

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

GUACYRA MACHADO LISBOA

**AVALIAÇÃO DO RISCO DE INFECÇÃO CRUZADA ATRAVÉS DAS LINHAS
D'ÁGUA DOS EQUIPOS ODONTOLÓGICOS NA REDE PÚBLICA ESTADUAL DE
ALAGOAS**

MACEIÓ
2011

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

GUACYRA MACHADO LISBOA

**AVALIAÇÃO DO RISCO DE INFECÇÃO CRUZADA ATRAVÉS DAS LINHAS
D'ÁGUA DOS EQUIPOS ODONTOLÓGICOS NA REDE PÚBLICA ESTADUAL DE
ALAGOAS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Alagoas para obter o Título de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde Área de Concentração: Morfologia Aplicada à Genética Médica.

Orientador: Prof. Dr. Eurípedes Alves da Silva Filho

MACEIÓ
2011

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico

Bibliotecária Responsável: Helena Cristina Pimentel do Vale

L769a Lisboa, Guacyra Machado.

Avaliação do risco de infecção cruzada através das linhas d'água dos
equipos odontológicos na rede pública estadual de Alagoas / Guacyra
Machado Lisboa. – 2011.

116 f. : il.

Orientador: Eurípedes Alves da Silva Filho.

Dissertação (mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal de
Alagoas. Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde. Maceió, 2011.

Bibliografia: f. 79-85.

Apêndices: f. 86-98.

Anexos: f. 99-116.

1. Biofilmes. 2. Contaminação da água. 3. Infecções – Controle. I. Título.

CDU: 616-022.1



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

Defesa da Dissertação de Mestrado da aluna Guacyra Machado Lisboa, intitulado: "Avaliação do risco de infecção cruzada através das linhas d'água dos equipos odontológicos na rede pública estadual de Alagoas", orientada pelo Prof. Dr. Eurípedes da Silva Alves Filho, apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde, da Universidade Federal de Alagoas, em 03 de junho de 2011.

Os membros da Banca Examinadora, consideraram a candidata APROVADA

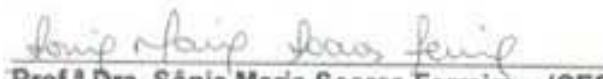
Banca Examinadora:



Prof.ª Dra. Diene Maria de Holanda - (ICBS- UFAL)



Prof. Dr. Francisco Javier Tovar – (ICBS – UFAL)



Prof.ª Dra. Sônia Maria Soares Ferreira– (CESMAC)

DEDICATÓRIA

À Taynah e Gyulia, meus “bebês”, com todo meu amor. Em vocês, busco força para continuar meu caminho e tornar, sempre que possível, o mundo um pouco melhor do que está.

A meu pai Flaviano Vieira Lisboa (in memoriam) seus ensinamentos como homem íntegro, honesto e trabalhador sempre guiaram minha vida. E a minha mãe Zenaide Machado Lisboa por todo carinho, apoio e compreensão recebido em todos os momentos de minha vida, tenho muito orgulho de ser sua filha.

Aos meus irmãos, Telma, João e Rosinha, aos meus cunhados Rogério e Genes e a minha cunhada Carla saibam que cada um a seu modo me ajudou a crescer.

A vocês, com carinho, dedico este trabalho.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao meu primeiro orientador, Prof. **Dr. Milton Fernando de Andrade e Silva**, pela atenção e disponibilidade que me dedicou durante o pouco tempo que estive sob sua tutela no mestrado. Levo comigo a certeza de que nossos caminhos se cruzarão outras vezes. E ao meu segundo e definitivo orientador, **Prof. Dr. Eurípedes Alves da Silva Filho**, por sua infinita bondade em aceitar me orientar, agradeço por seus ensinamentos, por sua amizade, pela paciência e confiança que depositou em mim e principalmente por tudo que aprendi.

“Se vi mais longe é porque estava nos ombros dos gigantes”

Isaac Newton

À Telma e Rogério Pinheiro, pela confiança e incentivo. Sem a preciosa ajuda que recebi de vocês, tudo teria sido muito mais difícil.

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.”

Madre Tereza de Calcutá

A **Krystianelly Patrícia Pedrosa Santa Rita**, “minha mamãe”, agradeço seu empenho para que fosse eu aceita no laboratório de microbiologia e genética, agradeço também por sua amizade, carinho e incentivo e por todas as vezes que me disse: isto é besteira, você consegue! Eu consegui! De coração muito obrigado.

“O valor das coisas não está no tempo que elas duram, mas na intensidade com que acontecem. Por isso existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis.”

Fernando Pessoa

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela vida e por sempre estar ao meu lado.

A todos que fazem parte dos setores de Bromatologia, Insumos, Administração, Recursos Humanos, Tecnologia da Informação e Transporte do Lacen- AL e em especial a seus respectivos chefes: Dr Everaldo Campos, Dra Janete Brito da Mota, Dr. Rubenstein Leite da Silva, Dra Cândida Rosa de Melo Christofolletti, Dr. João Batista Neto e João Jonas Rios, pela inestimável ajuda na realização deste trabalho.

À Selme, Carla, Margarida (Magal), Valéria e Djalma, pelas solicitações sempre atendidas com uma enorme boa vontade, pelos sorrisos e momentos agradabilíssimos, levo vocês no meu coração.

Aos amigos do setor de Biologia Molecular do Laboratório Central: Dr Jorge Alves, por ter me aceito em sua equipe e por todo aprendizado. Ao Dr. Jean Ferro, pelos ensinamentos que tanto me ajudaram a entender o mundo da microbiologia. Aos amigos: Marcos, Suzana, Luíza, Madalena, Vânia, Bethy e Bruno por tornarem agradável o ambiente de trabalho e pelo carinho com que me receberam.

As colegas do laboratório de Ambientes Climatizados: Mirella, Elaine, Rosana e Iara pela ajuda na parte micológica deste trabalho.

À Joyce pela ajuda nas extrações do DNA e pela paciência em me ensinar todas as técnicas que necessitei fazer; a Arianna e Luana pela ajuda nos Gram e a Marília pela disposição e infinita bondade durante as PCRs e géis.....Muito obrigada!

As amigas: Krys, Marília, Luana e Gabriele pela convivência, pela amizade, pelas conversas de apoio, pelos conselhos, pelos sorrisos e por todos os momentos vividos. Que Deus abençoe cada uma de vocês para que continuem sendo essas pessoas admiráveis que são.

Agradeço também aos outros colegas do Laboratório de microbiologia e genética: Bruna, Carol, Jordana e tantos outros que estiveram ao meu lado dividindo a bancada.

À professora Iracilda Maria de Moura Lima, pelas palavras de apoio e pelos conselhos sábios e pelos e-mails maravilhosos que muito me ajudaram a continuar a jornada.

Ao Professor Dr. Josealdo Tonholo e Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde por tornar possível este mestrado e por todo apoio recebido nas horas difíceis.

E a todos que transformaram minhas dificuldades, que foram muitas, em soluções, esperança e otimismo, na conclusão de mais uma etapa de minha vida.

“A pior coisa que pode acontecer na vida de uma pessoa, não é quando seu projeto não dá certo, seu plano de ação não funciona ou quando a viagem termina no lugar errado. O pior é não começar. Esse é o maior naufrágio”.

Amyr Klink

Não acrediteis em coisa alguma pelo fato de te mostrarem
o testemunho escrito de algum sábio antigo;
não acrediteis em coisa alguma com base na autoridade
de mestres e sacerdotes;
aquilo, porém, que se enquadrar na vossa razão,
e depois de minucioso estudo for confirmado
pela vossa experiência,
conduzindo ao vosso próprio bem
e ao de todas outras coisas vivas;
a isso aceitai como verdade;
por isso pautai vossa conduta.

Sakya-Muni (Buda)

RESUMO

Durante a rotina de trabalho, a equipe odontológica e os pacientes estão expostos a contaminação pelas águas utilizadas nas unidades dentais, através da ingestão acidental ou aspiração dos aerossóis gerados pela caneta de alta rotação e seringa tríplice. O presente estudo avaliou a qualidade da água dos equipamentos odontológicos da rede pública estadual de Alagoas, realizando a contagem de bactérias heterotróficas, a presença de coliformes totais e termotolerantes, assim como contagem de fungos filamentosos, potencialmente patogênicos e a presença de *Streptococcus mutans*. Foram coletadas água, da seringa tríplice, caneta de alta rotação com a peça de mão acoplada e desacoplada às mangueiras, reservatório de água e do local onde era abastecido o reservatório; de seis consultórios odontológicos. Para pesquisa de bactérias heterotróficas e fungos filamentosos volumes de 100 µl da amostra original e da diluição 10^{-1} foram semeados em duplicata, em meio Plate Count Agar adicionado de 50 mg.L⁻¹ de Cetoconazol e em Agar Sabouraud dextrose adicionado de cloranfenicol e ampicilina, 50 mg.L⁻¹ de cada. Os resultados foram expressos em UFC/mL. Para quantificação de coliformes totais e termotolerantes, foi utilizado o método do substrato enzimático (Colilert®) e os resultados foram expressos em NMP/100 mL, de acordo com tabela fornecida pelo fabricante. A pesquisa de *S. mutans* foi realizada utilizando o meio Mitis Salivarius Bacitracina com e sem desinfecção prévia com álcool a 70% dos pontos de coleta em placas de Petri e em um laminocultivo com meio Mitis Salivarius Bacitracina Sacarose sem limpeza prévia dos pontos de coleta. Todos os resultados foram expressos em UFC/mL e submetidos a testes moleculares para confirmação das identidades. Não foi observado o isolamento de *Streptococcus mutans*. Porém a alta contaminação encontrada indicou que a água era imprópria para o consumo humano; podendo ser considerada uma fonte potencial de infecções cruzadas.

Unitermos: biofilmes, contaminação da água, controle de infecções.

ABSTRACT

During routine work, the dental staff and patients are exposed to contamination by water used in dental units, through accidental ingestion or aspiration of aerosols generated by high-speed and air-water syringe. This study evaluated the water quality of the dental equipment of public dental offices in Alagoas, conducting the count of heterotrophic bacteria, filamentous fungi, as well as the presence of total and fecal coliforms and *Streptococcus mutans*. We collected water from air-water syringe, supply hoses with handpieces disconnected, handpieces with supply hose attached, reservoir and water where the reservoir was filled from six dental offices. To search for heterotrophic bacteria and fungi volumes of 100 μL of pure sample and 10^{-1} dilution were plated in duplicate on plate count agar medium supplemented with 50 mg.L^{-1} of Ketoconazole and Sabouraud dextrose agar supplemented with chloramphenicol and ampicilina, 50 mg.L^{-1} of each. The results were expressed in CFU/mL. For quantification of total and fecal coliforms, we used the method of enzyme substrate (Colilert $\text{\textcircled{R}}$) and the results were expressed in MPN/100ml, according to a table supplied by the manufacturer. The research of *S. mutans* was accomplished through the use Mitis Salivarius Bacitracin with and without prior disinfection with alcohol 70% of the collection points in Petri dishes and a vial with medium Mitis Salivarius Bacitracin Sucrose without prior disinfection of the collection points. All results were expressed in CFU/mL and subjected to molecular analysis to confirm the identities. We did not observe the isolation of *Streptococcus mutans*. However the high contamination found indicated that the water was unfit for human consumption can be considered a potential source of cross infections.

Key Words: biofilms, water contamination, infection control.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Recipiente utilizado na coleta de água com pastilha de tiosulfato de sódio a 10%.....	35
Figura 2	Organograma dos procedimentos realizados na primeira coleta.....	36
Figura 3	Esquema da divisão das amostras ocorrida na primeira coleta.....	37
Figura 4	Organograma dos procedimentos realizados na segunda coleta.....	38
Figura 5	Fluxograma da metodologia utilizada na pesquisa de bactérias Heterotróficas	45
Figura 6	Fluxograma da metodologia utilizada na pesquisa e identificação de fungos filamentosos.....	47
Figura 7	Fluxograma da reação ocorrida na técnica de substrato enzimático.....	48
Figura 8	Metodologia utilizada na pesquisa de coliformes totais e termotolerantes.....	49
Figura 9	Gabarito visual fornecido pelo fabricante para contagem de <i>Streptococcus.mutans</i> no laminocultivo.....	51
Figura 10	Aspecto macroscópico e microscópico de oito dos dezesseis gêneros isolados e identificados a partir de 30 coletas em seis unidades dentais da rede pública estadual de Alagoas.....	59
Figura 11	Aspecto macroscópico de colônias em meio MSB seletivo para <i>Streptococcus mutans</i>	61
Figura 12	Contagem e aspecto macroscópico de colônias crescida em meio MSB e MSBS seletivos para <i>S. mutans</i>	63
Figura 13	Eletroforese em gel de agarose dos produtos amplificados pela PCR para pesquisa de <i>S.mutans</i>	65
Figura 14	Eletroforese em gel de agarose dos produtos amplificados pela PCR para pesquisa de <i>S.mutans</i>	66

LISTA DAS TABELAS

Tabela 1	Reagentes utilizados na PCR para identificação de <i>Streptococcus mutans</i>	52
Tabela 2	Resultado quantitativo (média aritmética) em UFC/mL para bactérias heterotróficas, obtido a partir de 30 coletas em seis unidades dentais da rede pública estadual de Alagoas por ponto coletado.....	55
Tabela 3	Resultados das diferenças obtidas para bactérias heterotróficas, a partir de 60 coletas em seis unidades dentais da rede pública estadual por ponto coletado.....	56
Tabela 4	Análise qualitativa para fungos filamentosos e leveduras obtidas a partir de 30 coletas em seis unidades dentais da rede pública estadual de Alagoas por ponto coletado.....	57
Tabela 5	Número de isolados fúngicos e leveduras obtidos a partir de 30 coletas em seis unidades dentais da rede pública estadual de Alagoas por ponto coletado.....	57
Tabela 6	Número de isolados fúngicos por gêneros obtidos e identificados a partir de 30 coletas em seis unidades dentais da rede pública estadual de Alagoas.....	58
Tabela 7	Resultado quantitativo em NMP/100mL, para coliformes totais encontrados nas águas dos equipamentos das unidades de saúde da rede pública estadual de Alagoas por ponto pesquisado.....	60

Tabela 8	Média aritmética da concentração de <i>S.mutans</i> (UFC/mL) com desinfecção prévia dos pontos coletados obtidos a partir de 30 coletas em seis unidades dentais da rede pública estadual de Alagoas em meio MSB.....	61
Tabela 9	Média aritmética da concentração de <i>S.Mutans</i> (UFC/mL) sem limpeza prévia dos pontos coletados, obtidos a partir de 36 amostras inoculadas em placas de Petri em meio MSB e em vial com laminocultivo em meio MSBS, em seis unidades dentais da rede pública estadual de Alagoas.....	62
Tabela 10	Comparação estatística do nível de crescimento de colônias em amostras de água com e sem limpeza prévia dos pontos coletados obtidas de trinta seis coletas em seis unidades dentais da rede pública estadual de Alagoas em meio MSB por ponto de coleta.....	63
Tabela 11	Comparação estatística do nível de crescimento de colônias em amostras de água sem limpeza prévia dos pontos coletados obtidas de trinta e seis coletas em seis unidades dentais da rede pública estadual de Alagoas em meio MSB (placas de Petri) e MSBS (vial com laminocultivo).....	64

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

%	-	Porcentagem
<	-	Menor que
>	-	Maior que
°C	-	graus Celsius
X	-	Vezes
μL	-	microlitros
ADA	-	American Dental Association
AIDS	-	Síndrome da imunodeficiência adquirida
ANVISA	-	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ASD	-	Agar Sabouraud dextrose
ATCC	-	American Type Culture Collection
BSA		Soro Albumina Bovina
BHI	-	Brain Heart Infusion (infusão de cérebro e coração)
CD-ROM	-	Compact Disc-Read Only Memory
CO ₂		Dióxido de carbono
DNA	-	Ácido desoxirribonucléico
dNTP	-	Desoxirribonucleotídeos
et al.	-	E outros (abreviatura de et alli).
FIOCRUZ		Fundação Osvaldo Cruz
g	-	Grama
GE	-	Gel de Eletroforese
KB	-	KiloByte
LACEN-AL	-	Laboratório Central de Saúde Pública de Alagoas
mg.L ⁻¹	-	miligrama por litro
mL	-	Mililitro
mM		Milimolar
MSB	-	Mitis Salivarius Bacitracina
MSBS	-	Mitis Salivarius Bacitracina Sacarose

$\eta\text{g}.\mu\text{L}^{-1}$	- nanograma por microlitros
NaCl	- Cloreto de Sódio
NMP	- Número Mais Provável
p	Nível de significância estatística
pb	- Pares de base
PCA	- Plate Count Agar (Agar para contagem em placa)
PCR	- Polymerase Chain Reaction (Reação de Polimerização em Cadeia)
PDF	- Portable Document Format
pH	- Potencial hidrogeniônico
pmol	- Picomol
Primers	- Oligonucleotídeo que inicia uma reação de polimerização a partir de sua hibridização com a cadeia molde à qual é complementar.
rpm	rotação por minuto
SDS	- Dodecil Sulfato de Sódio
Taq	DNA polimerase isolada de <i>Termus aquaticus</i>
TRIS- EDTA	- Tris-(hidroximetil)-aminometano- Ácido etileno diamino tetracético
U.g^{-1}	- Unidade por grama
UFC	- Unidade Formadora de Colônia
UI.mL^{-1}	- Unidade Internacional por mililitro
$\text{U}.\mu\text{L}^{-1}$	Unidade por microlitro
v/v	- Volume por volume

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 OBJETIVO	20
3 REVISÃO DA LITERATURA	21
3.1 A Qualidade das Águas Utilizadas nas Unidades Dentais no Mundo.....	21
3.2 A Qualidade das Águas Utilizadas nas Unidades Dentais no Brasil	28
3.3 A Qualidade das Águas Utilizadas nas Unidades Dentais no Nordeste.....	32
4 MATERIAIS E MÉTODOS	35
4.1 Coleta das Amostras.....	35
4.1.1 Primeira Coleta.....	36
4.1.2 Segunda Coleta.....	38
4.2 Composição e Preparo dos Meios e Soluções Utilizados nas Coletas	40
4.3 Inoculação e Cultivo das Amostras	44
4.3.1 Bactérias Heterotróficas	44
4.3.2 Fungos Filamentosos e Leveduras	46
4.3.2.1 Identificação dos Fungos Filamentosos	46
4.3.3 Coliformes Totais e Termotolerantes.....	48
4.3.4 <i>Streptococcus mutans</i>	49
4.3.4.1 <i>S. mutans</i> com Desinfecção Prévia dos Pontos de Coleta Estudados.....	49
4.3.4.2 <i>S. mutans</i> sem Desinfecção Prévia dos Pontos de Coleta Estudados.....	50
4.3.4.2.1 Placas de Petri com meios MSB	50
4.3.4.2.2 Laminocultivo com meio MSBS.....	50
4.3.4.3 Identificação do <i>Streptococcus mutans</i>	51
4.4 Análise Estatística.....	53
5 RESULTADOS.....	55
5.1 Bactérias Heterotóxicas	55
5.2 Fungos Filamentosos e Leveduras	57
5.3 Coliformes Totais e Termotolerantes	60
5.4 Streptococcus mutans.....	61

5.4.1 Com Desinfecção Prévia dos Pontos de Coleta Estudados	61
5.4.2 Sem Desinfecção Prévia dos Pontos de Coleta Estudados	62
5.3.4 Identificação do <i>Streptococcus mutans</i>	64
6 DISCUSSÃO	67
6.1 Bactérias Heterotóficas	67
6.2 Fungos Filamentosos e Leveduras	71
6.3 Coliformes Totais e Termotolerantes	73
6.4 Streptococcus mutans.....	74
7 CONCLUSÕES	78
REFERÊNCIAS.....	79
APÊNDICES	86
APÊNDICE A Ilustrações dos Pontos de Coletas.....	87
APÊNDICE B Ilustrações dos Pontos Pesquisados no Momento da Coleta	92
APÊNDICE C Modelo do Protocolo de Recebimento do CD-ROM e Ilustração da Capa do Manual da ANVISA	94
APÊNDICE D Modelo do Protocolo de Recebimento dos Laudos	96
APÊNDICE E Modelo do Laudo Microbiológico	97
ANEXOS	99
ANEXO A Protocolo e Aprovação pela Secretária Estadual de Saúde para Coleta de Dados.....	100
ANEXO B Aprovação Para a Realização do Projeto Pelo Colegiado do Curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde	101
ANEXO C Artigo a Ser Submetido ao Periódico Journal of the American Dental Association	102

1 INTRODUÇÃO

A qualidade da água ofertada a população para utilização nas tarefas básicas diárias como beber, tomar banho ou cozinhar tem sido uma constante preocupação de especialistas em saúde pública em todo mundo.

No Brasil, ainda não existem normas específicas para avaliação da qualidade bacteriológica da água utilizada nos equipos odontológicos, existe apenas, uma legislação que regulamenta as águas de abastecimento público.

A portaria número 518 de 25 de março de 2004 do Ministério da Saúde determina que, para avaliar a qualidade da água potável fornecida à população pelos sistemas de distribuição públicos, sejam feitas análises bacteriológicas mensais, realizando-se pesquisas de coliformes totais e coliformes termotolerantes em todas as amostras colhidas. E em 20% destas amostras deve ser efetuada a contagem de bactérias heterotróficas que não devem exceder a um limite máximo de 500 unidades formadoras de colônia (UFC) de bactérias heterotróficas por mililitro de água; uma vez excedido este limite, deve ser providenciada imediata recoleta, inspeção local e se constatada irregularidade, outras providências cabíveis. (BRASIL, 2004a).

No serviço público, normalmente, a responsabilidade de fiscalizar os procedimentos de biossegurança fica ao encargo dos odontólogos, que além do imenso volume de trabalho junto ao paciente, acumula função de monitorar a equipe auxiliar nesses procedimentos, resultando assim, em uma atenção maior com as superfícies e instrumentais em detrimento das linhas d água dos equipos.

Nas peças de mão, na maioria das vezes, são apenas realizada desinfecção por fricção com álcool a 70% a cada troca de paciente, não havendo portanto uma limpeza mais efetiva como autoclavagem das pontas da seringa tríplice e da caneta de alta rotação, esta última, quase sempre, só é trocada quando apresenta mau funcionamento e raramente são autoclavadas, seja por temor que o procedimento danifique os rolamentos da peça de mão, seja por falta de outras canetas na unidade de saúde para ser realizada a troca, ou ainda por desconhecimento ou negligência.

Considerando o potencial de risco na transmissão de microrganismos causadores de doenças durante tratamentos odontológicos, torna-se importante à preocupação com o controle da qualidade da água utilizada nos equipamentos odontológicos da rede estadual de saúde de nosso estado, que tem como função o atendimento especializado a pacientes que necessitam de procedimentos de urgência e/ou emergência, e que muitas vezes se encontram comprometidos imunologicamente.

Assim, a proposição deste trabalho é de avaliar o nível de contaminação da água utilizada nos equipos odontológicos das unidades de saúde sob a tutela da Secretaria Estadual de Alagoas. Os resultados obtidos contribuirão para a busca de medidas que minimizem a presença de microrganismos patogênicos diminuindo, conseqüentemente, a possibilidade de contaminação para pacientes e profissionais.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral:

Avaliação microbiológica, associada ao risco de infecção cruzada, da água utilizada nos equipos odontológicos instalados na rede pública estadual de Alagoas.

2.2 Objetivos Específicos:

- 1- Quantificar bactérias heterotróficas e fungos filamentosos presentes nas águas utilizadas nos equipos odontológicos da rede pública estadual de Alagoas;
- 2- Identificar os fungos filamentosos em nível de gênero;
- 3- Avaliar a presença de bactérias do grupo coliformes (totais e termotolerantes) nas águas dos equipos odontológicos da rede pública estadual de Alagoas;
- 4- Detectar *Streptococcus mutans* nas águas utilizadas nos equipos odontológicos da rede pública estadual de Alagoas e realizar a sua identificação molecular, através da técnica da PCR-GE.

