UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

JULIANA GONÇALVES PIRES

**Comparação dos meios de cultura e das técnicas de quantificação
de bactérias e fungos em reservatórios e tubulações de água de
equipos odontológicos**

BAURU
2014

JULIANA GONÇALVES PIRES

**Comparação dos meios de cultura e das técnicas de quantificação de
bactérias e fungos em reservatórios e tubulações de água de equipos
odontológicos**

Dissertação apresentada a Faculdade de
Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Mestre em Ciências no
Programa de Ciências Odontológicas Aplicadas.

Área de concentração Biologia Oral

Orientador: Prof. Dr. Sergio Aparecido Torres

BAURU
2014

P665c Pires, Juliana Gonçalves
Comparação dos meios de cultura e das técnicas de quantificação de bactérias e fungos em reservatórios e tubulações de água de equipos odontológicos / Juliana Gonçalves Pires. – Bauru, 2014.

120 p. : il. ; 31cm.

Dissertação – Faculdade de Odontologia de Bauru. Universidade de São Paulo

Orientador: Prof. Dr. Sergio Aparecido Torres

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação/tese, por processos fotocopiadores e outros meios eletrônicos.

Assinatura:

Data:

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho

A Deus,

Pela sua bondade indiscutível.

A meus pais,

Moacir Duarte Pires e Rosangela Gonçalves Pires,

Pelo amor grandioso, apoio e por ensinarem o verdadeiro significado da vida.

A meu irmão,

Rafael Gonçalves Pires,

Por todo companheirismo, amor e por tornar nossas conversas engraçadas.

A meus avós,

Mauro Duarte Pires e Teresa Menzatto Pires,

Manoel Jesus Gonçalves (*in memorian*) e Aparecida Leonetti (*in memorian*),

Pessoas especiais com humildade incomparável.

A meus amigos,

Anahi Ricaldes, Clarissa Carolina Fernandes Herculiani, Daniela Razera, Eduardo Galeskas,

Guilherme Fernandes e Paulo Henrique Souza,

Verdadeiros amigos que levarei para a vida toda.

A minha família da Microbiologia,

Sergio Aparecido Torres, Ana Paula Campanelli, André Luís da Silva, Dalva Ribeiro de

Oliveira, Livia Maria de Melo, Thais Helena Gasparoto, Clarissa Carolina F. Herculiani,

Gabriela Neubern, Nádia Amôr e Rudan Paraíso,

Minha segunda família, por toda paciência e respeito.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Sergio Aparecido Torres,

Sempre amigo e dedicado, minha gratidão por toda a confiança depositada e por me mostrar esse caminho maravilhoso que é a Microbiologia e a vida acadêmica. Serei eternamente grata por todas as oportunidades, ensinamentos, amizade, respeito, paciência e conselhos que levarei para a minha vida profissional e pessoal. O senhor não só conquistou uma aluna, mas também uma amiga.

- À Faculdade de Odontologia de Bauru, sob o comando do Profa. Dra. Maria Aparecida de Andrade Moreira Machado.
- À Coordenação da pós-graduação e aos membros do Departamento de Ciências Biológicas.
- À Comissão de apoio a pesquisa do estado de São Paulo (CAPES), que me proporcionou a bolsa de Mestrado.
- Aos professores do Departamento de Ciências Biológicas, por passarem um pouco de seus conhecimentos.
- Ao professor Dr. Heitor Marques Honório que me ajudou com a estatística da pesquisa.
- À Profa. Dra. Ana Paula Campanelli, por todo suporte que proporcionou.
- Aos técnicos André Luís da Silva e Lívia Maria de Melo, por toda paciência e colaboração dentro do laboratório.
- À funcionaria Dalva Ribeiro de Oliveira, que sempre me ajudou independente do dia, hora ou circunstância.
- À pós-doutoranda Thais Helena Gasparoto, por toda sabedoria compartilhada.

