



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA

---

CINTHIA REGIANE KOTAKA

**AVALIAÇÃO DO NÍVEL DE CONTAMINAÇÃO  
MICROBIANA  
E PREVALÊNCIA DE BACILOS GRAM-NEGATIVOS  
NÃO FERMENTADORES DA ÁGUA DE  
EQUIPOS ODONTOLÓGICOS**

---

Londrina  
2004

CINTHIA REGIANE KOTAKA

**AVALIAÇÃO DO NÍVEL DE CONTAMINAÇÃO  
MICROBIANA  
E PREVALÊNCIA DE BACIOS GRAM-NEGATIVOS  
NÃO FERMENTADORES DA ÁGUA DE  
EQUIPOS ODONTOLÓGICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito final para obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Jacinta Sanchez Pelayo

Londrina  
2004

CINTHIA REGIANE KOTAKA

**AVALIAÇÃO DO NÍVEL DE CONTAMINAÇÃO  
MICROBIANA  
E PREVALÊNCIA DE BACILOS GRAM-NEGATIVOS  
NÃO FERMENTADORES DA ÁGUA DE  
EQUIPOS ODONTOLÓGICOS**

**COMISSÃO EXAMINADORA**

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lourdes Botelho Garcia  
Universidade Estadual de Maringá

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Halha Ostrensky Saridakis  
Universidade Estadual de Londrina

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Jacinta Sanchez Pelayo  
Universidade Estadual de Londrina

Londrina, 22 de março de 2004.

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Bacteriologia do Departamento de Microbiologia, do Centro de Ciências Biológicas, da Universidade Estadual de Londrina e no Laboratório de Microbiologia Básica do Departamento de Análises Clínicas da Universidade Estadual de Maringá, sob orientação da Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Jacinta Sanchez Pelayo e contou com apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior e da Coordenadoria de Pesquisa e Pós-graduação da Universidade Estadual de Londrina.

## **DEDICATÓRIA**

*Pelo que representam em minha vida,  
dedico este trabalho aos meus grandes  
amores Bianca e Nobuo;*

*Aos meus queridos pais, Tol e Kiyoko;*

*E aos meus irmãos Telma e Fábio.*

## AGRADECIMENTOS

*Gostaria de expressar minha gratidão a todas as pessoas e Instituições que contribuíram para a realização deste trabalho:*

*À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Jacinta Sanchez Pelayo pela orientação deste trabalho. Obrigada por ser uma pessoa tão especial e por possuir a maravilhosa arte de ensinar. Obrigada pela amizade, compreensão, confiança, carinho e paciência. Deus me deu o grande presente da minha vida e você contribuiu muito para que eu o conseguisse. Minha eterna gratidão.*

*À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lourdes Botelho Garcia pelas sugestões na realização deste trabalho. Obrigada pelos ensinamentos, pela amizade, carinho, apoio e por me receber em seu laboratório. Minha grande gratidão pela confiança, ajuda e disposição sempre que precisei.*

*À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Halha Ostrensky Saridakis, obrigada pelo estímulo, sugestões e amizade. Obrigada pelo laboratório, pelos incentivos e por todo apoio que recebi. Obrigada pelas palavras sempre amigas e pela contribuição prestada nesse trabalho.*

*Ao Prof. Dr. Celso Luiz Cardoso, meu eterno mestre. Obrigada pelo constante apoio, amizade, carinho, incentivo e dedicação. Por todos os ensinamentos que contribuíram para minha formação profissional, meu muito obrigada!*

*Aos Professores do Curso de Mestrado em Microbiologia, pelos ensinamentos e apoio durante toda a realização do Curso.*

*Aos colegas do Mestrado e em especial à Eliana Carolina Véspero, Glaciela Kaschuk e Fernando Lucas de Melo. Obrigada pela amizade, companheirismo e maravilhosos momentos de alegria. Obrigada a todos vocês por tornarem nossa turma tão especial.*

*Aos meus colegas de laboratório Sérgio Paulo Dejato da Rocha e Kathelin M. S. Lascowski pela ajuda no preparo do material.*

*Aos funcionários do Laboratório de Bacteriologia da Universidade Estadual de Londrina e do Laboratório de Microbiologia da Universidade Estadual de Maringá.*

*Ao Prof. Édio Vizoni, pelo auxílio na Estatística.*

*À minha pequena Bianca, que mesmo sem entender a ausência da sua mãe, foi paciente e compreensiva. Desculpe-me minha filha, pelos muitos momentos em que do computador, apenas te observava a brincar e a pedir colo.*

*Ao meu amado esposo Nobuo, obrigada pela compreensão devido aos momentos de ausência e por todo o incentivo.*

*Aos meus familiares, cuja ajuda e apoio foram imprescindíveis para que conseguisse realizar todo esse trabalho.*

*Aos meus amigos de Maringá que sempre me apoiaram e torceram por mim.*

*A todos vocês, minha eterna gratidão. Essa conquista também é de vocês!*

*“Lisonjei-me, e poderei não acreditar em você.*

*Critique-me, e poderei não gostar de você.*

*Ignore-me, e poderei não perdoá-lo.*

*Encoraje-me e não esquecerei.”*

*William Arthur Ward.*

KOTAKA, Cinthia Regiane. **Avaliação do nível de contaminação microbiana e prevalência de bacilos Gram-negativos não fermentadores da água de equipamentos odontológicos.** 2004. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina.

## RESUMO

**Objetivo:** Avaliação microbiológica da água utilizada em equipamentos odontológicos, identificação de bacilos Gram-negativos não fermentadores (BGNNF) e sua capacidade de aderir ao poliestireno e atividade antimicrobiana de desinfetantes nas amostras identificadas.

**Métodos e Resultados:** Contagens de bactérias heterotróficas e identificação de BGNNF foram realizadas em amostras de água coletadas de 25 equipamentos odontológicos (seringa-tríplice e reservatório). Das amostras coletadas da seringa-tríplice 88% estavam fora dos padrões de potabilidade e das coletadas do reservatório 68%. Em 88% dos equipamentos odontológicos o número de bactérias isoladas do reservatório foi menor que as da seringa-tríplice. Vários gêneros de BGNNF foram isolados sendo o *Methylobacterium* spp. encontrado em maior porcentagem (19,7%). Os BGNNF foram avaliados quanto à capacidade de aderir ao poliestireno e quanto à atividade antimicrobiana aos seguintes desinfetantes: hipoclorito de sódio (0,06%, 0,12%, 0,25%, 0,5%) e clorhexidina (0,03%, 0,06%, 0,12%). Das amostras, 85,04% apresentaram fraca aderência ao poliestireno. O hipoclorito de sódio a 0,25% inativou 100% dos BGNNF em 10 minutos, enquanto que a clorhexidina testada na concentração mais alta (0,12%) inativou 98,5% .

**Conclusão:** Estes resultados indicam a necessidade de tratamento da água utilizada nos equipamentos odontológicos.

**Importância e impacto do estudo:** Este estudo fornece informações do problema de contaminação das mangueiras de água dos equipamentos odontológicos (MAEOs). A descontaminação das MAEO pode ser realizada com hipoclorito de sódio a 0,25% (metade da concentração preconizada na literatura). Entretanto mais estudos quanto a periodicidade da descontaminação das MAEO são necessárias.

KOTAKA, Cinthia Regiane. **Evaluation of the level of microbial contamination and prevalence of Gram-negative nonfermentative rods in dental unit waterlines.** Dissertation (Master of Microbiology) – State of University of Londrina.

## ABSTRACT

**Aims:** Microbiological evaluation of the water used in dental units, identification of Gram-negative nonfermentative rods (GNNR) and their ability to adhere to polystyrene and antimicrobial activity of disinfectants on the identified strains.

**Methods and Results:** The heterotrophic bacteria count and GNNR identification were performed on water samples collected from 25 dental units (air/water syringe and reservoir). Of the collected samples from air/water syringe, 88% were out of the potability standards, as were 68% of the samples from reservoirs. In 88% of the dental units, the number of isolated bacteria from the reservoir was lower than from the air/water syringe. Several GNNR genus were isolated, being *Methylobacterium* spp. found in highest percentage (19.7%). The GNNR were assessed for their capability to adhere to polystyrene and for the antimicrobial activity to the following disinfectants: sodium hypochlorite (0.06%, 0.12%, 0.25%, 0.5%) and chlorhexidine (0.03%, 0.06%, 0.12%). 85.04% of the samples showed weak adherence to polystyrene. Sodium hypochlorite at 0.25% inactivated 100% of GNNRs in 10 minutes, while the highest tested concentration chlorhexidine (0.12%) inactivated 98.5%.

**Conclusions:** These results indicate a need for treatment of the water used in dental units.

**Significance and Impact of the Study:** This study provides information on the problem of dental unit waterlines (DUWL) contamination. The decontamination of DUWL can be performed with sodium hypochlorite at 0.25% (half the concentration preconized in the literature). However, further studies regarding DUWL decontamination frequency are necessary.

## SUMÁRIO

|   |    |
|---|----|
| <b>1 INTRODUÇÃO</b> .....   | 10 |
| <b>2 OBJETIVOS</b> .....  | 24 |
| <b>3 REFERÊNCIAS</b> .....  | 25 |
| <b>4 ARTIGO:</b> EVALUATION OF THE LEVEL OF MICROBIAL CONTAMINATION AND PREVALENCE<br>OF GRAM-NEGATIVE NONFERMENTATIVE RODS IN DENTAL UNIT WATERLINES ..... | 29 |
| SUMMARY .....   | 30 |
| INTRODUCTION .....  | 31 |
| MATERIALS AND METHODS. ....   | 33 |
| RESULTS.....  | 36 |
| DISCUSSION. ....  | 42 |
| REFERENCES .....  | 46 |
| <b>5 CONCLUSÃO</b> .....  | 49 |

## 1 INTRODUÇÃO

O controle da infecção cruzada no consultório odontológico tem merecido grande atenção dos profissionais da área e apesar dos esforços para manter a cadeia asséptica utilizando instrumentos esterilizados, equipamentos de proteção individual e protocolos de desinfecção, outras medidas preventivas são necessárias para impedir a propagação de doenças. Um dos pontos críticos é o controle bacteriológico da água utilizada no equipo odontológico (LEE et al., 2001; MILLS, 2000; PANKHURST & PHILPOTT-HOWARD, 1993; TIPPETT et al., 1988). Apesar do relato na literatura da utilização de vários métodos para reduzir ou eliminar essa contaminação bacteriana (PUTTAIAH et al., 1998; MURDOCH-KINCH et al., 1997; FIEHN & HENRIKSEN, 1988; MILLS et al., 1986; KELSTRUP et al., 1977), a água utilizada durante o tratamento odontológico continua muito abaixo dos padrões de potabilidade (MEILLER et al., 2000; WALKER et al., 2000; XAVIER et al., 2000; MAYO et al., 1990).

