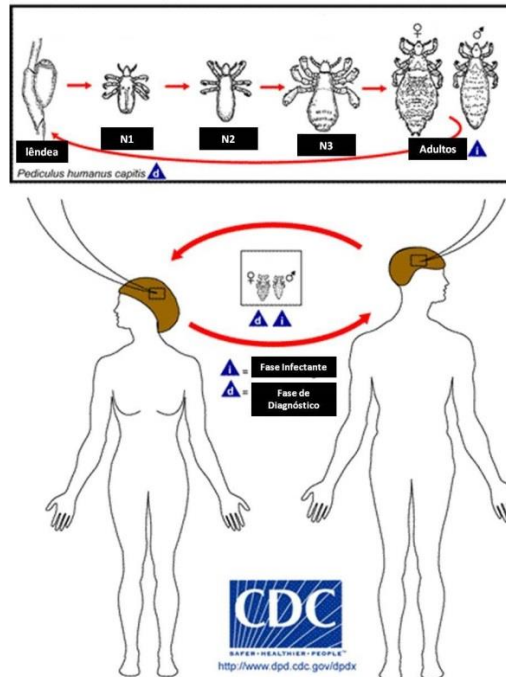


FIGURA 2 - Ciclo de vida do *Pediculus humanus capitis*.

FONTE: Adaptado de [www.cdc.gov.dpdx](http://www.cdc.gov/dpdx) (14/09/2014).

2.2. Pediculose

2.2.1. Epidemiologia

A pediculose afeta milhões de pessoas em todo o mundo, tanto em países desenvolvidos quanto em desenvolvimento. Nos últimos anos houve aumento nas taxas de prevalência, o que pode estar relacionado com o desenvolvimento de resistência dos piolhos aos pesticidas comumente utilizados, bem como com a aplicação imprópria – utilizando como tratamento de rotina para “prevenção” –, mudanças nas formulações dos pediculicidas e diagnósticos errôneos – como somente pela presença de lêndeas, que não sofrem ação de pediculicidas (TAPPEH *et al.*, 2012; VAHABI *et al.*, 2012).

Sabe-se que a pediculose é uma doença que afeta todas as classes sociais, não somente aquelas em que a população vive em condições precárias, com falta de higiene ou de educação. Segundo Barbosa & Pinto (2003) e Sim *et al.* (2011), qualquer pessoa pode ser infestada por piolhos, independentemente da idade, sexo, raça ou credo. Contudo, Vahabi *et al.* (2012) afirmam que fatores associados ao hospedeiro – como faixa etária, sexo e características do cabelo – podem estar relacionados com a prevalência de pediculose (TAPPEH *et al.*, 2012).

A transmissão da pediculose ocorre por contato direto, principalmente em crianças na faixa etária de 3 a 11 anos, devido ao comportamento social infantil, e acredita-se que estímulos como temperatura, umidade e odor possam interferir na preferência de piolhos por determinadas pessoas. A transmissão de piolhos através de fômites, como pentes, bonés e fronhas, pode ocorrer, porém é menos frequente (KO; ELSTON, 2004; CATALÁ *et al.*, 2005; BURKHART; BURKHART, 2005; GREIVE; BARNES, 2012).

No que diz respeito ao sexo, crianças do sexo feminino são mais afetadas, supõem-se que esse fato esteja relacionado com a preferência das mesmas por cabelos compridos, o que facilita o contágio e dificulta a aplicação de medidas de controle, como o uso de pente fino. O fator hormonal, também pode influenciar, uma vez que modifica as características do couro cabeludo e o comportamento das crianças (BARBOSA; PINTO, 2003; CATALÁ *et al.*, 2004; KO; ELSTON, 2004; TAPPEH *et al.*, 2012).

2.2.2. Fatores de suscetibilidade

Diversos fatores podem estar relacionados com a ocorrência de pediculose, entre eles: faixa etária, sexo, condições socioeconômicas e características estruturais do cabelo (VAHABI *et al.*, 2012).

Apesar das condições de higiene serem tidas como um dos principais fatores associados com a ocorrência da doença, existem divergências quanto a sua influência no desenvolvimento da infestação (RÍOS *et al.*, 2008; VAHABI *et al.*, 2012).

A pediculose afeta majoritariamente crianças, principalmente devido à alta ocorrência de contato cabeça-cabeça, sendo que independente da cultura ou do país, meninas são mais suscetíveis do que meninos. Uma explicação para este fato pode ser por terem cabelos mais compridos do que meninos e por terem contato mais próximo com outras meninas, o que facilita a transmissão (RÍOS *et al.*, 2008; FELDMIEIER, 2012).

De acordo com Doroodgar *et al.* (2014), a maioria da população infestada possui cabelos compridos e lisos, porém outros fatores podem estar relacionados,

como espessura do cabelo, abertura das escamas, entre outros que influenciem na capacidade de fixação do piolho ao fio de cabelo.

Segundo Vahabi *et al.* (2012) a taxa de infestação aumenta quando o nível socioeconômico diminui, e diminui conforme aumenta o nível de escolaridade dos pais, já que acredita-se que estes possuam maior conhecimento sobre a parasitose.

2.2.3. Microbiota da pele

A principal função da pele é barrar fisicamente a invasão de patógenos e a ação de substâncias tóxicas ao indivíduo. A interação entre o organismo e o meio externo, através da pele, possibilita o desenvolvimento de um ambiente propício para a colonização de micro-organismos, como bactérias, fungos, vírus e ácaros, que compõem a microbiota da pele (GRICE; SEGRE, 2011; HANNIGAN; GRICE, 2013; BAVIERA *et al.*, 2014).

Os micro-organismos presentes na pele atuam em simbiose com o organismo do hospedeiro, de forma que a presença de determinadas bactérias comensais impedem a colonização por bactérias patogênicas. Exemplo disso é a presença de *Staphylococcus epidermidis* que impede a colonização por *Staphylococcus aureus*, um potencial patógeno (BAVIERA *et al.*, 2014).

2.2.4. Micro-organismos abundantes na pele

Apesar de estar constantemente exposta a micro-organismos do ambiente, e, portanto abrigando-os de forma transitória, a pele possui uma flora residente constante e bem-definida. Diversos fatores podem contribuir para a variação da flora residente, como a fisiologia do próprio hospedeiro, a idade e o sexo, o clima e a geografia local, devido a variação de exposição à luz ultravioleta, bem como a ocupação e a higiene do indivíduo, além de patologias (GRICE; SEGRE, 2011).

Contudo, a composição da flora depende das características da pele, que podem variar conforme a localização anatômica. Sabe-se que a localização anatômica tem influência sobre a temperatura e a umidade, bem como na concentração de glândulas sebáceas. Fatores como proximidade a mucosas – boca, nariz e área perianal – ou exposição contínua a roupas também influenciam na composição da flora microbiana (ROTH; JAMES, 1988; GRICE; SEGRE, 2011).

Portanto, a colonização é dependente do microambiente da pele em análise, podendo ser uma área sebácea, seca ou úmida. As regiões occipital e retroauricular são áreas consideradas sebáceas, em que observa-se menor diversidade bacteriana, devido a determinadas características da pele que possibilitam selecionar os micro-organismos (GRICE; SEGRE, 2011).

Os micro-organismos mais abundantemente encontrados na pele são *Corynebacterium* e *Propionibacterium* (bacilos difteróides aeróbicos e anaeróbicos), *Staphylococcus epidermidis* e outros estafilococos coagulase-negativa, pequeno número de *Staphylococcus aureus* e de *Peptostreptococcus*, *Acinetobacter*, bacilos Gram-positivos, estreptococos do grupo *viridans* (α -hemolíticos), bacilos Gram-negativos, enterococos, *Candida sp*, *Malassezia spp.* e micobactérias não-patogênicas álcool-ácido-resistentes. Mais especificamente na região occipital são encontrados em maior abundância: *Staphylococcus sp.*, *Corynebacterium sp.*, proteobacterias, bacteroidetes, outras actinobacterias (por exemplo: *Propionibacterium acnes*). Na região retroauricular são encontrados em maior quantidade micro-organismos da família Propionibacteriaceae, Corynebacteriaceae e Staphylococcaceae, além de outras actinobactérias (BROOKS *et al.*, 2009; GRICE; SEGRE, 2011).

2.2.5. Relação entre micro-organismos e odor

As bactérias presentes na pele são responsáveis por produzir odores característicos através da transformação de compostos não-voláteis em voláteis. Dessa forma cada indivíduo possui um odor próprio, que está relacionado com os micro-organismos presentes em sua pele (VERHULST *et al.*, 2011; DAVIS *et al.*, 2013).

Sabe-se que insetos possuem receptores químicos sensíveis a compostos voláteis e que esses estímulos são capazes de modular o comportamento dos insetos frente a situações adversas ou não, como a presença de predadores ou de uma fonte de nutrientes. Tem-se observado que insetos são altamente responsivos aos compostos voláteis produzidos por bactérias, sendo que estes podem mediar a atração, repelir ou até mesmo gerar comportamentos anormais (DAVIS *et al.*, 2013).

Segundo Davis *et al.* (2013) os compostos voláteis produzidos pelas bactérias são utilizados pelos insetos como indicadores de locais promissores para a oviposição e bom desenvolvimento das formas imaturas, já que têm grande dependência de fatores olfativos para a escolha destes locais. Os insetos também sofrem influência dos odores no que diz respeito à busca de fontes alimentares, sendo capazes de diferenciar odores produzidos por bactérias presentes em sua fonte preferencial de alimentação de odores produzidos por bactérias presentes no ambiente de uma maneira geral.

Estudos realizados com *Anopheles gambiae*, mosquito transmissor da malária, demonstram a existência de uma relação entre a presença de determinadas bactérias e a atração ou repelência do inseto, sendo que estes insetos têm preferência por odores produzidos por bactérias abundantes na pele humana do que por odores relacionados com bactérias presentes no ambiente (VERHULST *et al.*, 2011; DAVIS *et al.*, 2013).

3. Hipótese

A variabilidade da flora bacteriana do couro cabeludo de crianças em idade escolar e os compostos voláteis produzidos por essas bactérias estão relacionados com a prevalência de pediculose.

4. Justificativa

A pediculose é uma doença que afeta indistintamente pessoas de todos os sexos, etnias, classes sociais, porém a faixa etária mais acometida é a de 3 a 11 anos.

Apesar de *P. h. capitis* não ser responsável pela transmissão de agentes patogênicos, podem ocorrer complicações devido à alta carga parasitária e ao intenso prurido associado, como lesões no couro cabeludo, infecções bacterianas secundárias, adenopatias cervicais, dermatites inespecíficas, anemia crônica e, em casos extremos, miíase. A presença do ectoparasito pode, também, afetar

psicologicamente a criança e sua família, gerando desconforto e embaraço, devido ao estigma social associado a essa patologia, culminando em ausência desnecessária na escola ou no ambiente profissional.

É de conhecimento popular que a pediculose afeta mais algumas pessoas do que outras, inclusive da mesma família, com os mesmos hábitos e que tem contato direto. Devido a isso, é importante estudar qual(is) fator(es) pode(em) estar relacionado(s) com a preferência dos piolhos por determinados indivíduos.

Um dos fatores que podem influenciar na escolha do hospedeiro é o cheiro, já que se sabe que os insetos, de uma maneira geral, são atraídos ou repelidos por diferentes odores. Um estudo realizado com *A. gambiae* demonstrou que as fêmeas do inseto são atraídas pelos odores produzidos por determinada espécie de bactérias presente na pele dos voluntários, enquanto que outras espécies bacterianas as repeliam. Da mesma forma, a identificação dos gêneros de bactérias presentes no couro cabeludo permite relacioná-los com os compostos voláteis por elas produzidos e estes com a suscetibilidade à pediculose, de maneira a esclarecer um dos fatores que podem influenciar o piolho na escolha do hospedeiro.

Contudo, até o presente momento, não se tem conhecimento a cerca de um protocolo estabelecido para a identificação de gêneros bacterianos presentes no couro cabeludo, de forma que se fez necessária a padronização de uma técnica para este fim.

5. Objetivos

5.1. Objetivo Geral

Padronizar a técnica para identificação morfológica e bioquímica de bactérias isoladas do couro cabeludo de crianças, visto que existem indícios de que a flora microbiológica exerce influência na predisposição à pediculose.

5.2. Objetivos Específicos

- Estabelecer os meios mais adequados para o transporte e a cultura (isolamento e purificação) de bactérias do couro cabeludo.

- Identificar, através da morfologia e de provas bioquímicas, os gêneros de bactérias presentes no couro cabeludo de crianças em idade escolar.

6. Metodologia

6.1. Público Alvo

O estudo foi realizado com 08 crianças com idades entre 6 a 10 anos, residentes na cidade de Curitiba/PR, cujos pais são professores, alunos de um programa de pós-graduação e/ou prestadores de serviços da Universidade Federal do Paraná. A suscetibilidade para a parasitose foi estabelecida a partir do preenchimento de um questionário (anexo 23), com perguntas relacionadas à pediculose, que foi distribuído aos pais das crianças. O projeto foi aprovado no comitê de ética em pesquisa com o número 38757614.9.0000.0102.

6.2. Critérios de exclusão e grupos

Não puderam participar do estudo crianças que tinham doenças dermatológicas crônicas ou que tinham utilizado antibióticos nos seis meses antecedentes a amostragem. Os voluntários aptos a participarem da pesquisa foram instruídos a não utilizarem xampus, condicionadores, creme de pentear ou produtos semelhantes nas 24 horas que antecedem a coleta das amostras.