- Às Doutoradas Carine Ervolino de Oliveira e Cláudia Ramos Pinheiro, pelo carinho, alegrias e risadas no laboratório.
- Às alunas de Iniciação Científica Dayane Catheline Wenceslau Silva e Gabriela Soares Tiburcio, parceiras de laboratório.
- À minha amiga Clarissa Carolina Fernandes Herculiani, por ter sempre me ajudado. Obrigada por fazer parte da minha vida.
- Aos alunos e companheiros de laboratório Gabriela Silva Neubern de Oliveira, Nádia Amôr e Rudan Paraíso, por todo apoio, colaboração, almoços engraçados e descontraídos.
- À pesquisadora Ana Carolina Villas Boas Weckwerth e aos membros do Departamento de Micologia do Instituto Lauro de Souza Lima, que desde a minha iniciação científica colaboraram e me ensinaram com muita dedicação e humildade, tudo o que foi necessário.

"Somos o que pensamos. Tudo o que somos surge com nossos
pensamentos. Com nossos pensamentos, fazemos o nosso
mundo."

Buda

RESUMO

Foram selecionados, aleatoriamente, 12 equipos em 7 clínicas da FOB/USP, dois foram preenchidos com água destilada (Ortodontia e Urgência), um com água de torneira (UBAs), em um o reservatório ficou seco por 30 dias (Odontopediatria) em outro por 60 dias (Pós-graduação), um equipo com a tecnologia B-Safe® (Multidisciplinar) e, em três, a limpeza com o detergente enzimático foi avaliado (Dentística). Amostras de 10 mL de água dos reservatórios e tubulações das canetas de alta rotação foram obtidas e diluições feitas até 10^{-4} , semeadas nos meios de cultura R2A, Peptona Diluída - PD, Plate Count Agar - PCA e Sabouraud Dextrose Agar – SDA. Alíquotas de 100 µL das amostras foram semeadas nos meios de cultura R2A, PD, PCA e SDA pela técnica de esgotamento, alíquotas de 25 µL foram semeadas (R2A, PD, PCA e SDA) pela técnica da gota e alíquotas de 100 µL das amostras foram semeadas no meio PCA pela técnica de pour plate. As placas de R2A, PD, PCA foram incubadas por 72 horas a 24°C e as placas de SDA por 4 a 7 dias a 24°C. Foi feita a identificação bacteriana através do kit Bactray I, II ou III e a fúngica através do microcultivo. A média bacteriana obtida foi de 128.151 UFC/mL na Odontopediatria, 1.834.807 UFC/mL na Ortodontia, 60.422 UFC/mL na Pós-Graduação, 615,68 UFC/mL na UBAs, 899,64 UFC/mL na Urgência, 97.632 UFC/mL na Multidisciplinar e 417.619 UFC/mL na Dentística sem limpeza e 135.924 UFC/mL após a limpeza. A média dos fungos foram 205 UFC/mL na Odontopediatria, 702,50 UFC/mL na Ortodontia, 12,50 UFC/mL na Pós-Graduação, 41.475 UFC/mL UBAs, 117.500 UFC/mL Urgência, 4.469 UFC/mL na Multidisciplinar e 64.642 UFC/mL e de 23.627 UFC/mL, antes e após a limpeza na Dentística. A presença de micro-organismos foi detectada nos reservatórios e tubulações de água em todas as 7 clínicas; para quantificar as bactérias, o meio R2A seguido do PD foram melhores que o PCA e, para detectar diferentes espécies o meio PCA foi superior ao R2A e PD; a técnica da gota foi melhor do que a de esgotamento e pour plate para as bactérias, enquanto a de esgotamento foi superior para os fungos. O detergente enzimático foi eficaz em desestruturar o biofilme, atuando mais sobre os fungos do que para as bactérias, que não foram eliminadas após as limpezas. Foram identificadas 22 espécies de bactérias: *Acinetobacter baumannii/calcoaceticus*, *Aeromonas hydrophila*, *Alcaligenes xylosoxidans denitrificans*, *Brevundimonas vesicularis*, *Burkholderia cepacia*, *Burkholderia*