3 Revisão da Literatura

3.1 A qualidade das águas utilizadas nas unidades dentais no mundo

Murray e Slack em 1957 testaram alternativas que diminuíssem a presença de microrganismos nos consultórios odontológicos, para isso eles selecionaram 20 seringas de ar das unidades dentais instaladas em um hospital de Liverpool, onde primeiramente pressionaram as seringas cinco milímetros de distância em placas contendo ágar sangue, depois colocaram um chumaço de algodão estéril na entrada das mangueiras que levavam as seringas, de forma a fazer um filtro e coletaram a água nas placas com ágar sangue. Repetiram a operação mais uma vez só que desta vez embeberam o algodão estéril em uma solução de paramonoclorofenol canforado. As placas foram incubadas por 48 horas e somente as placas onde foi utilizado algodão com paramonoclorofenol canforado não apresentaram crescimento bacteriano.

Concluíram que as seringas de ar estavam contaminadas e esta contaminação poderia ser eliminada utilizando um algodão estéril embebido em paramonoclorofenol canforado como um filtro.

Buscando verificar o nível de contaminação microbiana existente nos consultórios odontológicos, Sciaky e Sulitzeanu (1961), examinaram a presença de microrganismos em 30 seringas tríplexes, 15 mesas auxiliares e no ar em volta de 15 equipos odontológicos. Os resultados mostraram que apesar do ar em volta dos equipos se encontrar livre de microrganismos, o ar, a água, o spray das seringas tríplexes e as mesas auxiliares se encontravam com um considerável grau de contaminação.

Blake, em 1963, analisou o potencial de contaminação da água dos equipos odontológicos em um hospital, efetuando a contagem de microrganismos presentes em dois tipos de reservatórios: nove reservatórios tipo garrafas, de fácil remoção e limpeza, que abasteciam as seringas tríplexes e três fixos, que não podiam ser removidos e de difícil limpeza, que abasteciam as canetas de alta rotação. Para conseguir um número de microrganismos, foi pipetado 0,5 mL de cada reservatório e colocado em 15 mL de

caldo glicosado, seguido de homogeneização e diluições seriadas; alíquotas de 1,0 mL foram semeadas em meio agar sangue e incubadas em anaerobiose por 24 horas a 37 °C. Os resultados mostraram que as águas retiradas dos 3 reservatórios fixos apresentaram contagem de 10×10^3 , $1,03 \times 10^5$ e $2,52 \times 10^5$ respectivamente e dos reservatórios que abasteciam as seringas tríplexes, cinco não apresentaram crescimento bacteriano e quatro apresentaram contagens iguais a $9,6 \times 10^5$, $6,7 \times 10^5$, $4,3 \times 10^5$ e $8,5 \times 10^4$, respectivamente. O autor conclui que os dois tipos de reservatórios estavam contaminados.

Mohammed, Manhold e Manhold em 1964, ao estudar meios de diminuir a presença de microrganismos no aerosol da caneta de alta rotação, demonstraram que ao lavar a cavidade oral com um enxaguante bucal, antes da realização de procedimentos operatórios tornava mais efetiva a diminuição do número de microrganismos no spray da caneta de alta, do que quando a boca era lavada somente com água destilada.

Para observar a contaminação microbiana em consultórios particulares, Abel *et al* (1971), coletaram água primeiramente apenas de canetas de alta rotação e seringas tríplexes. Após, coletaram água de vários pontos: mangueiras das canetas de alta rotação com as canetas de alta rotação conectadas e desconectadas, das seringas tríplexes e das águas das torneiras que supriam as unidades dentais. Como conclusão, recomendaram aos dentistas testar a água das canetas de alta rotação e das seringas tríplexes, utilizando um método descrito pelos autores como muito simples, que consistia em acionar as peças de mãos coletando uma alíquota de aproximadamente 0,1 mL em uma placa com meio ágar sangue ou BHI, esperar o meio absorver a água, inverter e incubar a 37 °C por 48 horas. Em caso de crescimento de mais de 1000 colônias a água deveria ser considerada poluída e ações corretivas deveriam ser implementadas para retornar água aos padrões de potabilidade.

Examinando a flora nasal de trinta dentistas e vinte e nove atendentes, Clarck (1974) demonstrou que três atendentes tinham alteração na flora nasal e dos trinta dentistas quatorze também tinham alteração na flora nasal. Dezesete dentistas

reclamavam de rinite e, destes, dez tinham anormalidade na flora nasal. Quatro dentistas tinham a flora nasal anormal, mas não tinham queixa de rinite. Das atendentes, apenas um tinha reclamação de rinite, mas possui a flora nasal normal. Os microrganismos isolados da flora nasal dos dentistas e atendentes foram: *Pseudomonas* spp, *Proteus* spp, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas cepacia*, *Aeromonas* spp, *Klebsiella* spp e microrganismos típicos da água.

Segundo Gross, Devine e Cutright (1976), após examinarem a qualidade da água de doze equipos e nove aparelhos de ultra-sons, concluíram que o flushing de dois minutos reduzia o nível de contaminação microbiana, mas não realiza sua completa eliminação; e que a água contaminada pode potencialmente provocar infecções em dentistas e pacientes, principalmente nos imunocomprometidos.

Bagga *et al.* em 1984 estudando o refluxo que ocorre nas águas das canetas de alta rotação para dentro das mangueiras quando da desaceleração da caneta de alta rotação, realizou a comparação entre duas válvulas usadas nas unidades dentais por ele pesquisadas. Recomendou a remoção das válvulas que o autor chamou de retração e colocação das válvulas por ele denominada de anti-retração. Sugeriu ainda a esterilização das peças de mão entre as consultas, como forma de minimizar a contaminação cruzada e diminuir as chances de causar uma doença iatrogênica.

Em 1986, Mills, Lauderdale e Mayhew, objetivando reduzir o biofilme formado nas unidades dentais, testaram o potencial de povidine a 10% na descontaminação das linhas d'água. Dez equipos foram usados nesta pesquisa; em cinco, os reservatórios foram preenchidos apenas com água esterilizada e nos outros cinco foi colocado uma solução de povidine por 12 horas em overnight. Após os reservatórios foram preenchidos com água estéril, e todos os consultórios foram operados por 22 dias. Amostras de água foram obtidas em 24 horas, 72 horas, 8 dias, 14 dias e 22 dias. Os resultados mostraram que os reservatórios que usaram povidine overnight ficaram livres de contaminação de três a quatorze dias, enquanto os consultórios abastecidos apenas com água estéril apresentaram contaminação em todas as coletas. Os autores

concluíram que apenas água esterilizada não é eficiente para reduzir o nível de contaminação microbiana.

Mayo, Oertling e Andrieu (1990), estudaram a qualidade das águas dispensadas através das seringas tríplices de seis unidades dentais que não foram utilizadas por 48 horas, com o objetivo de verificar se a realização do flush nas seringas tríplices seria capaz remeter os níveis de contaminação bacteriana a níveis aceitáveis para potabilidade da água (<500 UFC/mL). Concluíram que um flush de 6 minutos reduziu a níveis aceitáveis de contaminação para água ser considerada potável em apenas duas das seis amostras colhidas. E recomendou a realização do flush adicionado de um biocida para uma redução mais efetiva dos níveis de contaminação nas linhas d'águas das unidades dentais.

Lewis e Boe (1992) tentaram simular o que ocorria com o material do paciente dentro da caneta de alta rotação, para isso injetou ou colocou externamente na caneta uma solução corante e demonstrou que o compartimento de ar da caneta serviu como um reservatório para o material que foi deslocado lentamente pelo ar e expelido durante o procedimento e posteriormente foi diluído pelo spray de água. Comprovando o fato de que parte de materiais dos pacientes poderia residir em partes internas do equipamento onde normalmente não são desinfetados e que o material poderia ser posteriormente pulverizado em cortes e abrasões na cavidade oral e que apenas a limpeza externa da caneta com o flushing não eram suficientes para a proteção dos pacientes atendidos depois de pacientes infectados e concluiu que a autoclavagem e a limpeza devem ser componentes essenciais de um protocolo universal para evitar a infecção cruzada.

As principais espécies microbianas que colonizam as unidades dentais são de acordo com Shearer (1996), bactérias, fungos e protozoários de vida livre. E os vírus como o da AIDS não se multiplicam nas linhas d' água, embora exista a possibilidade de fluídos humanos serem aspirados de volta para o interior das canetas de alta rotação e mangueiras fazendo com que parte deste material possa ser transferido ao próximo paciente.

Três anos depois, Meiller *et al.* (1999) estudou a recorrência do crescimento bacteriano nas linhas d'água dos equipos odontológico, para isso testou três agentes químicos: hipoclorito de sódio, glutaraldeído e isopropanol a 15,5%. Observou que esses agentes reduziam a quantidade de microrganismos nas linhas d'água, mas eram pouco eficazes para destruir a matriz do biofilme, que mesmo com tratamentos periódicos, a população bacteriana voltava rapidamente se recolonizar nas linhas d'águas. E concluiu que agentes químicos ou outros agentes podem ficar preso na matriz do biofilme podendo representar um risco adicional para o paciente.

No intuito reduzir a colonização e o crescimento de bactérias heterotróficas, Linger *et al.* (2001) investigaram o uso de um desinfetante a base de peróxido de hidrogênio nas linhas de água de unidades dentais. Escolheram vinte e três unidades dentais com sistemas de água independentes que foram selecionados aleatoriamente dentre as 76 unidades existentes na University of Detroit Mercy Simulation Lab. Três dessas unidades abastecidas com água da torneira serviram como controle. Vinte e quatro amostras de água foram colhidas no início do estudo e uma vez por semana durante cinco semanas. Concluíram que o desinfetante a base de peróxido de hidrogênio foi eficaz na melhoria da qualidade da água utilizada para procedimentos intraorais e que cumpriu a meta da ADA (200UFC/mL).

Em qualquer sistema de circulação de água, 99% das bactérias estão protegidas em biofilmes, aderidas às superfícies internas. Um biofilme maduro, completo, atua como se um tecido vivo existisse na superfície interna de uma tubulação, semelhante de um endotélio vascular. O biofilme é uma comunidade complexa, formada por microrganismos, incluindo bactérias, fungos e protozoários, aderidos por uma matriz de polissacarídeos e glicoproteínas, metabolicamente cooperativa, construída por espécies diferentes, cada uma vivendo em um micro-nicho. O crescimento do biofilme é favorecido nos equipos odontológicos devido à estagnação da água nas mangueiras que são feitas de plástico, com superfícies irregulares, de fino calibre e de difícil limpeza. (COSTERTON *et al.*, 1987; BERNAT *et al.*, 2001).

A presença de biofilme nas linhas d'água de equipos odontológicos e o tempo de flush necessário para reduzir a contaminação microbiana a níveis aceitáveis, foi avaliada por Cobb *et al.* (2002). O estudo foi realizado em 12 canetas de alta rotação, escolhidas ao acaso, dentre as 220 existentes na University of Missouri- Kansas city, School of Dentistry. Quatro amostras de 50 mL de água foram coletadas da seguinte maneira: tempo 0, 2, 3 e 4 minutos de flush contínuo. Parte de fragmentos das linhas d'água também foram analisados em microscópio eletrônico de varredura que demonstrou presença de biofilme em todos os equipamentos. Os autores concluíram que o flush contínuo de 4 minutos reduzia bastante o nível de contaminação, mas fica ainda muito acima do considerado ideal pela ADA (200 UFC/mL).

McDowell *et al.* (2004) testaram a capacidade de um produto à base de percarbonato de sódio, nitrato de prata e surfactantes catiônicos, A-dec ICX (A-dec, Newburg, Oregon), em forma de pastilha efervescente adicionado diretamente aos reservatórios dos equipo odontológicos para a inibição da formação de biofilme nas linhas d'água. Os resultados mostraram que o produto era eficiente para evitar a formação de biofilme por até 16 semanas. Os autores concluíram que o produto é fácil de utilizar e reduz as preocupações sobre contaminação bacteriana nas águas das unidades dentais.

Com objetivo de determinar se a prevalência de doenças respiratórias entre os estudantes e residentes de odontologia variava de acordo com a exposição ao ambiente da clínica odontológica, Scannapieco *et al.* (2004) estudou 817 alunos em três escolas de odontologia e concluiu que não havia associação entre a prevalência de doenças respiratórias e do número de anos de permanência por aluno na escola de odontologia ou exposição prévia a um ambiente odontológico como paciente. Estes resultados sugerem que a exposição ao ambiente odontológico não aumenta o risco de infecção respiratória em profissionais de odontologia.

Schell *et al.* em 2005 realizou um estudo para comparar alguns produtos utilizados como desinfetante nas linhas d'água das unidades dentais para testar o potencial destes produtos em atender a diretriz da American Dental Association de

reduzir para <200 UFC/mL a contaminação microbiana nas linhas d'água. Os produtos escolhidos foram: Alpron, BioBlue, Dentosept, Oxygenal, Sanosil, Sterilex Ultra, e Ster4Spray, testados em 134 unidades dentais situadas, na Dinamarca, Alemanha, Grécia, Irlanda, Holanda, Espanha e Reino Unido. Concluíram que os produtos aplicados continuamente possuíam um desempenho melhor do que o dos produtos aplicados intermitentemente. Os produtos mais eficazes foram Dentosept e Oxygenal, embora Dentosept obtivesse um efeito antimicrobiano mais prolongado.

A avaliação da concentração e a composição da flora fúngica em linhas de água dos equipos odontológicos foram realizadas por Szymanska (2006); onde amostras da água do reservatório, da caneta de alta rotação e do biofilme formado nas paredes das linhas d'água antes e após desinfecção com peróxido de hidrogênio foram analisadas. Foi observado que antes da desinfecção, *Candida albicans* e *Candida curvata* constituíram a maior proporção do total de fungos na água dos reservatórios, contudo na água da caneta de alta rotação a maior proporção era de *Candida albicans* e *Aspergillus glaucus*, e nas amostras de biofilme, *Aspergillus glaucus* e *Candida albicans* obtiveram maior contagem. Após a desinfecção, em todos os três pontos pesquisados, *Candida albicans* prevaleceu, constituindo 31,2 (85,7%) do total de fungos. Concluiu que a aplicação do agente contendo peróxido de hidrogênio causou uma diminuição significativa tanto no número total de fungos, como no número individual de espécies de fungos, o que confirma a eficácia do produto na descontaminação das linhas d'água dos equipo odontológico.

Um estudo *in vivo* foi realizado por Herd *et al.* em 2007, com 20 pacientes para determinar se os contra-ângulos da caneta de baixa rotação poderiam tornar-se contaminados com a flora oral, quando utilizado durante profilaxia. Os resultados mostraram que 75% dos contra-ângulos apresentaram crescimento bacteriano e concluíram que as superfícies internas canetas de baixa rotação ficaram contaminadas após profilaxia e recomendaram esterilização adequada após cada utilização, para evitar risco para infecção cruzada.

Porteous e Partida (2009) compararam a qualidade da água de três reservatórios de um ambulatório de ensino odontológico que foram tratadas com um produto à base de dióxido de cloro a outras três unidades dentais semelhantes, sem nenhum tratamento químico, que foram utilizadas como controle. Amostras de água foram coletadas de cada unidade e das torneiras que abasteciam os reservatórios em seis períodos de tempo diferentes e a frequência de uso de cada linha foi anotado. Após quatro semanas de teste, foram cruzados os resultados. A análise estatística mostrou que a maior frequência de utilização de linhas de água não afetou o nível de contaminação das linhas que foram quimicamente tratadas, mas apresentou uma menor contaminação nas linhas não tratadas.

3.2 A qualidade das águas utilizadas nas unidades dentais no Brasil

Fantinato *et al.* (1992) observou a contagem de bactérias heterotróficas da água utilizada em 83 equipos de escolas de odontologia e 10 equipos de consultórios particulares que foram utilizados como controles. O resultado mostrou que apenas um dos oitenta e três equipos estudados e dois dentre os utilizados como controle estavam dentro do padrão de potabilidade da água de 500 UFC/mL.

Baseados neste estudo em 1995, Fantinato e colaboradores, com o objetivo melhorar a higienização dos reservatórios do equipos, testou um anti-séptico à base de cloramina em 10 equipos odontológicos pelo período de 28 dias. Foi observado que todos equipos possuíam água com elevado número de bactérias heterotróficas antes da utilização do Calbenium (Airel- França) e que após adição de referido produto à água, as bactérias foram eliminadas.

A avaliação da qualidade da água que alimenta as canetas de alta rotação de quatro ambulatórios da Faculdade de Odontologia da UFRGS, através de análise microbiológica quantitativa foi realizada por Bianchi *et al.* (1998). Em um total de 27 amostras de água, analisou-se o número de UFC/mL, através da contagem de bactérias heterotróficas pelo método de Pour Plate e a presença ou ausência de coliformes totais e fecais usando o método dos túbulos múltiplos. Os resultados revelam que 24 das 27 amostras (88,89%) analisadas para bactérias heterotróficas estavam fora dos padrões

de potabilidade, apresentando contagens de UFC/mL com variação de 1,2 a mais de 130 vezes além do permitido. Apenas uma das amostras apresentou coliformes totais e nenhuma das amostras apresentou coliformes fecais.

Um total de 72 análises bacteriológicas foram realizadas por Xavier *et al.* (2000) em amostras de água de 68 equipos e de quatro torneiras, para verificar a qualidade microbiológica da água através da contagem de bactérias heterotróficas e pesquisa de coliformes. As amostras coletadas das torneiras apresentavam valores compatíveis com os padrões de potabilidade e das 68 amostras obtidas dos equipos 63 estavam contaminadas. Não foi encontrado coliforme nas amostras coletadas. Os autores concluíram que os resultados apontavam para a necessidade de cuidados especiais, tais como a descontaminação e a desinfecção periódica dos sistemas de água dos equipos.

Em 2001, Sant'anna *et al.*, conduziram um estudo onde segmentos de mangueiras das canetas de alta rotação foram retirados de 22 consultórios nas diversas clínicas especializadas do Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais (HRAC-USP) e foram submetidos à avaliação bacteriológica. Demonstraram que todas as culturas realizadas foram positivas com uma alta frequência de bacilos Gram negativo não fermentadores da glicose.

A investigação da existência de contaminação na água da seringa tríplice em 40 consultórios particulares e populares da cidade de Taubaté, as possíveis correlações com o tipo de reservatório, origem da água de abastecimento e limpeza realizada foi obtida por Chibebe, Ueno e Palos (2002). As águas coletadas foram avaliadas pela técnica de plaqueamento em profundidade para contagem total de microrganismos aeróbios mesófilos. As amostras de água provenientes de 29 equipamentos apresentaram níveis de contaminação elevados e fora do limite permitido para o consumo humano. Os consultórios particulares apresentaram menor taxa de contaminação, assim como os consultórios que utilizaram o reservatório tipo PET. Não foi encontrada nenhuma correlação entre o tipo de limpeza realizada ou o tipo de água de abastecimento com a contaminação da água.

A qualidade da água dos reservatórios de equipamentos odontológicos, por meio de análise microbiológica, realizando a contagem de coliformes totais, coliformes fecais e bactérias heterotróficas foi efetuada por Araujo e Lopes–Silva (2002). As amostras de água foram coletadas dos reservatórios de equipamentos odontológicos, em consultórios de odontopediatria e foi também questionado a fonte de abastecimento destes. A análise dos resultados permitiu concluir que metade das amostras de água analisadas não atendeu aos padrões de potabilidade estabelecidos pelo Ministério da Saúde, podendo ser consideradas fonte potencial de infecção cruzada e sugeriram que os cirurgiões-dentistas precisariam seguir normas de biossegurança no que se refere à procedência e ao manuseio da água do equipamento odontológico.

Bittencourt *et al.* (2003) avaliou cinco canetas de alta-rotação de diferentes marcas comerciais com relação a contaminação das linhas internas. Para isso contaminou todas as canetas com *Bacillus Sthearothern nophilus* simulando atendimento em clínica, descontaminando-as em seguida com álcool etílico 70% e após esterilizando-as a vapor sob pressão á temperatura de 134°C por 30 minutos. Os resultados mostraram que 80% das canetas apresentaram contaminação após os procedimentos de esterilização e em 40% houve contaminação das linhas d'água.

Souza-Gugelmin *et al* (2003) demonstraram a ocorrência de contaminação microbiana nas linhas d'água dos equipos odontológicos coletadas do reservatório, seringa tríplice e caneta de alta rotação. De 15 unidades dentais de consultórios privados de Ribeirão Preto. Os autores concluíram que possivelmente a água dos consultórios fosse contaminada pelo biofilme formado nas tubulações dos equipos.

A ocorrência de contaminação microbiana associada ao risco de infecção cruzada da água de 14 equipos instalados em consultórios públicos foi avaliada por Xavier, Bertolin e Naval em 2006. Os autores observaram que não houve diferença estatisticamente significativa entre os níveis de contaminação das águas das seringas tríplices e turbinas de alta rotação e entre seringas tríplices e mangueiras das turbinas. Contudo uma grande porcentagem das amostras obtidas das turbinas de alta rotação,

mangueiras das turbinas e seringas tríplexes, encontrava-se fora dos padrões preconizados pela ADA (< 200 UFC/mL).

Watanabe et al.(2006) comparou e avaliou o nível de bactérias aeróbias mesófilas totais presentes em amostras de água da caneta alta rotação, de 10 equipos odontológicos da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP, por meio do método tradicional/convencional pour plate e o método rápido Petrifilm™ AC (3M, St Paul,MN, USA). Concluíram que o método rápido Petrifilm™ foi mais prático que o tradicional, e totalmente adequado para monitorar a contaminação microbiana das águas das canetas de alta rotação que estavam acima do recomendado pela American Dental Association (<200 UFC/ml) e do permitido pela legislação brasileira (<500 UFC/ml).

No mesmo ano, Galvão, Mota e Alvarez-Leite (2006), avaliaram a contaminação da água das tubulações dos equipamentos odontológicos e a eficácia do sistema de descontaminação por cloração utilizada nas clínicas da Faculdade de Odontologia da Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais. Foi verificado que o nível de contaminação das amostras de água das conexões dos equipamentos eram superiores aos encontrados nos reservatórios apresentando um crescimento microbiano superior aos limites estabelecidos pela ADA. Após a utilização do sistema de descontaminação (Flush®), houve redução dos microrganismos presentes na tubulação, tornando-a adequada para o procedimento clínico odontológico.

Para Xavier (2006), o modelo de atendimento odontológico na rede pública, onde há um intenso fluxo de pacientes usando um único equipo durante todo o dia e, às vezes, uma única turbina, o contato constante da turbina com a saliva e a ausência de esterilização, facilita a proliferação de vários microrganismos patogênicos, formando biofilmes e tornando os equipamentos odontológicos possíveis veículos de disseminação de doenças na população.

Pereira *et al.* (2008) avaliaram a rotina de descontaminação das canetas odontológicas de alta rotação e verificaram a ação bactericida e fungicida do álcool etílico a 70% na descontaminação dessas canetas segundo a rotina adotada para o

reprocessamento em sete unidades básicas de saúde do município de Goiânia. Os autores observaram que após o uso do álcool etílico a 70% nas canetas de alta rotação, as mesmas acusavam a presença de microrganismos potencialmente patogênicos na superfície. Observaram também que o álcool etílico a 70% sem limpeza prévia da peça de mão, foi a ação predominantemente executada nos processos de descontaminação de canetas de alta rotação entre atendimentos nas unidades pesquisadas e concluíram que o álcool etílico a 70% não foi eficiente para inativar os microrganismos para os quais está provada a sua ação biocida.

Watanabe *et al* (2008) avaliaram por meio de Petrifilm™ sistema (3M, St Paul, MN, EUA), o nível de contaminação da água por bactérias aeróbias de equipos antigos e novos antes e depois flushing pelas linhas d'água e a presença de coliformes totais e fecais. Foram retiradas amostras de água das seringas tríplex e canetas de alta rotação. Os equipos antigos tinham treze anos de uso e os novos um ano. Vinte e quatro unidades dentais foram utilizadas neste estudo. Os resultados mostraram que as águas filtradas da torneira que abasteceram previamente os reservatórios das unidades apresentaram um baixo nível de contaminação bacteriana (4 a 15 UFC/mL). No entanto, todas as amostras de água das unidades dentais fossem novas ou velhas, estavam altamente contaminadas. O flushing reduziu a contagem de bactérias em todas as unidades, mas a redução foi maior nas unidades novas que nas unidades antigas. *E. coli* e coliformes totais não foram detectados em nenhuma das amostras de água analisadas, e concluíram que o flushing é uma medida simples que deve fazer parte da rotina odontológica, devido ao fato de reduzir o nível de bactérias aeróbias totais em água de antigas e novas unidades dentais.