O Ministério da Saúde (Portaria nº 1469, 29 de dezembro de 2000) menciona que para a água ser considerada segura para o consumo humano, poderá conter no máximo 500 unidades formadoras de colônia por mililitros (UFC/mL) desde que livre de coliformes. Esse padrão também é adotado para a água utilizada nos equipos odontológicos no Brasil (BIANCHI et al., 1998; FANTINATO et al., 1992). Nos Estados Unidos, o *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) e a *American Dental Association* (ADA) recomendam que a água utilizada para procedimentos não-invasivos não exceda 200 UFC/mL, e para procedimentos cirúrgicos com exposição óssea, que a água seja estéril (MILLS, 2000; ANONYMOUS, 1999).

Vários pesquisadores encontraram números elevados de bactérias heterotróficas no sistema de água nas unidades dentais (SOUZA-GUGELMIN et al., 2003; XAVIER et al., 2000; WALKER et al., 2000; WILLIAMS et al., 1993; FANTINATO et al., 1992; GROSS et al., 1976), que pode ocorrer devido à sucção dos microrganismos da microbiota da boca do paciente, ou ser decorrente da multiplicação dos microrganismos contidos na água de abastecimento. Apesar da possibilidade de ocorrer a aspiração dos microrganismos durante o tratamento odontológico, válvulas anti-retração instaladas nas peças de mão (canetas de alta e baixa rotação) dificultam que bactérias da cavidade oral contaminem as unidades dentais (WHITEHOUSE et al., 1991). Além disso, os trabalhos mostram que a maioria dos microrganismos que contaminam a mangueira de água dos equipos odontológicos (MAEO) são geralmente bacilos Gram-negativos isolados de água. Muitos desses microrganismos pertencem à classe dos bacilos Gram-negativos não fermentadores que compreendem um grupo de bactérias oportunistas, que podem causar várias doenças, principalmente em indivíduos imunocomprometidos (BARBEAU et al., 1996; WILLIAMS et al., 1994a; WILLIAMS et al., 1993; MARTIN, 1987).

Os equipos odontológicos são equipados por uma rede de tubos plásticos semi-rígidos de pequeno diâmetro (2 a 3 mm) que fornecem a água para a seringa tríplice e para as peças de mão. A água utilizada pode ser proveniente de reservatórios acoplados no equipo ou sobre o piso; ou vir diretamente da rede municipal de abastecimento. Muitas vezes, pode estar contaminada com microrganismos como *Pseudomonas* spp., *Acinetobacter* spp. e *Methylobacterium* spp.; dentre outros, facilitando a formação de biofilme nas mangueiras dos

equipos (DONLAN, 2001; MAYO et al., 1990) e fazendo dos biofilmes a principal fonte de contaminação das MAEOs (WILLIAMS et al., 1995; WILLIAMS et al., 1994a; WHITEHOUSE et al., 1991). Os materiais usados para a confecção das mangueiras utilizadas nos equipos (poliuretano, polivinil, silicone) se constituem em excelentes superfícies para a adesão dos microrganismos presentes na água (LEE et al., 2001; MILLS, 2000).

A primeira menção de biofilme na literatura foi feita por Van Leeuwenhoek em 1683, quando raspou de seus dentes uma placa bacteriana (biofilme) e observou os “animalículos” que formavam aquela comunidade microbiana. Entretanto, a teoria geral de biofilme só foi divulgada por Costerton et al. em 1978 (COSTERTON et al., 1978). Esta teoria descreve que a maioria das bactérias crescem em um biofilme envolvido em uma matriz aderente às superfícies de todos os ecossistemas aquáticos. Nestes sistemas, as bactérias sésseis (aderidas) diferem profundamente das suas parceiras, bactérias planctônicas (flutuantes). Atualmente, o biofilme é definido como uma comunidade de células sésseis que estão irreversivelmente aderidas a uma superfície biótica (tecidos ou células) ou abiótica (materiais inertes), produzem e estão envolvidas em uma matriz de substância polimérica extracelular (glicocálice) e apresentam uma alteração na taxa de crescimento e transcrição gênica (DONLAN & COSTERTON, 2002).

Processos físicos, químicos e biológicos resultam na formação do biofilme: inicialmente há adsorção de moléculas orgânicas e proteínas do meio aquático na superfície do material formando uma película chamada de camada condicionante. Após a formação dessa película condicionada, as bactérias planctônicas presentes no fluido aderem, de início, reversivelmente a essa

superfície e posteriormente a adesão se torna irreversível. Essa adesão ocorre através de diferentes mecanismos como: forças físicas, interações eletrostáticas, hidrofóbicas, hidrofílicas ou simplesmente pela força gravitacional (DONLAN & COSTERTON, 2002; COSTERTON et al., 1987).

As bactérias adsorvidas irreversivelmente se multiplicam e produzem substâncias poliméricas extracelulares formando as microcolônias. O processo de multiplicação das microcolônias continua e o biofilme torna-se maduro com a formação de estruturas denominadas de “cogumelos” e de canais de água formados pelo próprio fluxo de água. No biofilme maduro, inicia-se a dispersão de parte das células para a colonização de novas superfícies. Com a dispersão, as células perdem as características de células sésseis e voltam a apresentar as mesmas características de formas planctônicas (presença de flagelo, pili, fimbria). Todos esses processos que ocorrem para a formação e dispersão do biofilme (adesão, apoptose, dispersão) são regulados por “sinais” que fazem a comunicação célula-célula (*quorum sensing*). Estudos em bactérias Gram-negativas mostram que, quando o *quorum sensing* é ativado há produção de homoserinas lactonas, induzindo genes a produzir outros sinais como expressão de fimbria, produção de polímeros extracelular e alterações na arquitetura do biofilme (DAVEY & O'TOOLE, 2000; PRATT & KOLTER, 1999).

As bactérias pertencentes ao biofilme estão mais protegidas da ação dos antimicrobianos (antibióticos, antisépticos, desinfetantes), dos bacteriófagos, das amebas fagocíticas, dos anticorpos presentes no meio e da dessecação. A resistência aos agentes antimicrobianos pode ser devida à estrutura e fisiologia dos biofilmes. A lenta penetração do agente antimicrobiano através da matriz de polissacarídeo extracelular, a menor taxa de crescimento e

outras alterações fisiológicas no crescimento do biofilme em relação ao ambiente são causas da maior resistência das células do biofilme se comparado com as células planctônicas (DONLAN & COSTERTON, 2002). Por estarem aderidas a uma superfície são mais dificilmente carregadas pelo fluxo (DONLAN, 2001; MAYO et al., 1990).

O estudo da dinâmica de formação do biofilme foi realizado por Tall et al. (1995). Dois equipos com tubulações novas foram utilizados no estudo. Após 30 dias de uso as tubulações apresentaram microcolônias e com 60 dias já havia a formação do biofilme. As bactérias presentes na tubulação e na água da tubulação foram estudadas e 21 espécies foram identificadas. Houve a predominância de *Pseudomonas* spp. e a presença de outros microrganismos como *Flavobacterium* spp., *Moraxella* spp., *Achromobacter* spp., *Acinetobacter* spp., *Aeromonas* spp. e *Ochrobactrum* spp.

Devido a grande variedade e ao difícil cultivo das bactérias presentes na água e nas tubulações dos equipos odontológicos há uma grande variedade de métodos descritos na literatura, sendo que o meio de cultura e a temperatura são fatores que podem influenciar o número e o tipo de microrganismos recuperados (WILLIAMS et al., 1994b). Walker et al. (2000) utilizaram vários meios de cultura (ágar sangue, ágar R2A, ágar MacConkey, CFC suplementado com SR103, dentre outros) e diferentes condições de incubação na tentativa de recuperar uma maior diversidade de microrganismos.

Williams et al. (1994b) compararam 3 meios de cultura: ágar peptona diluída, *tryptic soy agar* (TSA) e ágar sangue de carneiro; e diferentes temperaturas de incubação: 25°C e 37°C. O meio ágar peptona diluída apresentou contagens maiores estatisticamente significativas que os demais,

porém com desvantagem do longo período de incubação. A temperatura de 25°C garantiu melhor recuperação de bactérias, visto que sendo elas pertencentes ao meio ambiente, ao contrário aos isolados em humanos, estão melhor adaptadas a crescer nessas temperaturas.

Segundo Pederson et al. (2002) e Mills (2000) os métodos propostos para reduzir a contaminação das MAEO incluem: uso de reservatórios independentes ao da rede pública; tratamento com agentes químicos; uso de filtros; sistemas de água estéril; válvulas anti-retração.

Os reservatórios de água independentes ao da rede pública devem ser monitorados quanto à qualidade da água utilizada e podem ser tratados com desinfetantes continuamente ou periodicamente, ou utilizando filtros (PEDERSON et al., 2002; MILLS, 2000; ANONYMOUS, 1999). O uso contínuo consiste de um tratamento de choque inicial utilizando o produto em alta concentração durante curto período de tempo e em seguida, o uso contínuo com doses baixas do produto, garantindo menor potencial de recolonização. Porém apresenta as desvantagens de causar danos aos equipamentos, interferir na aderência dos adesivos dentinários além da exposição crônica dos profissionais da área odontológica aos agentes químicos. O uso intermitente pode ser realizado utilizando o agente químico em altas concentrações periodicamente. A grande vantagem é o fato do produto não entrar em contato com o paciente. Mas a possível sobrevivência dos microrganismos, o uso de produtos concentrados e o possível dano aos equipamentos são as grandes desvantagens dessa técnica (MILLS, 2000).