pseudomallei, *Chromobacterium violaceum*, *Hafnia alvei*, *Hafnia alvei* (Biogrupo 1), *Ochrobactrum anthropi*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas alcaligenes*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas luteola*, *Pseudomonas oryzae*, *Pseudomonas pseudoalcaligenes*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas stutzeri*, *Serratia liquefaciens*, *Serratia plymuthica*, *Sphingobacterium multivorum*, *Tatumella ptyseos*. Foram identificados 12 gêneros de fungos: *Acremonium* sp, *Alternaria* sp, *Aspergillus* sp, *Cladosporium* sp, *Curvularia* sp, *Exophiala* sp, *Fonsecaea* sp, *Fusarium* sp, *Paecilomyces* sp, *Penicillium* sp, *Rhinochlamydia* sp, *Verticillium* sp.

Palavras-chave: Biofilme. Bactérias. Fungos. Riscos Biológicos. Biossegurança.

ABSTRACT

Comparison of media and techniques for bacteria and fungi quantification in reservoirs and dental unit waterlines

Twelve dental units of 7 clinics of FOB/USP were randomly selected, two were filled with distilled water (Orthodontics and Urgency), one with tap water (UBAs), one reservoir was dry for 30 days (Odontopediatry) and another for 60 days (Postgraduate Clinic), one dental unit was filled with the B - Safe ® technology (Multidisciplinary Clinic). Three dental clinics were evaluated concerning the cleaning procedure with enzymatic detergent. Samples of 10 mL of water reservoirs and high-speed handpieces were collected and made up to 10^{-4} dilutions, plated on R2A media, Peptone Diluted culture - PD, Plate Count Agar - PCA and Sabouraud Dextrose Agar - SDA. Aliquots of 100 μ L of the samples were plated on R2A media, PD, PCA and SDA culture technique for spreading. Aliquots of 25 μ L were seeded (R2A, PD, PCA and SDA) in drops and aliquots of 100 μ L samples were seeded in PCA by the pour plate technique. R2A plates, PD, PCA were incubated for 72 hours at 24°C and SDA plates for 4 to 7 days at 24°C. Bacterial identification was performed using Bactray I, II or III kit and fungal identification by microculture. Bacterial average was 128.151 CFU/mL in Odontopediatry, 1.834.807 CFU/mL in Orthodontics, 60.422 CFU/mL in Postgraduate Clinic, 615.68 CFU/mL in UBAs, 899.64 CFU/mL in Urgency, 97.632 CFU/mL in Multidisciplinary Clinic and 417.619 CFU/mL in Dentistry without the cleaning procedure and 135.924 CFU/mL after it. The average of fungi was 205 CFU/mL in Odontopediatry, 702.50 CFU/mL in Orthodontics, 12.50 CFU/mL in Postgraduate Clinic, 41.475 CFU/mL in UBAs, 117.500 CFU/mL in Urgency, 4.469 CFU/mL in Multidisciplinary and 64.642 CFU/mL and 23.627 CFU/mL before and after cleaning procedure in Dentistry. The presence of micro - organisms occurred in reservoirs and waterlines in all of the 7 clinics evaluated. To quantify bacteria, R2A and PD medium provided more accurate results than PCA. To detect different species, PCA medium was better than R2A and PD. The drop technique was better than the spreading technique and pour plate for

bacteria; however, the spreading technique provided better results for the yeasts. The enzymatic detergent was effective on disrupting the biofilm eliminating more yeasts than residual bacteria. Twenty-two species of bacteria were identified: *Acinetobacter baumannii/calcoaceticus*, *Aeromonas hydrophila*, *Alcaligenes xylosoxidans denitrificans*, *Brevundimonas vesicularis*, *Burkholderia cepacia*, *Burkholderia pseudomallei*, *Chromobacterium violaceum*, *Hafnia alvei*, *Hafnia alvei* (Biogroup 1), *Ochrobactrum anthropi*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas alcaligenes*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas luteola*, *Pseudomonas oryzae*, *Pseudomonas pseudoalcaligenes*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas stutzeri*, *Serratia liquefaciens*, *Serratia plymuthica*, *Sphingobacterium multivorum*, *Tatumella ptyseos*. Twelve genus of fungi were identified: *Acremonium* sp, *Alternaria* sp, *Aspergillus* sp, *Cladosporium* sp, *Curvularia* sp, *Exophiala* sp, *Fonsecaea* sp, *Fusarium* sp, *Paecilomyces* sp, *Penicillium* sp, *Rhinochlamydia* sp, *Verticillium* sp.