3.3 A qualidade das águas utilizadas nas unidades dentais no nordeste do Brasil

A qualidade da água dos equipos odontológicos de Recife, Pernambuco foi analisada por Aguiar e Pinheiro (1999). Um total de 148 amostras de 37 equipos odontológicos foram avaliadas e distribuídas em três grupos de acordo com a localização dos reservatórios e a disponibilidade do sistema de anti-sepsia Flush®. Os

autores observaram que a maioria das amostras de água (116 de 148 amostras), não satisfazia aos critérios de potabilidade estabelecidos pelo Ministério da Saúde. Assim como, não foram observados os supostos efeitos bactericidas do sistema Flush®. Os resultados mostraram que melhor padrão bacteriológico foi detectado nas amostras que procediam de reservatórios situados no solo dos consultórios.

No ano seguinte, os mesmos autores avaliaram a eficácia antimicrobiana das soluções usadas no tratamento de amostras de água procedentes de trinta equipos odontológicos, em Recife, Pernambuco. Os equipos foram aleatoriamente divididos em três grupos, onde cada um deles forneceu 80 amostras de água (40 experimentais e 40 controles). Reservatórios, canetas de alta rotação, seringas de tríplice e mangueiras sem a turbina serviram de locais de coleta. As amostras foram obtidas antes e depois da adição das soluções antimicrobianas. As soluções testadas foram: hipoclorito de sódio a 1% (Roval-Recife) (diluicao 1:100); timol a 0,64%, eucaliptol a 0,09% e salicilato de metila a 0,06% (Listerine TM– Warner-Lambert Co.-USA) (diluicao de 2 :100) ; e 0,5 mg de cloreto de cetilperidinium (Cepacol ®-Hoechst Marion Roussel S/A-Brasil) (diluicao 2:100). Concluíram que apenas o hipoclorito de sódio reduziu significativamente o numero de microrganismos detectados, proporcionando a água um nível de pureza semelhante ao da utilizada nos serviços de hemodiálise (200 UFC/mL)

O perfil bacteriológico da água utilizada nos reservatórios dos equipamentos odontológicos do Sistema Único de Saúde (SUS) foi analisado em 2006 por D'Ávila, Rosa e Caldas Júnior no município de João Pessoa, Paraíba. Cinquenta e quatro consultórios odontológicos em 45 unidades básicas de saúde foram utilizados neste estudo. Foi coletada água de dois pontos: na mangueira onde é adaptada a caneta de alta rotação do reservatório de água. Foram também entrevistados os diretores das unidades de saúde e os auxiliares de consultório dentário (ACD). Os seguintes resultados foram encontrados: 64,7% dos reservatórios, a água utilizada era proveniente de abastecimento público, em 23,5% era proveniente do processo de destilação e 11,8% utilizavam água mineral. A água era trocada em 58,8% dos consultórios e completada em 41,2%. Das 34 amostras analisadas verificou-se a contaminação em 14,7% e resultados negativos em 85,3%. Das cinco amostras

contaminadas, três ocorreram na mangueira e duas no reservatório, sendo que uma amostra contaminada era proveniente de água mineral. Os autores sugeriram a utilização de água destilada nos equipos.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Coleta das Amostras:

As amostras de água foram coletadas de seis equipos de consultórios odontológicos, pertencentes a unidades de saúde sob tutela da Secretaria Estadual de Saúde de Alagoas. Foram pesquisados 100% dos consultórios que possuíam linhas de água, segundo dados do Setor de Saúde Bucal, da referida secretaria. As coletas iniciaram-se após a permissão concedida por meio de ofício (anexo A). E os nomes das unidades de saúde nos quais estavam instalados os consultórios, foram mantidos em sigilo, e os equipos foram numerados de um a seis.

Amostras de água foram coletadas de cada equipo (apêndice A, figuras 1 e 4 e apêndice B, figura 1) em recipiente de boca larga, com marcas externas de 100 mL, hermeticamente fechado, esterilizado e contendo no seu interior uma pastilha de tiossulfato de sódio a 10%, para a neutralização do cloro residual em dias e horários aleatórios durante o período de trabalho no intervalo entre pacientes para não haver comprometimento do serviço oferecido. Porém foi evitado coletar no início da manhã, quando a água estagnada após o pernoite ou o final de semana poderia indicar concentrações anormais de bactérias.

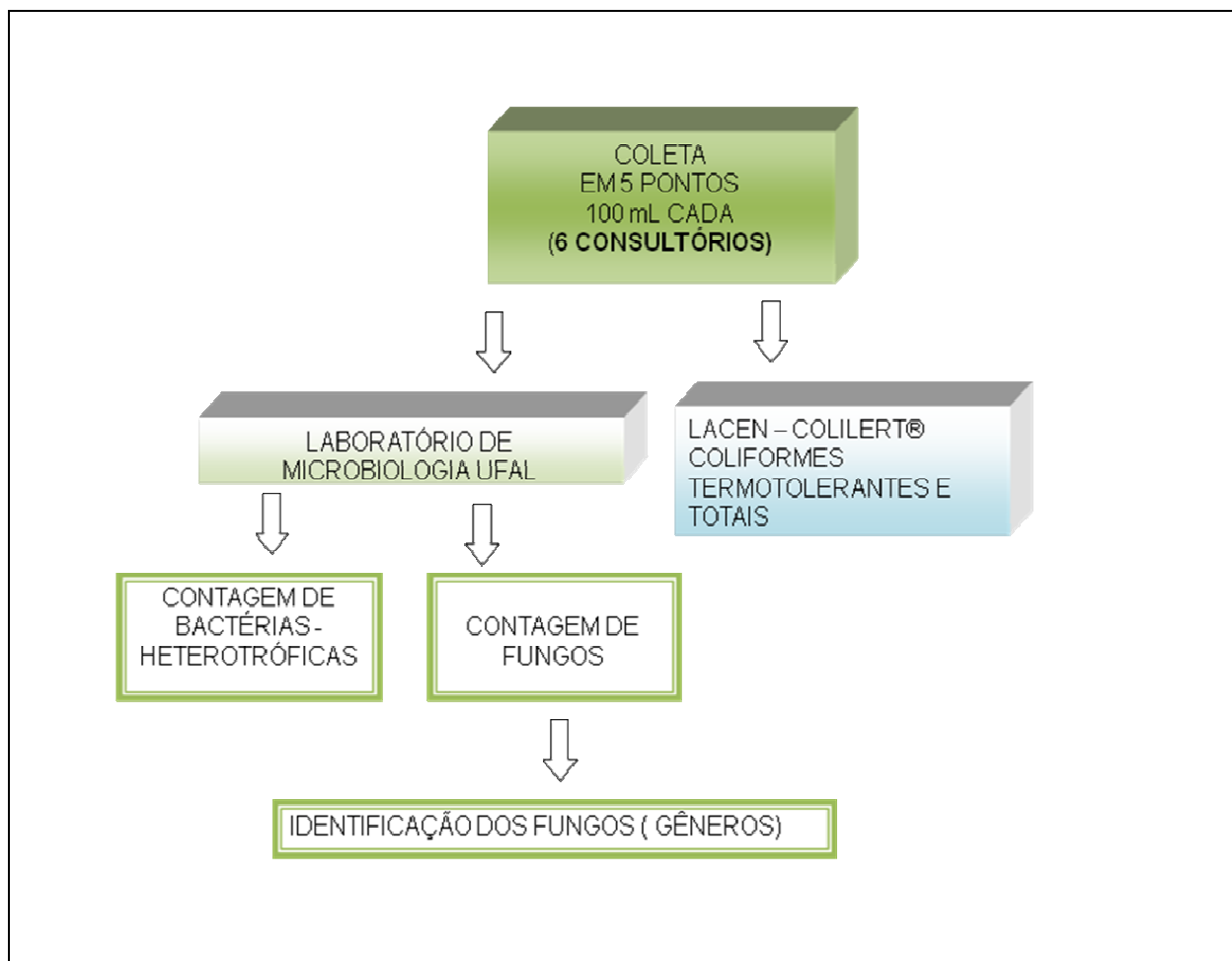
Figura 1- Recipiente utilizado na coleta de água com pastilha de tiossulfato de sódio a 10%



Fonte: Elaborado pela autora desta dissertação, 2011

4.1.1 Primeira Coleta:

Figura 2- organograma dos procedimentos realizados na primeira coleta



Fonte: Elaborado pela autora desta dissertação, 2011

Foi coletada água dos seguintes pontos: seringa tríplex – SERINGA (apêndice A, fotos 12,13,14), caneta de alta rotação com a caneta de alta rotação acoplada as mangueiras – CANETA (apêndice A, fotos 5, 6, 7, 8), mangueira da caneta de alta rotação sem a peça de mão acoplada – MANGUEIRA (apêndice A, fotos 9,10,11), reservatório de água – RESERVATÓRIO (apêndice A, foto 3) e do local onde foi abastecido o reservatório – FONTE (apêndice A, foto 2).

Para desinfecção dos pontos antes das coletas utilizou-se o método de fricção rápida com gaze embebida com álcool etílico 70% (v/v). A seringa tríplice e a caneta de alta rotação foram acionadas e a água vertida por 10 segundos antes de serem coletadas. Durante a coleta das amostras o profissional utilizava máscara, luvas de procedimento descartáveis, gorro e jaleco de manga longa com punhos, de maneira a evitar contaminação.

Foram coletadas dez amostras de água de cada unidade de saúde pesquisada, sendo duas de cada ponto, totalizando sessenta amostras, com 100 mL cada entre outubro de 2009 a janeiro de 2010.

Após coleta foi separada uma amostra de cada ponto, perfazendo um total de cinco amostras. Todas foram acondicionadas em caixas térmicas contendo gelo e transportadas para o Laboratório de Microbiologia e Genética da Universidade Federal de Alagoas, para a pesquisa de bactérias heterotróficas e fungos filamentosos, e outras cinco amostras, uma de cada ponto, foram levadas, também acondicionadas em gelo, para o Laboratório Central de Saúde Pública da Alagoas (LACEN-AL) para realização de pesquisa de coliformes totais e termotolerantes. Em ambos os casos as amostras foram processadas em prazo não superior a quatro horas após a coleta (figura 3).

Figura 3- Esquema da divisão das amostras ocorrida na primeira coleta.

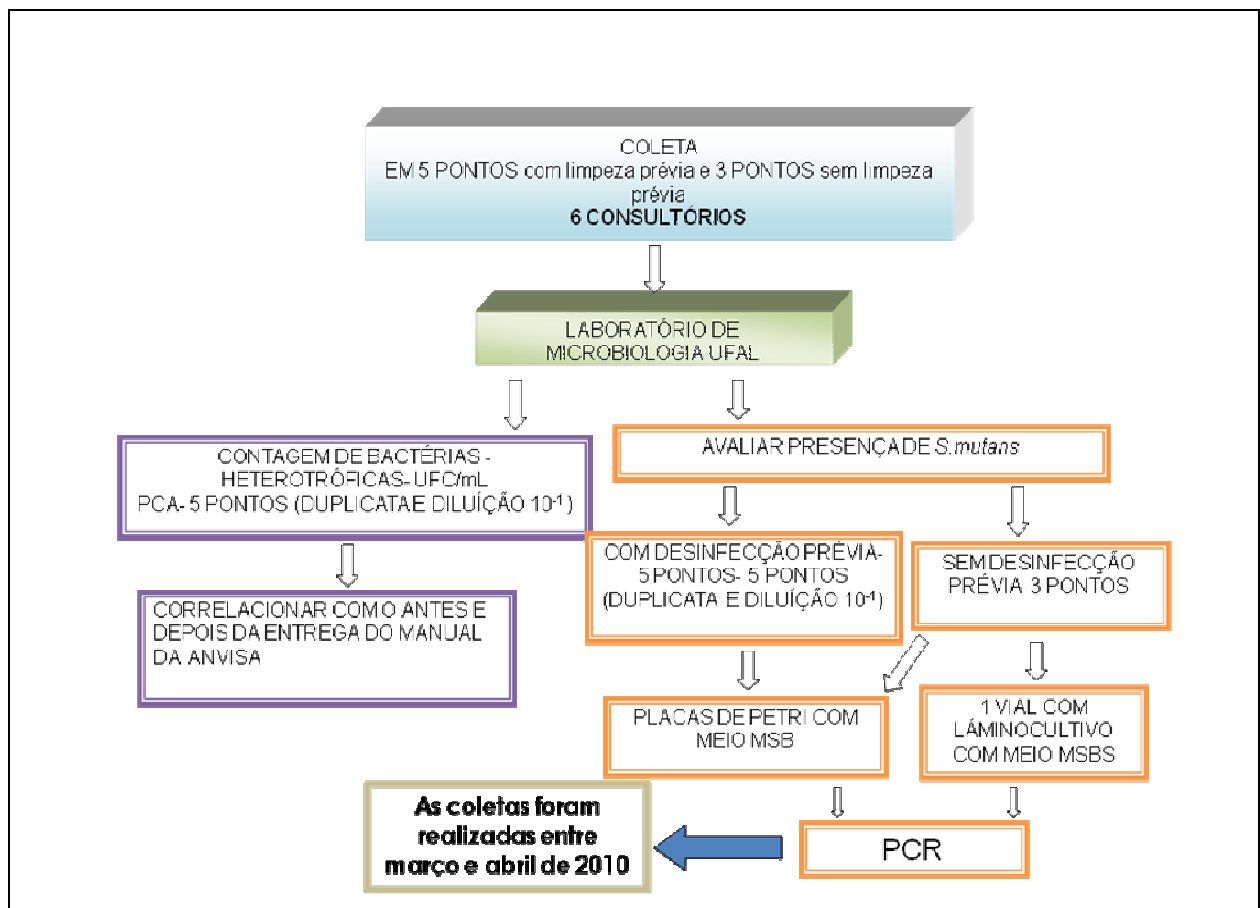


Fonte: Elaborado pela autora desta dissertação, 2011

Ao fim da coleta foi entregue a cada cirurgião-dentista responsável pelo setor de odontologia uma mídia digital gravada (CD-ROM) contendo um manual da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (BRASIL, 2006a), em PDF, 943 KB (apêndice C, figura 1), que versa sobre prevenção e controle de infecções nos serviços odontológicos, onde existe um capítulo dedicado exclusivamente à limpeza das linhas d'água do consultório odontológico, mediante recebimento protocolado (apêndice C), para que fosse amplamente divulgado para toda equipe odontológica de cada unidade de saúde.

4.1.2 Segunda Coleta

Figura 4- organograma dos procedimentos realizados na segunda coleta



Fonte: Elaborado pela autora desta dissertação, 2011

Foram coletadas amostras de água dos seguintes pontos: seringa tríple (SERINGA), caneta de alta rotação com a caneta de alta rotação acoplada as mangueiras (CANETA), mangueira da caneta de alta rotação sem a peça de mão acoplada (MANGUEIRA), sem qualquer desinfecção prévia dos pontos estudados, por se tratar de áreas que entram em contato direto ou através de refluxo com a saliva. Objetivo foi realizar a pesquisa da presença de *Streptococcus mutans* em meio aquoso.

Caso na hora da coleta houvesse atendimento a pacientes, era esperado o término deste e solicitado que a equipe realizasse os procedimentos de biossegurança exatamente como de costume. Após 15 minutos era realizada a coleta. O profissional durante a coleta das amostras utilizava máscara, luvas de procedimento descartáveis, gorro e jaleco de manga longa com punhos, de maneira a evitar contaminação. Foram coletadas três amostras de água, uma de cada ponto, totalizando dezoito amostras, com 100 mL cada.

Após, como na primeira coleta, foi coletada água dos seguintes pontos: seringa tríple (SERINGA), caneta de alta rotação com a caneta de alta rotação acoplada as mangueiras (CANETA), mangueira da caneta de alta rotação sem a peça de mão acoplada (MANGUEIRA), reservatório de água (RESERVATÓRIO) e do local onde foi abastecido o reservatório (FONTE). O objetivo foi reavaliar a contaminação por bactérias heterotróficas nas águas dos equipamentos estudados decorrido um período mínimo de dois meses da primeira coleta e da entrega do CD-ROM com o manual da ANVISA (BRASIL, 2006a), assim como realizar a pesquisa da presença de *Streptococcus mutans* em meio aquoso.

Para desinfecção dos pontos antes das coletas utilizou-se o método de fricção rápida com gaze embebida com álcool etílico 70% (v/v). A seringa tríple e a caneta de alta rotação foram acionadas e a água vertida por 10 segundos antes de ser coletada. O profissional durante a coleta das amostras utilizava máscara, gorro, jaleco de manga longa com punhos e luvas de procedimentos descartáveis, que foram trocadas a cada coleta. Foram coletadas cinco amostras de água, uma de cada ponto, totalizando trinta amostras, com 100 mL cada, entre março e abril de 2010.

Após realização das coletas, as amostras foram acondicionadas em uma caixa térmica contendo gelo e foram transportadas para o Laboratório de Microbiologia e Genética da Universidade Federal de Alagoas, para analisar a presença de bactérias heterotróficas e *Streptococcus mutans*. Todas as amostras foram processadas em prazo não superior a quatro horas após a coleta.

Foram também entregues nesta etapa, os laudos contendo os resultados encontrados em cada unidade de saúde na primeira coleta (apêndice E). Os laudos foram entregues lacrados e mediante assinatura comprovando o recebimento por parte do responsável pelo setor ou seu substituto (apêndice D).

A pesquisadora ficou a inteira disposição dos cirurgiões-dentistas para responder e esclarecer os questionamentos surgidos quando da entrega dos laudos.

4.2 Composição e preparo dos meios e soluções utilizados nas coletas

✓ Plate Count Agar (PCA) adicionado de 50 mg/L de Cetoconazol

TRIPTONA.....	5,0 g
EXTRATO DE LEVEDURAS.....	2,5 g
DEXTROSE.....	1,0 g
AGAR AGAR.....	24,0 g
ÁGUA DESTILADA.....	1000,0 mL

pH final: 7,0 ± 0,2

Todas as substâncias foram pesadas em balança de precisão, colocadas em Erlenmeyer, completando o volume para 1000 mL com água destilada, homogeneizado e esterilizado a 120 °C por 15 minutos. Após resfriamento do meio, à aproximadamente 50 °C foi adicionado Cetoconazol, homogeneizado e distribuídos em placas de Petri.

Solução de Cetoconazol

Foi macerado com o auxílio de cadinho e pistilo esterilizados um comprimido com 200 mg de cetoconazol em um volume 100 mL de água destilada esterilizada. Ao final foi armazenado em recipiente de vidro escuro na ausência de luz e em refrigeração, onde após o resfriamento do meio, foram adicionados 2,5 mL para cada 100 mL de meio.

✓ Agar Sabouraud dextrose (ASD), adicionado de cloranfenicol e ampicilina, 50mg/L de cada.

DEXTROSE	40,0 g
PEPTONA	10,0 g
ÁGAR	15,0 g
ÁGUA DESTILADA	1000,0 mL

pH final: 5.6 ± 0.2

Todas as substâncias foram pesadas em balança de precisão, colocadas em Erlenmeyer, completando o volume para 1000 mL com água destilada, homogeneizado e esterilizado a 120 °C por 15 minutos. Após resfriamento do meio, à aproximadamente 50 °C, foram adicionados 50 mg/L de ampicilina e 50 mg/L de cloranfenicol, homogeneizados e distribuídos em placas de Petri.

Solução de ampicilina

Foi macerado com o auxílio de cadinho e pistilo esterilizados um comprimido com 500mg de ampicilina em um volume 100 mL de água destilada esterilizada. Ao final foi armazenado em recipiente de vidro escuro na ausência de luz e em refrigeração, onde após o resfriamento do meio, foram adicionados 1mL para cada 100 mL de meio.

Solução de cloranfenicol

Foi macerado com o auxílio de cadinho e pistilo esterilizados um comprimido com 500 mg de cloranfenicol em um volume 100 mL de água destilada esterilizada. Ao final foi armazenado em recipiente de vidro escuro na ausência de luz e em refrigeração, onde após o resfriamento do meio, foram adicionados 1mL para cada 100 mL de meio.

✓ Mitis Salivarius adicionado de bacitracina na concentração final de 0,2 UI/mL e telurito de potássio a 1%. (MSB)

FOSFATO DIPOTÁSSICO	4,0 g
CASEÍNA ENZIMÁTICA HIDROLISADA	15,0 g
DIGESTÃO PÉPTICO DE TECIDO ANIMAL	5,0 g
AZUL DE TRIPAN	75,0mg
CRISTAL DE VIOLETA	0,8 mg
SACAROSE	50,0 g
ÁGAR	15,0 g
DEXTROSE	1,0 g

pH final: $7,0 \pm 0,2$

Foram dissolvidos 90 gramas da formulação em água destilada, completando-se o volume para 1000 mL. Em seguida o meio foi autoclavado por 15 minutos a 120 °C e então resfriado a aproximadamente 50 – 55 °C quando foi adicionada, em condições assépticas, 1mL de uma solução de bacitracina de forma a se obter uma concentração final de 0,2 UI/mL e 1 mL uma solução de telurito de potássio a 1%.

Solução de Bacitracina:

Foram pesados 40,0 mg de bacitracina (Sigma-Aldrich - potência 50,000 U/g), em balança analítica e em condições assépticas adicionou-se 10mL de água destilada esterilizada.

Solução de Telurito de Potássio

Foi pesado 0,1 g de telurito de potássio, em balança analítica e em condições assépticas adicionou-se 10 mL de água destilada esterilizada.

✓ caldo cérebro coração (BHI)

INFUSÃO DE CÉREBRO DE CARNEIRO.....	200,0g
INFUSÃO DE CORAÇÃO DE BOI.....	250,0g
PEPTONA PROTEOSE.....	10,0g
DEXTROSE.....	2,0g
CLORETO DE SÓDIO.....	5,0g
FOSFATO DISSÓDICO.....	2,5g

pH final: 7.4 ± 0.2

Todas as substâncias foram pesadas em balança de precisão, colocadas em Erlenmeyer, completando o volume para 1000 mL com água destilada, em seguida foram homogeneizadas e esterilizadas a 120 °C por 15 minutos. Após resfriamento o meio foi identificado e armazenado adequadamente a 2-8 °C.

Solução de Clorofil

Em um tubo de Falcon foram adicionados e homogeneizados 24 mL de clorofórmio e 1 mL de álcool isoamílico, após foi armazenado sob refrigeração.

Solução de Clorofane

Em um tubo de Falcon foram adicionados e homogeneizados 25 mL de fenol já saturado, 24 mL de clorofórmio e 1 mL de álcool isoamílico e posteriormente armazenado sob refrigeração e utilizado após 24 horas.