6.3. Identificação bacteriana

6.3.1. Coleta e transporte

O material para as culturas bacterianas foi obtido a partir de esfregaço do couro cabeludo com *swabs* estéreis e transportados em meio de transporte Stuart (anexo 3) e meio Sabouraud líquido (anexo 4). Os *swabs* foram friccionados em áreas de aproximadamente 4 cm² nas regiões occipital e retroauricular por cerca de 3 minutos, sendo que foram colhidos ao mesmo tempo quatro *swabs* por criança, dois transportados em meio de transporte stuart e dois em meio sabouraud líquido.

6.3.2. Isolamento

Posteriormente o material colhido nos *swabs* foi semeado em Ágar Sangue (anexo 5) e Ágar Chocolate (anexo 6) e então foram incubados a 37°C por 24 a 48 horas. Após o período de crescimento, foi feito registro fotográfico das placas com a

câmera digital Sony Still modelo DSC-H50 e a caracterização morfológica das colônias, segundo COSTA JUNIOR *et al.* (2009).

6.3.3. Purificação das culturas

Todas as colônias com aspectos diferentes de uma mesma placa foram inoculadas por esgotamento em ágar simples (anexo 7), a fim de minimizar a ocorrência de múltiplas espécies em um mesmo isolado. As placas foram colocadas em estufa a 37°C por 24 a 48 horas.

Após o período de incubação, foi verificado o crescimento, sendo que os purificados que não apresentaram crescimento suficiente foram deixados na estufa por até 48 horas. Os purificados em que foi observado crescimento de mais de uma espécie ou colônias com aspecto diferenciado foram estriados novamente em ágar simples e colocados em estufa a 37°C. Este processo foi repetido até que se obtivessem colônias macroscopicamente puras, após esse procedimento, as placas de petri contendo as colônias foram armazenadas em geladeira para inibir o crescimento bacteriano e serem posteriormente utilizadas.

6.3.4. Coloração de Gram

Feita a purificação das colônias, foram selecionadas as colônias purificadas que apresentavam aspectos diferentes entre si na placa do isolamento, portanto foi selecionado um isolado para cada tipo de colônia observado na placa do isolamento. Dentre os isolados com aspecto semelhante foram escolhidos os que apresentaram maior grau de pureza aparente e crescimento. Os demais foram descartados.

Com os isolados selecionados foram feitos esfregaços em lâminas (anexo 1) e em seguida foi realizado o procedimento de coloração de Gram (anexo 2). Após este procedimento as amostras isoladas foram semeadas em duplicata em tubos com ágar simples e em triplicata em eppendorfs com glicerol 40% para estoque do material.

6.3.5. Divisão dos grupos

Através da leitura das lâminas de Gram foi possível identificar a morfologia celular das bactérias isoladas. A partir dessa identificação foi feita uma divisão por grupos de bactérias, sendo eles: bacilos gram positivos, bacilos gram negativos, cocos gram positivos. Após a divisão em grupos foram feitas fotografias dos

esfregaços utilizando uma Câmera Digital modelo U Series, em aumento de 1000x, para catalogação da morfologia das bactérias isoladas.

6.3.6. Provas Bioquímicas

Para dar prosseguimento aos experimentos as amostras estocadas foram semeadas em ágar simples e incubadas por até 72 horas a 37°C. Após o crescimento foram separadas com base na classificação por coloração de gram.

6.3.6.1. Bacilos Gram Positivos

Para identificação dos bacilos gram positivos (BGP) foram realizadas os testes de motilidade e de fermentação dos carboidratos arabinose, manitol e sorbitol (Figura 3).

O teste de motilidade foi realizado utilizando-se o ágar motilidade (anexo 8), em que foi feita uma única picada central com o auxílio de uma agulha bacteriológica e foi incubado à 37°C por 24 horas, sendo mantido em estufa por até 48 horas em caso de prova negativa para confirmação do resultado.

O teste de fermentação de carboidratos foi feito em caldo *Brain Heart Infusion* (BHI) (anexo 9) com indicador púrpura de bromocresol (anexo 17) e carboidratos (arabinose 10%, sorbitol 10% e manitol 10%) filtrados (anexo 18). Com uma alça bacteriológica foi feito o inóculo por dissolução da colônia no caldo e, em seguida, foi incubado à 37°C por 24 até 48 horas, em caso de prova negativa.

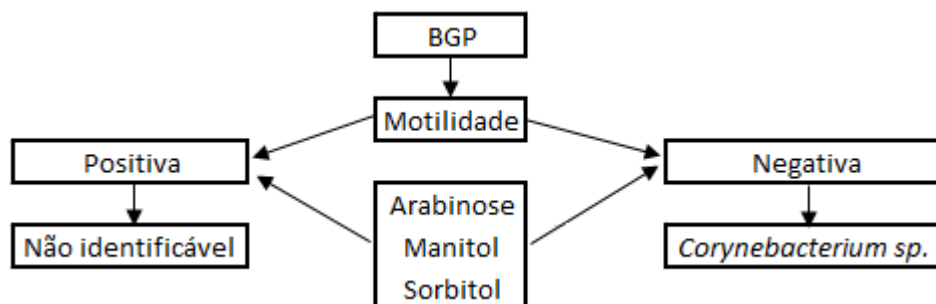


Figura 3 – Fluxograma para identificação de bacilos gram positivos.

FONTE: A autora (2015)

6.3.6.2. Bacilos Gram Negativos

Para a identificação dos micro-organismos classificados como bacilos gram negativos (BGN) primeiramente foi feita semeadura por esgotamento em Ágar MacConkey (anexo 10), a fim de observar o crescimento já que esse meio é diferencial e seletivo para BGN e se as colônias eram lactose positiva ou negativa. Após a semeadura as placas foram colocadas em estufa a 37°C por até 48 horas.

Após o crescimento em Ágar MacConkey foi realizado o teste de oxidase utilizando tiras de oxidase (Laborclin), em que uma colônia foi espalhada sobre a tira reagente e foi observado se houve imediata alteração da cor, de branco para roxo, indicando prova positiva. Não foram consideradas as alterações tardias.

Em caso de prova de oxidase positiva, indicando uma bactéria não fermentadora, foram realizados os testes de motilidade (anexo 8) e de crescimento em ágar cetrimide (anexo 11).

Em caso de prova de oxidase negativa, indicativo de enterobactérias, foi utilizado o Mini Kit de Identificação de Enterobactérias (Newprov), que contém cinco tubos com os seguintes meios: EPM modificado (anexo 12), Lisina (anexo 13), MIO (anexo 14), Citrato de Simmons (anexo 15) e Rhamnose (anexo 16).

A inoculação no tubo de EPM modificado foi feita utilizando uma agulha bacteriológica para coletar metade de uma colônia pura, inoculando por picada e estriamento na superfície, sendo o tubo deixado com a tampa frouxa; sem flambar a agulha, o tubo de Lisina foi incubado por dissolução e selado com óleo mineral estéril, a tampa foi bem fechada; ainda sem flambar a agulha, foi semeado o tubo de MIO, com picada única central e deixado com a tampa frouxa. Foi coletada a outra metade da colônia para ser inoculada por dissolução no meio de Rhamnose, que foi selado com óleo mineral estéril e tampa bem fechada; sem flambar foi estriada a superfície do meio Citrato de Simmons. Todos os tubos foram incubados a 37°C por 18 a 24 horas (Figura 4).

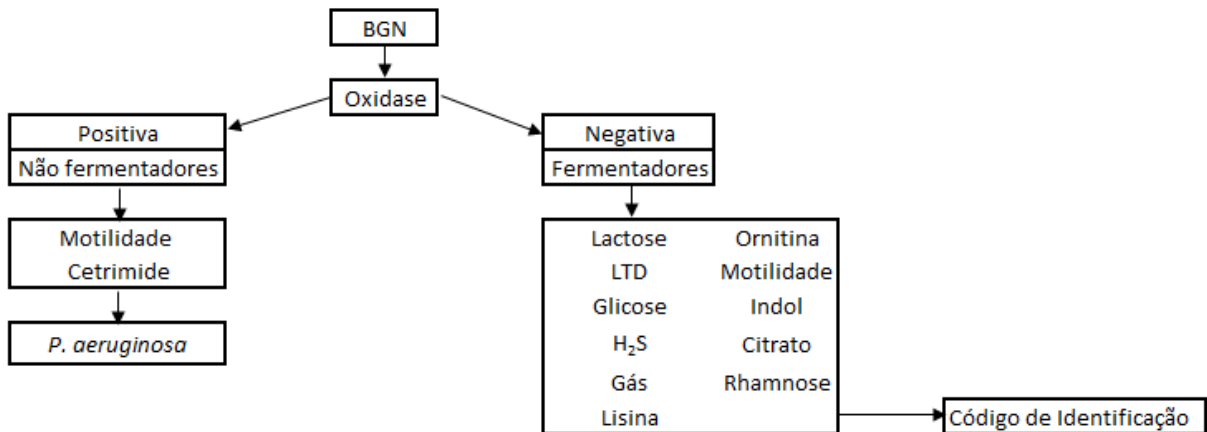


Figura 4 – Fluxograma para identificação de bacilos gram negativos.

FONTE: A autora (2015)

6.3.6.3. Cocos Gram Positivos

Para a identificação dos cocos gram positivos (CGP) foram realizadas as seguintes provas: hemólise em ágar sangue, catalase, coagulase em lâmina e coagulase em tubo, DNase, resistência a novobiocina, a optoquina e a bacitracina, crescimento em meio de tolerância ao NaCl 6,5% (MTS), bile esculina e fermentação de arabinose (Figura 5).

Para a verificação de hemólise em ágar sangue (anexo 5) foi feita semeadura das amostras por esgotamento no meio que, posteriormente, foi incubado a 37°C por 24 horas. Após o período de incubação foi observada presença de α , β ou γ -hemólise. A prova da catalase foi realizada colocando-se uma gota de peróxido de hidrogênio 3% sobre uma lâmina e agregando-se uma colônia ao peróxido de hidrogênio. Observou-se a ocorrência de formação de bolhas de ar (prova positiva) ou não (prova negativa).

A prova da coagulase em lâmina foi feita agregando-se uma colônia a ser testada a uma gota de plasma de coelho. Em caso de prova positiva houve aglutinação dos micro-organismos, já em caso de prova negativa não houve aglutinação, formando uma suspensão leitosa e uniforme.

Para a prova da coagulase em tubo foi feito o inóculo das amostras a serem testadas em caldo BHI (anexo 9) e foram incubados a 37°C por 24 horas. Após o período de incubação a turbidez foi acertada para 0,5 ($1,5 \times 10^8$ UFC/ml) na escala

nefelométrica de Mc Farland. Em um tubo de ensaio foram adicionados 500 µL de plasma de coelho e 500 µL de cada amostra em BHI. Os tubos de ensaio foram levados a estufa por 4 horas, sendo retirados após esse período e mantidos a temperatura ambiente por até 24 horas para confirmação dos resultados negativos. As provas positivas apresentaram formação de coágulo, enquanto não houve coagulação nas negativas.

A prova da DNase (anexo 19) foi realizada através da semeadura das amostras a serem testadas em ágar DNase com Azul de Toluidina. A semeadura feita foi circular e densa, em seguida foi incubada a 35°C por 24 horas. Nas provas positivas observa-se a presença de halo róseo ou transparente em torno da colônia, enquanto que nas provas negativas não é observado halo em torno da colônia após o crescimento.

As provas de resistência à Novobiocina, Optoquina e Bacitracina foram feitas a partir da semeadura para antibiograma em ágar Mueller-Hinton (anexo 20), em que foi feita uma suspensão de bactérias em solução fisiológica 0,9% e ajustada para escala de Mc Farland 0,5. Após a semeadura foi colocado um disco do antibiótico de interesse no centro do meio e incubado a 37°C por 24 horas. Após a incubação foi medido o tamanho do halo de inibição e comparado com os valores determinados nas bulas dos antibióticos para determinar se o micro-organismo é resistente ou sensível àquele medicamento (Quadro 1).

	NOVOBIOCINA	OPTOQUINA 5	BACITRACINA
Sensível	≥ 16 mm	≥ 12 mm	Qualquer halo
Resistente	< 16 mm	< 12 mm	Sem halo

QUADRO 1 - Valores de referência para teste de sensibilidade a antibióticos

FONTE: A autora (2015)

A prova de tolerância ao NaCl 6,5% (MTS) (anexo 21) foi feita a partir da dissolução da amostra no caldo MTS, que foi incubado a 37°C por 24 horas. Foi considerado como resultado positivo quando houve crescimento bacteriano com ou sem viragem do indicador.

A prova de Bile Esculina (anexo 22) consiste em inocular por esgotamento a superfície do meio e incubar a 37°C por até 72 horas. Após 24 horas de incubação

foi observado se houve enegrecimento de metade ou mais do meio, o que foi considerado como prova positiva. Se após 72 horas não houve crescimento superior a metade do meio ou não houve enegrecimento do meio a prova foi considerada negativa.

Para a prova de fermentação da arabinose (anexo 18) foi feita a dissolução da colônia bacteriana no caldo que foi incubado a 35°C por 24 horas. Após esse período foi observado se houve crescimento bacteriano e viragem do indicador, indicando prova positiva, ou se não houve crescimento nem mudança da cor original do meio, indicando prova negativa.