Key-words: Biofilm. Bacteria. Fungi. Biological risks. Biosafety.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- FIGURAS

Figura 1 – Ilustração da técnica da gota.....	49
Figura 2 – Kit Bactray® I, II e III.....	52
Figura 3 – Modelo do microcultivo para a identificação dos fungos.....	54
Figura 4 – Macro e microcultivo da colônia de <i>Acremonium sp.</i>	71
Figura 5 – Macro e microcultivo da colônia de <i>Alternaria sp.</i>	71
Figura 6 – Macro e microcultivo da colônia de <i>Aspergillus sp.</i>	72
Figura 7 – Macro e microcultivo da colônia de <i>Cladosporium sp.</i>	72
Figura 8 – Macro e microcultivo da colônia de <i>Curvularia sp.</i>	73
Figura 9 – Macro e microcultivo da colônia de <i>Exophiala sp.</i>	73
Figura 10 – Macro e microcultivo da colônia de <i>Fonsecaea sp.</i>	74
Figura 11 – Macro e microcultivo da colônia de <i>Fusarium sp.</i>	74
Figura 12 – Macro e microcultivo da colônia de <i>Paecilomyces sp.</i>	75
Figura 13 – Macro e microcultivo da colônia de <i>Penicillium sp.</i>	75
Figura 14 – Macro e microcultivo da colônia de <i>Rhinocladiella sp.</i>	76
Figura 15 – Macro e microcultivo da colônia de <i>Verticillium sp.</i>	76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Médias das bactérias em UFC/mL nas 7 clínicas avaliadas, e da clínica de Dentística, sem e com limpeza, nos meios de culturas, reservatórios (R) e tubulações (T) e, nas técnicas de isolamento esgotamento (E), gota (G) e pour plate (PP).....	60
Tabela 2 - Médias dos fungos em UFC/mL nas 7 clínicas avaliadas, e da clínica de Dentística, sem e com limpeza, nos meios de culturas, reservatórios (R) e tubulações (T) e, nas técnicas de isolamento esgotamento (E), gota (G) e pour plate (PP).....	61
Tabela 3 - Espécies encontradas nas clínicas 7 clínicas avaliadas.....	62
Tabela 4 - Número e porcentagem das espécies bacterianas encontradas nos meios PCA, R2A, PD e SDA, nos reservatórios (R), tubulações (T), e nas técnicas de isolamento esgotamento (E), gota (G) e pour plate (PP).....	64
Tabela 5 - Presença de bactérias, total de espécies e total de colônias coletadas nas 7 clínica avaliadas.....	66
Tabela 6 - Quantidade de gêneros de fungos encontrados nas 7 clínicas.....	67
Tabela 7 - Número e porcentagem dos gêneros fúngicos encontrados nos meios PCA, R2A, PD e SDA, reservatórios (R), tubulações (T), e nas técnicas de isolamento esgotamento (E), gota (G) e pour plate (PP).....	68
Tabela 8 - Presença de fungos, total de gêneros e total de colônias coletadas nas 7 clínica avaliadas.....	70