Solução de Lise

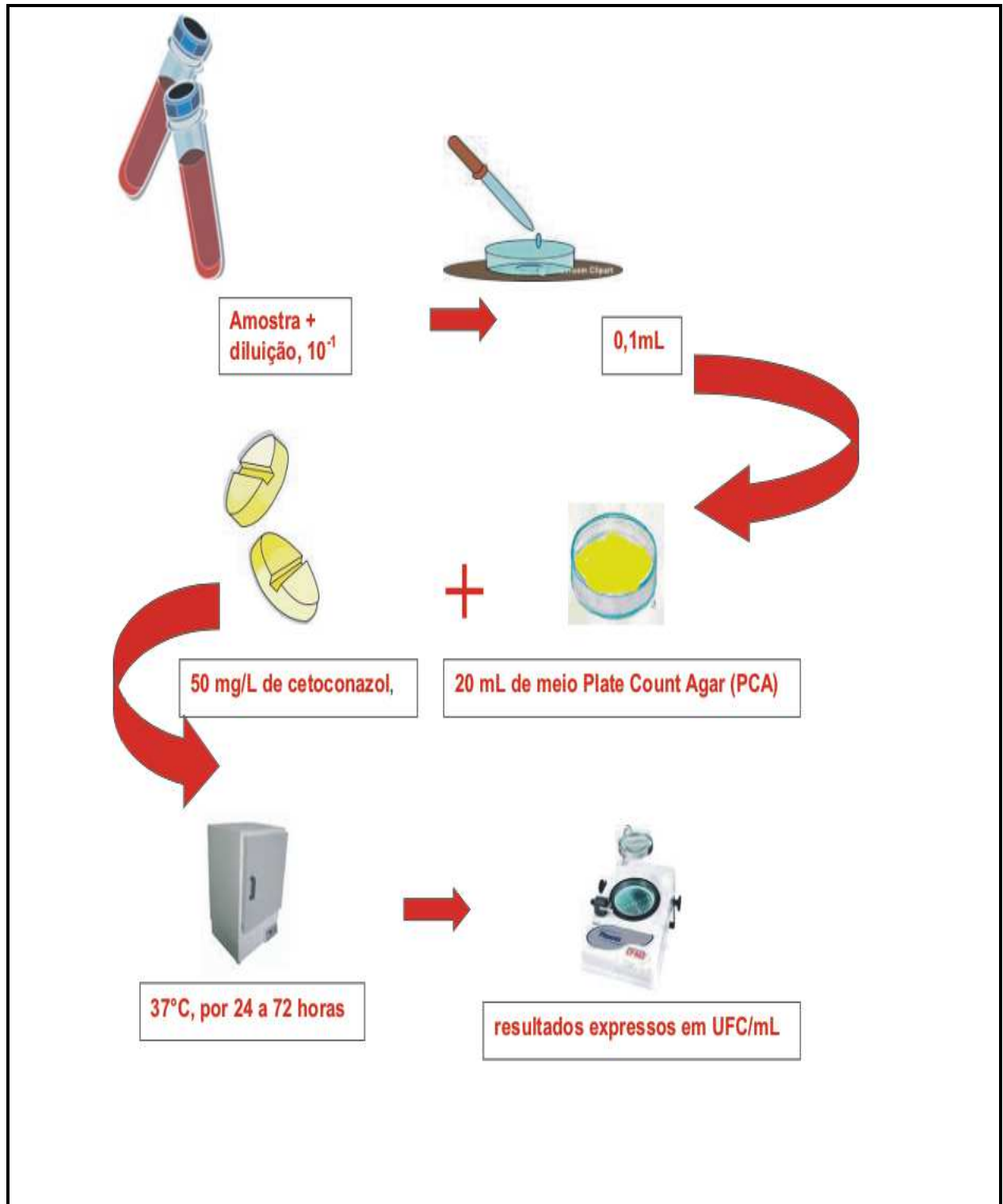
Foram adicionados e homogeneizados 20 mL de Tris 1M pH 8,0, 5 mL de EDTA 0,5M pH 8,0, 5 mL de NaCl 0,5M, 10 mL de SDS a 10% e 60 mL de água bi-destilada deionizada esterilizada. Ao final a solução foi armazenada em recipiente com tampa a temperatura ambiente.

4.3 Inoculação e cultivo das amostras:

4. 3.1 Bactérias Heterotróficas:

Para cada amostra foi realizada uma diluição de 10^{-1} . Volumes de 0,1mL da amostra original e da diluição em duplicata, foram semeadas em placas de Petri sobre a superfície do meio Plate Count Agar (PCA) adicionado de 50 mg/L de Cetoconazol e espalhado com auxílio de uma alça de Drigalski até a completa absorção. Em seguida, as placas foram incubadas invertidas em estufa bacteriológica a 37 °C, por 24 a 72 horas. Após incubação, as placas foram submetidas à contagem com o auxílio de um contador de colônias, e os resultados foram expressos em UFC/mL.

Figura 5 - Fluxograma da metodologia utilizada na pesquisa de bactérias Heterotróficas



Fonte: Elaborado pela autora desta dissertação, 2011

4.3.2 Fungos Filamentosos e Leveduras:

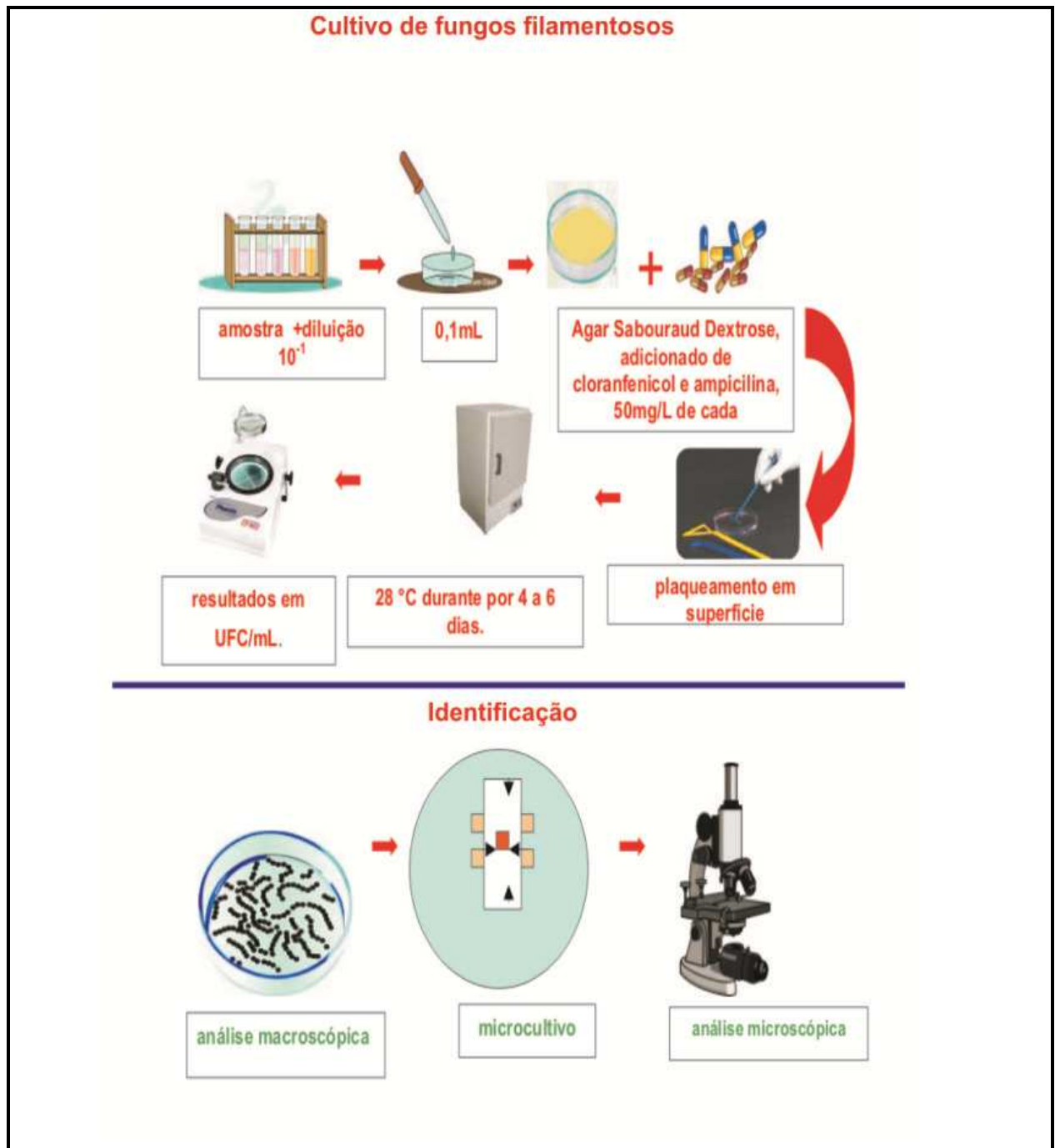
Para cada amostra foi realizada uma diluição de 10^{-1} . Volumes de 0,1mL da amostra original e da diluição, em duplicata, foram semeadas em placas de Petri sobre a superfície do meio Agar Sabouraud Dextrose, adicionado de cloranfenicol e ampicilina, 50 mg/L de cada e espalhado com auxílio de uma alça de Drigalski até a completa absorção. Em seguida, as placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 28 °C durante um período de quatro a seis dias. Após incubação, as placas foram submetidas à contagem e os resultados foram expressos em UFC/mL.

4.3.2.1 Identificação dos Fungos Filamentosos:

Foi realizada análise macroscópica tendo como base às características morfológicas macroscópicas de cada colônia como forma, cor, bordos, presença de pigmentos, tamanho e tempo de crescimento. As características microscópicas foram baseadas nas diferenças morfológicas das estruturas reprodutivas e no modo como os esporos são produzidos. Esta última foi analisada com o auxílio da técnica de microcultivo preconizada por Ridell (1950) em meio lactrimel; que consiste em colocar sobre uma lâmina esterilizada, dentro de uma placa de Petri estéril, um pequeno pedaço de meio de cultura lactrimel ágar. Esta lâmina, por sua vez, fica sobre um suporte formado por dois palitos ou canudos plásticos. Fragmentos do fungo devem ser semeados, nos quatro lados do cubo de meio de cultura. Após, recobriu-se com uma lamínula esterilizada. Para fazer uma câmara úmida, deve-se adicionar 1 a 2 mL de água destilada estéril no fundo da placa de Petri embebida ou não em um chumaço de algodão estéril, para evitar o ressecamento do meio de cultura, durante o crescimento do fungo.

Em seguida a estes procedimentos, as placas foram incubadas à temperatura de 28 °C por 7 a 15 dias, dependendo da velocidade de crescimento do fungo. Após crescimento, foi montada a lamínula, de cada microcultivo, em uma lâmina limpa, com uma gota de lactofenol azul-algodão. Foi também montada a lâmina do microcultivo, retirando-se o pedaço de lactrimel ágar e colocando uma lamínula limpa, com uma gota de lactofenol azul-algodão.

Figura 6 – Fluxograma da metodologia utilizada no cultivo e identificação de fungos filamentosos



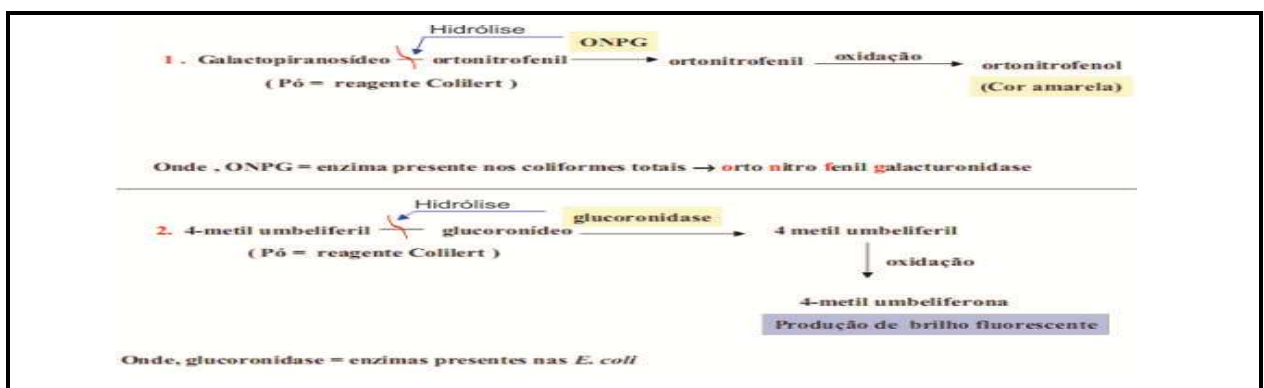
Fonte: Elaborado pela autora desta dissertação, 2011

4.3.3 Coliformes totais e termotolerantes:

Foi utilizado o método do substrato enzimático, Colilert®, que é uma técnica de identificação rápida de espécies bacterianas baseada na síntese de compostos incolores que originam produtos de hidrólise coloridos diretamente ou após adição de um reagente (MACHADO, 2004).

Inicialmente, foi feita a assepsia nos recipientes onde a água estava acondicionada, com gaze embebida com álcool etílico 70% (v/v), em seguida foi medido 100 mL da água coletada em uma proveta estéril, e transferida para um frasco de Erlenmeyer também estéril, onde foi adicionado o reagente à água. Após homogeneização, a solução foi colocada em uma cartela composta de cinquenta e uma cúpulas, e inserida em uma seladora e a água distribuída igualmente. A cartela foi datada e numerada. Em seguida, incubada em estufa bacteriológica a $35 \pm 0,2$ °C por 24 horas. Decorrido este tempo, a leitura foi feita com auxílio de uma lâmpada ultravioleta. O teste foi considerado positivo para coliforme total se nas cúpulas apresentasse a coloração amarela e, para coliforme termotolerante se apresentasse coloração azul sob a luz ultravioleta. O teste era negativo com ausência de coloração. Os resultados foram expressos de acordo com a tabela de NMP (número mais provável em 100 mL de água), fornecida pelo fabricante.

Figura 7- Fluxograma da reação ocorrida na técnica de substrato enzimático



Fonte: SILVEIRA NAF, 2006.

Figura 8 – Metodologia utilizada na pesquisa de coliformes totais e termotolerantes



Fonte: Elaborado pela autora desta dissertação, 2011

4.3.4 *Streptococcus mutans*

4.3.4.1 Com desinfecção prévia dos pontos de coleta estudados:

Para cada amostra foi realizada uma diluição de 10^{-1} . Inóculos de 0,1mL da amostra original e da diluição em duplicata foram semeadas em placas de Petri contendo aproximadamente 20 mL de meio Mitis Salivarius (HIMEDIA) adicionado de bacitracina e telurito de potássio a 1%. Os inóculos foram plaqueados em superfície, com auxílio de uma alça de Drigalski. Em seguida, as placas foram incubadas invertidas em estufa bacteriológica a 37 °C, por 24 a 48, em uma atmosfera de 10% de CO₂.

Para controle positivo do meio foi utilizada cepa de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175), gentilmente cedida pela Fundação Osvaldo Cruz (FIOCRUZ).

Após incubação, as placas foram submetidas à contagem com o auxílio de um contador de colônias, e os resultados foram expressos em UFC/mL.

4.3.4.2 Sem desinfecção prévia dos pontos de coleta estudados:

Foram utilizados dois dispositivos (placas de Petri e vial com laminocultivo) com meio Mitis Salivarius para pesquisa de crescimento de *Streptococcus mutans* em água.

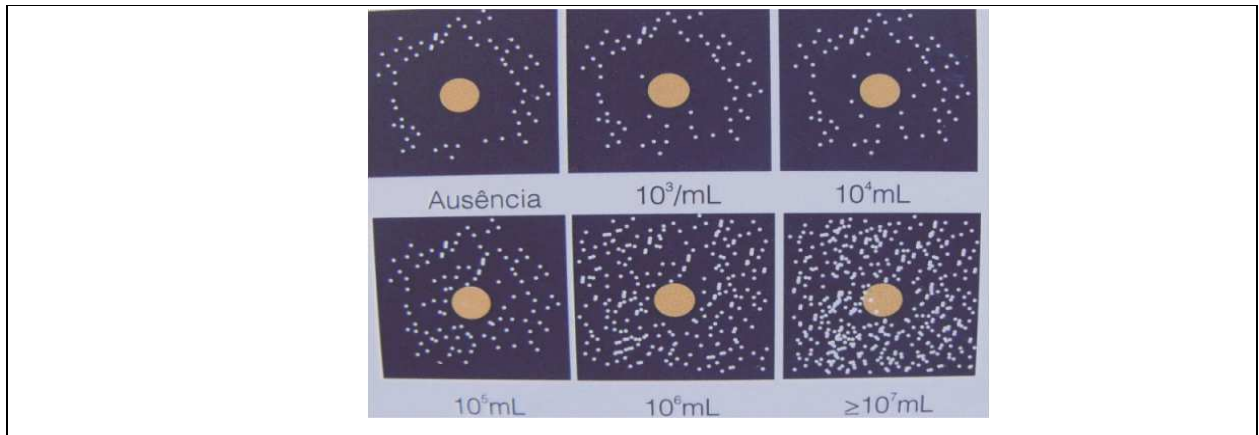
4.3.4.2.1 Placas de petri com meio Mitis Salivarius (HIMEDIA), adicionado de bacitracina na concentração final de 0,2 UI/mL e telurito de potássio a 1% (MSB).

Foram realizados exatamente os mesmos procedimentos descritos anteriormente no item 4.3.4.1.

4.3.4.2.2 Laminocultivo composto pelo meio Agar Mitis Salivarius modificado, com a concentração de 20% de sacarose e a utilização de discos de papeis impregnados de bacitracina – (MSBS) Dental Cult 2 (LABORCLIN).

Foram distribuídos 2 mL de água (1 mL em cada lâmina contendo meio de cultura), com uma pipeta de Pasteur, de forma homogênea. Aguardou-se alguns minutos para secar. Com auxílio de uma pinça estéril, foi colocado um disco de bacitracina em cada lâmina. Em seguida um comprimido de CO₂ foi depositado no fundo do vial em contato com o excesso da água utilizada na inoculação. Fechado o vial e incubado em estufa bacteriológica por 24-48 horas. Depois foi realizada a contagem através de um gabarito visual fornecido pelo fabricante (figura 9).

Figura 9- Gabarito visual fornecido pelo fabricante para contagem de *Streptococcus mutans* no laminocultivo.



Fonte: Elaborado pela autora desta dissertação, 2011

4.2.2.3 Identificação do *Streptococcus mutans*

✓ Extração do DNA

Para obtenção do DNA as colônias bacterianas foram inoculadas em meio BHI e incubadas a 37 °C por 24 a 48 horas em atmosfera com 10% de CO₂. Após o crescimento bacteriano, foi coletado 1.200 µL do inóculo e colocado em um microtubo de 1,5 mL onde foi homogeneizado, em seguida centrifugado a 5.000 rpm por três minutos, descartado o sobrenadante e recomposto o volume com água destilada estéril, repetindo-se o procedimento por mais uma vez. Em seguida o sobrenadante foi descartado e adicionado 600 µL de solução de lise, mantendo-se em banho-maria a 65 °C por 30 minutos e com agitação por inversão a cada cinco minutos. Na etapa seguinte foi acrescentado 600 µL de solução clorofane, agitando-se levemente no vortex até turvar e formar duas fases, centrifugando-se a 12.000 rpm por 10 minutos. Um volume de 500 µL foi transferido para outro microtubo devidamente identificado ao qual foi adicionado 500 µL solução de clorofit. Após agitação, centrifugou-se a 12.000 rpm por 10 minutos. Um volume de 400 µL do sobrenadante foi transferido para outro microtubo, ao qual foram adicionados 800 µL de etanol absoluto gelado, e colocado no freezer a -20 °C pra precipitação do DNA, por um período mínimo de duas horas. Após

a precipitação, o DNA foi lavado duas vezes com 300 µL de etanol gelado a 70 % (v/v). Após lavagem e secagem foi adicionado ao DNA 100 µL de TRIS- EDTA (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8,0) e armazenado a -20 °C até o momento do uso.

✓ Reação de Polimerização em Cadeia (PCR)

As amostras de DNA foram submetidas a PCR para confirmação molecular da identidade de *Streptococcus mutans*, através de pares de iniciadores específicos para a região do gene correspondente a glicosiltransferase (*gtfB* de *S. mutans*), de acordo com a seguinte seqüência: GTFB-F- 5'- ACT ACA CTT TCG GGT GGC TTG G - 3' e GTFB-R- 5'- CAG TAT AAG CGC CAG TTT CAT C -3', amplificando um fragmento de 517 pb.

A reação de PCR foi processada de acordo com a tabela 1.

TABELA 1- Reagentes utilizados na PCR para identificação de *Streptococcus mutans*

Componentes	Concentração de estoque	Concentração da reação (µL)	Concentração final
Água ultrapura	-	10,75	-
Tampão de PCR	10X	2,5	1X
BSA	0,25 mg/mL	2,5	0,025 mg/µL
Mistura DNATP's	2,0 mM	2,5	0,2 mM
Iniciador 1	10,0 pmol	2,0	0,8 pmol
Iniciador 2	10,0 pmol	2,0	0,8 pmol
Mg Cl ₂	50 mM	1,5	3,0 pmol/µL
Taq Polimerase	5 u/µL	0,25	0,05 U/µL
DNA	50,0 ng/µL	1,0	2,0 ng /µL

Fonte: Elaborado pela autora desta dissertação, 2011.

Além das amostras, em cada conjunto de PCR, foi utilizado como controle positivo, DNA extraído de *S. mutans* (ATCC 25175) e como controle negativo, água bi-destilada deionizada esterilizada.

A amplificação ocorreu em termocilcador MJ de acordo com a seguinte programação: desnaturação inicial a 95 °C por cinco minutos, seguida um total de 30 ciclos onde cada ciclo consistiu por 15 segundos de desnaturação a 95 °C, 30 segundos de pareamento a 59 °C e um minuto de extensão a 72 °C, e finalmente de um ciclo de extensão a 72°C por cinco minutos (OHO *et al.*, 2000).

Os produtos da PCR foram analisados imediatamente, ou armazenados em freezer a -20 °C. Os amplicons foram separados pela eletroforese em gel de agarose (1%) e 60 volts por 1 hora. Em seguida, o gel foi corado em brometo de etídeo a 0,5 µg/mL (INVITROGEN® – Life Technology do Brasil), visualizado sob luz ultravioleta e fotografado em sistema de fotodocumentação Vilber Lourmat modelo Doc-Print II®.

4.4 Análise Estatística

A análise estatística dos resultados foi realizada utilizando o programa Stat Plus Professional 2009; onde para comparação dos dados vinculados empregou-se o teste não paramétrico de Wilcoxon ao nível de 5% de significância. As comparações foram do nível de contaminação por bactérias heterotróficas em amostras de água coletada em cinco pontos pesquisados.

Foram também realizadas comparações do nível de crescimento de colônias nos meios MSB (placas de Petri) antes e depois da desinfecção dos pontos pesquisados com álcool a 70%, em amostras de água dos pontos abaixo discriminados:

- Mangueiras das canetas de alta rotação das unidades pesquisadas com e sem desinfecção prévia com álcool a 70% dos pontos pesquisados
- Canetas de alta rotação das unidades pesquisadas com e sem desinfecção prévia com álcool a 70% dos pontos pesquisados

- Seringas tríplexes das unidades pesquisadas com e sem desinfecção prévia com álcool a 70% dos pontos pesquisados.

Nos dados não vinculados foi usado o teste U não paramétrico de Mann-Whitney, a 5% de significância. A análise estatística dos resultados foi realizada utilizando o programa BioEstat 5.0; para as comparações do nível de crescimento de colônias nos meios MSB (placas de Petri) e MSBS (vial com lâminocultivo) em amostras de água dos seguintes pontos:

- Mangueiras das canetas de alta rotação das unidades pesquisadas:
 - Placas de Petri x Vial com lâminocultivo
- Canetas de alta rotação das unidades pesquisadas
 - Placas de Petri x Vial com lâminocultivo
- Seringas tríplexes das unidades pesquisadas
 - Placas de Petri x Vial com lâminocultivo

5 RESULTADOS

5.1. Bactérias Heterotróficas:

Todos os equipos apresentaram pelo menos dois pontos de coletas onde a presença de bactérias heterotróficas na água excedia o valor permitido pela Portaria 518 de 25 de março de 2004 do Ministério da Saúde (MS) que é de 500 UFC por 100 mL de água. Os valores encontrados podem ser observados na tabela 2.

TABELA 2- Resultado quantitativo (média aritmética) em UFC/mL para bactérias heterotróficas, obtido a partir de 30 coletas em seis unidades dentais da rede pública estadual de Alagoas por ponto coletado

EQUIPO	FONTE	RESERVATÓRIO	MANGUEIRA	CANETA	SERINGA
1	$2,7 \times 10^4$	$2,8 \times 10^4$	$1,7 \times 10^3$	$6,1 \times 10^2$	$3,1 \times 10^4$
2	$3,5 \times 10^2$	$7,0 \times 10^3$	$2,9 \times 10^3$	$8,6 \times 10^2$	$6,5 \times 10^2$
3	$2,2 \times 10^4$	$2,3 \times 10^2$	$1,0 \times 10^3$	$4,7 \times 10^2$	$5,3 \times 10^2$
4	$1,7 \times 10^2$	$6,4 \times 10^2$	$1,1 \times 10^3$	$2,1 \times 10^2$	$7,5 \times 10^3$
5	$9,3 \times 10^4$	$8,9 \times 10^4$	$8,9 \times 10^4$	$8,6 \times 10^4$	$1,2 \times 10^5$
6	SC	$2,3 \times 10^3$	$2,4 \times 10^3$	$1,6 \times 10^3$	$3,0 \times 10^4$

Nota: SC- SEM CRESCIMENTO

Fonte: Elaborado pela autora desta dissertação, 2011.