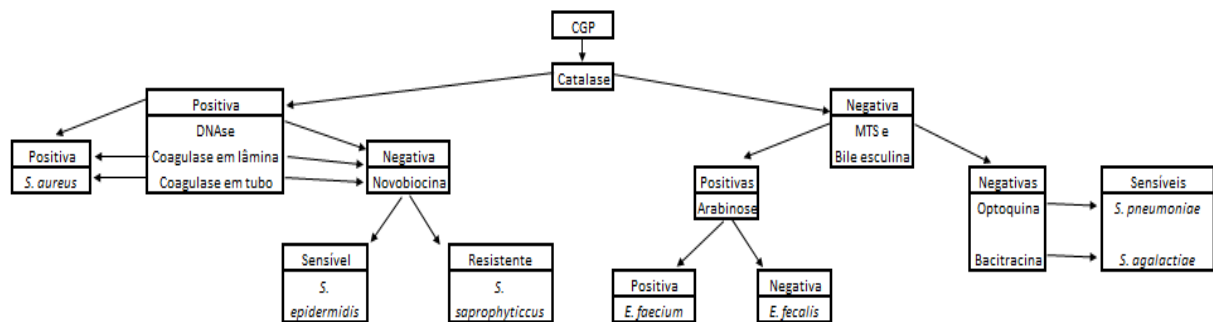


Figura 5 – Fluxograma para identificação de cocos gram positivos.

FONTE: A autora (2015)

7. Resultados e Discussão

7.1. Identificação dos participantes

Participaram do estudo oito crianças, identificadas por códigos, sendo que os números subsequentes (ex.: 3 e 4) indicam a mesma criança, no entanto com dois meios de cultura diferentes (ágar sangue e ágar chocolate). As letras “A” e “B” representam, respectivamente, os meios de transporte sabouraud líquido e stuart (Quadro 2).

7.2. Coleta e transporte

A área delimitada para coleta do material mostrou-se suficiente uma vez que 100% das crianças que tiveram material coletado apresentaram crescimento bacteriano abundante. Oh *et al.* (2012) utilizaram a mesma área para coleta de material da pele e concluíram que com as amostras coletadas foi possível analisar a

flora bacteriana dominante da pele. O tempo estipulado para coleta foi considerado eficiente, podendo inclusive ser diminuído. Fierer *et al.* (2010) utilizaram a mesma técnica para coleta, porém o tempo de exposição a superfície a ser coletada foi de 10 segundos.

IDENTIFICAÇÃO	CÓD.	MEIO DE CULTURA	CÓD.	MEIO DE TRANSPORTE	IDENTIFICAÇÃO	CÓD.	MEIO DE CULTURA	CÓD.	MEIO DE TRANSPORTE
Criança 1	3	Ágar sangue	A	Sabouraud líquido	Criança 5	19	Ágar sangue	A	Sabouraud líquido
			B	Stuart				B	Stuart
	4	Ágar chocolate	A	Sabouraud líquido		20	Ágar chocolate	A	Sabouraud líquido
			B	Stuart				B	Stuart
Criança 2	7	Ágar sangue	A	Sabouraud líquido	Criança 6	23	Ágar sangue	A	Sabouraud líquido
			B	Stuart				B	Stuart
	8	Ágar chocolate	A	Sabouraud líquido		24	Ágar chocolate	A	Sabouraud líquido
			B	Stuart				B	Stuart
Criança 3	11	Ágar sangue	A	Sabouraud líquido	Criança 7	27	Ágar sangue	A	Sabouraud líquido
			B	Stuart				B	Stuart
	12	Ágar chocolate	A	Sabouraud líquido		28	Ágar chocolate	A	Sabouraud líquido
			A	Stuart				A	Stuart
Criança 4	15	Ágar sangue	B	Sabouraud líquido	Criança 8	31	Ágar sangue	B	Sabouraud líquido
			A	Stuart				A	Stuart
	16	Ágar chocolate	A	Sabouraud líquido		32	Ágar chocolate	A	Sabouraud líquido
			B	Stuart				B	Stuart

QUADRO 2 – IDENTIFICAÇÃO DAS CRIANÇAS PARTICIPANTES DO ESTUDO. Código (CÓD.) das crianças, meio de cultura e de transporte utilizados para as amostras coletadas da microbiota do couro cabeludo

FONTE: A autora (2015)

O uso de quatro *swabs* possibilitou a coleta de uma maior quantidade de material e dessa forma pôde ser usado um *swab* para cada meio de cultura utilizado, evitando perda de material e, principalmente, contaminação. Fierer *et al.* (2010) e Flores *et al.* (2012) realizaram estudos para identificação bacteriana através de biologia molecular utilizando replicatas de 16 e 8 *swabs*, respectivamente, sendo que em ambos, 4 *swabs* foram usados inicialmente para os experimentos.

Dentre os meios selecionados para o transporte do material as amostras transportadas em meio stuart apresentaram 100% de crescimento enquanto que as transportadas em meio sabouraud líquido apresentaram 87,50% de crescimento bacteriano (Tabela 1). Segundo as bulas dos meios, o meio de transporte stuart é

indicado para o crescimento de micro-organismos aeróbios e anaeróbios de diversas espécies bacterianas e fúngicas, já o meio sabouraud líquido é mais específico para o transporte de leveduras, bolores e micro-organismos acidúricos, podendo por isso ter apresentado menor crescimento .

TABELA 1 – CRESCIMENTO BACTERIANO EM ÁGAR SANGUE E ÁGAR CHOCOLATE APÓS O TRANSPORTE EM MEIO STUART E SABOURAUD LÍQUIDO

Meio de transporte	Nº de crianças	%
Stuart	8	100
Sabouraud	7	87,50

FONTE: A autora (2015)

Apesar da pequena diferença de crescimento entre os meios de transporte, o meio stuart foi selecionado para a continuidade dos estudos principalmente devido a sua praticidade, uma vez que é comercializado, o que significa maior praticidade e menor risco de contaminação durante o procedimento de preparo do meio.

7.3. Isolamento

Os isolamentos realizados em ágar sangue e ágar chocolate (Figura 6) apresentaram os mesmos resultados, sendo que houve crescimento bacteriano de 100% das amostras isoladas em ambos os meios.

Apesar de os procedimentos para preparo dos meios serem semelhantes, o ágar chocolate tem um ponto crítico de temperatura para garantir a lise total dos eritrócitos e consequente liberação de hemina e hematina, compostos necessários para o crescimento de micro-organismos exigentes. Em virtude desse fator e de que os micro-organismos mais abundantes na região corporal estudada não são considerados fastidiosos, o ágar sangue foi escolhido como o padrão para o prosseguimento dos estudos. Porém, na continuidade deste trabalho foram identificados todos os micro-organismos isolados, tanto do ágar sangue como do ágar chocolate.



Figura 6 – ISOLAMENTO DA MICROBIOTA BACTERIANA. Biplaca com ágar chocolate e ágar sangue semeada com material colhido do couro cabeludo de uma criança

FONTE: A Autora (2015)

7.4. Purificação

A purificação das bactérias isoladas foi feita somente em ágar simples, por ser um meio de fácil preparo, barato e eficaz para o crescimento das bactérias. Foram purificadas 53 amostras (Tabela 2).

7.5. Coloração de Gram

Através da coloração de Gram foi possível analisar a morfologia celular e conferir a pureza das amostras. A partir da leitura das lâminas foi constatado que 46 (86,80%) amostras estavam puras e 7 (13,20%) estavam não puras, ou seja, com bactérias de mais de um tipo de morfologia celular ou com leveduras (Gráfico 1). As amostras não puras foram purificadas novamente até a completa purificação.

Ao final da purificação foram analisadas 49 amostras, sendo que destas, 3 (6,13%) foram classificadas como bacilos gram positivos (BGP), 5 (10,20%) como bacilos gram negativos (BGN) e 41 (83,67%) como cocos gram positivos (CGP) (Gráfico 2). Não foram encontrados dados na literatura referentes à morfologia celular das bactérias isoladas da pele. A morfologia celular dos grupos celulares isolados está representada na figura 7. Na tabela 3 estão descritas as amostras de bactérias conforme sua classificação.

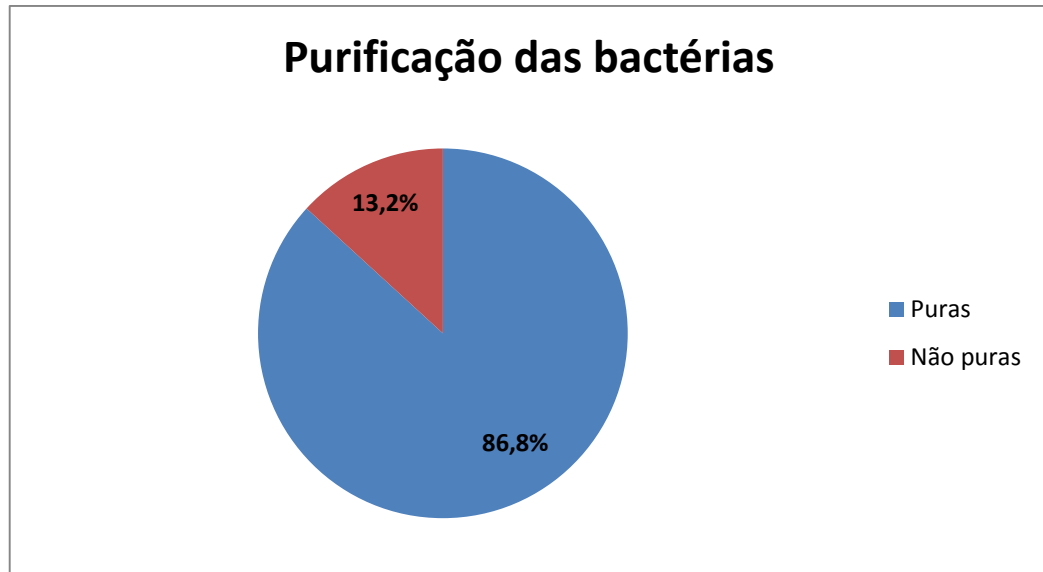


Gráfico 1 – Purificação inicial da microbiota bacteriana do couro cabeludo das crianças.

FONTE: A Autora (2015)

TABELA 2 – RELAÇÃO DAS AMOSTRAS DE BACTÉRIAS PURAS E NÃO PURAS DO COURO CABELUDO PURIFICADAS INICIALMENTE

PURAS				NÃO PURAS
1B2	12A1	20A1	26B1	1A2
2A1	12B1	20B1	27B1	4A1
3A1	14A1	21B1	28A1	17A2
3B1	15A1	22A2	28B1	19B1
4B1	15B1	23A1	29B2	22A2
4B2	16A1	23B1	29B4	26B1
5B3	16A2	23B2	31A1	27A1
7B1	16B1	24A1	31B1	
8B1	17A2	24B1	32A1	
8B2	17B1	25B1	32B1	
11A1	17B2	25B2		
11B1	19A1	25B4		

FONTE: A Autora (2015)

7.6. Morfologia bacteriana

Foram analisadas 46 colônias bacterianas quanto a sua morfologia comparando com a morfologia celular observada a partir da coloração de Gram.

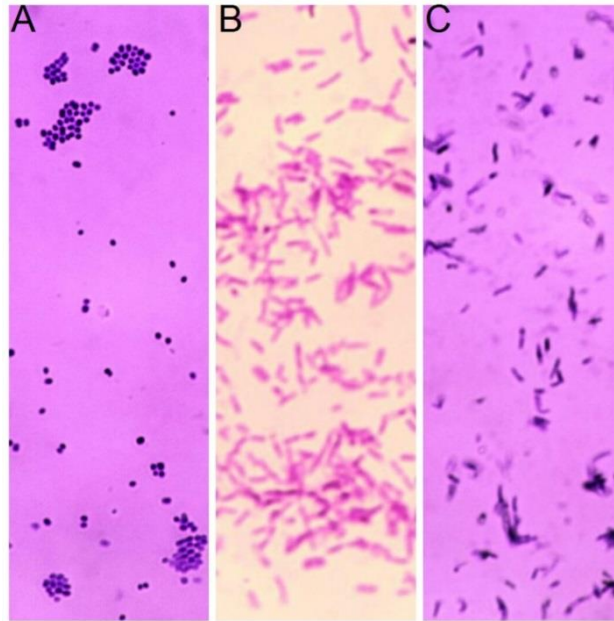


Figura 7 – COLORAÇÃO DE GRAM. Morfologia celular dos grupos de bactérias isoladas do couro cabeludo das crianças participantes.. A – Cocos gram positivos (CGP). B – Bacilos gram negativos (BGN). C – Bacilos gram positivos (BGP)

FONTE: A autora (2015)

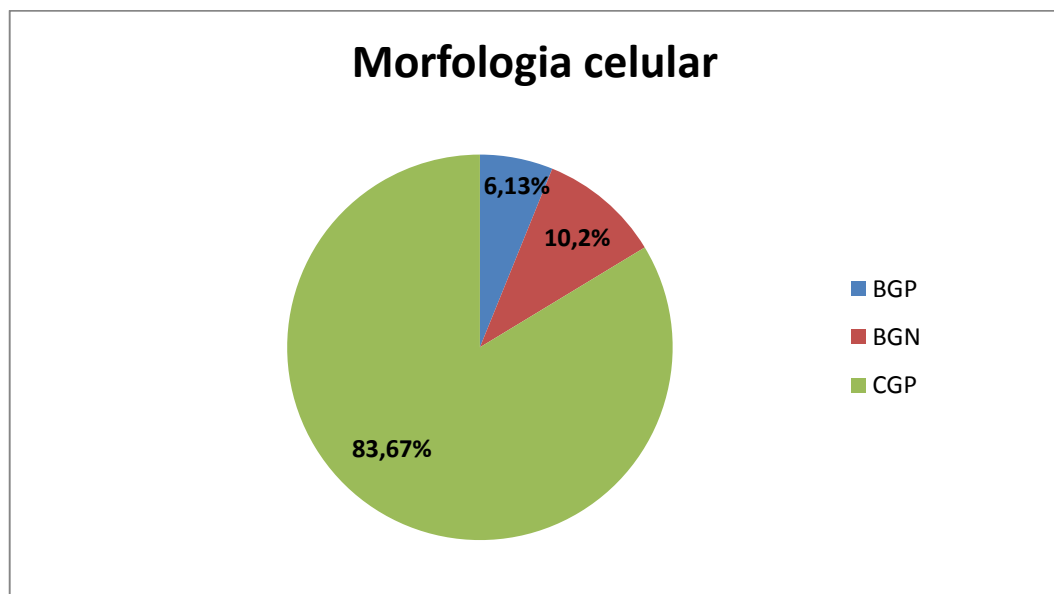


Gráfico 2 – Morfologia celular da microbiota bacteriana. Percentual de bacilos gram positivos (BGP), bacilos gram negativos (BGN) e cocos gram positivos (CGP) isolados do couro cabeludo das crianças.