Vários produtos foram utilizados para a descontaminação dos sistemas de água dos equipos odontológicos incluindo, entre outros, os seguintes

germicidas: Tween 80 (KELSTRUP et al., 1977); hipoclorito de sódio (NaOCl) (KIM et al., 2000; WALKER et al., 2000; PANKHURST & PHILPOTT-HOWARD, 1993; FIEHN & HENRIKSEN, 1988); glutaraldeído (MEILLER et al., 1999); digluconato de clorhexidina (MEILLER et al., 2001; WALKER et al., 2000); antisépticos orais (MEILLER et al., 2000); ácido acético em associação com hipoclorito de sódio (PUTTAIAH et al., 1998); ácido clorídrico (JORGENSEN et al., 1999); peróxidos alcalinos (LEE et al., 2001); etileno diamino tetra acetil (EDTA) (MONTEBUGNOLI & DOLCI, 2002) e polivinilpirrolidona-iodo (PVPI) (MILLS et al., 1986) porém não há um consenso sobre qual produto é o mais adequado. O agente químico ideal seria aquele que não possuísse propriedades corrosivas, não tivesse odor ou gosto ruim, não provocasse efeitos deletérios para os pacientes, não interferisse na adesão resina – dentina/esmalte (PEDERSON et al., 2002), fosse de baixo custo, de fácil uso e tivesse boa atividade bactericida (MILLS, 2000).

Kelstrup et al. (1977) analisando amostras de água e tubulações de equipos de escolas e clínicas de odontologia na Dinamarca isolaram e identificaram cepas de *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Flavobacterium* e *Moraxella*. O uso rotineiro de Tween 80 a 4% no tratamento desses equipos removeu bactérias e fungos sem causar corrosão nos equipos.

Em 1986, Mills et al. avaliaram o uso do PVPI a 10% na descontaminação das MAOEs. Antes da descontaminação foram encontradas cepas de *Sphingomonas paucimobilis*, *Flavobacterium* spp., *Flavobacterium grupo IIb*, *P. cepacea*, *P. maltophilia*, *Bacillus* spp., *B. subtilis*, *Streptococcus* spp., *Staphylococcus* spp., dentre outros. Após o tratamento durante 12 horas, não houve crescimento de microrganismos, mostrando que o PVPI 10% pode ser

utilizado para reduzir a colonização microbiana nas tubulações de água dos equipos. Apenas o uso de água estéril, sem a prévia descontaminação, não reduziu o número de UFC.

Em 1988, Fiehn & Henriksen verificaram que o uso de 0,5 a 1 partes por milhão (ppm) de cloro ativo durante 10 minutos diariamente reduz a contagem bacteriana, podendo ser utilizado para a desinfecção das MAEOs. Esses resultados foram similares aos do uso contínuo de cloro sendo assim mais indicado devido a menor corrosão nos equipamentos e menor toxicidade.

O trabalho realizado por Whitehouse et al. (1991) mostrou que somente após o acionamento da seringa tríplice por 20 minutos os equipos não apresentaram contaminação. A recontaminação ocorreu em 30 minutos em um equipo e nos demais, em 48 horas. Bactérias pertencentes a diferentes gêneros foram isolados, sendo dois identificados como: *Methylobacterium* spp., *S. paucimobilis* e os demais, a identificação foi duvidosa em *Neisseria elongata*, *Pseudomonas* spp. e *Flavobacterium* spp.

Williams et al. (1993) em seu estudo realizado nas regiões oeste e nordeste dos Estados Unidos, coletando água de equipos odontológicos, encontraram uma grande variedade de microrganismos como *Pseudomonas* spp., *Pasteurella* spp., *Streptococcus* spp., *Staphylococcus* spp., *Acinetobacter* spp., *Klebsiela pneumoniae*, *Flavobacterium tridologenes*, entre outras.

Williams et al. (1995) acompanharam a formação do biofilme em mangueiras de equipos novos recém-instalados e observaram que em uma a duas semanas há a presença de microcolônias e após seis meses, há formação de biofilme maduro.

No estudo de Barbeau et al. (1996) realizado na Universidade de Montreal no Canadá, foram coletadas amostras de água antes do uso e dois minutos após o acionamento da seringa tríplice e da caneta de alta rotação (ARO). O acionamento durante 2 minutos reduziu as contagens em 96%. Foram necessários pelo menos 8 minutos para que as contagens ficassem inferiores a 500 UFC/mL. *S. paucimobilis*, *P. aeruginosa*, *A. calcoaceticus* e *M. mesophilicum* foram as mais freqüentes, sendo que as duas primeiras estavam presentes em todos os equipos. Também encontraram *P. putida*, *P. maltophilia*, *P. fluorescens*, *P. vesiculares*, *P. acidovorans*, *Actinomyces* spp. e *Bacillus* spp.

O ácido clorídrico a 10% foi utilizado durante 12 horas para a desinfecção das MAEOs (tratamento de choque) e semanalmente a desinfecção foi realizada utilizando solução de NaOCl 0,5% durante 10 minutos. Após os tratamentos, foram realizados enxágüe das mangueiras utilizando água estéril. Apesar do ácido clorídrico ter promovido uma significativa redução no número de bactérias, não é um produto recomendado pelos fabricantes (JORGENSEN et al., 1999).

NaOCl 5,25%, glutaraldeído 3% e o isopropanol 1,5% foram utilizados durante 15 horas no tratamento das tubulações dos equipos. Não houve o crescimento de microrganismos e a recolonização ocorreu após 24 horas devido à presença de biofilme remanescente (MEILLER et al., 1999).

Listerine<sup>®</sup> (mistura de óleos essenciais, timol, menta, eucalipto e metilsalicilato) foi utilizado para o tratamento das MAEO por Meiller et. al. (2000). O seu uso na diluição 1:50 durante 18 horas inibiu a formação do biofilme em equipos novos por 7 dias. Tratamentos múltiplos (3 dias consecutivos) de 18

horas não eliminaram a matriz de biofilme nos equipos que estavam em uso, mas manteve a qualidade da água a níveis aceitos pela ADA.

Como os equipos odontológicos podem ser abastecidos com diferentes tipos de água (deionizada, destilada, água leve e água pesada) provenientes de diferentes fontes (reservatórios independentes tipo garrafa, rede pública ou sistemas de tanques), Walker et al. (2000) avaliaram a contaminação e formação de biofilme nesses diferentes sistemas, com e sem sanitizantes (NaOCl 2% e clorhexidina 0,2%). Esse estudo mostrou que o número de UFC variou com o tipo de água utilizada, sendo que as maiores contaminações foram obtidas utilizando água destilada tratada e com reservatórios independentes. A explicação porquê a água tratada obteve contagens maiores estatisticamente significativas que a não tratada é pelo fato de que a descontaminação utilizando detergentes ou ácidos inorgânicos (ácido hipocloroso) podem elevar a liberação de microrganismos do biofilme e aumentar o número de UFC na água.

Kim et al. (2000) utilizando água pasteurizada, atingiram a meta da ADA de máximo de 200 UFC/mL. Testaram também o NaOCl em duas concentrações 0,5% (5000 ppm) e 0,15% (1500 ppm) para o tratamento da água das mangueiras dos equipos odontológicos. Como não houve diferença estatisticamente significativa entre as duas concentrações, sugeriram o uso da menor concentração para manter a boa qualidade da água.

No estudo de Meiller et al. (2001) vários produtos foram avaliados dentre eles, o NaOCl 0,5%, o Listerine<sup>®</sup> e o Peridex<sup>®</sup> (digluconato de clorhexidina 0,12%). Após o tratamento dos equipos durante 18 horas, todos os produtos foram efetivos para a desinfecção das MAEOs.

Os sistemas de água estéril são eficazes, porém extremamente caros (PEDERSON et al., 2002). Devido ao elevado custo, é indicado para procedimentos cirúrgicos uma vez que o sistema autoclavável evita a formação do biofilme (ANONYMOUS, 1999).

Os filtros com membranas de microporos (0,2  $\mu\text{m}$ ) eliminam satisfatoriamente os microrganismos, mas não os minerais, compostos orgânicos e principalmente as endotoxinas (MILLS, 2000). São instalados na saída de água e devem ser trocados periodicamente. Embora haja um pequeno número de trabalhos que atestam a sua efetividade, o seu uso está bem aceito em setores médicos e industriais, podendo ser usados associados com outros tratamentos (ANONYMOUS, 1999).

Trabalho realizado por Murdoch-Kinch et al. (1997) mostrou que o uso de filtros (0,22  $\mu\text{m}$ ) utilizados na seringa tríplice e na caneta de alta rotação foram eficazes para reduzir a contaminação microbiana nas mangueiras dos equipos odontológicos. Além disso, os fabricantes também recomendam a instalação de válvulas anti-retração, uso de água destilada, troca diária da água dos reservatórios, esgotamento das linhas de água ao fim do expediente e “flush” semanal com NaOCl a 0,5%.

ADA e o CDC (MILLS, 2000; MEILLER et al., 1999) recomendam que protocolos sejam seguidos para o controle da infecção cruzada no consultório odontológico. Dentre eles está o acionamento das peças de mão no início do expediente (2 minutos) e entre o atendimento dos pacientes (20-30 segundos). A esse acionamento temporário para o escoamento da água estagnada nas tubulações e para eliminação de possíveis microrganismos provenientes da cavidade oral do paciente dá-se o nome de “flushing”. Pode ser realizado

acionando apenas a água do reservatório ou usando soluções desinfetantes que são adicionadas ao reservatório (FAYLE & POLLARD, 1996). Há controvérsias quanto à efetividade do “flushing” realizado apenas com água. Segundo Williams et al. (1993) o “flush” contínuo com água durante 2 minutos reduziu em um terço as contagens quando comparadas com os valores de “pré-flushing”. Mills et al. (1986) garantem que esse procedimento pode ser eficaz na remoção de bactérias planctônicas, mas é ineficaz na eliminação de bactérias pertencentes ao biofilme. Gross et al. (1976) concluíram que o “flushing” durante 2 minutos não reduziu significativamente a concentração microbiana das linhas de água. Segundo Mayo et al. (1990) o “flushing” apenas com água durante 6 minutos reduziu as contagens de  $10^7$  para  $10^4$  UFC/mL, sugerindo que esse procedimento seja realizado com biocidas.