A tabela 3 mostra a avaliação da qualidade da água, através da contagem de bactérias heterotróficas, encontrada nos equipos após um período mínimo de dois meses entre a primeira e a segunda coleta e da entrega do CD-ROM com o manual da ANVISA (BRASIL, 2006) nas unidades pesquisadas. Os valores encontrados nas duas coletas foram analisados através do teste não paramétrico de Wilcoxon ao nível de 5% de significância, pelo programa Stat Plus Professional 2009.

Tabela 3- Resultados das diferenças obtidas para bactérias heterotróficas, a partir de 60 coletas em seis unidades dentais da rede pública estadual por ponto coletado.

PONTO DE COLETA	Equipo	Antes	Depois	Valor de p	significância
FONTE	1	$2,7 \times 10^4$	$5,7 \times 10^3$	0,4652	NS
	2	$3,5 \times 10^2$	$3,4 \times 10^3$		
	3	$2,2 \times 10^4$	$8,2 \times 10^3$		
	4	$1,7 \times 10^2$	$1,5 \times 10^2$		
	5	$9,3 \times 10^4$	$1,3 \times 10^3$		
	6	SC	SC		
RESERVATÓRIO	1	$2,8 \times 10^4$	$5,0 \times 10^1$	0,1380	NS
	2	$7,0 \times 10^3$	$1,3 \times 10^4$		
	3	$2,3 \times 10^2$	$1,4 \times 10^4$		
	4	$6,4 \times 10^2$	$6,7 \times 10^2$		
	5	$8,9 \times 10^4$	$1,0 \times 10^5$		
	6	$2,3 \times 10^3$	$7,0 \times 10^1$		
MANGUEIRA	1	$1,7 \times 10^3$	$5,6 \times 10^2$	0,0431	S
	2	$2,9 \times 10^3$	$3,7 \times 10^4$		
	3	$1,0 \times 10^3$	$7,1 \times 10^3$		
	4	$1,1 \times 10^3$	$1,2 \times 10^4$		
	5	$8,9 \times 10^4$	$1,0 \times 10^5$		
	6	$2,4 \times 10^3$	$1,7 \times 10^5$		
CANETA	1	$6,1 \times 10^2$	$3,1 \times 10^2$	0,0431	S
	2	$8,6 \times 10^2$	$1,4 \times 10^4$		
	3	$4,7 \times 10^2$	$9,2 \times 10^4$		
	4	$2,1 \times 10^2$	$7,9 \times 10^2$		
	5	$8,6 \times 10^4$	$1,0 \times 10^5$		
	6	$1,6 \times 10^3$	$5,5 \times 10^4$		
SERINGA	1	$3,1 \times 10^4$	$3,6 \times 10^2$	0,6858	NS
	2	$6,5 \times 10^2$	$5,7 \times 10^3$		
	3	$5,3 \times 10^3$	$6,4 \times 10^3$		
	4	$7,5 \times 10^3$	$9,0 \times 10^3$		
	5	$1,2 \times 10^5$	$1,0 \times 10^5$		
	6	$3,0 \times 10^4$	$1,4 \times 10^3$		

Notas: NS= não significativa, S= significativa; SC = sem crescimento

Fonte: Elaborado pela autora desta dissertação, 2011.

5.2 Fungos Filamentosos e leveduras

Foram isolados fungos filamentosos em 21 de 30 amostras, o que corresponde a um total de 70% e em 19 de 30 amostras (63,3%) cresceram leveduras e em 50% das amostras cresceram fungos e leveduras (tabela 4).

TABELA 4– Análise qualitativa para fungos filamentosos e leveduras obtida a partir de 30 coletas em seis unidades dentais da rede pública estadual de Alagoas por ponto coletado

UNIDADE	FONTE	RESERVATÓRIO	MANGUEIRA	CANETA	SERINGA
1	F/ L	F/ L	SC	SC	SC
2	L	F/ L	F/ L	F/ L	F/ L
3	F/ L	F	F	F	L
4	F	F/ L	F	SC	F
5	F/ L	F/ L	F/ L	L	L
6	SC	F/ L	F/ L	F/ L	F/ L

Notas: SC = SEM CRESCIMENTO; F = FUNGO FILAMENTOSO; L= LEVEDURA.

Fonte: Elaborado pela autora desta dissertação, 2011

O maior número de isolados de fungos filamentosos foi encontrado nas águas coletadas do ponto MANGUEIRA e a maior concentração de leveduras foi encontrada no ponto SERINGA (tabela 5).

TABELA 5– Número de isolados fúngicos e de leveduras obtidos a partir de 30 coletas em seis unidades dentais da rede pública estadual de Alagoas por ponto coletado.

PONTO DE COLETA	FUNGOS ISOLADOS (nº)	LEVEDURAS ISOLADOS (nº)
SERINGA	07	1488
RESERVATÓRIO	43	688
CANETA	39	63
MANGUEIRA	108	54
FONTE	15	16
Total	212	2.315

Fonte: Elaborado pela autora desta dissertação, 2011

No total, 212 isolados e 16 gêneros de fungos filamentosos foram recuperados das águas das unidades dentais (tabela 6 e figura 7).

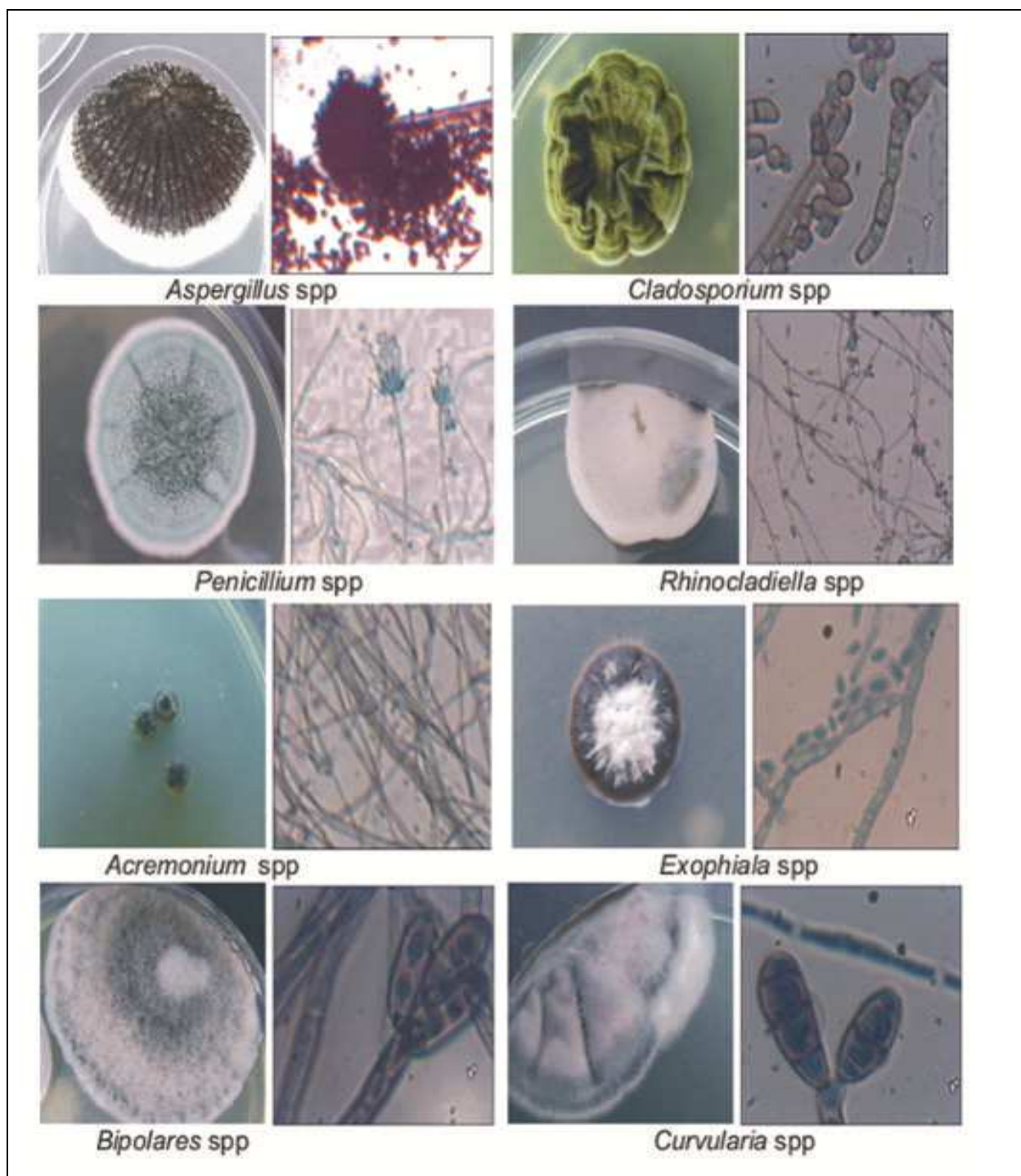
TABELA 6 – Número de isolados fúngicos por gêneros obtidos e identificados a partir de 30 coletas em seis unidades dentais da rede pública estadual de Alagoas

FUNGOS ISOLADOS	(n°)	(%)
<i>Acremonium</i> spp	99	46,7
<i>Aspergillus</i> spp	19	8,9
<i>Bipolaris</i> spp	06	2,9
<i>Cladophialophora</i> spp	10	4,7
<i>Cladosporium</i> spp	06	2,9
<i>Chrysosporium</i> sp	01	0,4
<i>Curvularia</i> sp	05	2,3
<i>Exophiala</i> spp	31	14,7
<i>Fusarium</i> spp	02	1,0
<i>Mycelia Sterilia</i>	06	2,9
<i>Paecilomyces</i> sp	01	0,4
<i>Penicillium</i> spp	20	9,4
<i>Phoma</i> spp	01	0,4
<i>Rhinoctadiella</i> spp	02	1,0
<i>Scapulariopsis</i> sp	01	0,4
<i>Verticillium</i> spp	02	1,0
Total	212	100,0

Nota: n°= número total de isolados obtidos

Fonte: Elaborado pela autora desta dissertação, 2011

Figura 10- Aspecto macroscópico (esquerda) e microscópico (direita) de oito dos dezesseis gêneros isolados e identificados a partir de 30 coletas em 6 unidades dentais da rede pública estadual de Alagoas



Fonte: Elaborado pela autora desta dissertação, 2011

5.3 Coliformes Totais e Termotolerantes:

Não foi detectada presença de coliformes termotolerantes em nenhum dos pontos coletados de todas as unidades de saúde pesquisadas (NMP < 1UFC/mL). No entanto, onze de trinta amostras (36,6%), apresentaram coliformes totais, indicando que a água se encontrava fora de especificação segundo Portaria 518 do MS, que preconiza ausência de coliformes totais e termotolerantes em 100 mL de água (tabela 7).

TABELA 7– Resultado quantitativo em NMP/100mL, para coliformes totais encontrados nas águas dos equipos das unidades de saúde da rede pública estadual de Alagoas por ponto pesquisado.

UNIDADE	FONTE	RESERVATÓRIO	MANGUEIRA	CANETA	SERINGA
1	NMP >200,5 UFC/100 mL	NMP <1 UFC/100 mL	NMP <1 UFC/100 mL	NMP <1 UFC/100 mL	NMP <1 UFC/100 mL
2	NMP <1 UFC/100 mL	NMP = 3,1 UFC/100 mL	NMP = 11,1 UFC/100 MI	NMP = 8,7 UFC/100 mL	NMP = 4,1 UFC/100 mL
3	NMP <1 UFC/100 mL	NMP <1 UFC/100 mL	NMP <1 UFC/100 mL	NMP <1 UFC/100 mL	NMP <1 UFC/100 mL
4	NMP = 8,7 UFC/100 mL	NMP <1 UFC/100 mL	NMP <1 UFC/100 mL	NMP <1 UFC/100 mL	NMP <1 UFC/100 mL
5	NMP = 83,1 UFC/100 mL	NMP = 22,2 UFC/100 mL	NMP = 40,6 UFC/100 mL	NMP = 7,5 UFC/100 mL	NMP = 13,7 UFC/100 mL
6	NMP <1 UFC/100 mL	NMP <1 UFC/100 mL	NMP <1 UFC/100 mL	NMP <1 UFC/100 mL	NMP <1 UFC/100 mL

Fonte: Elaborado pela autora desta dissertação, 2011

5.4 *Streptococcus mutans*

5.4.1- Com desinfecção prévia dos pontos de coleta estudados:

Dentre trinta amostras colhidas, nove amostras (30%) apresentaram crescimento, tabela 8. Todas às colônias crescidas em placas de Petri apresentavam-se macroscopicamente semelhantes (figura 11).

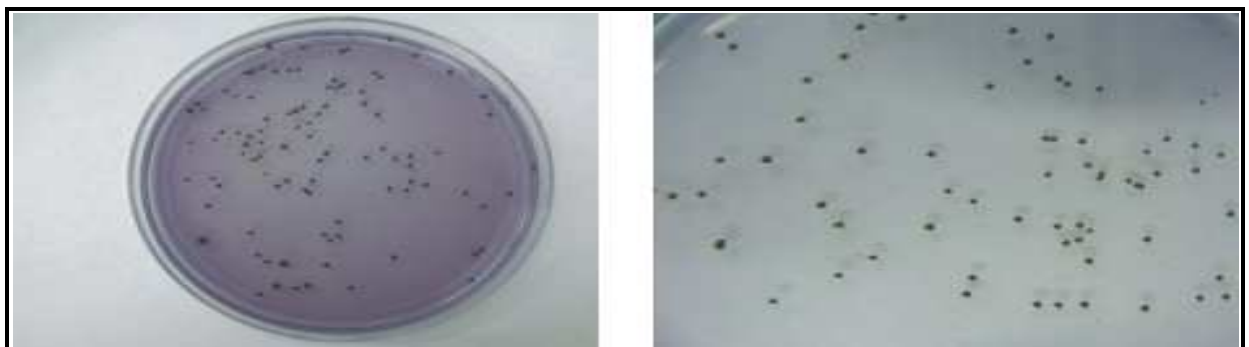
TABELA 8– Média aritmética da concentração de *S.mutans* (UFC/mL) com desinfecção prévia dos pontos coletados obtidos a partir de 30 coletas em seis unidades dentais da rede pública estadual de Alagoas em meio MSB

EQUIPO	FONTES	RESERVATÓRIO	MANGUEIRA	CANETA	SERINGA
1	SC	SC	SC	SC	SC
2	SC	2,0x10 ²	1,0x10 ¹	6,5x10 ¹	SC
3	SC	SC	SC	SC	SC
4	SC	1,0x10 ¹	SC	SC	2,0x10 ¹
5	SC	SC	3,7x10 ²	7,1x10 ²	7,8x10 ²
6	SC	SC	SC	SC	3,5x10 ¹

Nota:SC = SEM CRESCIMENTO

Fonte: Elaborado pela autora desta dissertação, 2011

Figura 11 – Aspecto macroscópico de colônias crescidas em meio MSB seletivo para *Streptococcus mutans*



Fonte: Elaborado pela autora desta dissertação, 2011

5.4.2 Sem desinfecção prévia dos pontos de coleta estudados:

Na tabela 9 pode-se observar que nas placas de Petri com meio MSB houve crescimento de 44,4% (oito de dezoito amostras), enquanto que no vial com lâminocultivo com meio MSBS, houve crescimento em apenas 16,6% (três de dezoito amostras). Todas as colônias crescidas em placas de Petri e laminocultivo apresentavam-se macroscopicamente semelhantes (figura 12)

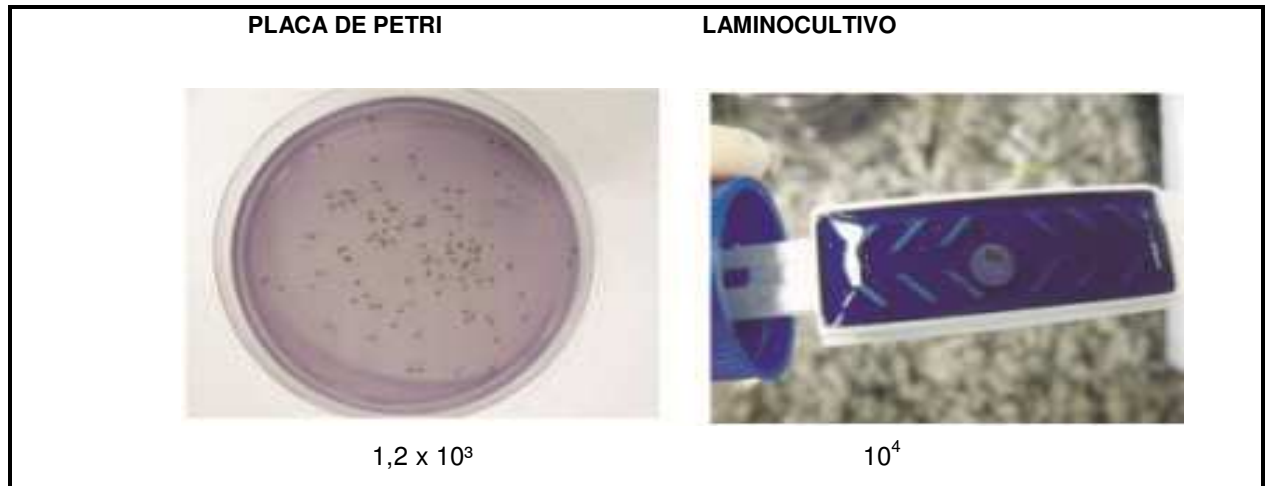
TABELA 9– Média aritmética da concentração de *S.Mutans* (UFC/mL) sem limpeza prévia dos pontos coletados, obtidos a partir de 36 amostras inoculadas em placas de Petri em meio MSB e em vial com laminocultivo em meio MSBS, em seis unidades dentais da rede pública estadual de Alagoas

EQUIPO	CANETA		MANGUEIRA		SERINGA TRIPLICE	
	P.PETRI	VIAL	PETRI	VIAL	PETRI	VIAL
1	SC	SC	SC	SC	SC	SC
2	1,4 x 10 ³	SC	7,3 x 10 ²	SC	1,0 x 10 ²	SC
3	SC	SC	SC	SC	SC	SC
4	SC	SC	1,0 x 10 ¹	SC	1,2 x 10 ²	SC
5	1,0 x 10 ³	10 ³	1,2 x 10 ³	10 ⁴	7,7 x 10 ²	10 ³
6	SC	SC	SC	SC	SC	SC

Notas: SC = SEM CRESCIMENTO, P.PETRI = MEIO MSB EM PLACAS DE PETRI, VIAL = MEIO MSBS EM LÂMINOCULTIVO

Fonte: Elaborado pela autora desta dissertação, 2011

Figura 12- Contagem e aspecto macroscópico de colônias crescidas em meio MSB e MSBS seletivos para *S.mutans*



Fonte: Elaborado pela autora desta dissertação, 2011

TABELA 10- Comparação estatística do nível de crescimento de colônias bacterianas em amostras de água com e sem desinfecção prévia dos pontos coletados obtidas de trinta seis coletas em seis unidades dentais da rede pública estadual de Alagoas em meio MSB por ponto de coleta

PONTO DE COLETA	Valor de p	Significância
MANGUEIRA		
com desinfecção prévia (álcool a 70%) x sem desinfecção prévia	0,1797	NS
CANETA		
com desinfecção prévia (álcool a 70%) x sem desinfecção prévia	0,1088	NS
SERINGA		
com desinfecção prévia (álcool a 70%) x sem desinfecção prévia	0,4652	NS

Nota: NS= não significante

Fonte: Elaborado pela autora desta dissertação, 2011

TABELA 11- Comparação estatística do nível de crescimento de colônias bacterianas em amostras de água sem desinfecção prévia dos pontos coletados obtidas de trinta e seis coletas em seis unidades dentais da rede pública estadual de Alagoas em meio MSB (placas de Petri) e MSBS (vial com laminocultivo)

PONTO DE COLETA	Valor de p	Significância
MANGUEIRA Placa de Petri x Vial	0.4712	NS
CANETA Placa de Petri x Vial	0.5752	NS
SERINGA Placa de Petri x Vial	0.4712	NS