FONTE: A Autora (2015)

TABELA 3 – DIVISÃO DAS AMOSTRAS DA MICROBIOTA DO COURO CABELUDO CONFORME CLASSIFICAÇÃO POR COLORAÇÃO DE GRAM

BGP	BGN	CGP				
4A1	2A1	1B2	12A1	19A1	25B1	32B1
22A2	4B1	3A1	12B1	19B1	25B2	
27A1	17B1	3B1	14A1	20A1	26B1	
	25B4	4B2	15A1	20B1	27B1	
	31B1	5B3	15B1	21B1	28A1	
		7B1	16A1	23A1	28B1	
		8B1	16A2	23B1	29B2	
		8B2	16B1	23B2	29B4	
		11A1	17A2	24A1	31A1	
		11B1	17B2	24B1	32A1	

Legenda: BGP – bacilo gram positivo. BGN – Bacilo gram negativo. CGP – Coco gram positivo

FONTE: A Autora (2015)

Quanto a forma das 2 (4,35%) colônias identificadas como bacilos gram positivos (BGP), uma (50%) era circular com aspecto rugoso e borda ondulada e a outra (50%) irregular com aspecto papiloso e borda inteira, ambas (100%) apresentavam coloração acinzentada, eram planas e grandes.

Já 3 (75%) das 4 (8,70%) colônias identificadas como bacilos gram negativos eram circulares e 1 (25%) era irregular, 2 (50%) tinham coloração amarela, 1 (25%) tinha coloração branca e 1 (25%) coloração cinza, 3 (75%) eram lisas e 1 (25%) era rugosa, sendo 2 (50%) com borda inteira e 2 (50%) com borda ondulada. Quanto a elevação, 2 (50%) eram convexas e 2 (50%) eram planas, sendo 3 (75%) grandes e 1 (25%) pequena. As colônias das amostras identificadas como *Serratia liquefaciens* apresentaram a mesma morfologia – colônia circular, amarelada, lisa com borda inteira e convexa.

Foram identificadas como cocos gram positivos 40 (86,96%) colônias, destas, 14 (35%) com coloração acinzentada, 12 (30%) brancas, 7 (17,50%) amarelas, 6 (15%) com coloração creme e 1 (2,5%) esverdeada. Quanto a forma, 30 (75%) eram circulares, 6 (15%) puntiformes e 4 (10%) irregulares. Das 40 colônias, 38 (95%) eram lisas, 1 (2,5%) era papilosa e 1 (2,5%) era rugosa. 33 (82,5%) tinham borda inteira e 7 (17,5%) com borda ondulada. Foram classificadas como convexas 24 (60%) colônias, 14 (35%) como planas e 2 (5%) como umbanadas – semelhante a convexa, porém com uma elevação ao centro da colônia. Foram consideradas como

grandes 18 (45%) colônias, 12 (30%) como médias e 10 (25%) como pequenas. Todas as colônias de identificadas como de *Staphylococcus aureus* eram acinzentadas, lisas com bordas inteiras e convexas, de tamanho pequeno a médio. As demais espécies apresentaram morfologia variável entre si.

Não foram encontrados dados sobre a morfologia das colônias bacterianas isoladas da pele de crianças na literatura consultada.

7.7. Provas Bioquímicas

7.7.1. Bacilos Gram Positivos

A partir da utilização das provas selecionadas foi possível identificar duas das três amostras de bacilos gram positivos isoladas. As amostras apresentaram resultados para todas as provas realizadas, contudo não foi possível identificar a amostra 4A1, pois acredita-se que os testes selecionados não tenham sido completamente eficientes para a identificação deste grupo de bactéria.

As amostras 22A1 e 27A1 apresentaram resultado negativo para motilidade, enquanto que 4A1 era positiva. Quanto às provas de fermentação de carboidratos, foi observado que 4A1 era positiva para fermentação de arabinose, já 22A1 e 27A1 eram negativas. Para os demais carboidratos – sorbitol e manitol – as provas foram negativas para todas as amostras (Tabela 4). A figura 8 ilustra os resultados obtidos após incubação de 48 horas a 37°C.

TABELA 4 - INTERPRETAÇÃO DAS PROVAS BIOQUÍMICAS REALIZADAS PARA IDENTIFICAÇÃO DE BACILOS GRAM POSITIVOS (BGP) ISOLADOS DO COURO CABELUDO DAS CRIANÇAS

AMOSTRA	MOTILIDADE	ARABINOSE	SORBITOL	MANITOL
4A1	+	+	-	-
22A1	-	-	-	-
27A1	-	-	-	-

FONTE: A Autora (2015)

A amostra 4A1 foi submetida a um teste adicional de motilidade a 25°C, uma vez que, segundo a literatura consultada, haveria a possibilidade de ter sido isolado *Listeria sp.*, devido a ser considerada pouco móvel a 37°C. A amostra foi incubada por 48 horas, porém não apresentou crescimento em forma de guarda-chuva, o que é incompatível com a espécie em questão. A tabela 5 representa a identificação dos

bacilos gram positivos (BGP) isolados e o gráfico 3 representa o percentual de cada espécie identificada.

TABELA 5 – IDENTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS DE BACILOS GRAM POSITIVOS (BGP) ISOLADAS DO COURO CABELUDO DAS CRIANÇAS

AMOSTRA	IDENTIFICAÇÃO
4A1	NI
22A1	<i>Corynebacterium sp.</i>
27A1	<i>Corynebacterium sp.</i>

Legenda: NI – Não foi possível identificar através das provas bioquímicas utilizadas

FONTE: A Autora (2015)

Segundo Grice & Segre (2011), as regiões occipital e retroauricular são colonizadas principalmente por *Propionibacterium sp.* e *Corynebacterium sp.* Tais resultados são compatíveis com os identificados neste estudo, uma vez que 66,67% dos bacilos gram positivos isolados pertencem ao gênero *Corynebacterium*. Grice et al. (2009), identificaram mais de 22% como *Corynebacterium sp.* e 23% como *Propionibacterium sp.* Assim como Grice et al. (2008), que identificaram *Corynebacterium sp.* e *Propionibacterium sp.* além de outras actinobactérias. Futuros testes em anaerobiose serão propostos para a identificação de espécies anaeróbias, como *Propionibacterium sp.*

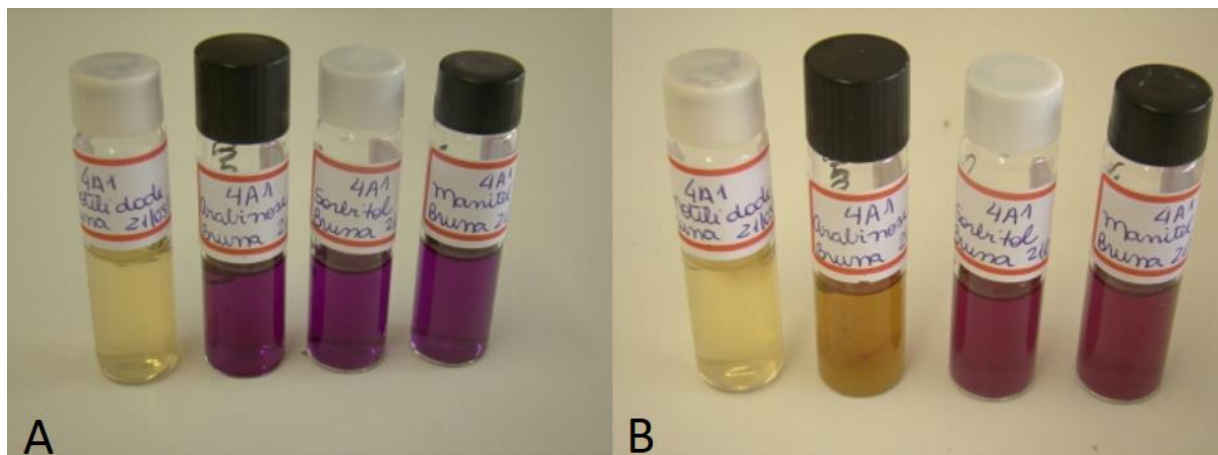


Figura 8 – PROVAS BIOQUÍMICAS UTILIZADAS PARA A IDENTIFICAÇÃO DE BACILOS GRAM POSITIVOS (BGP) ANTES DA INCUBAÇÃO (A) E APÓS 48 HORAS DE INCUBAÇÃO A 37°C (B). Da esquerda para a direita: prova da motilidade, prova da fermentação de arabinose, prova da fermentação de sorbitol e prova da fermentação de manitol

FONTE: A Autora (2015)

7.7.2. Bacilos Gram Negativos

Foi possível identificar 4 das 5 amostras de bacilos gram negativos, já que a amostra 17B1 não apresentou crescimento nas provas bioquímicas do kit de identificação utilizado. Isso pode ter ocorrido devido às bactérias já estarem enfraquecidas, uma vez que precisaram de incubação mais prolongada para apresentar crescimento mesmo quando semeadas em ágar sangue.

Todas as amostras, inclusive a 17B1, eram oxidase negativas, portanto fermentadoras da glicose. As amostras 2A1, 17B1, 25B4 e 31B1 eram fermentadoras de lactose, enquanto que a 4B1 não a fermentava. Nenhuma das quatro amostras analisadas por completo era positiva para desaminação do L-triptofano, nem produzia gás sulfídrico (H_2S) – enegrecimento do meio –, gás – presença de bolhas ou ruptura do meio – ou indol – anel róseo após a adição de reativo de Kovacs. As amostras 2A1 e 4A1 foram positivas para a descarboxilação da L-lisina, já as amostras 25B4 e 31B1 eram negativas. Todas as quatro amostras eram positivas para a descarboxilação da ornitina. Somente a amostra 25B4 era móvel, sendo as demais consideradas imóveis. As amostras 4A1 e 25B4 utilizavam citrato como única fonte de carbono, enquanto que 2A1 e 31B1 possuem outras fontes. Somente a amostra 25B4 não fermentava rhamnose, sendo que 2A1, 4A1 e 31B1 fermentavam este açúcar (Tabela 6). As figuras 9 e 10 ilustram os testes realizados com as amostras de bacilos gram negativos.

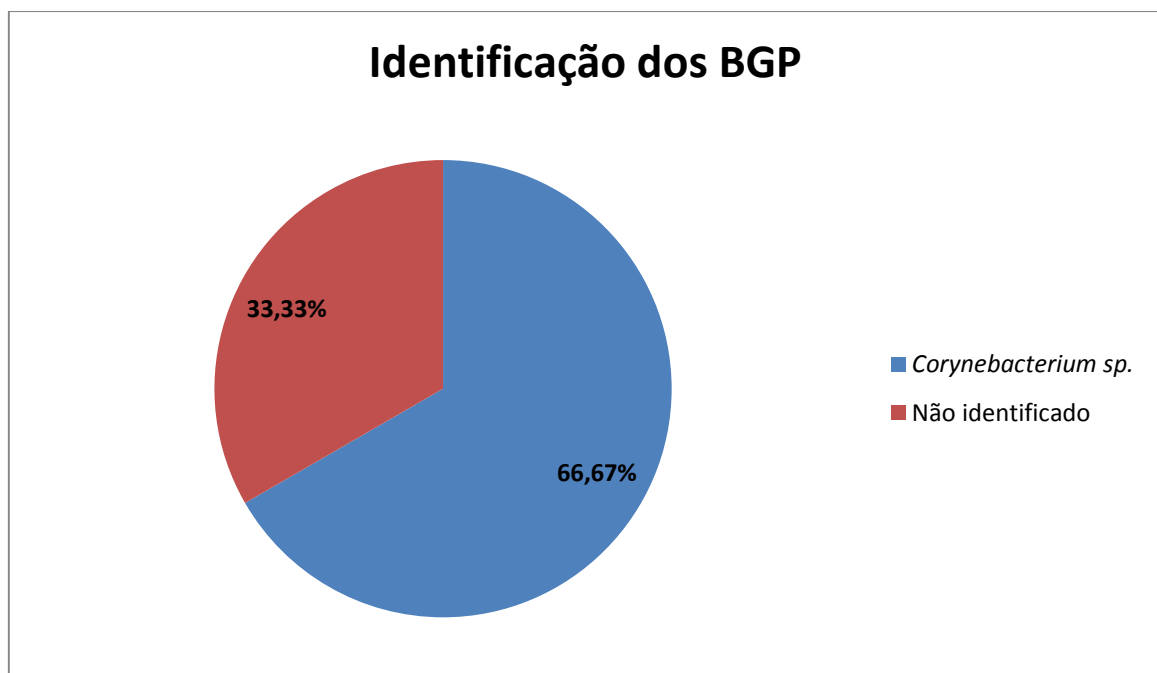


Gráfico 3 – Representação do percentual de cada espécie de bacilos gram positivo (BGP) isolados do couro cabeludo das crianças.