Fabricantes de equipamentos estão desenvolvendo sistemas de flush automáticos com soluções desinfetantes. Fayle & Pollard (1996) descrevem o sistema (Castellini Autosteril), eficaz para o controle de *Pseudomonas* e *Moraxella*, mas ineficaz na eliminação de esporos de *Bacillus megaterium*. Além disso, apresenta desvantagens como o uso de uma solução de glutaraldeído 2%, o sistema demora 7 minutos para a desinfecção entre os pacientes, e o “flushing” não atinge as mangueiras de água da seringa tríplice, somente as linhas de água das peças de mão. Outro fabricante desenvolveu um sistema que adiciona continuamente peróxido de hidrogênio (Kavo Systematic), mas não há dados que atestem a eficácia deste produto.

No Brasil há dois sistemas de flush automáticos: Bio System (Gnatus<sup>®</sup>) e sistema “Flush” (Dabi Atlante<sup>®</sup>), nos quais se emprega uma solução de NaOCl a 0,05% (500 ppm) em um reservatório próprio, que fica ligado em

paralelo com o reservatório que contém a água para a refrigeração das peças de mão. Os fabricantes recomendam os seus usos no início e final de expediente e entre os pacientes. Esses sistemas foram introduzidos pelos fabricantes recentemente, sendo necessário o desenvolvimento de outros métodos para controle da contaminação microbiana em equipos que não apresentam o flush automático.

O cloro é o agente mais estudado para o controle e eliminação do biofilme principalmente o NaOCl (MILLS, 2000; PANKHURST & PHILPOTT-HOWARD, 1993). Contudo, apresenta algumas desvantagens como seu alto poder corrosivo nas peças de mão principalmente quando utilizado continuamente, e, além das desvantagens já apresentadas e inerentes ao produto, a principal delas é a formação de trialometanas. Alguns agentes químicos, principalmente os compostos clorados (gás cloro, dióxido de cloro, NaOCl e monocloramidas) podem reagir com o biofilme e outros compostos orgânicos dissolvidos e produzir as trialometanas. As trialometanas pertencem ao mesmo grupo químico do clorofórmio, considerados carcinogênicos para o homem. O limite de trialometanas aceito pela *Environmental Protection Agency* (EPA) é de 100 partes por bilhão (ppb) (KARPAY et al., 1999). O risco de formação das trialometanas é maior nos sistemas com cloração contínua e uso em concentrações bacteriostáticas quando comparado com clorações periódica em concentrações bactericidas acima de 500 ppm de cloro livre (MILLS, 2000; KARPAY et al., 1999).

Uma associação de ácido acético 1% e NaOCl 0,5% (5000 ppm) foi testada mas não reduziu significativamente o número de UFC. Além disso, houve a formação de trialometanas em quantidades 30 vezes mais que a máxima

aceita pela EPA. Quando foi utilizado somente o NaOCl 0,5%, as contagens foram reduzidas a níveis aceitos pela ADA (200 UFC/mL), com formação de 45 ppb de trihalometanos (PUTTAIAH et. al., 1998).

Karpay et al. (1999) recomendam a desinfecção semanal com solução de NaOCl a 0,5% (5000 ppm) durante 10 minutos e uso diário de 3 ppm de cloro. Futuras investigações quanto aos efeitos do uso prolongado da água clorada na adesão de esmalte e dentina devem ser realizadas.

Segundo Pankhurst & Philpott-Howard (1993) o paciente não deve ser exposto a altas concentrações de cloro, pois há relação entre o nível de cloro ingerido e o desenvolvimento de câncer gástrico, sendo necessário o constante monitoramento e doseamento do nível de cloro dos produtos comercializados.

## 2 OBJETIVOS

- 1- Avaliação bacteriológica da água utilizada nos equipos odontológicos (seringa-tríplice e reservatório) através da contagem total de bactérias heterotróficas.
- 2- Isolar e identificar bactérias Gram-negativas não fermentadoras presentes na água (seringa-tríplice e reservatório).
- 3- Verificar se os microrganismos isolados têm a capacidade de aderir ao poliestireno e conseqüentemente formar biofilme nas tubulações.
- 4- Avaliar a atividade antimicrobiana de diferentes concentrações de hipoclorito de sódio (0,06%, 0,12%, 0,25%, 0,5%) e clorhexidina (0,03%, 0,06%, 0,12%) frente às bactérias isoladas.

### 3 REFERÊNCIAS

ANONYMOUS. ADA Council on Scientific Affairs. Dental unit waterlines: approaching the year 2000. **Journal of American Dental Association** **130**, 1653-1663, 1999.

BARBEAU, J., TANGUAY, R., FAUCHER, E., AVEZARD, C., TRUDEL, L., CÔTÉ, L. & PRÉVOST, A.P. Multiparametric analysis of waterline contamination in dental units. **Applied and Environmental Microbiology** **62**, 3954-3959, 1996.

BIANCHI, R., ROSSI, S.S., CAMPREGHER, U.B., WUST, P.R., BARTH, A., FIGUEIREDO, J.A.P. & BARBISAN, A.O. Análise microbiológica quantitativa da água que alimenta as canetas de alta rotação dos ambulatórios da FOUFRGS. **Revista da Faculdade de Odontologia** **39**, 03-07, 1998.

DAVEY, M. E. & O'TOOLE, G. A. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. **Microbiology and Molecular Biology Reviews** **64**, 847-867, 2000.

COSTERTON, J.W., GESSEY, G.G. & CHENG, G.K. How bacteria stick. **Scientific American** **238**, 86-95, 1978.

COSTERTON, J.W., . CHENG, G.K., GESSEY, G.G., LADD, T.I., NICKEL, J.C., DASGUPTA, M. & MARRIE, T.J. Bacterial biofilms in nature and disease. **Annual Review of Microbiology** **41**, 435-464, 1987.

DONLAN, R.M. Biofilms and device-associated infections. **Emerging Infectious Diseases** **7**, 277-281, 2001.

DONLAN, R.M. & COSTERTON, J.W. Biofilms: survival mechanisms of clinical relevant microorganisms. **Clinical Microbiology Reviews** **15**, 167-193, 2002.

FANTINATO, V., SILVA, M.V., ALMEIDA, N.Q., JORGE, A.O.C. & SHIMIZU, M.T. Exame bacteriológico da água em clínica odontológica. **Revista da Associação Paulista de Cirurgiões Dentistas** **46**, 829-831, 1992.

FAYLE, S.A. & POLLARD, M.A. Decontamination of dental unit water systems: a review of current recommendations. **British Dental Journal** **181**, 369-372, 1996.

FIEHN, N.E. & HENRIKSEN, K. Methods of disinfection of the water system of dental units by water chlorination. **Journal of Dental Research** **67**, 1499-1504, 1988.

GROSS, A., DEVINE, M.J. & CUTRIGHT, D.E. Microbial contamination of dental units and ultrasonic scalers. **Journal Periodontol** **47**, 670-673, 1976.

JORGENSEN, M.G; DETSCH, S.J. & WOLINSKY, L.E. Disinfection and monitoring of dental unit waterlines. **General Dentistry** **69**, 152-156, 1999.

KARPAY, R.I., PLAMONDON, T.J. MILLS, S.E. & DOVE, S.B. Combining periodic and continuous sodium hypochlorite treatment to control biofilms in dental unit water systems. **Journal of American Dental Association** **130**, 957-965, 1999.

KELSTRUP, J., FUNDER-NIELSEN, T.D. & THEILADE, J. Microbial aggregate contamination of water lines in dental equipment and its control. **Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica** **85**, 177-183, 1977.

KIM, P.J.; CEDERBERG, R.A. & PUTTAIAH, R. A pilot study of 2 methods for control of dental unit biofilms. **Quintessence International** **31**, 41-48, 2000

LEE, T.K.; WAKED, E.J.; WOLINSKY, L.E.; MITO, R.S. & DANEILSON, R.E. Controlling biofilm and microbial contamination in dental unit waterlines. **CDA Journal** **29**, 679-684, 2001.

MARTIN, M.V. The significance of the bacterial contamination of dental unit water systems. **British Dental Journal** **163**, 152-154, 1987.

MAYO. J.A., OERTLING, K.M. & ANDRIEU, S.C. Bacterial biofilm: a source of contamination in dental air-water syringes. **Clinical Preventive Dentistry** **12**, 13-20, 1990.

MEILLER, T.F., DEPAOLA, L.G.; KELLEY, J.I.; BAQUI. A.A.M.A; TURMG. B.F. & FALKER, W.A.J. Dental unit waterlines: Biofilms, disinfection and recurrence. **Journal of American Dental Association** **130**, 65-72, 1999.

MEILLER, T.F., KELLEY, J.I., BAQUI, A.A. & DEPAOLA, L. G. Disinfection of dental unit waterlines with an oral antiseptic. **The Journal of Clinical Dentistry** **11**, 10-15, 2000.

MEILLER, T.F., KELLEY, J.I., BAQUI, A.A. & DEPAOLA, L. G. Laboratory evaluation of anti-biofilm agents for use in dental unit waterlines. **The Journal of Clinical Dentistry** **12**, 97-103, 2001.

MILLS, S.E., LAUDERDALE, P.W. & MAYHEW, R.B. Reduction of microbial contamination in dental units with povidone-iodine 10%. **Journal of American Dental Association** **113**, 280-284, 1986.

MILLS, S.E. The dental unit waterline controversy: defusing the mythis, defining the solutions. **Journal of American Dental Association** **131**, 1427-1441, 2000.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, Portaria n 1.469/MS, 29 de dezembro de 2000. DOU de 19/01/2001. Brasília – DF.