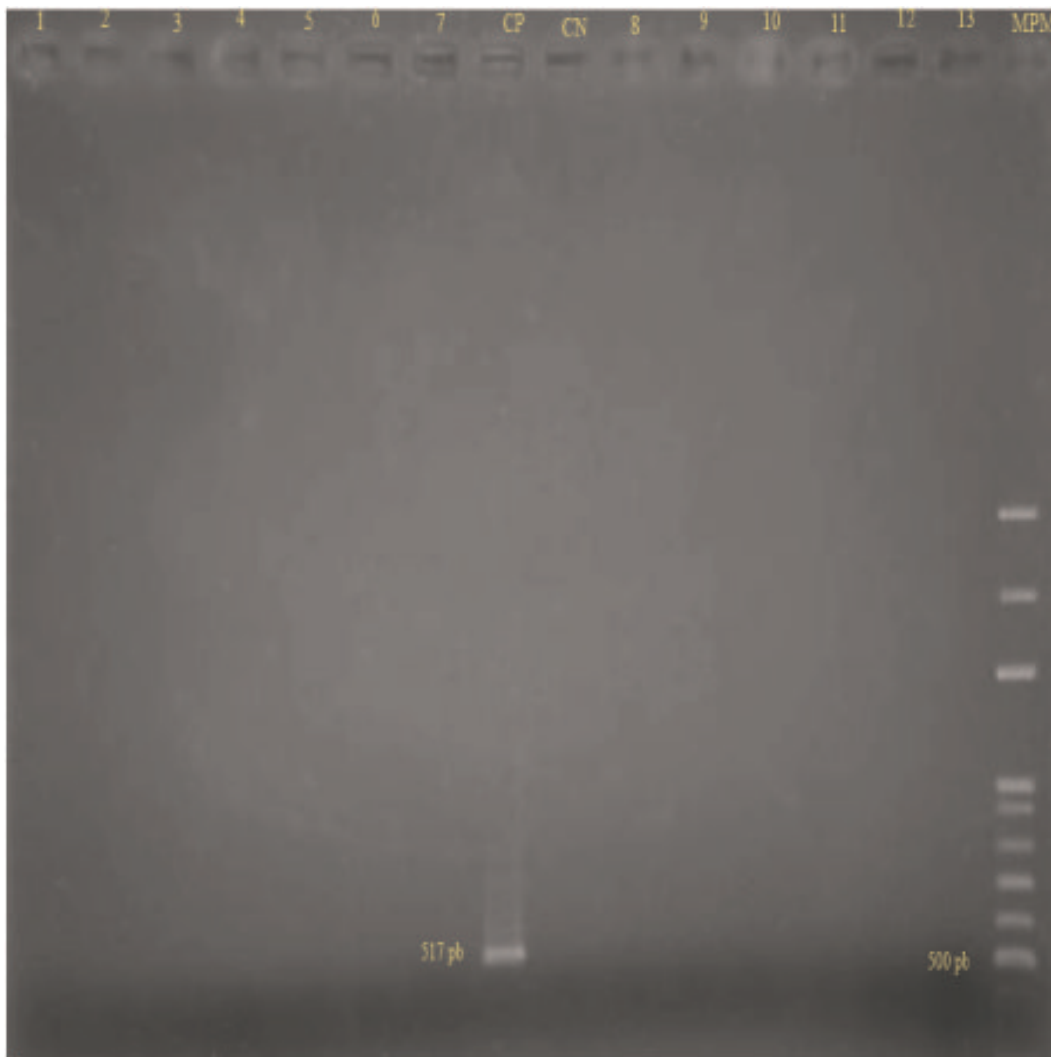
Nota: NS= não significante

Fonte: Elaborado pela autora desta dissertação, 2011

5.4.3 Identificação de *Streptococcus mutans*

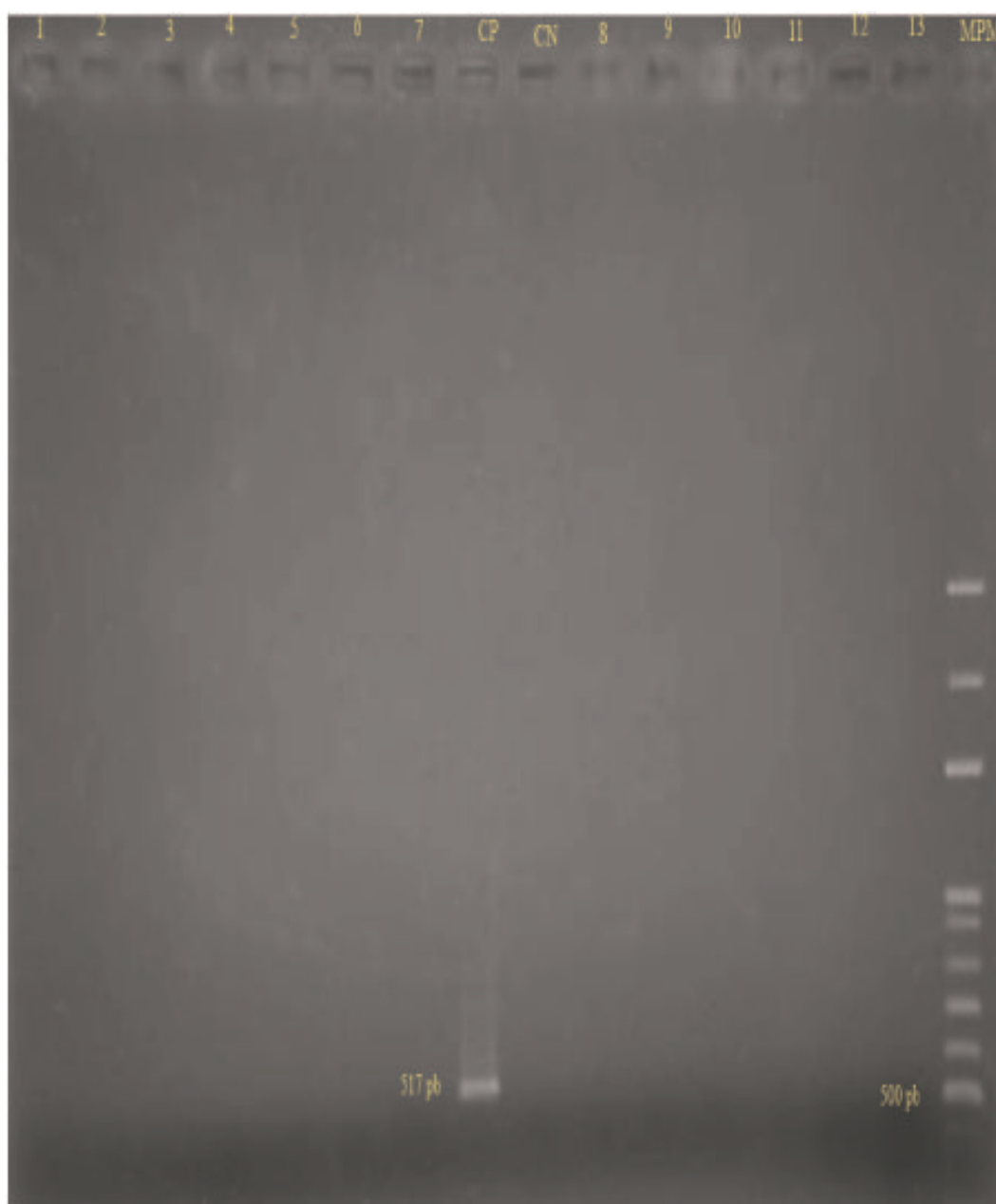
Todas as colônias isoladas das águas coletadas e inoculadas em placa de Petri ou laminocultivo sejam com ou sem desinfecção prévia, não foram confirmadas para *S. mutans*, como mostram as figuras 13 e 14, onde houve amplificação apenas da cepa controle.

Figura 13- Eletroforese em gel de agarose dos produtos amplificados pela PCR para pesquisa de *S.mutans* das amostras crescida em placas de Petri com meio MSB com desinfecção prévia dos pontos estudados (**amostras de 1 a 9**) e sem desinfecção prévia dos pontos estudados (**amostras de 10 a 13**): **1-** Reservatório equipo 2, **2-** Mangueira equipo 2, **3-** Caneta equipo 2, **4-** reservatório equipo 4, **5-** Seringa equipo 4, **6-** Mangueira equipo 5, **7-** Caneta equipo 5, **CP-** Controle positivo, **CN-** Controle negativo, **8-** Seringa equipo 5, **9-** Seringa equipo 6, **10-** Caneta equipo 2, **11-** Mangueira equipo 2, **12-** Seringa equipo 2, **13-** Mangueira equipo 4, **MPM-** Marcador de peso molecular de 100 pb.



Fonte: Elaborado pela autora desta dissertação, 2011

Figura 14- Eletroforese em gel de agarose dos produtos amplificados pela PCR para pesquisa de *S.mutans* das amostras crescidas em placas de Petri com meio MSB (**amostras de 1 a 4**) e em vial com o meio MSBS (**amostras de 5 a 7**): **1-** Seringa equipo 4, **2-** Caneta equipo 5, **3-** Mangueira equipo 5, **4-** Seringa equipo 5, **5-** Caneta equipo 5, **CP-** Controle positivo, **CN-** Controle negativo, **6-** Mangueira equipo 5, **7-** Seringa equipo 5, **MPM-** Marcador de peso molecular de 100 pb



Fonte: Elaborado pela autora desta dissertação, 2011

6. DISCUSSÃO

6.1 Bactérias Heterotróficas:

Em 1995 a ADA (American Dental Association) lançou um desafio aos dentistas para baixar o nível aceitável de contaminação bacteriana das águas que abastecia os equipamentos odontológicos de 500 UFC/mL para 200 UFC/mL, a meta deveria ser atingida até o ano 2000. Porém, diversos estudos realizados ao longo destes mais de 15 anos demonstraram que esta é uma realidade ainda difícil de ser alcançada. Embora métodos de redução ou eliminação da contaminação microbiana nas unidades dentais tenham sido amplamente reportados, muitos dentistas ainda não implantaram no dia a dia estes métodos.

No equipo odontológico são encontrados o reservatório de água com aproximadamente 1000 mL, a caneta de alta rotação, a seringa tríplice e a caneta de baixa rotação, todos funcionando através de um compressor de ar quando do acionamento de um pedal ou no caso da seringa tríplice, durante o pressionamento dos botões localizado no cabeçote da mesma. Contudo, o reservatório de água não está ligado a um nenhum sistema de abastecimento automatizado, devendo sempre ser reabastecido manualmente (XAVIER, 2000)

Os equipos possuem tubulações construídas com materiais plásticos, de diâmetro reduzido e imperfeições microscópicas nas suas superfícies internas, que propiciam o desenvolvimento e a formação de uma capa de bactérias, chamada de biofilme, recobrimdo todo o interior destas pequenas tubulações (PREVOUST *et al.*, 1995).

As águas coletadas neste estudo no ponto FONTE, que vieram de garrafões de água mineral (apêndice B, figura 2), apresentaram crescimento bacteriano. Três de cinco equipos abastecidos com água mineral estavam fora das especificações ditadas pelo MS (equipos um, três e cinco) e dois apresentavam níveis de contaminação dentro do permitido pelo MS (equipos dois e quatro). No entanto a unidade seis que era

abastecida por um destilador de água existente na unidade de saúde, foi a única que não apresentou crescimento bacteriano.

Para Xavier *et al.* (2000) a utilização de água destilada ou mesmo esterilizada nos reservatórios dos equipos não é suficiente para prevenir ou impedir a contaminação e a formação de biofilmes no interior dos sistemas de água desses equipamentos. Por outro lado, Watanabe *et al.* (2006) recomenda que no início de todo expediente de trabalho se deve preencher os reservatórios com água da torneira e/ou filtrada do sistema de abastecimento público, visto que a água mineral apresenta um custo mais elevado e não é adicionada de cloro, o que pode levar a maior proliferação microbiana.

Na presente pesquisa, todos os equipos dos quais foram coletadas as amostras de água, apresentava reservatório tipo garrafa pet. Porém foi possível perceber que em três unidades as garrafas pet eram garrafas de refrigerantes reutilizadas. (apêndice 2, figura 3). Todas as amostras coletadas do ponto RESERVATÓRIO estavam acima de 500 UFC/mL, com exceção do equipo três que apresentou contagem de $2,3 \times 10^2$.

Para Chibebe, Ueno e Pallos (2002) os reservatórios tipo pet apresentam menor índice de contaminação quando comparado com reservatórios tipo fixo, por apresentar maior facilidade de limpeza e custo reduzido fato que poderia propiciar um descarte mais freqüente do mesmo.

Foi observado também que nenhuma das unidades de saúde adiciona qualquer solução desinfetante, como por exemplo, hipoclorito de sódio ou peróxido de hidrogênio à água do reservatório, para realizar através de desinfecção química a limpeza interna das linhas d'água e nenhum dos equipamentos possuíam sistema de desinfecção tipo "flush", que possibilita a liberação de uma solução desinfetante, para este fim. Estes dados sugerem que a maioria das unidades de saúde pesquisadas não mantém limpas as linhas d'água de seus equipos, o que foi comprovado com a enorme contaminação encontrada nas águas que abastecem equipos pesquisados.

Segundo Xavier (2006), a falta de limpeza periódica da garrafa pet, que serve como reservatório de água do equipo, pode contribuir para que bactérias se

multipliquem no remanescente de água que fica parado na garrafa, principalmente após longos períodos de desuso (finais de semana), e quando acionada as peças de mão, tais microrganismos podem ser expelidos no paciente através do spray de água.

De acordo com ANVISA (BRASIL, 2006a) as estratégias para assegurar qualidade à água dos equipamentos odontológicos e alguns periféricos incluem desinfecção química das linhas de água e drenagem diária, manutenção a seco durante a noite e finais de semana dos reservatórios.

Como mencionado anteriormente, metade das amostras coletadas do ponto FONTE, estavam dentro do limite permitido pelo MS, (equipos dois, quatro e seis); porém, as amostras correspondentes a estas no ponto RESERVATÓRIO, apresentaram número acima do permitido pela legislação, o que sugere desatenção aos procedimentos de biossegurança, no tocante a limpeza dos reservatórios nestas unidades de saúde.

O alto nível de contaminação observado no ponto de coleta RESERVATÓRIO deste estudo foi confirmado em outras pesquisas (GALVÃO, MOTTA e ALVAREZ-LEITE, 2006; RUSSO *et al.*, 2000; XAVIER, 2006).

A contagem de bactérias heterotróficas das águas coletadas das amostras das canetas de alta rotação variou de $2,1 \times 10^2$ UFC/mL a $8,6 \times 10^4$ UFC/mL, concordando com Souza-Gugelmin *et al.* (2003) que também encontrou diferentes níveis de contaminação neste ponto, com variações de $1,9 \times 10^2$ UFC/mL a $3,0 \times 10^8$ UFC/mL.

Não foi possível precisar se as canetas de alta rotação encontradas nas unidades pesquisadas possuíam válvulas anti-retração, pois a maioria era muito antiga, sem marca comercial definida e com diversos consertos realizados, nem sempre em lojas autorizadas pelo fabricante, coincidindo com os achados de Xavier (2006).

De acordo com Russo *et al.* (2000) apenas um procedimento operatório, em um único paciente, é suficiente para promover alta contaminação da ponta da seringa tríplici-ce (número de UFC > 300).

No presente estudo, todos os equipos no ponto de coleta SERINGA, apresentaram valores acima do recomendado pelo MS, coincidindo com resultados de Mayo, Oertling e Andrieu (1990), Williams *et al.* (1994), Prevoust *et al.* (1995) e Barbeau *et al.* (1996).

Watanabe (2006), ao comparar níveis de bactérias heterotróficas através de métodos tradicionais e rápidos demonstrou uma contagem de $3,35 \times 10^6$ UFC/mL, em amostras de águas das mangueiras da caneta de alta rotação sem a peça de mão acoplada. Por outro lado, neste estudo a maior contagem encontrada neste ponto, foi de $8,6 \times 10^4$ UFC/mL no equipo de número cinco. Porém, em ambos os estudos foi possível perceber o alto índice de bactérias encontrado neste ponto de coleta.

Nas águas coletadas da caneta de alta rotação, seja acoplada a mangueira (CANETA) ou desacoplada (MANGUEIRA), todas apresentaram crescimento acima do permitido pela legislação, exceto nos equipos três e quatro no ponto CANETA, que tiveram valores dentro do permitido. Demonstrando que a contaminação bacteriana ocorreu mais nas mangueiras do que nas canetas.

Neste ponto de coleta (MANGUEIRA) foram obtidas contagens de $1,0 \times 10^3$ UFC/mL a $8,9 \times 10^4$ UFC/mL. Contrariando os dados de Prevoust *et al.* (1995) e Xavier (2006) que obtiveram contagem entre 5×10^2 UFC/mL a $3,3 \times 10^3$ UFC/mL e $1,0^2$ UFC/mL a $3,7 \times 10^5$ UFC/mL, respectivamente.

Na segunda coleta foram obtidas novas amostras de água dos mesmos pontos estudados para comparação do nível de contaminação por bactérias heterotróficas antes e depois da entrega do CD-ROM com o manual da ANVISA (BRASIL, 2006a). Os resultados mostraram significância estatística apenas nos pontos MANGUEIRA e CANETA (tabela 3) indicando um aumento da contaminação nestes pontos, que teve a maior variação no ponto MANGUEIRA no equipo seis, com variação de $2,4 \times 10^3$ (antes) para $1,7 \times 10^5$ (depois) e no ponto CANETA, no equipo três, que variou de $4,7 \times 10^2$ (antes) para $9,2 \times 10^4$ (depois). Estes resultados demonstram um aumento considerável no nível de contaminação. Os demais pontos continuaram, com índices semelhantes de contaminação, não havendo portanto diferença, estatisticamente significativa entre o

antes e depois., ficando claro a necessidade de capacitação, atualização e avaliação das equipes odontológicas da rede pública estadual de Alagoas, assim como a padronização de procedimentos em toda rede.

6.2 Fungos Filamentosos e leveduras

Durante muitos anos a micologia teve pouca expressão na área médica, possivelmente pela falta de diagnóstico adequado. Com o aparecimento da antibioticoterapia, utilização de métodos imunossupressores, surgimento da AIDS e melhora nos métodos diagnósticos foi observado um aumento no número de casos de infecções fúngicas. (ALMEIDA, [2000?])

Apenas recentemente os fungos foram conhecidos como causadores de enfermidades disseminadas, endocardites, infecções pulmonares, ceratites entre outras, em pacientes imunodeprimidos (BRASIL, 2004b).

Os patógenos fúngicos oportunistas, como *Candida* spp, *Cryptococcus neoformans* e *Aspergillus* spp, geralmente só causam infecção quando ocorrem quebras nas barreiras protetoras da pele e das mucosas ou quando defeitos no sistema imune do hospedeiro permitem a penetração, colonização e reprodução no hospedeiro. Entretanto nas infecções oportunistas há fatores associados ao organismo, e não ao hospedeiro, que contribuem para capacidade do fungo causar doença. (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2006).

Os fungos mais comuns que causam problemas orais são as leveduras imperfeitas e destas, a espécie *Candida* responde pela maioria das infecções. A *Candida albicans* é sem dúvida, a levedura mais comumente isolada das infecções orais, mas outras espécies podem também ser isoladas (MARSH e MARTIN, 2005), em nosso estudo 2.315 leveduras foram isoladas.

De acordo com Molinare (1994) e Williams, Molinare e Andrews (1996) apenas os seguintes gêneros de fungos haviam sido isolados das unidades dentais até aquele momento: *Penicillium* spp, *Cladosporium* spp, *Alternaria* spp, *Scapulariopsis* spp. No

entanto Pankhurst, Johnson e Woods (1998), em sua revisão citaram *Phoma* spp, *Penicillium* spp, *Cladosporium* sp, *Alternaria* spp e *Scapulariopsis* spp.

No presente estudo o gênero mais freqüente foi o *Acremonium* spp, diferindo do estudo de Mills, Lauderdale e Mayhew (1986), que isolaram: *Rhodotorula rubra*, como o fungo mais frequente, seguido por *Aspergillus* sp, *Cladosporium* sp, *Penicillium* sp e um fungo amarelo cinza não identificado. Diferindo também do estudo de Szymanska (2005), onde o gênero de fungo filamentoso mais freqüente foi o *Aspergillus* spp, seguido por *Penicillium* spp, *Sclerotium* sp e *Citromyces* spp.

Porteus *et al.*(2003), isolaram *Exophiala* sp, ao qual os autores denominaram como um fungo não usualmente presente nas linhas d'água dos consultórios odontológicos. Neste estudo também foi isolado *Exophiala* spp, sendo este gênero o segundo mais freqüente.

Foram recuperados das linhas d'água dos consultórios pesquisados, dezesseis gêneros destes, dez gêneros dos que foram isolados, *Acremonium* spp, *Bipolaris* spp, *Cladophialophora* spp, *Chrysosporium* sp, *Curvularia* spp, *Fusarium* spp, *Mycelia Sterilia*, *Paecilomyces* sp, *Rhinocladiella* spp, *Verticillium* spp, não foram mencionados nos estudos acima.

O aerossóis contaminado com fungos gerados durante o trabalho com peças de mão dos equipos odontológicos, podem ser uma ameaça para a saúde tanto para pacientes como para a equipe odontológica. A infecção resultante da inalação de esporos de *Aspergillus* spp pode causar asma brônquica em pacientes alérgicos a antígenos deste fungo (SZYMANSKA, 2005). Além do *Aspergillus* spp, fungos como, *Curvularia* spp, *Mycelia Sterilia*, *Phoma* spp e *Scopulariopsis* spp, apresentam algumas espécies com potencial patogênico para causar reações alérgicas e hipersensibilidade (MURAY, 2002). Por outro lado, os gêneros *Acremonium* spp, *Bipolares* spp, *Cladosporium* spp, *Penicillium* spp, *Paecilomyces* spp e *Verticillium* spp, podem causar infecções nas córneas, podendo trazer problemas para usuários de lentes contato (MURAY, 2002; SZYMANSKA, 2005).

Uma atenção maior tem sido dada a infecções por fungos do gênero *Fusarium* spp em pacientes após traumas e cirurgias, pois espécies deste fungo podem causar Infecção ocular, infecção sistêmica, sinusite, infecção na pele e nas unhas (MURAY, 2002).

Outra preocupação é com os gêneros *Cladophialophora* spp e *Rhinocladiella* spp, pela possibilidade de causar cromoblastomicose, uma infecção crônica, granulomatosa, caracterizada por lesões nodulares, verrucosas, às vezes ulceradas (MURAY, 2002; BRASIL, 2004b).

Preocupante também são os gêneros *Chrysosporium* spp e *Exophiala* spp que podem provocar lesões de pele e endocardites (MURAY, 2002;).

Foi encontrada presença de uma grande diversidade de fungos filamentosos nas águas dos consultórios estudados, com o agravante fato, que todos os gêneros isolados apresentam espécies potencialmente patogênicas.

6.3 Coliformes Totais e Termotolerantes:

As bactérias do grupo coliforme estão presentes no intestino humano e de animais de sangue quente, sendo eliminadas nas fezes em números elevados (10^6 - 10^8 /g). Entretanto, o grupo dos coliformes totais inclui bactérias não exclusivamente de origem fecal, podendo ocorrer naturalmente no solo, água e plantas.

O grupo dos coliformes termotolerantes inclui bactérias de origem não exclusivamente fecal, embora em proporção bem menor que a encontrada no grupo dos coliformes totais. Contudo, a presença de coliformes termotolerantes, na maioria das vezes, guarda melhor relação com a presença de *E. coli*, o indicador mais preciso de contaminação fecal. Mesmo em mananciais bem protegidos não se pode desconsiderar a importância sanitária da detecção de *E. coli*, pois, no mínimo, indicaria a contaminação de origem animal silvestre, podendo tornar-se reservatórios de agentes patogênicos ao ser humano.(BRASIL, 2006b).

Assim sendo a presença de coliformes totais indica a possibilidade de contaminação fecal e a presença de coliformes termotolerantes determina a origem fecal da contaminação.

Neste estudo 11 amostras apresentaram coliformes totais, discordando dos estudos realizados por Mayo, Oertling e Andrieu (1990), Xavier *et al*, (2000) e Araújo e Lopes-Silva, (2002), onde foram negativas as pesquisas para bactérias do grupo Coliformes.

Todas as águas coletadas do ponto FONTE vieram de garrafões de água mineral que se localizavam sobre bebedouros elétricos, exceto na unidade seis que foi coletada de um destilador de água existente na unidade de saúde (apêndice B, figura 2). Os resultados mostraram que a água que tem por propósito matar a sede das equipes multidisciplinares das unidades um, quatro e cinco, eram impróprias para o consumo humano. O mesmo ocorreu com as águas que abasteceram os reservatórios, seringas tríplices e canetas de alta rotação dos equipos das unidades dois e cinco.

Como todos os cuidados foram tomados para não haver contaminação durante coleta e processamento da água, os resultados do ponto FONTE no que diz respeito às unidades um e quatro, sugere que a água que existia no reservatório no momento da coleta, não provinha do mesmo bebedouro ou talvez, se do mesmo bebedouro, de um garrafão de água mineral diferente.

6.4 Identificação do *Streptococcus mutans*

De acordo com Jorge (2008) os estreptococos do grupo mutans são cocos Gram positivos, imóveis, catalase negativos, que formam cadeias curtas ou médias. Em meio Agar Mitis Salivarius crescem como colônias convexas, opacas, com aparência de vidro esmerilhado. Para Moreira (2006) as bactérias *S. mutans* são cocos Gram positivos, com morfologia ovalada, medindo aproximadamente 0,5 a 0,75 µm de diâmetro, agrupam-se aos pares ou em cadeias, requerem meios nutricionalmente ricos para seu crescimento e temperatura média de 37 °C. Em meio de cultura ágar Mitis Salivarius acrescido de bacitracina (MSBS), formam colônias pequenas, com bordos irregulares,

fortemente aderidas ao meio. Com adição de sacarose ao agar, muitas linhagens de *S. mutans* produzem colônias de cerca de 1 mm de diâmetro. O *Streptococcus mutans* é o coco Gram-positivo mais rotineiramente isolado da placa dental, das lesões cariosas e da saliva. (LINDQUIST e EMILSON,1991; RODRIGUES *et al*, 2008).

O meio de cultura mais utilizado para isolamento do *Streptococcus mutans* é o Agar Mitis Salivarius. Este meio foi inicialmente elaborado por Chapman (1946) e continha azul de tripan e cristal de violeta como agentes seletivos e era ainda acrescido de 1% de telurito de potássio; foi por muito tempo utilizado no isolamento de estreptococos da cavidade bucal (JORGE, 2008). Porém Gold *et al.*(1973), fizeram uma modificação no meio Mitis Salivarius acrescentando 15% de sacarose e 0,2 UI de bacitracina por mililitro, surgindo assim, o meio Mitis Salivarius Bacitracina Sacarose (MSBS). O MSBS possui custo bastante elevado e sua preparação é laboriosa. Outra desvantagem deste meio de cultura é o curto prazo de validade em média de sete dias devido à presença da bacitracina na sua composição (JORGE, 2008).

Segundo Kamiyama *et al.* (2003) e Saraiva (2010), diferentes meios de cultura sólidos ou líquidos tem sido utilizados para a detecção de estreptococos do grupo mutans na saliva e no biofilme dentário. Porém, o MSBS é ainda o mais utilizado no isolamento do *Streptococcus mutans* (JORGE, 2008).

Neste estudo foi utilizado o meio Mitis Salivarius elaborado por Chapman (1946) adicionado de bacitracina (MSB) em placa de Petri com desinfecção prévia dos pontos (fricção de álcool a 70%) em todos os cinco pontos estudados, e sem desinfecção prévia em três pontos (CANETA, MANGUEIRA e SERINGA) onde a possibilidade da presença de *Streptococcus mutans* seria mais efetiva.