FONTE: A Autora (2015)

TABELA 6 – INTERPRETAÇÃO DAS PROVAS BIOQUÍMICAS REALIZADAS PARA IDENTIFICAÇÃO DE BACIOS GRAM NEGATIVOS (BGN) ISOLADOS DO COURO CABELUDO DAS CRIANÇAS

AMOSTRA	OXIDASE	LACTOSE	LTD	H ₂ S	GLICOSE	GÁS	LISINA	INDOL	ORNITINA	MOTILIDADE	CITRATO	RHAMNOSE
2A1	-	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-	+
4B1	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	+
17B1	-	+	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
25B4	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-
31B1	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+

Legenda: NC – Não cresceu após incubação a 37°C por 48 horas

FONTE: A Autora (2015)

A partir do sistema de identificação utilizado foi possível gerar um código relacionado à determinada espécie de bacilo gram negativo (BGN), com um percentual de probabilidade, consultado no “Manual para Identificação de Enterobactérias Newprov” (Tabela 7). O gráfico 4 representa o percentual de cada espécie isolada.

TABELA 7 – IDENTIFICAÇÃO DOS BACIOS GRAM NEGATIVOS (BGN) ISOLADOS DO COURO CABELUDO DAS CRIANÇAS ANALISADAS

AMOSTRA	CÓDIGO	IDENTIFICAÇÃO
2A1	2721	<i>Escherichia coli</i>
4B1	723	<i>Serratia liquefaciens</i>
17B1	NI	NI
25B4	2632	<i>Serratia liquefaciens</i>
31B1	2621	<i>Shigella sonnei</i>

Legenda: NI - Não foi possível identificar a amostra 17B1

FONTE: A Autora (2015)

A presença de enterobactérias no couro cabeludo pode ser intrigante, devido a serem normalmente associadas a contaminações do trato gastrointestinal, contudo Grice & Segre (2011) afirmam que as regiões secas, possuem uma diversidade filogenética ainda maior do que o intestino e a cavidade oral, incluindo uma grande diversidade de bactérias gram negativas. Apesar de as regiões estudadas serem consideradas sebáceas, é possível observar que as autoras indicam a presença de

proteobactérias principalmente na região occipital. Oh *et al.* (2012) também identificaram proteobactérias nas narinas, região considerada úmida, de crianças e adultos, portanto, mesmo em regiões mais úmidas ou sebáceas é possível identificar enterobactérias como pertencentes a flora bacteriana da pele. Grice *et al.* (2008) estudaram a pele dos braços de cinco voluntários e obtiveram grande abundância de proteobactérias nestes locais, principalmente do gênero *Pseudomonas*, porém afirmam que é comum encontrar *Serratia sp.*

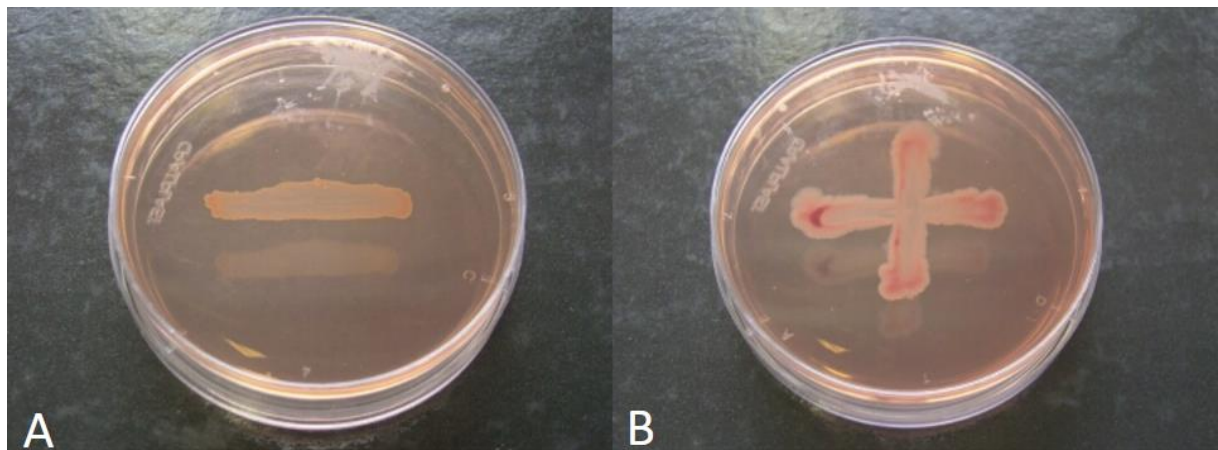


Figura 9 – PROVAS DE FERMENTAÇÃO DA LACTOSE EM ÁGAR MACCONKEY. (A) Negativa. Com colônia amarelada ou incolor. (B) Positiva. Com colônia rosada. A forma de estriamento representa o tipo de bactéria,

FONTE: A Autora (2015)

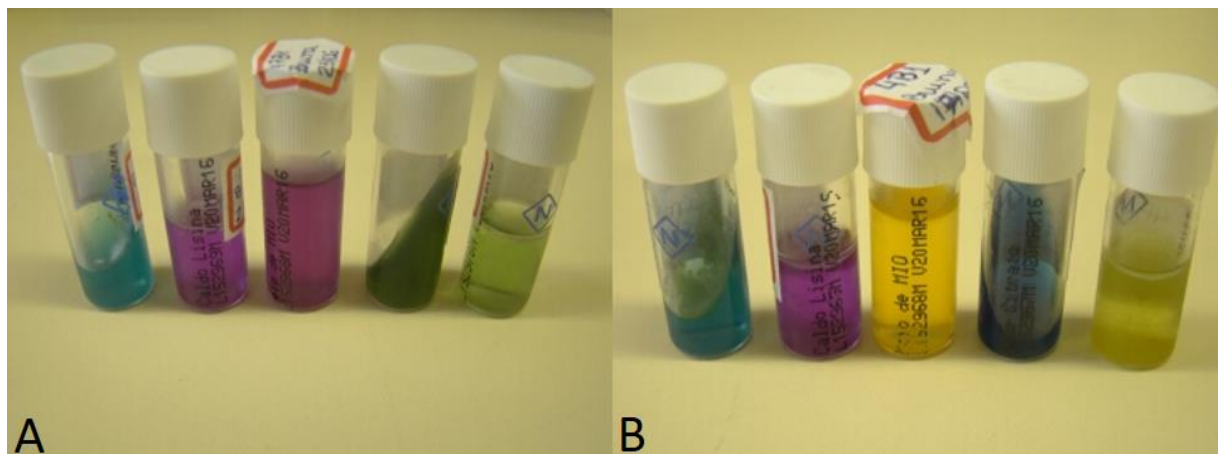


Figura 10 – PROVAS BIOQUÍMICAS UTILIZADAS PARA A IDENTIFICAÇÃO DE BACILOS GRAM NEGATIVOS (BGN). (A) Meios em suas cores originais após 48 horas de incubação a 37°C e sem evidência de crescimento bacteriano. (B) Com evidência de crescimento e alteração da cor de alguns meios. No momento da leitura das provas o meio de MIO apresentava coloração roxa, porém após a adição de reativo de Kovacs (para prova do indol) o meio muda de coloração. Da esquerda para a direita: Meio EPM, Caldo Lisina, Meio de MIO, Meio Citrato de Simmons e Caldo Rhamnose.

FONTE: A Autora (2015)

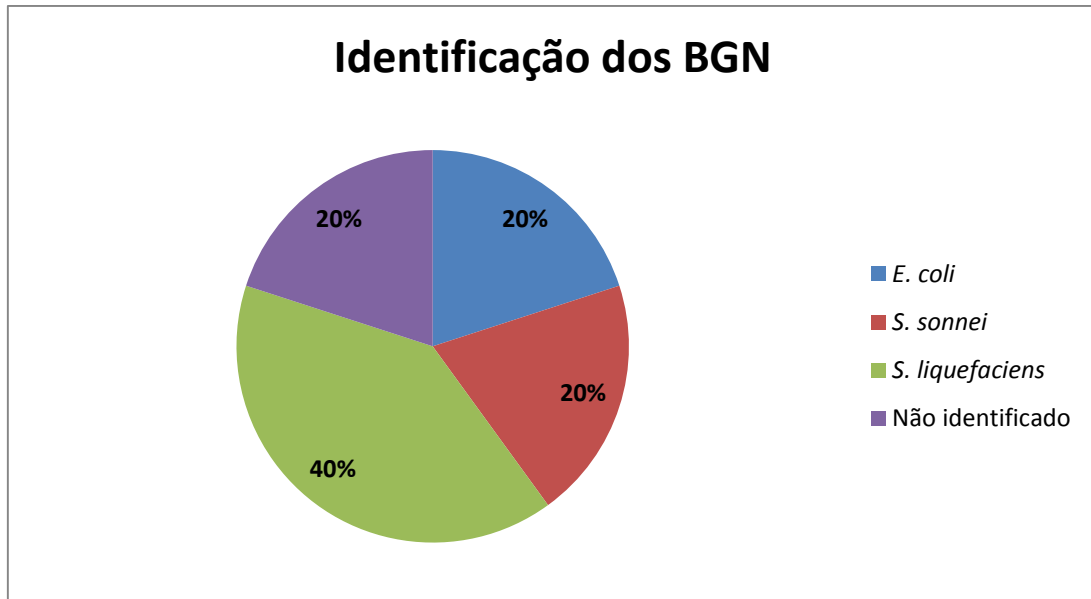


Gráfico 4 – Representação do percentual de cada espécie de bacilos gram negativos (BGN) isolados do couro cabeludo das crianças.

FONTE: A Autora (2015)

7.7.3. Cocos Gram Positivos

Apenas 30 (73,17%) das 41 amostras inicialmente isoladas foram identificadas, pois não foi possível recuperar todas as amostras após o estoque em ágar simples, sendo que 11 não cresceram mesmo após semeadura em ágar sangue. Acredita-se que o estoque em ágar simples não tenha sido suficiente para garantir a viabilidade das bactérias após estoque por período de tempo prolongado. Sugere-se que em estudos posteriores seja testada a viabilidade das bactérias após estoque em ágar sangue, visto que este é um meio enriquecido e que a semeadura para prosseguimento dos experimentos seja realizada também em ágar sangue.

Todas as 30 amostras foram positivas na prova da catalase (Figura 11), o que indica que eram de espécies de estafilococos. Portanto não foi necessário realizar algumas das provas inicialmente propostas – MTS, bile esculina, arabinose, optoquina e bacitracina – para a identificação de estreptococos e enterococos, já que estes não foram isolados. Segundo a distribuição topográfica das bactérias na pele, proposta por Grice & Segre (2011), uma pequena parcela de outros firmicutes (como estreptococos) é encontrada na pele, porém em outras regiões que não a retroauricular e a occipital. Outra explicação para a ausência de estreptococos nos

isolados é que existem indícios de que a colonização por *Staphylococcus epidermidis* inibe a colonização por *Streptococcus sp.*

Após o crescimento das colônias em ágar sangue foi observado o tipo de hemólise apresentado. Das 30 amostras, 21 (70%) apresentaram γ -hemólise e 9 (30%) β -hemólise (Figura 12). Conforme manual da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), *Staphylococcus epidermidis* é considerado um controle de qualidade para γ -hemólise, já *Staphylococcus aureus* é controle de qualidade para β -hemólise.

As provas da DNase (Figura 13), coagulase em lâmina (Figura 14) e coagulase em tubo (Figura 15) foram realizadas com todos os isolados, sendo que foram positivas, respectivamente, 5 (16,67%), 10 (33,33%) e 5 (16,67%) amostras. As amostras negativas na prova de coagulase em lâmina foram submetidas à prova da novobiocina (Figura 16), sendo que das 23 amostras, 18 (78,26%) eram sensíveis ao antibiótico (Tabela 8).

A maior parte das amostras identificadas, 46,67%, correspondem a *Staphylococcus* não produtores de coagulase, com indicativo de *Staphylococcus epidermidis* por serem sensíveis a novobiocina e não produzirem hemólise (γ -hemólise). As amostras identificadas como *Staphylococcus saprophyticus* representam 16,67%, mesmo percentual de *Staphylococcus aureus*. Não foi possível identificar a nível de espécie 20% das amostras, contudo pode-se afirmar que pertencem ao gênero *Staphylococcus*, que não são produtores de coagulase e que não são *S. epidermidis* nem *S. saprophyticus* (Tabela 9). O gráfico 5 representa o percentual de cada espécie identificada.

Diversos autores identificaram espécies de estafilococos em amostras de pele, sendo que Roth & James (1988) e Hannigan & Grice (2013) afirmam que em sua maioria tratam-se de *Staphylococcus epidermidis*. Segundo Roth & James (1988) aproximadamente 50% da flora residente da pele é composta por *S. epidermidis*, outras espécies de *Staphylococcus* não produtores de coagulase também são encontradas abundantemente na pele.

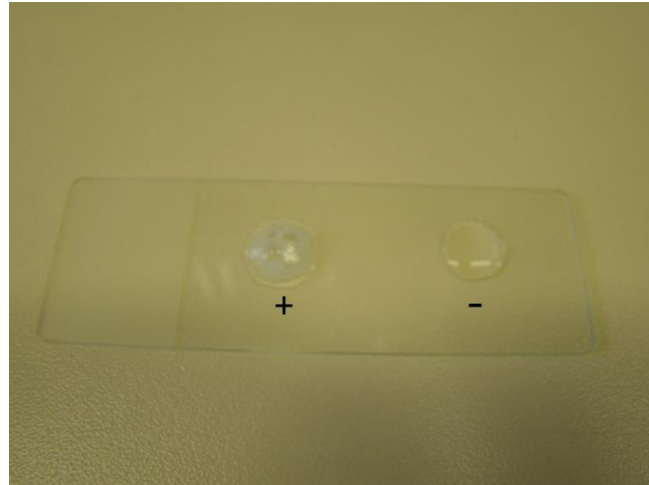


Figura 11 – PROVA DA CATALASE. (+) indica prova positiva com formação de bolhas de ar. (-) indica prova negativa.