MONTEBUGNOLI, L.L. & DOLCI, G.G. A new chemical formulation for control of dental unit water line contamination: An “in vitro” and clinical study. **BioMed Central Oral Health**, **2**, 2002.

MURDOCH-KINCH, C.A., ANDREWS, N.L., ATWAN, S., JUDE, R., GLEASON, M.J. & MOLINARI, J.A. Comparison of dental water quality management procedures. **Journal of American Dental Association** **128**, 1235-1243, 1997.

PANKHURST, C.L. & PHILPOTT-HOWARD, J.N. The microbiological quality of water in dental chair units. **Journal of Hospital Infection** **23**, 167-174, 1993.

PEDERSON, E.D.; STONE, M. E.; RAGAIN JR., J. C. & SIMECEK, J.W. Waterline biofilm and the dental treatment facility: A review. **General Dentistry** **50**, 190-195, 2002.

PRATT, L.A. & KOLTER, R. Genetic analyses of bacterial biofilm formation. **Current Opinion in Microbiology** **2**, 598-603, 1999.

PUTTAIAH, R., KARPAY, R.I., FABRE, C., SHERMAN, L.R., NEMETH, J.F., MILLS, S.E. & PLAMONDON, T.J. Dental unit waer line treatment with sodium hypochlorite and acetic acid. **Microchemical Journal** **59**, 333-340, 1998.

SOUZA-GUGELMIN, M.C.M., LIMA, C.D.T., LIMA, S.N.M., MIAN, H. & ITO, I.Y. Microbial contamination in dental unit waterlines. **Brazilian Dental Journal** **14**. 55-57, 2003.

TALL, B.D., WILLIAMS, H.N, GEORGE, K.S., GRAY, R.T. & WALCH, M. Bacterial succession within a biofilm in water supply lines of dental air-water syringes. **Canadian Journal Microbiology** **41**, 647-654, 1995.

TIPPETT, B.F., EDWARDS, J.L. & JENKINSON, H.F. Bacterial contamination of dental unit water lines – a possible source of cross-infection. **New Zealand Dental Journal** **84**, 112-113, 1988.

XAVIER, H.V.M.; BULLA, J.R.; LUIZE, L.M.; MORENO, T.; TOGNIM, M.C.B. & GARCIA, L.B. Análise bacteriológica da água de equipos odontológicos. **Acta Scientiarum** **22**, 631-636, 2000.

WALKER, J.T., BRADSHAW, D.J., BENNETT, A.M., FULFORD, M.R., MARTIM, M.V. & MARSH, P.D. Microbial biofilm formation and contamination of dental-unit water systems in general dental practice. **Applied and Enviromental Microbiology** **66**, 3363-3367, 2000.

WHITEHOUSE, R.L.S., PETERS, E., LIZOTTE, J. AND LILGE, C. Influence of biofilms on microbial contamination in dental unit water. **Journal Dental** **19**, 290-295, 1991.

WILLIAMS, J.F., JOHNSTON, A.M., JOHNSON, B., HUNTINGTON, M.K. MACKENZIE, C.D. & PATH, M.R.C. Microbial contamination of dental unit waterlines: prevalence, intensity and microbiological characteristics. **Journal of American Dental Association** **124**, 59-65, 1993.

WILLIAMS, H.N., KELLEY, J., FOLINEO, D., WILLIAMS, G.C., HAWLEY, C.L. & SIBISHI, J. Assessing microbial contamination in clean water dental – units and compliance with disinfection protocol. **Journal of American Dental Association** **125**, 1205-1211, 1994a.

WILLIAMS, H.N., QUINBY, H. & ROMBERG, E. Evaluation and use of a low nutrient medium and reduced incubation temperature to study bacterial contamination in the water supply of dental units. **Canadian Journal Microbiology** **40**, 127-131, 1994b.

WILLIAMS, H. N., JOHNSON, A., KELLEY, J.I., BAER, M.L., KING, T.S., MITCHELL, B. & HASLER, J.F. Bacterial contamination of the water supply in newly installed dental units. **Quintessence International** **26**, 331-337, 1995.

**4 ARTIGO: EVALUATION OF THE LEVEL OF MICROBIAL CONTAMINATION AND PREVALENCE OF GRAM-NEGATIVE NONFERMENTATIVE RODS IN DENTAL UNIT WATERLINES**

C. R. Kotaka<sup>1</sup>, L. B. Garcia<sup>2</sup>, J. S. Pelayo<sup>1</sup>

*<sup>1</sup>Departamento de Microbiologia, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, Brazil, <sup>2</sup>Departamento de Análises Clínicas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR, Brazil*

**Abbreviated running title:** Microbial contamination in dental unit

Correspondence to: Jacinta S. Pelayo, Departamento de Microbiologia, Universidade Estadual de Londrina (UEL), Cx. P. 6001, 86051-970, Fax: +55 43 3371-4788, Londrina, PR, Brazil (e-mail: [jspelayo@sercomtel.com.br](mailto:jspelayo@sercomtel.com.br)).

Este trabalho foi enviado para a revista: **Journal of Applied Microbiology.**

## SUMMARY

**Aims:** Microbiological evaluation of the water used in dental units, identification of Gram-negative nonfermentative rods (GNNR) and their ability to adhere to polystyrene and antimicrobial activity of disinfectants on the identified strains.

**Methods and Results:** The heterotrophic bacteria count and GNNR identification were performed on water samples collected from 25 dental units (air/water syringe and reservoir). Of the collected samples from air/water syringe, 88% were out of the potability standards, as were 68% of the samples from reservoirs. In 88% of the dental units, the number of isolated bacteria from the reservoir was lower than from the air/water syringe. Several GNNR genus were isolated, being *Methylobacterium* spp. found in highest percentage (19.7%). The GNNR were assessed for their capability to adhere to polystyrene and for the antimicrobial activity to the following disinfectants: sodium hypochlorite (0.06%, 0.12%, 0.25%, 0.5%) and chlorhexidine (0.03%, 0.06%, 0.12%). 85.04% of the samples showed weak adherence to polystyrene. Sodium hypochlorite at 0.25% inactivated 100% of GNNRs in 10 minutes, while the highest tested concentration chlorhexidine (0.12%) inactivated 98.5%.

**Conclusions:** These results indicate a need for treatment of the water used in dental units.

**Significance and Impact of the Study:** This study provides information on the problem of dental unit waterlines (DUWL) contamination. The decontamination of DUWL can be performed with sodium hypochlorite at 0.25% (half the concentration preconized in the literature). However, further studies regarding DUWL decontamination frequency are necessary.

**Keywords:** DUWL, microbial contamination, nonfermentative rods, biofilm disinfection.

## INTRODUCTION

Despite the efforts to avoid cross-infection in dental office using sterilized instruments, individual protection equipment, and disinfection procedures, other measures such as bacteriologic control of the water used in dental units are required to prevent the spread of diseases (Pankhurst and Philpott-Howard, 1993; Mills, 2000; Lee *et al.*, 2001). The literature reports the use of several methods to reduce or eliminate this bacterial contamination (Kelstrup *et al.*, 1977; Mills *et al.*, 1986; Murdoch-Kinch *et al.*, 1997; Puttaiah *et al.*, 1998), yet there is no standard procedure and the water used in dental units during odontological treatment still shows high amounts of heterotrophic bacteria (Meiller *et al.*, 2000; Walker *et al.*, 2000; Xavier *et al.*, 2000). This contamination can be originated from the suction of microorganisms from the patient's mouth, or derive from the multiplication of microorganisms contained in the water supply or in the biofilms present in the dental unit water lines (DUWL) (Whitehouse *et al.*, 1991, Pankhurst and Philpott-Howard, 1993; Fayle and Pollard, 1996).

In Brazil, the Health Ministry (Ordinance No. 1469, December 29th 2000) states that for water to be considered safe for human consumption, it can contain a maximum of 500 colony forming units per milliliter (CFU/ml) given it is free from coliforms. Both Centers for Disease Control and Prevention (CDC) and American Dental Association (ADA) recommend that water used for non-invasive procedures not exceed 200 CFU/ml, and for surgical procedures with bone exposure, that water be sterile (Anonymous, 1999).

The dental units are equipped with a network of small bore semi-rigid plastic tubes (two to three mm) which provide water to the air/water syringe

and to the handpieces (Barbeau *et al.*, 1996; Lee *et al.*, 2001). The water used comes from reservoirs coupled to the unit or on the ground, or come directly from a tap water. Different studies show that water coming from dental units can be contaminated with microorganisms such as *Pseudomonas* spp., *Acinetobacter* spp., *Burkholderia* spp., *Alcaligenes* spp., *Methylobacterium* spp., *Sphingomonas* spp., *Flavobacterium* spp., and *Moraxella* spp., favoring biofilm formation on DUWL (Kelstrup *et al.*, 1977; Williams *et al.*, 1993; Barbeau *et al.*, 1996; Meiller *et al.*, 1999). The bacteria belonging to the biofilm are adhered to a surface and produce extracellular polymers that ease adhesion (Donlan, 2001) and are even more protected from the action of antimicrobials, of bacteriophages, of phagocytic amoebas, and from desiccation (Mills, 2000).

Several authors have suggested the use of disinfectants for the decontamination of dental unit water systems (Kelstrup *et al.*, 1977; Puttaiah *et al.*, 1998; Walker *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2001), however there is no agreement on which product is the most appropriate.

Considering the possible contamination of dental units due to the colonization by microorganisms capable of forming biofilm, this paper had as aims: to evaluate the bacteriological quality of water used in dental units (air/water syringe and reservoir) through the total count of heterotrophic bacteria; to isolate and identify Gram-negative nonfermentative rods (GNNR) present in water; to verify the adherence capability to polystyrene and antimicrobial activity of different sodium hypochlorite (0.06%, 0.12%, 0.25%, 0.5%) and chlorhexidine (0.03%, 0.06%, 0.12%) concentrations against the isolated bacteria.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Collection of water samples**

Water samples were collected from 25 dental units, being 15 from the Northern Parana University Odontological Clinic (units one - 15); four from the Community Welfare University Center (units 16 - 19); six from the Northern Parana Odontological Association (units 20 - 25). Water samples were collected from the air/water syringe and reservoir of each dental unit.