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

ADA	American Dental Association
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APHA	American Public Health Association
AWWA	American Water Works Association
c/l	Com limpeza
CDC	Disease Control and Prevention
E	Esgotamento
G	Gota
PCA	Plate Count Agar
PD	Peptona Diluída
PP	Pour Plate
R	Reservatório
s/l	Sem limpeza
SDA	Sabouraud Dextrose Agar
SPE	Substâncias Poliméricas Extracelulares
T	Tubulação
UBAs	Unidade Básica de Saúde
UFC/mL	Unidades Formadoras de Colônias por mililitro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO DE LITERATURA	21
3	PROPOSIÇÃO	41
4	MATERIAL E MÉTODOS	45
4.1	COLETA DAS AMOSTRAS	47
4.2	PROCESSAMENTO MICROBIOLÓGICO	48
4.2.1	R2A Agar	49
4.2.2	Plate Count Agar – PCA	50
4.2.3	Peptona Diluída – PD	50
4.2.4	Sabouraud Dextrose Agar – SDA com Cloranfenicol a 1%	50
4.3	ESTOCAGEM DAS BACTÉRIAS E FÚNGOS	50
4.4	REATIVAÇÃO DAS AMOSTRAS BACTERIANAS	51
4.5	IDENTIFICAÇÃO DAS BACTÉRIAS	51
4.6	REATIVAÇÃO DAS AMOSTRAS FÚNGICAS	53
4.7	IDENTIFICAÇÃO DOS FUNGOS	53
4.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA	54
5	RESULTADOS	55
5.1	PRESENÇA DE BACTÉRIAS E FUNGOS (UFC/mL)	57
5.2	IDENTIFICAÇÃO DAS BACTÉRIAS E FUNGOS	62
6	DISCUSSÃO	77
7	CONCLUSÕES	91
	REFERÊNCIAS	95
	APÊNDICES	109
	ANEXOS	115

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Em 1962, Scaky e Sulitzeanu fizeram o primeiro relato da presença microbiana em seringas de spray e ar de 30 equipamentos odontológicos, sendo estas informações posteriormente confirmadas por Blake em 1963 e, desde então a água apresenta quantidades elevadas de micro-organismos, podendo inclusive apresentar patógenos oportunistas (KARPAY; PLAMONDON; MILLS, 1999; WALKER et al. 2003; SZYMAŃSKA, 2007; WATANABE et al., 2008; SZYMAŃSKA, SITKOWSKA, 2013).

A contagem de bactérias heterotróficas pode ser determinada pelas técnicas de pour plate, esgotamento, ou membrana de filtro, fornecendo a quantidade aproximada de bactérias viáveis. Quando se tem uma grande quantidade disponível de água, usa-se a técnica de filtração por membrana. As técnicas de esgotamento ou pour plate são utilizadas, mas requerem quantidades menores de água (APHA, 1999). Estas técnicas foram utilizadas em várias pesquisas, além da técnica da gota (WESTERGREN; KRASSE, 1978; REASONER; GELDREICH, 1985; MAKI et al., 1986; SZYMAŃSKA, 2007). O meio de cultura padronizado para a contagem total de bactérias em alimentos e água é o Plate Count Agar – PCA (APHA, 1999), e o meio R2A e Peptona Diluída – PD foram utilizados para a contagem microbiológica da água em algumas pesquisas (REASONER; GELDREICH, 1985; MAKI et al., 1986; BARBEAU et. al., 1996; BARBEAU, BUHLER, 2001; YABUNE; IMAZATO; EBISU, 2008; SIQUEIRA; LIMA, 2013) e Sabouraud Dextrose Agar – SDA para fungos (AL-GABR; ZHENG; XIN YU, 2013).

Para a ADA – American Dental Association - a concentração máxima de bactérias heterotróficas, em água potável, conforme preconizado pela APHA – American Public Health Association e pela AWWA - American Water Works Association, é de 500 UFC/mL, na qual, é necessário o monitoramento das unidades dentárias, para assegurar o cumprimento destas normas, sendo que a CDC – Centers for Disease Control and Prevention – afirma que "expor pacientes ou profissionais de odontologia à água de qualidade microbiológica incerta, apesar da falta de efeitos adversos à saúde documentados, é incompatível com os princípios

de controle de infecção geralmente aceitos.” (KOHN et al., 2003). Para a ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária – segundo a portaria nº 2.914, a norma de 500 UFC/ml também se aplica no Brasil, em água para consumo humano (BRASIL, 2011). A contaminação microbiana na água segundo Prevost et al. (1995), no Japão é de 100 UFC/ml, na Europa de 200 UFC/ml e nos EUA também é de 500 UFC/ml.