FONTE: A Autora (2015)

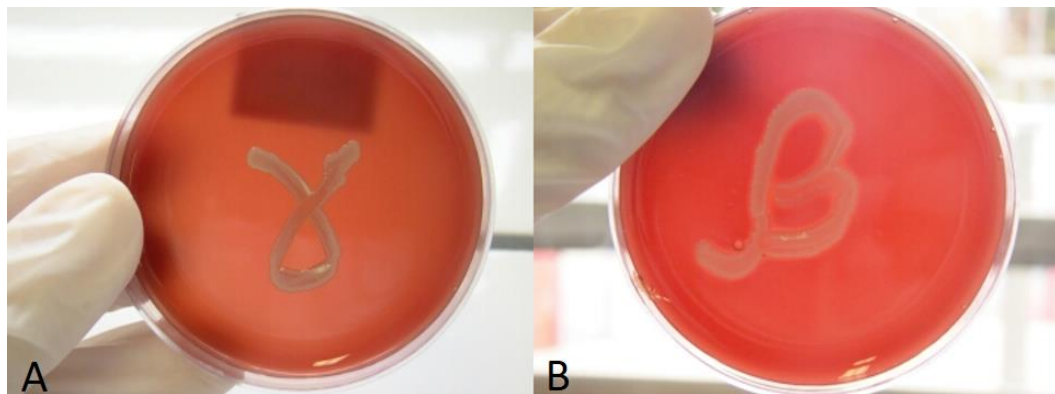


Figura 12 – CRESCIMENTO EM ÁGAR SANGUE PARA A VERIFICAÇÃO DE HEMÓLISE. (A) representa a γ -hemólise (não há formação de halo). (B) representa a β -hemólise (há formação de halo ao redor da colônia).

FONTE: A Autora (2015)

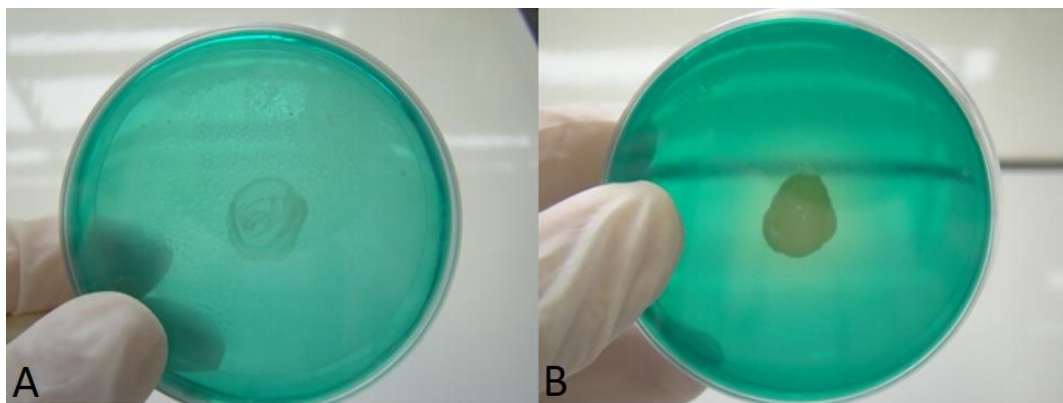


Figura 13 – PROVA DA DNASE. (A) Negativa. Não há formação de halo róseo ou transparente ao redor da colônia. (B) Positiva. Observa-se o halo transparente ao redor da colônia.

FONTE: A Autora (2015)

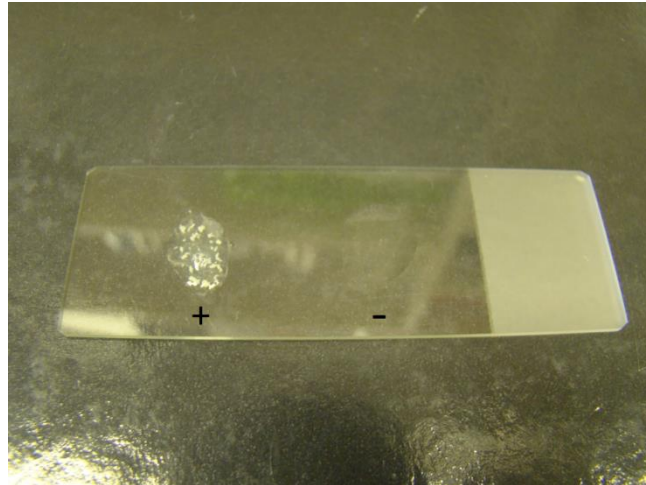


Figura 14 – PROVA DA COAGULASE EM LÂMINA. (+) Positiva. Há formação de grumos. (-) Não há aglutinação.

FONTE: A Autora (2015)

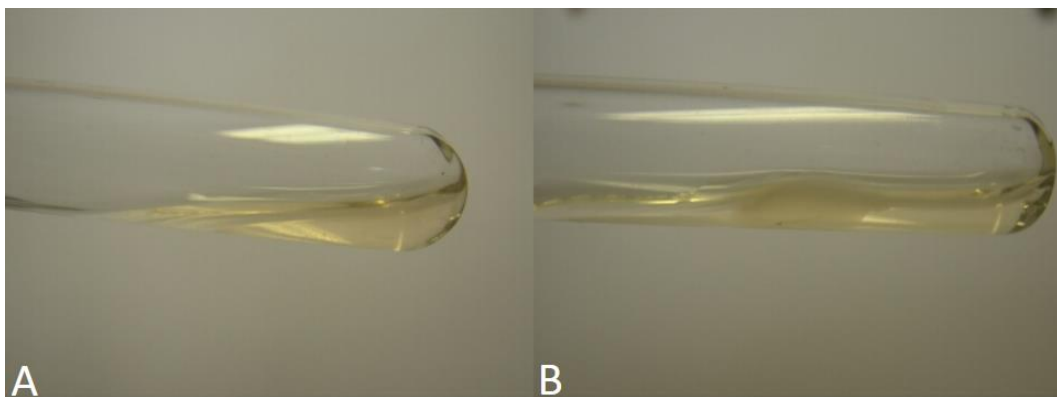


Figura 15 – PROVA DA COAGULASE EM TUBO. (A) Negativa. Não há formação de coágulo. (B) Positiva. Há formação de coágulo.

FONTE: A Autora (2015)

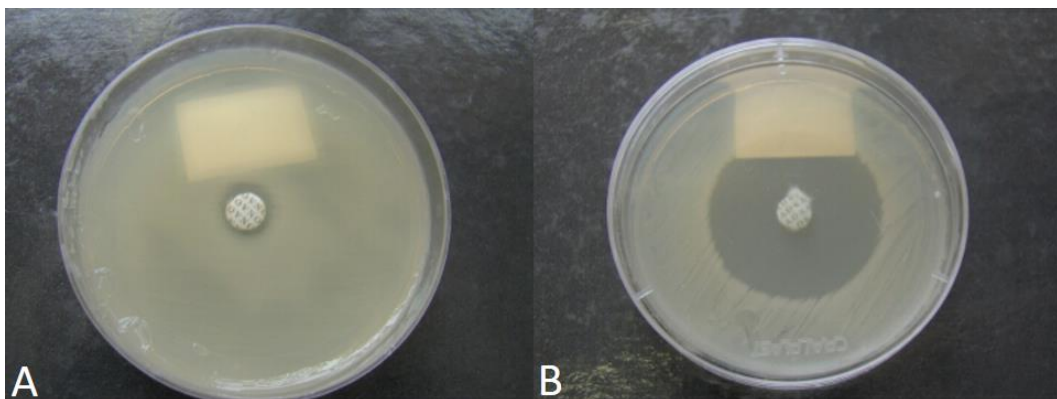


Figura 16 – PROVA DA NOVOBIOCINA. (A) Resistente: o halo de inibição é inferior a 16 mm. (B) Sensível: o halo de inibição é superior a 16 mm.

FONTE: A Autora (2015)

Roth & James (1988) afirmam que *Staphylococcus saprophyticus* são considerados micro-organismos residentes da região perianal e Rodrigues *et al.* (1993) associam esta espécie com infecções urinárias. Acredita-se que não seja uma espécie residente da flora bacteriana do couro cabeludo, mas que seja uma espécie transitória resultante da contaminação da pele por material fecal ou da região perianal.

Conforme Santos *et al.* (2007) e Gelatti *et al.* (2009), apesar de *Staphylococcus aureus* ser conhecidamente um patógeno causador de diversos tipos de infecções, desde as mais simples até as mais graves, esta espécie bacteriana faz parte da flora residente da pele, tornando-se patogênica em casos de quebra de barreira cutânea e/ou de diminuição da imunidade. Devido a sua patogenicidade, vários autores (ROTH & JAMES, 1988; GRICE *et al.*, 2008; GRICE *et al.*, 2009; GRICE & SEGRE, 2011; KONG *et al.*, 2012; HANNIGAN & GRICE, 2013) fazem relação entre seu isolamento com o desenvolvimento de doenças cutâneas, como dermatite atópica ou eczema atópico.

TABELA 8 - INTERPRETAÇÃO DAS PROVAS BIOQUÍMICAS REALIZADAS PARA IDENTIFICAÇÃO DE COCOS GRAM POSITIVOS (CGP) ISOLADOS DO COURO CABELUDO DAS CRIANÇAS (CONTINUA)

AMOSTRA	HEMÓLISE	CATALASE	DNAse	COAGULASE EM LÂMINA	COAGULASE EM TUBO	NOVOBIOCINA
3A1	γ	+	-	-	-	30 mm
3B1	γ	+	-	-	NS	NC
8B1	β	+	-	-	-	22 mm
8B2	γ	+	-	+	-	NS
11A1	γ	+	-	-	-	0 mm
11B1	γ	+	-	-	-	28 mm
12B1	β	+	-	-	-	29 mm
15A1	β	+	+	+	+	NS
15B1	β	+	+	+	+	NS
16A1	β	+	-	+	-	29 mm
16A2	β	+	+	+	+	NS
16B1	β	+	+	+	+	NS
17A2	γ	+	-	-	-	23 mm
19A1	γ	+	-	-	-	0 mm
19B1	γ	+	-	-	-	09 mm
20A1	γ	+	-	+	-	29 mm
20B1	γ	+	-	-	NS	29 mm

TABELA 8 - INTERPRETAÇÃO DAS PROVAS BIOQUÍMICAS REALIZADAS PARA IDENTIFICAÇÃO DE COCOS GRAM POSITIVOS (CGP) ISOLADOS DO COURO CABELUDO DAS CRIANÇAS (CONCLUSÃO)

23A1	γ	+	-	-	-	19 mm
23B1	γ	+	-	-	-	17 mm
23B2	γ	+	-	+	-	18 mm
24A1	γ	+	-	-	-	24 mm
24B1	γ	+	-	-	-	21 mm
25B2	γ	+	-	-	-	0 mm
26B1	γ	+	-	-	-	26 mm
27B1	β	+	+	+	+	NS
28A1	γ	+	-	-	-	0 mm
28B1	γ	+	-	-	NS	27 mm
31A1	γ	+	-	-	-	26 mm
32A1	γ	+	-	-	-	24 mm
32B1	β	+	-	+	-	26 mm

Legenda: NS – Não semeado

FONTE: A Autora (2015)

TABELA 9 – IDENTIFICAÇÃO DOS COCOS GRAM POSITIVOS (CGP) ISOLADOS DO COURO CABELUDO DAS CRIANÇAS (CONTINUA)

AMOSTRA	IDENTIFICAÇÃO	INDICATIVO DE
3A1	<i>Staphylococcus</i> não produtor de coagulase	<i>S. epidermidis</i>
3B1	<i>Staphylococcus</i> não produtor de coagulase	NE
8B1	<i>Staphylococcus</i> não produtor de coagulase	NE
8B2	<i>Staphylococcus</i> não produtor de coagulase	NE
11A1	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	<i>S. saprophyticus</i>
11B1	<i>Staphylococcus</i> não produtor de coagulase	<i>S. epidermidis</i>
12B1	<i>Staphylococcus</i> não produtor de coagulase	NE
15A1	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>S. aureus</i>
15B1	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>S. aureus</i>
16A1	<i>Staphylococcus</i> não produtor de coagulase	NE
16A2	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>S. aureus</i>
16B1	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>S. aureus</i>
17A2	<i>Staphylococcus</i> não produtor de coagulase	<i>S. epidermidis</i>
19A1	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	<i>S. saprophyticus</i>
19B1	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	<i>S. saprophyticus</i>
20A1	<i>Staphylococcus</i> não produtor de coagulase	<i>S. epidermidis</i>
20B1	<i>Staphylococcus</i> não produtor de coagulase	<i>S. epidermidis</i>
23A1	<i>Staphylococcus</i> não produtor de coagulase	<i>S. epidermidis</i>
23B1	<i>Staphylococcus</i> não produtor de coagulase	<i>S. epidermidis</i>

TABELA 9 – IDENTIFICAÇÃO DOS COCOS GRAM POSITIVOS (CGP) ISOLADOS DO COURO CABELUDO DAS CRIANÇAS (CONCLUSÃO)