Prior to the collection, decontamination was performed on the external surface of the air/water syringe and reservoir with 70% (v/v) alcohol. Before the water collection from the air/water syringe, a 20 to 30 s continuous flush was purged, simulating the recommended procedure before equipment use on patients (Fayle and Pollard, 1996). The reservoirs were disconnected from the units for water collection. Approximately 100 ml of water were collected from the air/water syringe and from the reservoirs in previously sterilized flasks containing 0.1 ml 10% (w/v) sodium thiosulfate solution (Reagen, Brazil) to neutralize the residual chlorine from chlorine-treated water samples.

### **Total heterotrophic bacteria count**

The samples were homogenized and diluted 1:10 and 1:100 in 0.9% (w/v) physiologic solution. One hundred microliters of the pure samples and dilutions were uniformly applied on surface of Plate Count Agar (PCA) (Difco,

USA). The plates were incubated at 30°C for 48-96 h. The reading was carried out on the plates which showed between 30 and 300 CFU after the 48 h and 96 h incubation period. The experiments were performed in duplicate.

To evaluate whether there was a statistically significant difference regarding the contamination level of the syringe and reservoir, the Qui-square test with 0.01 significance level was applied.

### **Isolation and identification of Gram-negative nonfermentative rods**

The morphologically different colonies isolated on the PCA plates were submitted to Gram stain. The Gram-negative bacteria were identified according to the technique described in the Manual of Clinical Microbiology (Murray *et al.*, 2003) and by the kit NF-Prov (nonfermenters) (Newprov, Paraná, Brazil). The Gram-positive bacteria, Gram-negative glucose-fermentative and fungi were excluded from this study.

### **Adhesion to inert surface (polystyrene)**

Adhesion to inert surface was assessed by employing the method described by Stepanovic *et al.* (2000) with some modification. The GNNR were incubated for 24-48 h at 30°C in Plate Count Broth (PCB). The cultures were diluted 1:200 in PCB and 200 µl of this suspension were inoculated in quadruplicate in sterile 96-well polystyrene plates (NUNC, Naperville, IL) and

incubated for 24 h at 30°C. Negative control wells contained broth only. Then, the content of each well was aspirated and the wells were washed three times with 250 µl phosphate-buffered saline (PBS-pH 7.2). The attached bacteria were fixed with 200 µl methanol p.a (Merck, Germany) per well, and after 15 min the plates were emptied and left to dry. The plates were stained for five min with 0.2 ml 2% (w/v) Hucker crystal violet per well. Excess stain was rinsed off under running tap water. After the plates were air-dried the optical density (O.D.) of each well was measured at 550 nm with a Micro-ELISA Autoreader (MultiScan EX, Labsystem, Uniscience). The cut-off O.D. (O.Dc) was defined as three standard deviation above the mean O.D. of the negative control. Strains were classified as follows: non-adherent ( $O.D. \leq O.Dc$ ), weakly adherent ( $O.Dc < O.D. \leq 2 \times O.Dc$ ), moderately adherent ( $2 \times O.Dc < O.D. \leq 4 \times O.Dc$ ) and strongly adherent ( $4 \times O.Dc < O.D.$ ).

### **Evaluation of disinfectants antimicrobial activity**

Sodium hypochlorite solutions of different concentrations were used: 0.06% (600 p.p.m.), 0.12% (1200 p.p.m.), 0.25% (2500 p.p.m.) and 0.5% (5000 p.p.m.). Before the use, the solutions were titrated by the volumetric method according to the United States Pharmacopeia (1980). Chlorhexidine solutions were used in the following concentrations: 0.03%, 0.06%, and 0.12%.

The assay was performed in duplicate according to technique described by Litsky and Litsky (1968), with some modifications. The GNNR strains were inoculated in three ml PCB and incubated for 24-48 h at 30°C. After the

incubation period, these cultures were standardized according to the turbidity with tube one of the MacFarland scale to obtain a suspension with  $10^8$  microorganisms  $\text{ml}^{-1}$ . One ml of this suspension was added to four ml disinfectant. The tubes were manually agitated for one min and left at room temperature for 10 minutes. One hundred microliters of this mixture were uniformly applied on the surface of PCA containing neutralizer and then incubated for 48-96 h at  $30^\circ\text{C}$ . After the incubation, the colony counts were performed. In the assay performed with sodium hypochlorite, the neutralizer used was 0.6% (w/v) sodium thiosulfate (Reagen, Brazil), while 0.5% (w/v) Tween 80 and 0.07% (w/v) soy lecithin (Sigma, USA) were used for chlorhexidine.

## RESULTS

Table 1 shows the heterotrophic bacteria counts found in waters collected from the reservoirs and from air/water syringes of the 25 dental units. In the water samples from the reservoirs, the obtained count average was  $4.0 \times 10^4 \pm 1.0 \times 10^5$  ranging from  $2.0 \times 10^1$  to  $4.6 \times 10^5$  CFU  $\text{ml}^{-1}$ . In the air/water syringes, the count values ranged from  $1.1 \times 10^2$  to  $4.6 \times 10^5$  CFU  $\text{ml}^{-1}$  and the obtained average was  $8.4 \times 10^4 \pm 1.1 \times 10^5$ . Employment of the Qui-square test with  $\alpha < 0.01$  showed that there was a statistically significant difference regarding the contamination level of the water collected from the air/water syringe and from the reservoir according to the obtained averages of the heterotrophic bacteria count. In most units (except for numbers 12, 19, 21, and 25), the number of isolated

bacteria from the reservoir was lower than the isolated samples from the air/water syringes.

Considering the Brazilian Health Ministry Ordinance No. 1469, 88% (22/25) of the water samples from the air/water syringes and 68% (17/25) of the samples from reservoirs showed results above the potability bacterial standards (Table 1).

The GNNR isolated from air/water syringe and reservoir water samples are shown in Table 2. *Methylobacterium* spp. was the highest percentage (19.7%) isolated genus, followed by *Moraxella* spp. (15.2%) and *Acinetobacter* spp. (13.6%). In only 24% of the dental units, the microorganisms belonging to the same genus were recovered in the reservoir and the air/water syringe.

Of the studied strains, 85,04% (57/67) showed weak adherence to polystyrene. Only one showed strong adherence and seven showed moderate adherence.

Sodium hypochlorite at 0.06% concentration inactivated 56.1% of the strains, at 0.12% it inactivated 89,4% and all the strains were inactivated when it was used at 0.25% and 0.5% (Table 3).

Chlorhexidine at 0.03% inactivated 72.7% of the tested strains; at 0.06%, 90.9%; and at 0.12% it inactivated 98.5% of the strains (Table 3).

**Table 1** – Determination of the number of heterotrophic bacteria in water samples from reservoirs and air/water syringes collected from 25 dental units in the city of Londrina.

| Unit            | Total heterotrophic bacteria count (CFU ml <sup>-1</sup> )* |   |
|-----------------|---|---|
|                 | Reservoir   | Air/water syringe                             |
| 01              | 2,0x10 <sup>2</sup>   | 2,5x10 <sup>4</sup>                           |
| 02              | 4,3x10 <sup>3</sup>   | 8,1x10 <sup>4</sup>                           |
| 03              | 1,9x10 <sup>4</sup>   | 2,2x10 <sup>5</sup>                           |
| 04              | 1,0x10 <sup>3</sup>   | 1,9x10 <sup>5</sup>                           |
| 05              | 3,3x10 <sup>3</sup>   | 3,7x10 <sup>4</sup>                           |
| 06              | 8,0x10 <sup>2</sup>   | 7,5x10 <sup>3</sup>                           |
| 07              | 1,4x10 <sup>2</sup>   | 8,0x10 <sup>3</sup>                           |
| 08              | 1,8x10 <sup>2</sup>   | 7,9x10 <sup>3</sup>                           |
| 09              | 1,8x10 <sup>2</sup>   | 1,7x10 <sup>4</sup>                           |
| 10              | 7,0x10 <sup>2</sup>   | 2,9x10 <sup>5</sup>                           |
| 11              | 7,0x10 <sup>2</sup>   | 3,6x10 <sup>4</sup>                           |
| 12              | 4,6x10 <sup>5</sup>   | 4,2x10 <sup>4</sup>                           |
| 13              | 8,0x10 <sup>3</sup>   | 6,7x10 <sup>4</sup>                           |
| 14              | 1,4x10 <sup>5</sup>   | 1,9x10 <sup>5</sup>                           |
| 15              | 2,0x10 <sup>2</sup>   | 1,8x10 <sup>5</sup>                           |
| 16              | 1,4x10 <sup>5</sup>   | 4,6x10 <sup>5</sup>                           |
| 17              | 4,1x10 <sup>4</sup>   | 7,3x10 <sup>4</sup>                           |
| 18              | 1,1x10 <sup>4</sup>   | 1,7x10 <sup>4</sup>                           |
| 19              | 1,7x10 <sup>5</sup>   | 1,3x10 <sup>5</sup>                           |
| 20              | 2,0x10 <sup>1</sup>   | 2,5x10 <sup>2</sup>                           |
| 21              | 1,0x10 <sup>3</sup>   | 1,1x10 <sup>2</sup>                           |
| 22              | 1,5x10 <sup>2</sup>   | 4,0x10 <sup>2</sup>                           |
| 23              | 3,4x10 <sup>2</sup>   | 5,4x10 <sup>2</sup>                           |
| 24              | 5,8x10 <sup>2</sup>   | 7,9x10 <sup>3</sup>                           |
| 25              | 1,6x10 <sup>3</sup>   | 8,0x10 <sup>2</sup>                           |
| average ± S.D.† | 4,0 x 10 <sup>4</sup> ± 1,0 x 10 <sup>5</sup>               | 8,4 x 10 <sup>4</sup> ± 1,1 x 10 <sup>5</sup> |

\*Count average. Tests performed in duplicate.