Foi feita a comparação dos pontos sem desinfecção prévia entre o meio MSB e MSBS, utilizando para o primeiro o meio em placas de Petri e para o segundo um dispositivo (vial) feito de duas lâminas contendo o meio MSBS, e através da PCR foi comprovado que de todas as colônias bacterianas crescidas em ambos os meios, nenhuma era de *Streptococcus mutans*. (figuras 13 e 14) Para Kimmel e Tinanoff, (1991), o MSB não suprime os estreptococos não-mutans, podendo levar a resultados

falso-positivos e para Tanzer *et al.* (1984) o MSBS é parcialmente seletivo. Nesta pesquisa, em ambos os meios houve crescimento de outros microrganismos que não eram *Streptococcus mutans*, inclusive crescimento de fungos filamentosos. Confirmando os achados de Tanzer *et al.* (1984) e Kimmel e Tinanoff, (1991), que os meios MSB e MSBS não são seletivos, são, quando muito, parcialmente seletivos.

Entretanto, este resultado apontou o meio menos susceptível a um crescimento diferenciado, que neste caso foi o MSBS, como também mostrou que o laminocultivo pode ser uma alternativa interessante para isolamento de *Streptococcus mutans*, pois sua utilização é muito prática e seu preço de aproximadamente U\$ 8,0 por vial não é tão abusivo se levado em conta que vem um kit completo, incluindo a pastilha de CO₂ para a anaerobiose. A única desvantagem observada foi seu gabarito (figura 9) que leva a uma superestimação no número de colônias. Por outro lado, cabe ressaltar que este foi um estudo feito em água, não em saliva. Para uma avaliação deste dispositivo em saliva, seriam necessários novos estudos.

A desinfecção prévia com álcool a 70% não inibiu a sua presença de microrganismos. Concordando com Pereira *et al.*, (2008) que ao estudar a rotina de descontaminação de 19 canetas de alta rotação concluiu que álcool a 70% não foi eficiente para inativar os microrganismos presentes.

Bagga *et al.*, (1984) e Berlutti *et al.* (2003), demonstraram que as válvulas de retração na sua maioria não impedem o refluxo quando da paralisação da caneta de rotação e que parte do material do paciente retorna para dentro das mangueiras contaminando as linhas d'água. Por sua vez Russo, (2003) demonstrou que a contaminação do ambiente de trabalho por *Streptococcus mutans* resultante do aerosol gerado pela caneta de alta rotação durante procedimentos de dentística, variou de um paciente para o outro e atingiu a uma distância de 2 metros e a contaminação foi maior na área próximo ao paciente, sobretudo à esquerda a 30 centímetros, bem como no avental e na máscara do operador.

A presença de *Streptococcus mutans* no biofilme dental está bem documentada na literatura. Mas quanto ao isolamento de *Streptococcus mutans* no biofilme formado

nas linhas d'água dos consultórios odontológicos existe um vazio literário. Isto acontece talvez devido a pouca possibilidade de sobrevivência desse microrganismo no biofilme formado nas mangueiras dos equipos que são flexíveis e não tão dura quanto à superfície dental, dificultando assim a adesão à parede das mangueiras. Outro fator que dificulta o isolamento de *S mutans* pode estar ligado à ausência de um fornecimento constante de sacarose nas linhas d' água, pois segundo Marsh e Martin (2005), a distribuição dos microrganismos está relacionada à sua habilidade de aderência a um local, assim como a satisfação das necessidades ambientais e nutricionais. Outra possibilidade para o não isolamento seria devido à variação de temperatura sofrida pela água que muitas vezes ficam acondicionadas durante horas em um reservatório de um equipo, sujeita a mudanças de temperatura ocorridas dentro do consultório; ou ainda durante a coleta onde sofre uma variação de temperatura brusca, quando depois de colhida a amostra, a mesma é colocada diretamente no gelo. Outra alternativa plausível, seria devido à variação do pH, que segundo a portaria número 518 do MS (BRASIL, 2004a) a água potável deve ter o pH entre 6,0 e 9,5, quando o pH ideal para o desenvolvimento do *Streptococcus mutans*, de acordo com JORGE (2008), é um pH ácido (4,3), entretanto para Li (2001) o *Streptococcus mutans* tem viabilidade de 100% para seu crescimento e multiplicação em um pH entre 5,5 e 6,0, em um pH de 5,0 esta viabilidade cai e fica entre 98% a 91% e no pH 3,0 suas células morrem. Provavelmente o fato de não ter conseguido isolar *S.mutans* nas águas dos equipos estudados, seja devido a uma associação de todos os fatores expostos anteriormente.

7 CONCLUSÕES

Os dados obtidos permitiram concluir que:

- O alto índice de contaminação encontrado demonstrou que a água das unidades dentais pesquisadas não era de boa qualidade. A presença de coliformes totais tornou a água não potável e considerada imprópria para o consumo humano e conseqüentemente para utilização em procedimentos odontológicos, podendo assim, ser considerada como uma fonte potencial de infecções cruzadas.
- A grande quantidade e diversidade encontradas de isolados de fungos filamentosos com espécies potencialmente patogênicas mostraram que a análise micológica periódica das águas utilizadas nos procedimentos odontológicos é de suma importância na prevenção contra infecções.
- A técnica de PCR-GE demonstrou que os microrganismos que cresceram, nos meios seletivos para *S.mutans* não correspondiam a esta espécie, mostrando que estes meios não suprimem o crescimento de outras espécies de bactérias e fungos filamentosos. Não foi possível o isolamento de *Streptococcus mutans* nas linhas d'água dos consultórios odontológicos da rede pública estadual de Alagoas. Sugerindo a necessidade de novos estudos que retifiquem ou ratifiquem estes dados.

REFERÊNCIAS

- ABEL, L. C. et al. Studies on dental aerobiology IV: bacterial contamination of water delivered by dental units. *Journal Dental Research*, v. 50, n. 6, p. 1567-1569. Nov./Dec. 1971.
- AGUIAR, C. M.; PINHEIRO, J. T. Avaliação bacteriológica da qualidade da água usada nos equipos odontológicos. *Revista da Associação Paulista de Cirurgiões Dentistas*, São Paulo, v. 53, n. 3, p. 228-235. Maio/Jun. 1999.
- AGUIAR, C. M.; PINHEIRO, J. T. Avaliação de tratamento químico da água dos equipos odontológicos. *An. Fac. Odont. Univ. Fed. Pernamb.*, Recife, v.10, n.1, p. 4-13. 2000.
- ALMEIDA,SR, Apostila de micologia clínica, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo.[2000?]. Disponível em: <www.portalbrasil.net/downloads/micoses.pdf>. Acesso em 20 de janeiro de 2011.
- AMERICAN DENTAL ASSOCIATION. Statement on dental unit waterlines. *ADA Council on Scientific Affairs Resol B*, p.168-1996. Feb,1995.
- ARAÚJO, C. M.; LOPES-SILVA, A M. S. Análise da qualidade da água de reservatórios de equipamentos odontológicos. *Revista Biociência*, Taubaté, v. 8, n.1, p. 21-28. Jan/Jun. 2002.
- BAGGA, B. S. R. et al. Retraction valves on modern dental units may cause cooling water to return to the unit? How significant is this action? Can it be prevented? *Journal American Dental Association*, Chicago, v. 109, p. 712-716. Nov. 1984.
- BARBEAU, J et al. Multiparametric Analysis of Waterline Contamination in Dental Units. *Applied and Environmental Microbiology*, v.62, n. 11. p. 3954–3959. Nov. 1996.
- BERLUTTI, F et al. Efficacy of anti-retraction devices in preventing bacterial contamination of dental unit water lines. *J Dent*, n. 31, p.105-110. 2003.
- BIANCHI, R. et al. Análise microbiológica quantitativa da água que alimenta as canetas de alta rotação dos ambulatórios da FO-UFRGS. *Revista da Faculdade de Odontologia, Porto Alegre*, v. 39, n. 2, p. 03-07. Dez. 1998.
- BIERNAT, PC et al. Amiloidose por hemodiálise: o que pode mudar com ozônio e água ultra-pura? Disponível em: <<http://www.medonline.com.br/biern5.htm>>. Acesso em 20 de janeiro de 2011.
- BITTENCOURT, E.I et al. Avaliação da contaminação das canetas de alta rotação na clínica odontológica. *Rev. ABO Nac*, v. 11, n. 2, p.92-98. Abril/Maio. 2003.

BLAKE G. C. The incidence and control of bacterial infection in dental spray reservoirs. *British Dental Journal*, v. 115, n.19, p.413-416. Nov. 1963.

BRASIL. Portaria Ministério da Saúde nº 518 de 25 mar. 2004. Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, e dá outras providências. *Diário Oficial da União*, Brasília, 26 mar. 2004a.

BRASIL. ANVISA. Ministério da Saúde. Detecção e identificação de bactérias de importância médica. In: Manual de microbiologia clínica para o controle de infecção em serviços de saúde, módulo VII. Brasília: ANVISA, 2004. Edição comemorativa para IX Congresso Brasileiro de Controle de Infecção e Epidemiologia Hospitalar, Salvador 30 de agosto de 3 de setembro de 2004b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Serviços Odontológicos: Prevenção e Controle de Riscos / Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Ministério da Saúde, 2006a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Inspeção sanitária em abastecimento de água / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. Brasília : Ministério da Saúde, 2006b.

CHAPMAN, G. H. The isolation and testing of fecal streptococci. *American Journal of Digestive Diseases*, V. 13, n. 4, p.105-107.1946.

CHIBEBE, P. C.; UENO, M.; PALLOS, D. Biossegurança: avaliação da contaminação da água de equipamentos odontológicos. *Revista Biociência*, Taubaté, v. 8, n. 1, p. 53-59. Jan./jun. 2002.

CLARCK, A. Bacterial colonization of dental units and the nasal flora of dental personnel. *Proc.Roy.Soc.Med*, v.67, p. 1269-1270. Dec. 1974.

COBB, C.M. et al. How does time-dependent dental unit waterline flushing affect planktonic bacteria levels? *Journal of Dental Education*, Washington, v. 66, n. 4, p.549-555. Apr. 2002.

COSTERTON, J. W. et al. Bacterial biofilm in nature and disease. *Annual Review Microbiology*, Palo Alto, v. 41, p. 435-464. October.1987.

D'ÁVILA, S; ROSA, M.R.D; CALDAS JÚNIOR, A.F. Análise bacteriológica da água utilizada nos equipos odontológicos do SUS em João Pessoa, PB. *Rev. ABO Nac*, v.14, n. 2. Abril/ Maio. 2006.

FANTINATO, V. et al. Exame bacteriológico da água em clínica odontológica. *Revista da Associação Paulista de Cirurgiões Dentistas*, São Paulo, v. 46, n. 4, p. 829-831. Jul./Ago. 1992.

FANTINATO, V. et al. Descontaminação da água de equipos através de antisséptico. *Revista Brasileira de Odontologia*, v. 2, n. 2, p. 6-8. Mar/Abr. 1995.

GALVÃO, C.F; MOTTA, G.F; ALVAREZ-LEITE, M.E. Análise quantitativa da contaminação da água das tubulações de equipamentos odontológicos. *Arquivo brasileiro de Odontologia*, v. 2, n.2, p.3-9. Agosto/Dezembro. 2006.

GOLD, O. G. et al. A selective medium for *Streptococcus mutans*. *Arch. Oral Biol.*, v. 18, p. 1357-1364. 1973.

GROSS, A.; DEVINE, M. J.; CUTRIGHT, D. E. Microbial contamination of dental units and ultrasonic scalers. *Journal of Periodontology*, Chicago, v. 47, n. 11, p.670-673. Nov. 1976.

HERD, S et al. The in vivo contamination of air-driven low-speed handpieces with prophylaxis angles. *Journal American Dental Association*, v. 138, p. 1360-1365. October 2007.

JORGE, O.C. *Microbiologia- Atividades práticas*. 2.ed. São Paulo. Ed: Livraria Santos Editora Ltda, 2008.

KOMIYAMA, E.Y et al. Avaliação do meio LAPTg como alternativa para o isolamento de *Streptococcus* do grupo *mutans* e Lactobacilos da saliva. *Rev. Biociência*, Taubaté, v.9, n.4, p.59-64. Out-Dez. 2003.

LEWIS, D. L.; BOE, R. K. Cross-infection risk associated with current procedures for using high-speed dental handpieces. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 30, n. 2, p. 401-406. Feb. 1992.

Li, Y.H et al. Cell density modulates acid adaptation in *Streptococcus mutans*: implications for survival in biofilms. *J Bacteriology*, v. 23, n.183, p. 6875-6884, 2001.

LINDQUIST, B.; EMILSON, C. G. Dental localization of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* in human harboring both species. *Caries Res*, v.25, p.146-152. 1991.

LINGER, J.B. et al. Evaluation of a hydrogen peroxide disinfectant for dental unit waterlines. *Journal American Dental Association*, v. 132, p. 1287-1291. Sept. 2001.

MACHADO, C. F. *Avaliação da presença de microrganismos indicadores de contaminação e patogênicos em líquidos lixiviados de aterro sanitário de Belo Horizonte*. 2004. 125 f. Dissertação (Mestrado em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos) Universidade Federal de Minas Gerais. 2004.

MARSH, P; MARTIN, M. V. *Microbiologia oral*. 4.ed. São Paulo. Ed: Livraria Santos Editora Com. Imp. Ltda., 2005.

- MAYO, J. A.; OERTLING, K. M.; ANDRIEU, S.C. Bacterial biofilm: a source of contamination in dental air-water syringes. *Clinical Preventive Dentistry*, Philadelphia, v. 12, n. 2, p. 13-20. June/July. 1990.
- McDOWELL, J.S et al. A simulated-use evaluation of a strategy for preventing biofilm formation in dental unit waterlines. *Journal American Dental Association*, v.135, p.779-805. June. 2004.
- MEILLER, T.F et al. Dental unit waterlines: biofilms, disinfection and recurrence. *Journal American Dental Association*, v. 130, p.65-72. Jan. 1999.
- MILLS, S. E.; LAUDERDALE, P. W.; MAYHEW, R. B. Reduction of microbial contamination in dental units with povidone-iodine 10%. *Journal American Dental Association*, Chicago, v. 113, n. 2, p. 280-284. Aug. 1986.
- MOHAMMED, C. I.; MANHOLD, J. H.; MANHOLD, B. S. Efficacy of preoperative rinsing to reduce air contamination during use of air turbine handpieces. *Journal American Dental Association*, v. 69, p. 43-46, Dec.1964.
- MOLINARE J. A. Waterborne microorganisms: colonization, contamination, and disease potential - part 1. *Compendium Cont Dent Educ*, v.15, n.10, p.1192-1194. 1994.
- MOREIRA, M. *Variabilidade genética de Streptococcus mutans em isolados intrafamiliares, por meio de marcadores RAPD*. 2006. 106 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia). Parasitologia e Patologia do Setor de Ciências Biológicas na Universidade Federal do Paraná. Curitiba. 2006.
- MURRAY, J.P, SLACK, G.L. Bacterial colonization of dental units . *British Dental Journal*, v.102, p.172.1957.
- MURRAY,P.R. *Microbiologia Clínica*. 2.ed. Rio de Janeiro. Ed: MEDSI Editora Médica e Científica Ltda, 2002.
- MURRAY, P. R; ROSENTHAL, K. S; PFALLER, M. A. *Microbiologia Médica*. 5.ed. Rio de Janeiro Ed:Elsevier Editora Ltda, 2006.
- OHO T, YAMASHITA Y, SHIMAZAKI Y, KUSHIYAMA M, KOGA T. Simple and rapid detection of Streptococcus mutans and Streptococcus sobrinus in human saliva by Polymerase Chain Reaction. *Oral Microbiol Immunol*. 2000; 15: 258-62.
- PANKHURST, C. L.; JOHNSON, N.W; WOODS, R.G. Microbial contamination of dental unit waterlines: the scientific argument. *International Dental Journal*, v. 48, n. 4, p. 359-368, 1998.

PEREIRA, R.S et al. Análise microbiológica de canetas odontológicas de alta rotação submetidas à descontaminação com álcool etílico a 70%. *Robrac*, v.44, n. 17, p. 124-132. 2008.

PORTEOUS, N. B. et al. Isolation of an usual fungus in treated dental unit waterlines. *Journal American Dental Association*, Chicago, v. 134, n. 7, p. 853-858. July. 2003.

PORTEOUS, N; PARTIDA MN. The Effect of Frequent Clinical Use of Dental Unit Waterlines on Contamination. *New York State Dental Journal*, New York, v. 75, n. 3, P. 20-24. April. 2009.

PREVOST, A. P. et al. Doctor, would you drink water from your dental unit? *New York State Dental Journal*, New York, v. 61, n. 12, p. 22-28, Dec. 1995.

RIDDELL, R. W. Permanent stained mycological preparations obtained by slide culture. *Mycologia*, V.42, N.2, P. 265-270, 1950.

RODRIGUES, MR et al. Análise do sorotipo e dos genes para mutacinas em *streptococcus mutans* isolados de pré-escolares com diferentes experiências de cárie. *Cienc Odontol Bras*, v.11, n.4,p. 40-46. Out/Dez.2008.

RUSO, E et al. Avaliação da intensidade de contaminação de pontas de seringa triplice. *Pesqui Odontol Bras*, v. 14, n. 3, p. 243-247. Jul/Set, 2000.

RUSO, E. *Avaliação do grau e da extensão da contaminação no consultório durante procedimentos de dentística restauradora*;2003. 93 f. Dissertação (Mestrado em Odontologia, área de concentração: Dentística) Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia. São Paulo. 2003.

SANT'ANNA, R.M.F et al. Avaliação bacteriológica do biofilme formado em equipamentos odontológicos. *Salusvita*, Bauru, v. 20, n. 1, p. 159-166. 2001.

SARAIVA, M.E. *Quantificação e identificação morfológica e bioquímica para confirmação fenotípica de S.mutans e S.sobrinus, utilizando o meio de cultura SB-20 modificado: Estudo in vitro e in vivo*. 2010. 93 f. Tese (Doutorado em Ciências. Programa: odontopediatria, Área de concentração: Odontopediatria). Universidade de São Paulo Faculdade de odontologia de Ribeirão Preto. Ribeirão Preto, 2010.

SCANNAPIECO, F.A et al. Exposure to the Dental Environment and Prevalence of Respiratory Illness in Dental Student Populations. *Journal de l'Association dentaire canadienne*, v. 70, n. 3, p.170-174. Mars. 2004.

SCHL, A.J et al. Comparison of the Efficacies of Disinfectants To Control Microbial Contamination in Dental Unit Water Systems in General Dental Practices across the European Union. *Applied and Environmental Microbiology*, v.72, n. 2, p.1380–1387. Feb..2006.

SHEARER, B. G. Biofilm and the dental office. *Journal American Dental Association*, v. 127, p. 181-189. Feb. 1996.

SILVEIRA, N. F.A. Aplicação de métodos rápidos para controle microbiológico. Disponível em: < www.fooddesign.com.br/arquivos/academia/nelianesilveira.pdf > acesso em 20 de janeiro de 2011.

SCIAKY, I, SULITZEANU, A. Importance of dental units in the mechanical transfer of oral bacteria. *J.dent.Res*, v.41, p. 714. 1961.

SOUZA-GUGELMIN, M. C. M. et al. Microbial contamination in dental unit waterlines. *Brazilian Dental Journal*, Ribeirão Preto, v. 14, n. 1, p. 55-57. Mar. 2003.

SZYMANSKA, J. Evaluation of mycological contamination of dental unit waterlines. *nnals of Agricultural Environmental Medicine*, v.12, p. 153-155. 2005.

SZYMANSKA, J. Exposure to airborne fungi during conservative dental treatment. *Annals of Agricultural Environmental Medicine*, v.13, p. 77-179. 2006.

TANZER, J. M. et al. Glucose-sucrose-potassium tellurite-bacitracin agar, an alternative to mitis salivarius-bacitracin agar for enumeration of *Streptococcus mutans*. *J. Clin. Microbiol*, v. 20, p. 653-659. 1984.

WATANABE, E et al. Diferentes métodos de avaliação do nível de contaminação microbiana da água de alta rotação. *Robrac*, v. 40, n. 15, p. 3-9. 2006.

WATANABE, E et al. Dental unit water: bacterial decontamination of old and new dental units by flushing water. *Int J Dent Hygiene*, n. 6, p. 56–62. 2008.

WILLIAMS JF; MOLINARI JA and ANDREWS N. Microbial contamination of dental unit waterlines: origins and characteristics. *Compendium Cont Dent Educ*, v.17, n.6, p.538-58. 1996.

WILLIAMS, H. N. et al. Assessing microbial contamination in clean water dental units and compliance with disinfection protocol. *Journal American Dental Association*, Chicago, v. 125, p. 59-65. Sept. 1994.

XAVIER, F.V. Avaliação microbiológica associada ao risco de infecção cruzada através das linhas d'água dos equipos odontológicos na rede pública de saúde. 2006. 97 f. Dissertação (Mestrado em Ciência do Ambiente) Universidade Federal do Tocantins. Palmas. 2006.

XAVIER, F.V; BERTOLINI, A.O; NAVAL, L.P. Avaliação micobiológica associada ao risco de infecção cruzada através das linhas d'água dos equipos odontológicos na rede pública de saúde. *Revista Ciências Odontológicas* , ano 9, n. 9, p.13-18. 2006.

XAVIER, H.V.M. Análise bacteriológica da água de equipos odontológicos. *Acta Scientiarum*, v.22, n.2, P.631-636. 2000.

APÊNDICES

APÊNDICE A

ILUSTRAÇÕES DOS PONTOS DE COLETA

Figura 1- Vista geral do consultório odontológico



Fonte: Elaborado pela autora desta dissertação, 2011

Figura 2- Pontos de coleta FONTE



Fonte: Elaborado pela autora desta dissertação, 2011

Figura 3- Ponto de coleta RESERVATÓRIO



Fonte: Elaborado pela autora desta dissertação, 2011

Figura 4- Circuito hídrico do equipo odontológico



Fonte: Elaborado pela autora desta dissertação, 2011

Figura 5- Ponto de coleta CANETA
(caneta de alta rotação acoplada a mangueira)



Figura 6- Orifícios de saída de água
da caneta de alta rotação



Fonte: Elaborado pela autora desta dissertação, 2011

Figura 7- Orifícios de encaixe da caneta de alta
rotação com a mangueira



Figura 8- Spray da caneta de alta rotação



Fonte: Elaborado pela autora desta dissertação, 2011

Figuras 9 e 10- Ponto de coleta MANGUEIRA (mangueira da caneta do alta rotação sem a peça de mão acoplada)



Fonte: Elaborado pela autora desta dissertação, 2011

Figura 11- Ponto de coleta MANGUEIRA (mangueira da caneta do alta rotação sem a peça de mão acoplada)



Fonte: Elaborado pela autora desta dissertação, 2011

Figura12- Ponto de coleta SERINGA
(seringa tríplice)



Figura13- Ponto de coleta SERINGA
(seringa tríplice)



Fonte: Elaborado pela autora desta dissertação, 2011

Figura 14- Flushing da seringa tríplice



Fonte: Elaborado pela autora desta dissertação, 2011

APÊNDICE B

ILUSTRAÇÕES DOS PONTOS PESQUISADOS NO MOMENTO DA COLETA

Figura 1- Situação dos equipos encontrada em cada consultório pesquisado antes da coleta nos seis consultórios avaliados na primeira coleta no período de outubro de 2009 a janeiro de 2010



Fonte: Elaborado pela autora desta dissertação, 2011

Figura 2- Pontos informados por cada unidade de saúde como sendo o local de abastecimento dos reservatórios.



Fonte: Elaborado pela autora desta dissertação, 2011

Figura 3- Reservatórios encontrados em cada equipo no dia da coleta.