23B2	<i>Staphylococcus</i> não produtor de coagulase	<i>S. epidermidis</i>
24A1	<i>Staphylococcus</i> não produtor de coagulase	<i>S. epidermidis</i>
24B1	<i>Staphylococcus</i> não produtor de coagulase	<i>S. epidermidis</i>
25B2	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	<i>S. saprophyticus</i>
26B1	<i>Staphylococcus</i> não produtor de coagulase	<i>S. epidermidis</i>
27B1	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>S. aureus</i>
28A1	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	<i>S. saprophyticus</i>
28B1	<i>Staphylococcus</i> não produtor de coagulase	<i>S. epidermidis</i>
31A1	<i>Staphylococcus</i> não produtor de coagulase	<i>S. epidermidis</i>
32A1	<i>Staphylococcus</i> não produtor de coagulase	<i>S. epidermidis</i>
32B1	<i>Staphylococcus</i> não produtor de coagulase	NE

Legenda: NE – Não foi possível determinar a espécie. Considerar como *Staphylococcus* não produtor de coagulase

FONTE: A Autora (2015)

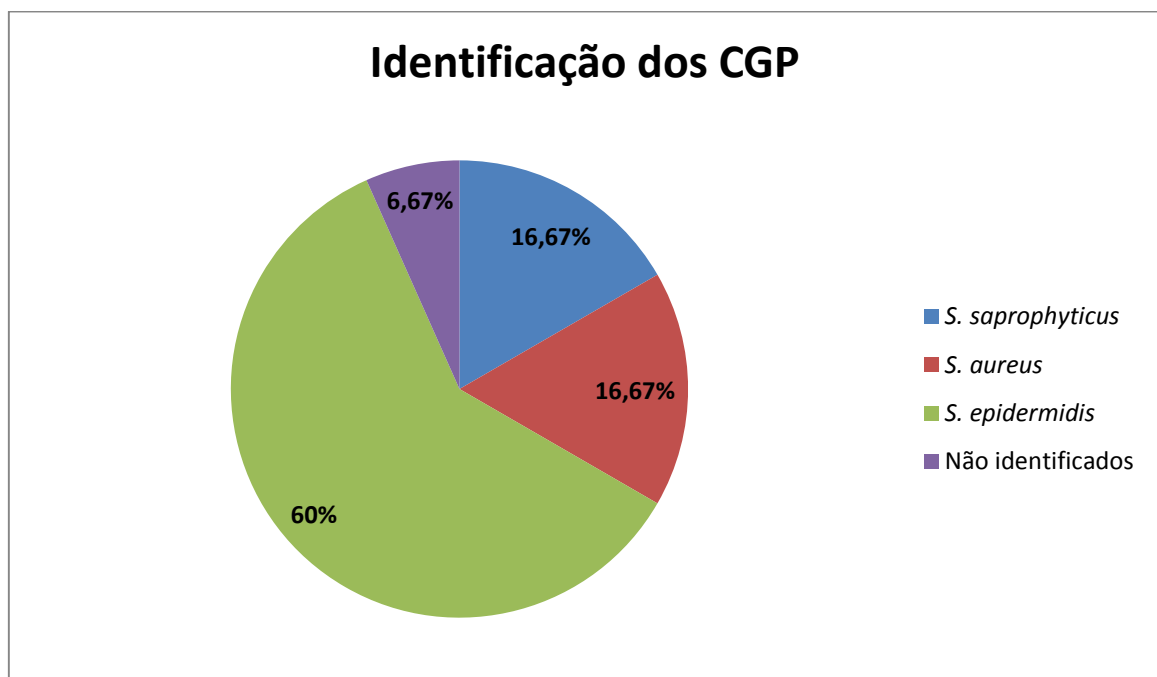


Gráfico 5 – Representação do percentual de cada espécie de cocos gram positivos (CGP) isolados do couro cabeludo das crianças.

FONTE: A Autora (2015)

8. Considerações finais

Através da realização deste estudo foi possível analisar a microbiota do couro cabeludo de oito crianças em idade escolar. A padronização desta técnica possibilitará o desenvolvimento de estudos futuros que buscam analisar as bactérias

do couro cabeludo a fim de relacionar tais micro-organismos com a prevalência de pediculose, já que bactérias transformam compostos não voláteis em voláteis e dessa forma podem ser um fator importante no processo de escolha do hospedeiro.

A técnica utilizada para o isolamento da microbiota do couro cabeludo possibilitou a obtenção de colônias puras que puderam ter sua morfologia, bem como seu gênero e, em alguns casos, sua espécie identificados através de coloração de gram e de testes bioquímicos.

O grupo de bacilos gram positivos (BGP) foi corretamente identificado através de microscopia óptica, porém uma das três amostras não pôde ser identificada. Supõe-se que o acréscimo de testes bioquímicos – como teste CAMP, redução de nitrato, teste da pirazinamidase, entre outros – será possível identificar todas as amostras de bacilos gram positivos isolados.

Os grupos de bacilos gram negativos (BGN) e cocos gram positivos (CGP) foram identificados em nível de gênero e alguns em nível de espécie, com exceção de uma amostra de BGN que não apresentou crescimento nos meios para identificação bioquímica, porém acredita-se que com a adaptação para estoque em ágar sangue este caso seja solucionado.

As bactérias identificadas foram compatíveis com as relatadas na literatura, com exceção de *Propionibacterium sp.*, pois por ser um micro-organismo anaeróbio necessita de condições de anaerobiose para crescimento.

REFERÊNCIAS

- ANVISA: AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Manual de Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção em Serviços de Saúde, módulo IV Descrição dos Meios de Cultura Empregados nos Exames Microbiológicos, 2004.
- BACITRACINA: discos. Responsável técnico: Helena A. P. H. de Mello de Souza. Local: Pinhais/PR. Newprov Produtos para Laboratório, 2015. 1 bula de remédio.
- BARBOSA, J. V.; PINTO, Z. T. Pediculose no Brasil. **Entomologia y Vectores**, v. 4, n. 10, p. 579–586, 2003.
- BAVIERA, G.; LEONI, M. C.; CAPRA, L.; CAPRA, L.; CIPRIANI, F.; LONGO, G.; MAIELLO, N.; RICCI, G.; GALLI, E. Microbiota in Healthy Skin and in Atopic Eczema. **BioMed research international**, v. 2014, p. 436921, 2014.
- BORGES, R.; SILVA, J. J.; RODRIGUES, R. M.; MENDES, J. Prevalence and monthly distribution of head lice using two diagnostic procedures in several age groups in Uberlândia, State of Minas Gerais, Southeastern Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, n. 2, p. 247-249, 2007.
- BORGES, R.; MENDES, J. Epidemiological Aspects of Head Lice in Children Attending Day Care Centres, Urban and Rural Schools in Uberlândia, Central Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 2, p. 189-192, 2002.
- BURKHART, C. N.; BURKHART, C. G. Head lice: scientific assessment of the nit sheath with clinical ramifications and therapeutic options. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 53, n. 1, p. 129–33, 2005.
- CATALÁ, S.; CARRIZO, L.; CÓRDOBA, M.; KHARALLAH, R.; MOSCHELLA, F.; BOCCA, J. N.; CALVO, A. N.; TORRES, J.; TUTINO, R. Prevalência e intensidade da infestação por *Pediculus humanus capitis* em escolares de seis a onze anos. Prevalence and parasitism intensity by *Pediculus humanus capitis* in six to eleven-year-old schoolchildren. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 37, n. 6, p. 499–501, 2004.
- CATALÁ, S.; JUNCO, L.; VAPORAKY, R. *Pediculus capitis* infestation according to sex and social factors in Argentina. Infestação por *Pediculus capitis* segundo sexo e fatores sociais na Argentina. **Revista de Saúde Pública**, v. 39, n. 3, p. 438–443, 2005.
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Pediculosis. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/dpdx/pediculosis/>>. Acesso em: 07/12/2014.
- COSTA JUNIOR, C. R. DA; SILVA, L. D. DE A.; OLIVEIRA, A. V. DE; SOUZA, C. A. DE; COUTINHO, A.E.; COSTA, A. L.; LIRA JUNIOR, M. A. Isolamento e caracterização morfológica de bactérias em nódulos de leguminosas forrageiras. In:

SEMANA NACIONAL DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA, VI.,2009, Recife; JORNADA DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO - JEPEX, IX., 2009. Recife.

DAVIS, T. S.; CRIPPEN, T. L.; HOFSTETTER, R. W.; TOMBERLIN, J. K. Microbial volatile emissions as insect semiochemicals. **Journal of chemical ecology**, v. 39, n. 7, p. 840–59, 2013.

DOROODGAR, A.; SADR, F.; DOROODGAR, M.; DOROODGAR, M.; SAYYAH, M. Examining the prevalence rate of *Pediculus capitis* infestation according to sex and social factors in primary school children. **Asian pacific journal of tropical disease**, v. 4, n. 1, p. 25-29, 2014.

FELDMEIER, H. Pediculosis capitis: new insights into epidemiology, diagnosis and treatment. **European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology**, v. 31, n. 9, p. 2105–10, 2012.

FIERER, N.; LAUBER, C. L.; ZHOU, N.; McDONALD, D.; COSTELLO, E. K.; KNIGHT, R. Forensic identification using skin bacterial communities. **Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America**, v. 107, n. 14, p. 6477- 81, 2010.

FLORES, G. E.; HENLEY, J. B.; FIERER, N. A Direct PCR Approach to Accelerate Analyses of Human Associated Microbial Communities. **PloS one**, v. 7, n. 9, 2012.

GELATTI, L. C.; BECKER, A. P.; BONAMIGO, R. R.; D'AZEVEDO, P.A. *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina: disseminação emergente na comunidade. **Anais Brasileiros de Dermatologia**. v. 84, n. 5, p. 501-6, 2009.

GREIVE, K. A.; BARNES, T. M. In vitro comparison of four treatments which discourage infestation by head lice. **Parasitology research**. v. 110. p. 1695-99, 2012.

GRICE, E. A.; SEGRE, J. A. The skin microbiome. **Nature reviews. Microbiology**, v. 9, n. 4, p. 244–53, 2011.

GRICE, E. A.; KONG, H. H.; CONLAN, S.; DEMING, C. B.; DAVIS, J.; YOUNG, A. C.; BOUFFARD, G. G.; BLAKESLEY, R. W.; MURRAY, P. R.; GREEN, E. G.; TURNER, M. L.; SEGRE, J. Topographical and Temporal Diversity of the Human Skin Microbiome. **Science**, v. 29, n. 324, 2009.

GRICE, E. A.; KONG, H. H.; RENAUD, G.; YOUNG, A. C.; BOUFFARD, G. G.; BLAKESLEY, R. W.; WOLFSBERG, T. G.; TURNER, M. L.; SEGRE, J. A. A diversity profile of the human skin microbiota. **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, v. 18. p. 1043-50, 2008.

HANNIGAN, G. D.; GRICE, E. A. Microbial ecology of the skin in the era of metagenomics and molecular microbiology. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, v. 3, n. 12, p. a015362, 2013.

HEUKELBACH, J.; VAN HAEFF, E.; RUMP, B.; WILCKE, T.; MOURA, R. C. S.; FELDMIEIER, H. Parasitic skin diseases: health care-seeking in a slum in north-east Brazil. **Tropical Medicine and International Health**, v. 8, n. 4, p. 368-373, 2003.

KO, C. J.; ELSTON, D. M. Pediculosis. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 50, n. 1, p. 1–12, 2004.

KONG, H. H.; OH, J.; DEMING, C.; CONLAN, S.; GRICE, E. A.; BEATSON, M. A.; NOMICOS, E.; POLLEY, E. C.; KOMAROW, H. D.; MURRAY, P. R.; TURNER, M. L.; SEGRE, J. A. Temporal shifts in the skin microbiome associated with disease flares and treatment in children with atopic dermatitis. **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, v. 22, p. 850-59, 2012.

LEUNG, A. K. C.; FONG, J. H. S.; PINTO-ROJAS, A. Pediculosis capitis. **Journal of pediatric health care : official publication of National Association of Pediatric Nurse Associates & Practitioners**, v. 19, n. 6, p. 369–73, 2005.

MARTINS, L. P.; FIORENTIN, G. L. PRIMEIRA À QUARTA SÉRIE NA ESCOLA MUNICIPAL DE ENSINO FUNDAMENTAL TANCREDO NEVES , SÃO LEOPOLDO / RS . **IX Salão de Iniciação Científica - PUCRS**, 2008.

NASH, B. Treating head lice. **BMJ**, v. 326, p. 1256-58, 2003.

NOVOBIOCINA: discos. Responsável técnico: Helena A. P. H. de Mello de Souza. Local: Pinhais/PR. Newprov Produtos para Laboratório, 2015. 1 bula de remédio.

NUNES, S. C. B.; MORONI, R. B.; MENDES, J.; JUSTINIANO, S. C. B.; MORONI, F. T. Biologia e epidemiologia da pediculose de cabeça. **Scientia Amazonia**, v. 3, n. 2, p. 85 - 92, 2014.

NUTANSON, I.; STEEN, C. J.; SCHWARTZ, R. A.; JANNIGER, C. K. *Pediculus humanus capitis* : an update. **Acta Dermatovenerologica APA**, v. 17, n. 4, 2008.

OH, J.; CONLAN, S.; POLLEY, E. C.; SEGRE, J. A.; KONG, H. H. Shifts in human skin and nares microbiota of healthy children and adults. **Genome medicine**, v. 4, n. 10, 2012.

OPTOQUINA 5: discos. Responsável técnico: Helena A. P. H. de Mello de Souza. Local: Pinhais/PR. Newprov Produtos para Laboratório, 2015. 1 bula de remédio.

PAULA, A. P. DE. **Infestação por pediculus humanus em escolas do município de Machado/MG, Brasil**. 32 f. Monografia (Graduação em Ciências Biológicas) - instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sul de Minas Gerais – Câmpus Machado, 2013.