† Standard deviation

**Table 2** – Gram-negative nonfermentative rods isolated from water samples from reservoirs and air/water syringes of dental units.

| <b>Unit</b> | <b>Reservoir</b>   | <b>Air/water syringe</b>  |
|-------------|--|---|
| 01          | <i>Acinetobacter calcoaceticus</i><br><i>Stenothrophomonas maltophilia</i>   | <i>Delftia acidovarans</i><br>01 GNNR*  |
| 02          | 01 strain not recovered <sup>†</sup>   | <i>Moraxella osloensis</i><br>01 GNNR*  |
| 03          | <i>Stenothrophomonas maltophilia</i>   | <i>Stenothrophomonas maltophilia</i><br>01 GNNR*  |
| 04          | <i>Burkholderia cepacea</i>  | <i>Burkholderia cepacea</i><br><i>Sphingomonas paucimobilis</i>                                 |
| 05          | <i>Acinetobacter</i> spp.<br><i>Stenothrophomonas maltophilia</i>  | <i>Methylobacterium</i> spp.<br><i>Sphingomonas paucimobilis</i><br><i>Alcaligenes faecalis</i> |
| 06          | 01 strain not recovered <sup>†</sup>   | <i>Moraxella osloensis</i><br><i>Methylobacterium</i> spp.<br><i>Acinetobacter haemoliticus</i> |
| 07          | <i>Methylobacterium</i> spp.<br><i>Moraxella osloensis</i>   | <i>Methylobacterium</i> spp.<br>01 GNNR*  |
| 08          | <i>Sphingomonas paucimobilis</i><br><i>Moraxella catarrhalis</i>   | <i>Sphingomonas paucimobilis</i><br><i>Alcaligenes faecalis</i>                                 |
| 09          | 01 strain not recovered <sup>†</sup>   | <i>Moraxella osloensis</i>  |
| 10          | 01 strain not recovered <sup>†</sup>   | <i>Sphingomonas paucimobilis</i>  |
| 11          | <i>Delftia acidovarans</i><br><i>Methylobacterium</i> spp.   | 01 strain not recovered <sup>†</sup>  |
| 12          | <i>Methylobacterium</i> spp.<br><i>Comamonas acidovarans</i><br><i>Acinetobacter iwoffii</i><br><i>Sphingomonas paucimobilis</i> | 01 strain not recovered <sup>†</sup>  |

.../ **Table 2** - continuation

|    |  |  |
|----|--|--|
| 13 | 01 strain not recovered <sup>†</sup>   | <i>Moraxella osloensis</i><br><i>Acinetobacter iwoffii</i>             |
| 14 | <i>Alcaligenes faecalis</i><br><i>Moraxella catarrhalis</i>                                  | <i>Methylobacterium</i> spp.<br><i>Moraxella osloensis</i>             |
| 15 | <i>Sphingomonas paucimobilis</i><br><i>Methylobacterium</i> spp.                             | <i>Moraxella catarrhalis</i>   |
| 16 | 01 strain not recovered <sup>†</sup>   | <i>Pseudomonas stutzeri</i><br><i>Acinetobacter calcoaceticus</i>      |
| 17 | <i>Methylobacterium</i> spp.   | 01 strain not recovered <sup>†</sup>                                   |
| 18 | <i>Pseudomonas stutzeri</i><br><i>Flavobacterium mizutaii</i><br><i>Alcaligenes faecalis</i> | <i>Pseudomonas stutzeri</i><br><i>Acinetobacter baumannii</i>          |
| 19 | <i>Pseudomonas stutzeri</i><br><i>Acinetobacter calcoaceticus</i><br>01 GNNR*                | <i>Delftia acidovarans</i><br><i>Methylobacterium</i> spp.<br>01 GNNR* |
| 20 | 01 strain not recovered <sup>†</sup>   | <i>Acinetobacter haemoliticus</i>                                      |
| 21 | 02 strains not recovered <sup>†</sup>  | 02 strains not recovered <sup>†</sup>                                  |
| 22 | <i>Methylobacterium</i> spp.   | <i>Burkholderia cepacea</i>  |
| 23 | 02 strains not recovered <sup>†</sup>  | <i>Moraxella osloensis</i>   |
| 24 | 01 strain not recovered <sup>†</sup>   | 01 strain not recovered <sup>†</sup>                                   |
| 25 | <i>Methylobacterium</i> spp.   | <i>Alcaligenes faecalis</i>  |

\*Gram-negative glucose-nonfermentative rods not identified

† strains not recovered in the adopted standards

**Table 3** – Effect of different sodium hypochlorite and chlorhexidine concentrations on Gram-negative nonfermentative rods (GNNR) isolated from water from 25 dental unit water lines.

| .Isolated bacteria (n)                  | Inactivation by sodium hypochlorite |                |                | Inactivation by chlorhexidine |                |                |
|---|-------------------------------------|----------------|----------------|-------------------------------|----------------|----------------|
|   | 0.06%<br>n (%)                      | 0.12%<br>n (%) | 0.25%<br>n (%) | 0.03%<br>n (%)                | 0.06%<br>n (%) | 0.12%<br>n (%) |
| <i>Methylobacterium</i> spp. (13)       | 8/13 (62%)                          | 11/13 (85%)    | 13/13 (100%)   | 9/13 (69%)                    | 12/13 (92%)    | 12/13 (92%)    |
| <i>Moraxella</i> spp. (10)              | 8/10 (80%)                          | 8/10 (80%)     | 10/10 (100%)   | 10/10 (100%)                  | 10/10 (100%)   | 10/10 (100%)   |
| <i>Acinetobacter</i> spp. (9)           | 6/9 (67%)                           | 9/9 (100%)     | 9/9 (100%)     | 6/9 (66.6%)                   | 7/9 (78%)      | 9/9 (100%)     |
| <i>Sphingomonas paucimobilis</i> (7)    | 4/7 (57%)                           | 6/7 (86%)      | 7/7 (100%)     | 5/7 (71%)                     | 7/7 (100%)     | 7/7 (100%)     |
| GNNR not identified (6)                 | 3/6 (50%)                           | 5/6 (83%)      | 6/6 (100%)     | 4/6 (67%)                     | 5/6 (83%)      | 6/6 (100%)     |
| <i>Alcaligenes faecalis</i> (5)         | 3/5 (60%)                           | 4/5 (80%)      | 5/5 (100%)     | 4/5 (80%)                     | 5/5 (100%)     | 5/5 (100%)     |
| <i>Pseudomonas stutzeri</i> (4)         | 1/4 (25%)                           | 4/4 (100%)     | 4/4 (100%)     | 3 / 4 (75%)                   | 4/4 (100%)     | 4/4 (100%)     |
| <i>Stenothrofomonas maltophilia</i> (4) | 1/ 4 (25%)                          | 2/4 (50%)      | 4/4 (100%)     | 3/4 (75%)                     | 4/4 (100%)     | 4/4 (100%)     |
| <i>Delftia acidovarans</i> (4)          | 1/4 (25%)                           | 4/4 (100%)     | 4/4 (100%)     | 2/4 (50%)                     | 2/4 (50%)      | 4/4 (100%)     |
| <i>Burkolderia cepacea</i> (3)          | 1/3 (33%)                           | 3/3 (100%)     | 3/3 (100%)     | 1/3 (33%)                     | 3/3 (100%)     | 3/3 (100%)     |
| <i>Flavobacterium mizutaii</i> (1)      | 1/1 (100%)                          | 1/1 (100%)     | 1/1 (100%)     | 1/1 (100%)                    | 1/1 (100%)     | 1/1 (100%)     |
| Total (66)                              | 37/66 (56%)                         | 59/66 (89%)    | 66/66 (100%)   | 48/66 (73%)                   | 60/66 (91%)    | 65/66 (98%)    |

## DISCUSSION

While the water used in dental unit reservoirs continue with high microbial contamination, they will keep being an infection source in dentistry (Martin, 1987; Williams *et al.*, 1993). The majority of microorganisms present in DUWL do not represent a risk for public health (Murdoch-Kinch *et al.*, 1997), but they are considered opportunistic microorganisms, liable to cause diseases in immunosuppressed patients (Williams *et al.*, 1993).

DUWL are favorable environments for biofilm formation due to their small diameter and tube wall imperfections, water flow, presence of minerals and organic molecules, and frequent rest periods (Anonymous, 1999; Mills, 2000). Under these conditions, the microorganisms present in the water used to supply the dental units multiply and form biofilm on the luminal tube surfaces (Tall *et al.*, 1995).

The number of isolated bacteria in water samples from air/water syringes is usually higher than the ones isolated from reservoirs, once with the water flow through the dental unit lines there is the release of bacteria belonging to the biofilm (Kelstrup *et al.*, 1977; Whitehouse *et al.*, 1991; Williams *et al.*, 1994). This way, even when using water of good origin, if biofilm is present in DUWLs the water ejected through the air/water syringe will be contaminated with bacteria belonging to the biofilm (Mills, 2000).

In our study, four units showed lower CFU in air/water syringe in comparison to the reservoir. This variation may be attributed to the heterogeneous distribution of bacteria in the water sample or to the unit's age. When new, they may not show biofilm yet and, therefore, not show such different results in the water from the air/water syringe and reservoir. Or, if the unit is old, but if the lines have been

recently replaced, this same behavior in the count can occur. Besides, even using appropriate culture media, temperature and incubation time, a variation in the total microorganism count can happen once the bacteria have slow growth, being some of them not cultivable in the mediums and conditions used and others not recovered (Williams *et al.*, 1994; Tall *et al.*, 1995; Walker *et al.*, 2000). These reasons, together with the difficult identification of GNNR explain why many microorganisms were isolated from the reservoir but not from the syringe and vice-versa.

The heterotrophic bacteria number readings in our study were performed in 48 and 96 h. This is because in 48 h we had the result of the total number of heterotrophic bacteria and only after 96 h incubation the colonies showed pigmentation.

The incubation temperature used in our experiments was 30°C, once several papers reported that at this temperature there was recovery of a greater number of microorganisms (Kelstrup *et al.*, 1977; Williams *et al.*, 1994; Barbeau *et al.*, 1996).