Fonte: Elaborado pela autora desta dissertação, 2011

APÊNDICE C

MODELO DO PROTOCOLO DE RECEBIMENTO DO CD-ROM E ILUSTRAÇÃO DA CAPA DO MANUAL DA ANVISA

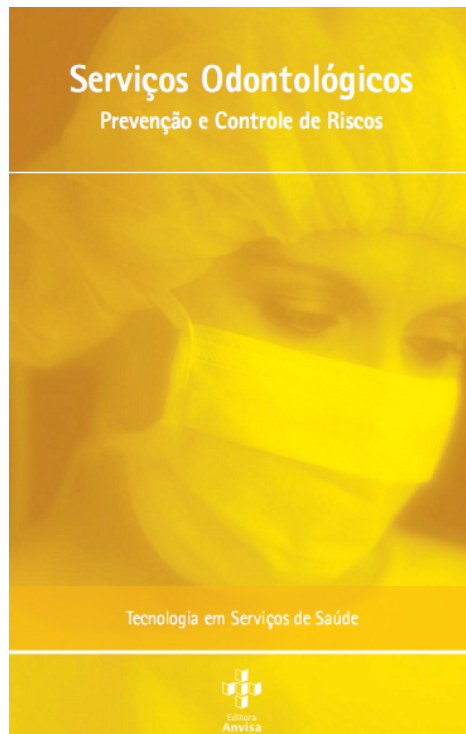
PROTOCOLO

Recebi da **Dra Guacyra Machado Lisboa**, 01(um) CD-ROM onde se encontra gravado o manual de odontologia da ANVISA, em PDF, 943 KB, entregue após realização de coleta de amostras de água para a pesquisa: **ANÁLISE DA CONTAMINAÇÃO DA ÁGUA DAS TUBULAÇÕES E RESERVATÓRIOS DE EQUIPAMENTOS ODONTOLÓGICOS DAS UNIDADES DE ATENDIMENTO ESTADUAL**, realizada após autorização constante no processo 19768 da Secretaria Estadual de Saúde.

Maceió, / /

Nome legível

Figura 1- capa do manual da ANVISA



Fonte: MINISTÉRIO DA SAÚDE/ANVISA

APÊNDICE D**MODELO DO PROTOCOLO DE RECEBIMENTO
DOS LAUDOS****PROTOCOLO**

Recebi da **Dra Guacyra Machado Lisboa**, 01(um) envelope com os laudos dos resultados obtidos na pesquisa: **ANÁLISE DA CONTAMINAÇÃO DA ÁGUA DAS TUBULAÇÕES E RESERVATÓRIOS DE EQUIPAMENTOS ODONTOLÓGICOS DAS UNIDADES DE ATENDIMENTO ESTADUAL**, obtidos após autorização constante no processo 19768 da Secretaria Estadual de Saúde.

Maceió, / /

Nome legível

APÊNDICE E

MODELO DO LAUDO MICROBIOLÓGICO



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALGOAS
LABORATÓRIO DE MICROBIOLOGIA E GENÉTICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

LAUDO MICROBIOLÓGICO

PROJETO: ANÁLISE DA CONTAMINAÇÃO DA ÁGUA DAS TUBULAÇÕES E RESERVATÓRIOS DE EQUIPAMENTOS ODONTOLÓGICOS DAS UNIDADES DE ATENDIMENTO ESTADUAL.

UNIDADE DE SAÚDE:

Data da coleta:

Amostra 1: **seringa tríplice**

Resultado:

INTERPRETAÇÃO: () Valores dentro do padrão de aceitabilidade (portaria 518/04)
() Valores fora do padrão de aceitabilidade (portaria 518/04)

Amostra 2: **Caneta de alta rotação com a caneta acoplada as mangueiras**

Resultado:

INTERPRETAÇÃO: () Valores dentro do padrão de aceitabilidade (portaria 518/04)
() Valores fora do padrão de aceitabilidade (portaria 518/04)

Amostra 3: **Caneta de alta rotação com a caneta desacoplada das mangueiras**

Resultado:

INTERPRETAÇÃO: () Valores dentro do padrão de aceitabilidade (portaria 518/04)
() Valores fora do padrão de aceitabilidade (portaria 518/04)

Amostra 4: **Reservatório**

Resultado:

INTERPRETAÇÃO: () Valores dentro do padrão de aceitabilidade (portaria 518/04)
() Valores fora do padrão de aceitabilidade (portaria 518/04)

Amostra 5: **Local onde é abastecido o reservatório (FONTE)**

Resultado:

INTERPRETAÇÃO: () Valores dentro do padrão de aceitabilidade (portaria 518/04)
() Valores fora do padrão de aceitabilidade (portaria 518/04)

Valores de referência segundo portaria 518 de março de 2004:

§7º Em 20% das amostras mensais para análise de coliformes totais nos sistemas de distribuição, deve ser efetuada a contagem de bactérias heterotróficas e, uma vez excedidas 500 unidades formadoras de colônia (UFC) por ml, devem ser providenciadas imediata coleta, inspeção local e, se constatada irregularidade, outras providências cabíveis.

PONTO	CONTAGEM COLIFORMES TOTAIS NMP		CONTAGEM DE ESCHERICHIA COLI NMP	
	RESULTADO QUANTITATIVO	RESULTADO QUALITATIVO	RESULTADO QUANTITATIVO	RESULTADO QUALITATIVO
CANETA DE ALTA COM CANETA (CANETA)				
CANETA DE ALTA SEM CANETA (MANGUEIRA)				
FONTE				
RESERVATÓRIO				
SERINGA TRÍLPICE				

NMP- NÚMERO MAIS PROVÁVEL

Padrão microbiológico de potabilidade da água para consumo humano (portaria Nº 518 de 25 de março de 2004)

PARÂMETRO	VMP ⁽¹⁾
Água para consumo humano ⁽²⁾	
Escherichia coli ou coliformes termotolerantes ⁽³⁾	Ausência em 100ml
Água na saída do tratamento	
Coliformes totais	Ausência em 100ml
Água tratada no sistema de distribuição (reservatórios e rede)	
Escherichia coli ou coliformes termotolerantes ⁽³⁾	Ausência em 100ml
Coliformes totais	Sistemas que analisam 40 ou mais amostras por mês: Ausência em 100ml em 95% das amostras examinadas no mês; Sistemas que analisam menos de 40 amostras por mês: Apenas uma amostra poderá apresentar mensalmente resultado positivo em 100ml

NOTAS:

(1) Valor Máximo Permitido.

(2) água para consumo humano em toda e qualquer situação, incluindo fontes individuais como poços, minas, nascentes, dentre outras.

(3) a detecção de Escherichia coli deve ser preferencialmente adotada.

Responsável Técnico

ANEXOS

ANEXO A

PROTOCOLO E APROVAÇÃO PELA SECRETÁRIA ESTADUAL DE SAÚDE PARA A COLETA DOS DADOS


ESTADO DE ALAGOAS
SECRETARIA ESTADUAL DE SAÚDE
SUPERINTENDÊNCIA DE ATENÇÃO À SAÚDE
DIRETORIA DE ASSISTÊNCIA HOSPITALAR E DE URGÊNCIA

Processo - nº. 2000 / 19768 / 2008

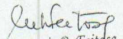
Interessado: Dra. Guacyra Lisboa

Assunto: Pesquisa Microbiológica da Água dos Equipamentos Odontológicos da Rede Pública Estadual

A: Gerência de Núcleo de Saúde Bucal

Para tomar ciência, análise e parecer. Voltando.

Maceió, 18 de novembro de 2008.


Maria Lucia B. Feitosa
Assessoria Técnica da SUAS
Superintendência de Atenção à Saúde


Dr. Alfredo Aurélio de Almeida Rosa
Diretor de Assistência Hospitalar e de Urgência

*Aguardando memorando com orçamento de execução da pesquisa.
De acordo, por entender que a pesquisa constitui uma melhoria p/ a qualidade dos serviços. Técnico da Gerência do Núcleo de S. Bucal
Bernardo U. p. da Silva. CN 01334*


Dr. Vanilo Soares da Silva
Superintendente de Atenção à Saúde


ESTADO DE ALAGOAS
Secretaria Executiva de Saúde — SESAU

 GOVERNO DE ALAGOAS
SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
NÚCLEO DE PROCESSAMENTO DE DADOS - NPD
DIVISÃO DE PROTOCOLO E ARQUIVO - DIPAR

SESAU

Processo Nº: 20000/19768/2008

Interessado: GUACYRA MACHADO LISBOA

Data processo: 10/11/2008

Natureza: REQUERIMENTO

Assunto: SOL AUTORIZAÇÃO PARA COLETAR DADOS

ANEXO B**APROVAÇÃO PARA REALIZAÇÃO DO PROJETO PELO COLEGIADO DO CURSO
DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

Maceió, 23 de março de 2009

Senhora Mestranda Guacyra Machado Lisboa

O Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (PPGCS), reunido em 17 de fevereiro de 2009 e após análise do projeto intitulado: **"Análise da contaminação da água das tubulações e reservatórios de equipamentos odontológicos das Unidades de atendimento estadual"**, de sua autoria e sob orientação do Prof Dr Eurípedes Alves da Silva Filho, vem por meio deste instrumento comunicar sua aprovação.

Atenciosamente,

Profª Drª Salete Smaniotto
Coordenadora PGCS/ICBS/UFAL

ANEXO C**ARTIGO A SER SUBMETIDO AO PERIÓDICO JOURNAL OF THE AMERICAN
DENTAL ASSOCIATION****Isolation of filamentous fungi in dental unit waterlines**

Guacyra Machado Lisboa;^a Eurípedes Alves da Silva Filho^b

^a Graduate student, Master Program in Health Sciences, Universidade Federal de Alagoas (UFAL), Maceió, Brazil. E-mail: gmlgat@uol.com.br

^b Associate Professor, UFAL, Maceió, Brazil. E-mail: alvessf@gmail.com

Corresponding author:

Eurípedes Alves da Silva Filho

ICBS/UFAL

Praça Afrânio Jorge S/N, Poço

Maceió, AL – Brazil

57010-020

Phone: +55 82 9982 5916

e-mail: alvessf@gmail.com

ABSTRACT

Fungi cause disseminated infections, endocarditis, lung infections, keratitis and other diseases in immunosuppressed patients. Host penetration occurs preferentially by upper airways or through the epidermis after trauma with cutting or perforating objects. This study analyzed the quality of water in dental units in the public dental services of the state of Alagoas, Brazil, and evaluated this water as a possible source of filamentous fungi, which are potentially pathogenic organisms. We collected 100 mL of water at 5 sites in six dental offices: three-way syringe, the high-speed handpiece connected to tubing, the high-speed handpiece not connected to tubing, the water reservoir, and the source of water for the reservoir. Aliquots of 100 μ L of pure samples and at a 10^{-1} dilution were plated in duplicate in Sabouraud dextrose agar to which 50 mg.L⁻¹ of chloramphenicol and 50 mg.L⁻¹ of ampicillin were added and incubated at 28° C for 4 to 6 days. Results were expressed in CFU/mL. The large number and diversity of filamentous fungus isolates with potentially pathogenic species suggest that the water used in dental units should undergo regular mycological analysis to prevent infections.

Key words: Water Quality, Biofilms, Infection Control.

1. INTRODUCTION

As the incidence of serious transmissible diseases increased in the last decades, dentists went through a radical change of attitude, which demanded a greater awareness of the risks of contamination (Russo et al. 2000). Although infection control procedures have been extensively discussed, exposure of patients and dental staff to microorganisms found in the water in the dental units remains common in public and private dental services (Xavier 2006). Microbial contamination of dental office waterlines comes from biofilm accumulation on the walls of the hose, which originates in the quality of the water used or the reflux of material from the patient's mouth when the high-speed handpiece slows down and is promoted by the defects on the hose walls and water stagnation within the water circuit. Highly contaminated sprays generated when the high-speed handpieces and tree-way syringes are operated seem to be a difficult problem to solve (Cobb et al. 2002, Lee et al. 2001, Russo et al. 2000, Szymanska 2003).

Once contaminated, the surface of hose lumen may act as a reservoir and facilitate continuous recontamination (Russo et al. 2000).

For many years, mycology received little attention in medical sciences, probably because adequate diagnoses were not made. However, the number of fungal infection diagnoses increased after the advent of antibiotic treatments, the use of immunosuppression, the appearance of AIDS, and the improvement of diagnostic methods (de Almeida).

In Brazil, the Ministry of Health issued the Directive # 518 of March 25, 2004, which defined that, to evaluate the quality of potable water supplied to the population by the public distribution systems, monthly bacteriological analysis should be performed and total coliforms and thermotolerant coliforms should be investigated in all collected samples. In 20% of the samples, heterotrophic bacteria should be counted, and the total should not be greater than 500 colony forming units (CFU) per milliliter of water (Brasil 2004). However, according to Varo et

al. (2007), there are no national or international qualitative or quantitative standards for the mycological analysis of water.

Therefore, this study analyzed the quality of the water used in dental services in the public health care system of the state of Alagoas, Brazil, and evaluated samples as possible sources of potentially pathogenic filamentous fungi.

2. MATERIAL AND METHODS

Water samples were collected from six dental units in hermetically closed, sterilized 100 mL graded wide-mouth bottles containing a 10% sodium thiosulfate tablet to neutralize residual chlorine. Water was collected at random times and days during working hours at the intervals between patients to avoid disrupting the provision of dental care.

Water was collected from the following sites: three-way syringe – SYRINGE; high-speed handpiece connected to the tubing – HANDPIECE; high-speed handpiece not connected to the tubing – TUBING; water reservoir – RESERVOIR; and the source at which the reservoir was supplied – SOURCE.

To disinfect these sites before collection, they were rapidly wiped with a piece of gauze soaked in 70% ethyl alcohol. The three-way syringe and the high-speed handpiece were turned on and the water ran for 10 seconds before collection. From October 2009 to January 2010, five samples of water were collected, one from each site, in the six dental units, at a total of thirty 100 mL samples. After collection, the samples were kept in ice boxes with ice and processed within four hours of collection.

2.1 Sample inoculation and culture

The samples were diluted at 10^{-1} . We plated 0.1 mL of the original sample and the dilution on Sabouraud dextrose agar in Petri dishes, to which 50 mg/l of chloramphenicol and 50 mg.L⁻¹ ampicillin were added, and were spread with a Drigalski spatula until fully absorbed. After that, the dishes were incubated in a bacteriological incubator at 28° C for four to six days. After incubation, the plates were analyzed and colonies were counted; the results were expressed in CFU/mL.

2.2 Identification of filamentous fungi

Filamentous fungi were identified according to genus based on macroscopic and microscopic features. Microscopic analysis was conducted using the microculture technique (Riddell 1950) in Lactrimel medium (14 g wheat meal, 14 g dried milk, 7 g honey and 0.4 g chloramphenicol per liter).

3. RESULTS

Filamentous fungi were isolated in 21 (70%) of the 30 samples (Table 1).

A total of 212 isolates and 16 genera of filamentous fungi were identified in water collected from dental units (Table 2 and Figure 1).

All the 16 genera isolated had potentially pathogenic species.

The greatest number of filamentous fungi isolated was found in the water collected from the TUBING site, which indicates that there is a greater concentration of biofilm in this site (Table 3).

4. DISCUSSION

For many years, mycology had little expression among medical sciences, probably because adequate diagnostic tests were not available. With the development of antibiotic treatments, the use of immunosuppression methods, the appearance of AIDS and the improvement of diagnostic methods, there was an increase in the number of fungal infections (de Almeida).

It was only recently that fungi were recognized as the cause of disseminated diseases, endocarditis, pulmonary infections, keratitis and other conditions that affect patients with immunosuppression (Brasil 2004).

Opportunistic fungal pathogens, such as *Candida* spp, *Cryptococcus neoformans* and *Aspergillus* spp, usually only cause infections when there are breaks in the protective skin and mucosal barriers or when immune system defects allow their penetration, colonization and reproduction in the host. However, opportunistic infections have factors associated with the microorganism, rather than with the host, that contribute to the microorganism's capacity to cause disease (Murray et al. 2006). That might explain why few authors have been concerned with including the investigation of fungi in their studies.

Several genera of filamentous fungi have been found in reviews of the specialized literature. According to Molinari (1994) and Williams, Molinare and Andrews (1996), only the following fungi had been isolated in dental units up to the time their studies were conducted: *Penicillium* spp, *Cladosporium* spp, *Alternaria* spp, and *Scapulariopsis* spp. However, Pankhurst, Johnson and Woods (1998) found *Phoma* spp, *Penicillium* spp, *Cladosporium* sp, *Alternaria* spp and *Scapulariopsis* spp in their review.

In this study, the most frequent genus was *Acremonium* spp, differently from the study conducted by Mills, Lauderdale and Mayhew (1986), who found that *Rhodotorula rubra* was the

most frequent fungus, followed by *Aspergillus* sp, *Cladosporium* sp, *Penicillium* sp and an unidentified grey-yellow fungus. Our findings were also different from those reported in the study conducted by Szymanska (2006), in which the most frequent filamentous fungus was *Aspergillus* spp, followed by *Penicillium* spp, *Sclerotium* sp and *Citromyces* spp.

Porteus et al. (2003) isolated *Exophiala* sp, which, according to the authors, was not often found in dental unit waterlines. *Exophiala* spp was also found in this study and was the second most frequent genus.

In this study, 16 genera were found in the dental unit waterlines under examination, and 10 of the isolated genera, *Acremonium* spp, *Bipolaris* spp, *Cladophialophora* spp, *Chrysosporium* sp, *Curvularia* spp, *Fusarium* spp, *Mycelia Sterilia*, *Paecilomyces* sp, *Rhinocladiella* spp, *Verticillium* spp, had not been reported in the studies discussed above.

Sprays contaminated with fungi and generated when the dental unit handpieces are operated may be a threat to the health of both patients and the dental team.

Infections resulting from inhaling *Aspergillus* spp spores may cause asthma in patients allergic to this fungal antigen (Szymanska 2006). In addition to *Aspergillus* spp, some other species of fungi, such as *Curvularia* spp, *Mycelia Sterilia*, *Phoma* spp and *Scopulariopsis* spp, have a pathogenic potential to cause allergic reactions and hypersensitivity (Murray 2003). Also, *Acremonium* spp, *Bipolares* spp, *Cladosporium* spp, *Penicillium* spp, *Paecilomyces* spp and *Verticillium* spp may cause corneal infections and be a problem for contact lens wearers (Murray 2003, Szymanska 2006).

Greater attention has been assigned to infections due to *Fusarium* spp fungi in patients after trauma and surgeries because some of these fungal species may cause ocular and systemic infections, sinusitis, and skin and nail infections (Murray 2003).

Cladophialophora spp and *Rhinocladiella* spp are an additional source of concern because they may cause chromoblastomycosis, a chronic, granulomatous infection characterized by verrucous, occasionally ulcerated nodules (Brasil 2004, Murray 2003).

Also concerning are *Chrysosporium* spp and *Exophiala* spp, which may cause skin lesions and endocarditis (Murray 2003).

A great variety of filamentous fungi was found in the dental unit waterlines under study, which is of greater concern because all isolated genera have potentially pathogenic species.

5. CONCLUSIONS

Regular microbiological evaluation of the water used in dental units is extremely important to prevent crossed infections.

All the fungi found in our study had potentially pathogenic species. Therefore, standardized procedures must be urgently reviewed to establish new protocols and criteria to evaluate the water used in dental units in private offices and public healthcare services. Moreover, they should be monitored not only for number of bacteria, but also for the presence of filamentous fungi.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Elaine Santos, Mirella Vieira, Rosana Santos and Iara Fonseca from UFAL for their valuable assistance in identifying fungi.

REFERENCES

- Brasil (2004) Portaria Ministério da Saúde nº 518 de 25 mar. 2004. Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, e dá outras providências, Diário Oficial da União, Brasília.
- Cobb, C.M., Martel, C.R., McKnight, S.A., 3rd, Pasley-Mowry, C., Ferguson, B.L. and Williams, K. (2002) How does time-dependent dental unit waterline flushing affect planktonic bacteria levels? *J Dent Educ* 66(4), 549-555.
- de Almeida, S.R. Apostila de micologia clínica, Faculdade Ciências Farmacêuticas Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Lee, T.K., Waked, E.J., Wolinsky, L.E., Mito, R.S. and Danielson, R.E. (2001) Controlling biofilm and microbial contamination in dental unit waterlines. *J Calif Dent Assoc* 29(9), 679-684.
- Mills, S.E., Lauderdale, P.W. and Mayhew, R.B. (1986) Reduction of microbial contamination in dental units with povidone-iodine 10%. *J Am Dent Assoc* 113(2), 280-284.
- Molinari, J.A. (1994) Waterborne microorganisms: colonization, contamination, and disease potential--Part 1. *Compendium* 15(10), 1192, 1194, 1196.
- Murray, P., Rosenthal, K. and Pfaller, M. (2006), Elsevier, Rio de Janeiro.
- Murray, P.R. (2003) *Microbiologia Clínica*, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.
- Pankhurst, C.L., Johnson, N.W. and Woods, R.G. (1998) Microbial contamination of dental unit waterlines: the scientific argument. *Int Dent J* 48(4), 359-368.
- Porteous, N.B., Redding, S.W., Thompson, E.H., Grooters, A.M., De Hoog, S. and Sutton, D.A. (2003) Isolation of an unusual fungus in treated dental unit waterlines. *J Am Dent Assoc* 134(7), 853-858.

- Riddell, R.W. (1950) Permanent stained mycological preparations obtained by slide culture. *Mycologia* 42(2), 265-270.
- Russo, E.M.A., de Carvalho, R.C.R., de Lorenzo, J.L., Garone Netto, N., Cardoso, M.V. and Grossi, E. (2000) [Evaluation of the bacterial contamination of air/water syringes tips]. *Pesqui Odontol Bras* 14(3), 243-247.
- Szymanska, J. (2003) Control methods of the microbial water quality in dental unit waterlines. *Ann Agric Environ Med* 10(1), 1-4.
- Szymanska, J. (2006) Exposure to airborne fungi during conservative dental treatment. *Ann Agric Environ Med* 13(1), 177-179.
- Varo, S.D., Martins, C.H.G., Cardoso, M.J.O., Sartori, F.G., Montanari, L.B. and Pires-Gonçalves, R.H. (2007) [Isolation of filamentous fungi from water used in a hemodialysis unit]. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 40(3), 326-331.
- Williams, J.F., Molinari, J.A. and Andrews, N. (1996) Microbial contamination of dental unit waterlines: origins and characteristics. *Compend Contin Educ Dent* 17(6), 538-540, 542 passim; quiz 558.
- Xavier, F.V. (2006) Avaliação microbiológica associada ao risco de infecção cruzada através das linhas d'água dos equipos odontológicos na rede pública de saúde. dissertation, Universidade Federal do Tocantins, Palmas.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Macroscopic and microscopic image of eight of the sixteen genera isolated and identified in 30 samples from 6 dental units in the public dental care services of the state of Alagoas, Brazil

TABLE 1. Qualitative analysis of filamentous fungi and yeasts found in 30 samples of water of dental units in the public dental care services of the state of Alagoas, Brazil, according to collection site

Unit	Source	Reservoir	Tubing	Handpiece	Syringe
1	F/Y	F/Y	NG	NG	NG
2	Y	F/Y	F/Y	F/Y	F/Y
3	F/Y	F	F	F	Y
4	F	F/Y	F	NG	F
5	F/Y	F/Y	F/Y	Y	Y
6	NG	F/Y	F/Y	F/Y	F/Y

NG = no growth; F = filamentous fungus Y = yeast

TABLE 2. Number of fungi according to genus isolated and identified in 30 samples from 6 dental units in the public dental care services of the state of Alagoas, Brazil

Isolated fungi	n	%
<i>Acremonium</i> spp	99	46.7
<i>Aspergillus</i> spp	19	8.9
<i>Bipolaris</i> spp	06	2.9
<i>Cladophialophora</i> spp	10	4.7
<i>Cladosporium</i> spp	06	2.9
<i>Chrysosporium</i> sp	01	0.4
<i>Curvularia</i> sp	05	2.3
<i>Exophiala</i> spp	31	14.7
<i>Fusarium</i> spp	02	1.0
Mycelia Sterilia	06	2.9
<i>Paecilomyces</i> sp	01	0.4
<i>Penicillium</i> spp	20	9.4
<i>Phoma</i> spp	01	0.4
<i>Rhinocladiella</i> spp	02	1.0
<i>Scapulariopsis</i> sp	01	0.4
<i>Verticilium</i> spp	02	1.0
TOTAL	212	100.0

n = total number of isolates; % = percentage according to number of isolates

TABLE 3. Number of fungi isolated and identified in 30 samples from 6 dental units in the public dental care services of the state of Alagoas, Brazil, according to collection site

Collection site	Isolates (n)
Syringe	07
Reservoir	43
Handpiece	39
Tubing	108
Source	15
TOTAL	212

n = number of isolates