RÍOS, S. M.; FERNÁNDEZ, J. A.; RIVAS, F.; SÁENZ, M. L. Prevalencia y factores asociados a la pediculosis en niños de un jardín infantil de Bogotá. , p. 245–251, 2008.

RODRIGUES, M. A. V.; REIS, C.; SANTOS, R. A. *Staphylococcus saprophyticus* em infecções do trato urinário masculino e feminino. **Revista de patologia tropical**, v. 22, n. 2, p. 245-52, 1993.

ROTH, R. R.; JAMES, W. D. Microbial ecology of the skin. **Annual Review of Microbiology**, v. 42, p. 441-64, 1988.

SANTOS, A. L.; SANTOS, D. O.; FREITAS, C. C.; FERREIRA, B. L. A.; AFONSO, I. F.; RODRIGUES, C. R.; CASTRO, H. C. *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 43, n. 6, p. 413-23, 2007.

SIM, S.; LEE, W.; YU, J.; LEE, I. Y.; LEE, S. H.; OH, S.; SEO, M.; CHAI, J. Risk Factors Associated with Head Louse Infestation in Korea. **The Korean Journal of Parasitology**, v. 49, n. 1, p. 95-98, 2011.

SMITH, C. H.; GOLDMAN, R. D. Child Health Update An incurable itch. **Child Health Update**, v. 58, p. 839–841, 2012.

TAPPEH, K. H.; CHAVSHIN, A.; HAJIPIRLOO, H. M.; KHASHAVEH, S.; HANIFIAN, H.; BOZORGOMID, A.; MOHAMMADI, M.; GHARABAG, D. J.; AZIZI, H. Pediculosis capitis among Primary School Children and Related Risk Factors in Urmia, the Main City of West Azarbaijan, Iran. **Journal of arthropod-borne diseases**, v. 6, n. 1, p. 79–85, 2012.

TEBRUEGGE, M.; PANTAZIDOU, A.; CURTIS, N. What's bugging you? An update on the treatment of head lice infestation. **Archives of disease in childhood. Education and practice edition**, v. 96, n. 1, p. 2–8, 2011.

VAHABI, A.; SHEMSHAD, K.; SAYYADI, M.; BIGLARIAN, A.; VAHABI, B.; SAYYAD, S.; SHEMSHAD, M.; RAFINEJAD, J. Prevalence and risk factors of *Pediculus (humanus) capitis* (Anoplura: Pediculidae), in primary schools in Sanandaj City, Kurdistan Province, Iran. **Tropical biomedicine**, v. 29, n. 2, p. 207–11, 2012.

VERHULST, N. O.; QIU, Y. T.; BEIJLEVELD, H.; MALIEPAARD, C.; KNIGHTS, D.; SCHULZ, S.; BERG-LYONS, D.; LAUBER, C. L.; VERDUIJN, W.; HAASNOOT, G. W.; MUMM, R.; BOUWMEESTER, H. J.; CLAAS, F. H. J.; DICKE, M.; VAN LOON, J. J. A.; TAKKEN, W.; KNIGHT, R.; SMALLEGAGE, R. C. Composition of human skin microbiota affects attractiveness to malaria mosquitoes. **PloS one**, v. 6, n. 12, p. e28991, 2011.

Anexos

Anexo 1. Procedimento para realização de esfregaço em lâmina

- Identificação de lâminas limpas com código do isolado, data e nome;
- Adição de uma gota de água destilada na lâmina identificada;

- Com uma alça bacteriológica flambada, foi coletada uma pequena quantidade da colônia a ser analisada;
- Homogeneizado a colônia com a água destilada, cuidando para que o esfregaço não ficasse muito carregado, ou seja, muito esbranquiçado;
- Fixado o esfregaço por calor, passando a lâmina logo acima do fogo, por 4 ou 5 vezes ou até que todo o esfregaço ficasse seco, dando intervalos de alguns segundos entre uma passagem e outra para que a lâmina não esquentasse demais para não ocorrer alteração da morfologia celular.

Anexo 2. Procedimento para coloração de Gram

- Cobrir o esfregaço com Violeta de Genciana por 1 minuto;
- Retirar o excesso e cobrir com Lugol por 1 minuto;
- Retirar o excesso e lavar com água destilada;
- Adicionar álcool-acetona ou etanol 99% até que todo o excesso de Violeta de Genciana seja eliminado;
- Lavar com água destilada;
- Cobrir o esfregaço com Fucsina por 30 segundos;
- Retirar o excesso e lavar com água destilada;
- Secar a parte posterior da lâmina, retirando as manchas de corante que dificultam a visualização ao microscópio;
- Deixar as lâminas secando a temperatura ambiente;
- Após as lâminas estarem secas, observar em microscópio na objetiva de 100x, utilizando óleo de imersão.

Composição dos meios de transporte

Anexo 3. Stuart COPAN:

Cloreto de cálcio	0,1 g/L
Glicerolfosfato de cálcio	10,0 g/L
Ácido tioglicólico	1,0 ml/L
Água destilada	q.s.p.
pH 7,4 ± 0,2	

Anexo 4. Sabouraud líquido:

Dextrose (Glicose Anidra)	40,0 g/L
Peptona	10,0 g/L
Água destilada	q.s.p.
pH 5,6 ± 0,1	

Composição dos meios de cultura

Anexo 5. Ágar Sangue

Peptona de caseína	10,0 g/L
Peptona de carne	5,0 g/L
Extrato de levedura	5,0 g/L
Infuso de carne	3,0 g/L
Amido de milho	1,0 g/L
Cloreto de sódio	5,0 g/L
Ágar	13,5 g/L
Sangue de carneiro	5 %
Água destilada	q.s.p.
pH final 7, 3 ± 0,2	

Anexo 6. Ágar Chocolate

Peptona de caseína	7,5 g/L
Peptona de carne	7,5 g/L

Amido de milho	1,0 g/L
Fosfato dipotássico	4,0 g/L
Fosfato monopotássico	1,0 g/L
Cloreto de sódio	5,0 g/L
Ágar	10,0 g/L
Sangue de carneiro	5%
Polienriquecimento	10ml/L
Água destilada	q.s.p.
pH final 7,2 ± 0,2	

Anexo 7. Ágar Simples

Extrato de carne	4 g/L
Cloreto de sódio	4 g/L
Peptona	10 g/L
Ágar	15 g/L
Água destilada	q.s.p.

Anexo 8. Ágar Motilidade:

Triptose	10 g
Cloreto de sódio	5,0 g

Ágar 5,0 g
 pH 7,2 ± 0,2

Anexo 9. Caldo *Brain Heart Infusion* (BHI):

Infusão de cérebro de carneiro 12,5 g
 Infusão de coração de boi 5,0 g
 Proteose-peptona 10,0 g
 D (+) glicose 2,0 g
 Cloreto de sódio 5,0 g
 Fosfato dissódico 2,5 g
 pH 6,6 ± 0,2

Anexo 10. Ágar MacConkey

Digestão péptica de tecido animal 1,5 g/L
 Caseína enzimática hidrolisada 1,5 g/L
 Digestão pancreática de gelatina 17,0 g/L
 Lactose 10 g/L
 Sais biliares 1,5 g/L
 Cloreto de sódio 5,0 g/L
 Cristal de violeta 0,001 g/L
 Vermelho neutro 0,03 g/L
 Ágar 15,0 g/L
 Água destilada q.s.p.
 pH 7,1 ± 0,2

Anexo 11. Ágar Cetrimide

Peptona pancreática de gelatina	20,0 g/L
Cetrimida	0,3 g/L
Cloreto de magnésio	1,4 g/L
Sulfato de potássio	10,0 g/L
Ágar Bacteriológico	15,0 g/L
pH 7,2 ± 0,2	

Anexo 12. EPM Modificado

Ágar bacteriológico	11,0 g/L
Triptona	10,0 g/L
Extrato de carne	2,0 g/L
Cloreto de sódio	5,0 g/L
Fosfato dissódico	2,0 g/L
L-triptofano	1,0 g/L
Citrato férrico amoniacal	0,35 g/L
Tiosulfato de sódio	0,35 g/L
Sacarose	14,0 g/L
Glicose	1,925 g/L
Azul de bromotimol	0,03 g/L

Água deionizada q.s.p.

Anexo 13. Caldo Lisina

Peptona de gelatina 5,0 g/L

Extrato de levedura 3,0 g/L

Dextrose 1,0 g/L

Cloridrato de L-lisina 5,0 g/L

Púrpura de bromocresol 0,02 g/L

Água deionizada q.s.p.

Anexo 14. Meio de MIO

Extrato de levedura 3,0 g/L

Peptona bacteriológica 10,0 g/L

Triptona 10,0 g/L

Ornitina 5,0 g/L

Dextrose 1,0 g/L

Púrpura de bromocresol 0,02 g/L

Ágar bacteriológico 2,4 g/L

Água deionizada q.s.p.

Anexo 15. Meio de Citrato de Simmons

Sulfato de magnésio 0,02 g/L

Fosfato de amônio dihidrogenado	1,0 g/L
Fosfato dipotássico	1,0 g/L
Citrato de sódio	2,0 g/L
Cloreto de sódio	5,0 g/L
Azul de bromotimol	0,08 g/L
Ágar bacteriológico	15,0 g/L
Água deionizada	q.s.p.

Anexo 16. Caldo de Rhamnose

Extrato de carne	1,0 g/L
Triptona	10,0 g/L
Cloreto de sódio	5,0 g/L
Rhamnose	5,0 g/L
Azul de bromotimol	0,03 g/L
Água deionizada	q.s.p.

Anexo 17. Composição do Indicador Púrpura de Bromocresol 1,6%

Púrpura de Bromocresol	1,6 g
Álcool 95%	100 ml

Anexo 18. Composição da Solução de Carboidratos 10%:

Arabinose 10%:

Arabinose 10,0 g
 Água destilada 100 ml

Sorbitol 10%:

Sorbitol 10,0 g
 Água destilada 100 ml

Manitol 10%:

Manitol 10,0 g
 Água destilada 100 ml

Anexo 19. Ágar DNase

Triptose 20,0 g/L
 Ácido Desóxirribonucléico (DNA) 2,0 g/L
 Cloreto de sódio 5,0 g/L
 Azul de toluidina 0,1 g/L
 Ágar 15,0 g/L
 Água destilada q.s.p.
 pH 7,3 ± 0,2

Anexo 20. Ágar Mueller-Hinton

Infusão de carne bovina 300 g/L
 Caseína enzimática hidrolisada 17,5 g/L

Amido	1,5 g/L
Ágar	17,0 g/L
Água destilada	q.s.p.

pH 7,3 ± 0,2

Anexo 21. Meio de Tolerância ao NaCl 6,5%

Caldo BHI	25,0 g/L
Cloreto de sódio	60,0 g/L
Indicador púrpura de bromocresol	1,0 ml/L
Glicose anidra	1,0 g/L
Água destilada	q.s.p.

Anexo 22. Ágar Bile Esculina

Digestão péptica de tecido animal	5,0 g/L
Bile de boi	40,0 g/L
Citrato férrico	0,5 g/L
Extrato de carne	3,0 g/L
Esculina	1,0 g/L
Ágar	15,0 g/L

Anexo 23. Questionário sobre suscetibilidade



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
Departamento de Patologia Básica



O projeto intitulado “Diferentes aspectos de susceptibilidade à pediculose no Brasil” tem por objetivo investigar porquê algumas crianças são mais infestadas por piolhos que outras, para tanto, pretende-se estudar se a microbiota do couro cabeludo (fungos e/ ou bactérias) pode influenciar na predisposição à pediculose. Para que esta pesquisa seja realizada é necessária a seleção de crianças para a coleta de material (fricção de um swab no couro cabeludo) para participarem do *projeto piloto*. Estamos convidando as crianças de sua família para participarem desta fase do projeto e a seleção será baseada em características que atendam às questões abaixo relacionadas.

1. Nome do entrevistado (a): _____
2. Nome da criança: _____
3. Escola que estuda: _____
4. Idade da criança: _____
5. A criança tem alguma doença dermatológica crônica? () Sim () Não
6. Tomou antibiótico e/ou antifúngico nos últimos seis meses? () Sim () Não
7. A criança:
 - () Nunca teve piolhos no decorrer da sua vida.
 - () Teve piolhos até duas vezes no decorrer da sua vida.
 - () Teve piolhos mais de duas vezes no decorrer da sua vida.
8. A criança tem cabelo oleoso? () Sim () Não
9. O couro cabeludo apresenta umidade “suor” excessivo? () Sim () Não
10. Convive com pessoas infestadas por piolhos e não é parasitada? () Sim () Não
11. Caso a criança seja selecionada para participar do projeto piloto seria possível, no período de 24 horas que antecederão a coleta (que será dia 09 de março – Segunda-feira próxima):
 - Não lavar o cabelo e/ou utilizar creme de pentear () Sim () Não
 - Não utilizar produtos como perfumes, loções, cremes corporais ou sabonetes antibacterianos próximos da região occipital e retroauricular da cabeça () Sim () Não
 - Não ingerir alimentos como cebola, alho ou pimenta () Sim () Não

Obs. Caso a criança seja selecionada entraremos em contato e por isso solicitamos seu e-mail e ou telefone:

E-mail: _____ Telefone: _____

Obrigada,

Dra. Débora do Rocio Klisiowicz

Universidade Federal do Paraná
Setor de Ciências Biológicas
Departamento de Patologia Básica
C.P. 19031, 81.531-980, Curitiba, PR, Brasil
Tel: +55 41 33611704 Fax +55 41 3266.2042
e-mail: deborak@ufpr.br

Centro Politécnico – Caixa Postal 19031 – CEP: 81531-990 – Curitiba/PR
Telefones: (41) 3361-1697/1700 – Fax (41) 3266-2042 – dpat@ufpr.br