Our paper focused on the identification and study of GNNR. Studies performed in different countries have reported the prevalence of GNNR, opportunistic and adapted to water which proliferate and form biofilms (Williams *et al.*, 1993; Tall *et al.*, 1995; Barbeau *et al.*, 1996). Despite the possible DUWL contamination with microorganisms from the patients' mouths, oral bacteria are not usually present in dental unit waters due to the use of antiretraction valves and sterile handpieces which control the suction of these microorganisms (Whithouse *et al.*, 1991).

The bacteria found in our study were predominantly environmental organisms. Some of the bacteria identified (*S. maltophilia*, *B. cepacea*, *P. stutzeri*, *Acinetobacter* spp.) are known opportunistic pathogens. Martin (1987) reported two

cases of infections caused by *P. aeruginosa* acquired by immunocompromised patients after restorative dentistry treatment.

The results of adhesion to polystyrene showed that the majority of samples showed weak adherence. This is probably due to the kind of bacteria studied, because, since they showed slow growth, the results could have shown a greater number of moderately or weakly adhering bacteria if other methodologies or a longer incubation period had been used. Another factor that might have contributed to the increased number of bacteria with weak adherence was the non-addition of glucose to the culture medium (recommended in most techniques), once we strongly sought to match the conditions found in dental unit waters.

Sodium hypochlorite and chlorhexidine were tested because of their frequent use in dentistry. Chlorine compounds have been studied more extensively than any other class of chemical agents intended to control or eliminate biofilm in DUWL (Mills, 2000). Several studies indicate the use of sodium hypochlorite at 0.5% (5000 p.p.m.) to disinfect DUWLs (Puttaiah *et al.*, 1998; Karpay *et al.*, 1999). However, due to its high corrosive power, we tested smaller concentrations for the same purpose.

Sodium hypochlorite at 0.25% (2500 p.p.m.) was able to inactivate all tested microorganisms. Due to possible damages from the use of a more concentrated solution both to patients and professionals and also to equipment, we suggested the use of sodium hypochlorite at 0.25% to decontaminate DUWLs. However, more studies about the frequency of DUWL decontamination with sodium hypochlorite at 0.25% and its impact on equipment, on other microorganism groups (Gram-positive bacteria, *Mycobacterium* spp., fungi) and on removal of already-present biofilm in the DUWLs are necessary.

*P. stutzeri* and bacteria that belonged to *Pseudomonas* genus, that is, *Burkholderia* spp., *D. acidovarans* and *S. maltophilia* were the most resistant microorganisms to sodium hypochlorite at 600 p.p.m.. Due to their ability to survive in aqueous mediums, these microorganisms became particularly problematic in hospital environments (Murray *et al.*, 2003). A study by Stampi *et al.* (1999) reports a strong resistance of *D. acidovarans* to chlorine. *S. maltophilia* was the microorganism which showed the highest number of strains resistant to chlorine at 1200 p.p.m. concentration. Today, this bacterial species is being better studied since it is frequently associated with hospital infections (Murray *et al.*, 2003).

Chlorhexidine is probably the most used compound in oral anti-septic compositions. New products with this active principle have been recommended by the FDA (Food and Drug Administration) to control DUWL contamination (Mills, 2000). Chlorhexidine shows good disinfectant activity and wide action range, nevertheless there are disadvantages such as possible skin irritability (McDonnel and Russel, 1999), high cost, possibility of color changes in restorations, teeth and tongue, and oral microbiota and gustation modification when continuously used (Lascalea and Moussali, 1999). According to our results, chlorhexidine should be used in a concentration higher than 0.12% to achieve better antimicrobial activity. Nevertheless, further studies must be performed to determine the ideal chlorhexidine concentration to use in dental unit waters and what the advantages and disadvantages of its use in higher concentrations are.

### **Acknowledgements**

The authors thank Dr. Ézio Vizoni for statistical analysis.

## REFERENCES

- Anonymous. ADA Council on Scientific Affairs. (1999) Dental unit waterlines: approaching the year 2000. *Journal of American Dental Association* **130**, 1653-1663.
- Barbeau, J., Tanguay, R., Faucher, E., Avezard, C., Trudel, L., Côté, L. and Prévost, A.P. (1996) Multiparametric analysis of waterline contamination in dental units. *Applied and Environmental Microbiology* **62**, 3954-3959.
- Donlan, R.M. (2001) Biofilms and device-associated infections. *Emerging Infectious Diseases* **7**, 277-281.
- Fayle, S.A. and Pollard, M.A. (1996) Decontamination of dental unit water systems: a review of current recommendations. *British Dental Journal* **181**, 369-372.
- Health Ministry, Ordinance Nº 1.469/MS, December 29th 2000. DOU de 19/01/2001. Brasília – DF, Brazil.
- Karpay, R.I., Plamondon, T.J. Mills, S.E. and Dove, S.B. (1999) Combining periodic and continuous sodium hypochlorite treatment to control biofilms in dental unit water systems. *Journal of American Dental Association* **130**, 957-965.
- Kelstrup, J., Funder-Nielsen, T.D. and Theilade, J. (1977) Microbial aggregate contamination of water lines in dental equipment and its control. *Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica* **85**, 177-183.
- Lascaia, N.T. and Moussali, N.H. (1999), In: *Compêndio Terapêutico Periodontal*, 3ª. Ed., Editora Artes Médicas, 263-264, São Paulo, SP.
- Lee, T.K.; Waked, E.J.; Wolinsky, L.E.; Mito, R.S. and Daneilson, R.E. (2001) Controlling biofilm and microbial contamination in dental unit waterlines. *CDA Journal* **29**, 679-684.
- Litsky, B.Y. and Litsky, W. (1968) Investigations on decontamination of hospital surfaces by the use of disinfectant-detergents. *American Journal of Public Health*. **58**, 534-543.
- Martin, M.V. (1987) The significance of the bacterial contamination of dental unit water systems. *British Dental Journal* **163**, 152-154.
- McDonnell, G. and Russell, A. D. (1999). Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. *Clinical Microbiology Reviews* **12**, 147-179.
- Meiller, T.F., DePaola, L.G.; Kelley, J.I.; Baqui, A.A.M.A; Turmg. B.F. and Falker, W.A.J. (1999) Dental unit waterlines: Biofilms, disinfection and recurrence. *Journal of American Dental Association* **130**, 65-72.
- Meiller, T.F., Kelley, J.I., Baqui, A.A. and DePaola, L. G. (2000) Disinfection of dental unit waterlines with an oral antiseptic. *The Journal of Clinical Dentistry* **11**, 10-15.

Mills, S.E., Lauderdale, P.W. and Mayhew, R.B. (1986) Reduction of microbial contamination in dental units with povidone-iodine 10%. *Journal of American Dental Association* **113**, 280-284.

Mills, S.E. (2000) The dental unit waterline controversy: defusing the myths, defining the solutions. *Journal of American Dental Association* **131**, 1427-1441.

Murdoch-Kinch, C.A., Andrews, N.L., Atwan, S., Jude, R., Gleason, M.J. and Molinari, J.A. (1997) Comparison of dental water quality management procedures. *Journal of American Dental Association* **128**, 1235-1243.

Murray, P.R.; Baron, E.J.; Jorgensen, J. H.; Pfaller, M. A. And Tenover, R.H. (2003) *Manual of Clinical Microbiology* 8 th ed., American Society of Microbiology, Washington, DC, USA.

Pankhurst, C.L. and Philpott-Howard, J.N. (1993) The microbiological quality of water in dental chair units. *Journal of Hospital Infection* **23**, 167-174.

Puttaiah, R., Karpay, R.I., Fabre, C., Sherman, L.R., Nemeth, J.F., Mills, S.E. and Plamondon, T.J. (1998) Dental unit waer line treatment with sodium hypochlorite and acetic acid. *Microchemical Journal* **59**, 333-340.

Stampi, S.; Zanetti, F.; Bergamaschi, A. and De Luca, G.(1991) *Comamonas acidovarans* contamination of dental unit water. *Letters in Applied Microbiology* **29**:52-55.

Stepanovic, S., Vukovic, D., Dakic, I., Savic, B. And Svabic-Vlahovic, M. (2000) A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *Journal of Microbiological Methods*, **40**, 175-179.

Tall, B.D., Williams, H.N, George, K.S., Gray, R.T. and Walch, M. (1995) Bacterial succession within a biofilm in water supply lines of dental air-water syringes. *Canadian Journal Microbiology* **41**, 647-654.

United States Pharmacopeia, 20<sup>th</sup> ed. Rockville, MD: United States Pharmacopeial Convention, Inc., 1980:732.

Xavier, H.V.M.; Bulla, J.R.; Luize, L.M.; Moreno, T.; Tognim, M.C.B. and Garcia, L.B. (2000) Análise bacteriológica da água de equipos odontológicos. *Acta Scientiarum* **22**, 631-636.

Walker, J.T., Bradshaw, D.J., Bennett, A.M., Fulford, M.R., Martim, M.V. and Marsh, P.D. (2000) Microbial biofilm formation and contamination of dental-unit water systems in general dental practice. *Applied and Enviromental Microbiology* **66**, 3363-3367.

Whitehouse, R.L.S., Peters, E., Lizotte, J. and Lilge, C. (1991) Influence of biofilms on microbial contamination in dental unit water. *Journal Dentistry*.**19**, 290-295.

Williams, J.F., Johnston, A.M., Johnson, B., Huntington, M.K. Mackenzie, C.D. and Path, M.R.C. (1993) Microbial contamination of dental unit waterlines: prevalence, intensity and microbiological characteristics. *Journal of American Dental Association* **124**, 59-65.

Williams, H.N., Quinby, H. And Romberg, E. (1994) Evaluation and use of a low nutrient medium and reduced incubation temperature to study bacterial contamination in the water supply of dental units. *Canadian Journal Microbiology* **40**, 127-131.

## 5 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos indicam a necessidade de tratamento da água utilizada nos equipos odontológicos, sendo que a descontaminação das mangueiras de água dos equipos odontológicos (MAEO) pode ser realizada com hipoclorito de sódio a 0,25% (metade da concentração preconizada na literatura). Entretanto, mais estudos quanto à periodicidade da descontaminação das MAEO são necessários.