Quando há um ambiente aquoso, as condições favorecem o desenvolvimento de micro-organismos que ficam imersos em uma matriz de substâncias poliméricas extracelulares (SPE), denominado biofilme, na qual proteínas, polissacarídeos, DNA e substâncias húmicas estão presentes (COSTERTON; COOK; LAMONT, 1999; DONLAN; COSTERTON, 2002). O SPE apresenta capacidade de elasticidade, força, absorção e adesão, além de ser fonte de nutrientes e proteção contra substâncias tóxicas (MORTON et al., 1998), o que torna o biofilme 1000 vezes mais resistentes a agentes antimicrobianos, luz ultravioleta, desidratação, fagocitose e a fatores ambientais como pH e oxigênio, quando comparados com as células na forma planctônica (MARSH; MARTIN, 2005; SEDLACEK; WALKER, 2007; WELIN-NEILANDS; SVENSATER, 2007; BRYERS, 2008). Sendo assim, o biofilme pode ser formado por uma grande variedade de bactérias, leveduras, fungos, algas e protozoários que podem estar em populações autóctones ou endógenas e alóctones ou exógenas (CHAVES, 2004; O'DONNELL et al., 2011), tanto em sítios aeróbicos e anaeróbios, respectivamente camada superficial e camada profunda (CHARACKLIS; MARSHALL, 1990; VAN DER WENDE; CHARACKLIS, 1990).

Os reservatórios e tubulações dos equipos odontológicos são lugares propícios para as bactérias, pois estão constantemente com a presença de água, além das tubulações apresentarem diâmetro pequeno, o que contribui para a multiplicação e formação do biofilme (WHITEHOUSE et al., 1991; BARBEAU et al., 1996; YABUNE; IMAZATO; EBISU, 2008; WATANABE et al., 2008; KRAMER et al., 2012). Para a limpeza destas tubulações e reservatórios normalmente foi empregado hipoclorito de sódio a 1% ou outros produtos químicos com: peróxido de hidrogênio, clorexidina e ácido acético (PUTTAIAH et al., 1998; WALKER et al., 2003; ZANETTI; DE LUCA; SACCHETTI, 2009; KRAMER et al., 2012), sem contudo eliminar totalmente o biofilme.

Os fungos foram relatados em mananciais de água desde a década de 60 e 70 quando foram associados com o mau gosto e odor (BAYS; BURMAN; LEWIS, 1970; METZGER et al., 1976). Em água potável também foram relatados (KELLEY et al., 2003; GONÇALVES; PATERSON; LIMA, 2006; HAGESKAL; LIMA; SKAAR, 2009), como patógenos oportunistas ou não, (SEIDLER et al., 2008; MOWAT et al., 2009; LOUSSERT et al., 2010), que se tornaram resistentes a tratamentos antifúngicos (PATERSON, 2009; RAJENDRAN et al., 2011). Fungos variam de tamanho, formato (filamentoso e leveduriforme), cor (HAWKSWORTH, 2004) e produzem micotoxinas (CAST, 2003). Normalmente, em água clorada ou não, os gêneros *Acremonium* sp, *Paecilomyces* sp e *Penicillium* sp foram encontrados (KELLEY et al., 2003). Desempenham um papel importante no ciclo de carbono e de nutrientes, e a ocorrência na água de abastecimento pode resultar numa variedade de problemas para a saúde humana (AL-GABR; ZHENG; XIN YU, 2013).

O presente trabalho abordou a presença microbiana nos reservatórios e tubulações de canetas de alta rotação dos equipos odontológicos de 7 (sete) clínicas da Faculdade de Odontologia de Bauru, além da identificação destes micro-organismos, avaliou diferentes técnicas de isolamento (esgotamento, gota e pour plate) e diferentes meios de cultura para a recuperação destes micro-organismos (PCA, R2A, PD e SDA). Um protocolo de limpeza para reservatórios e tubulação foi avaliado, sendo utilizado o detergente enzimático (Riozyme IV E Neutro Gold, Rioquímica Ltda).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2 REVISÃO DE LITERATURA

Scaky e Sulitzeanu em 1962 relataram a contaminação microbiana de 30 unidades odontológicas, nas quais foram avaliadas as seringas ar/água em placas de agar sangue incubadas por 24 a 96 horas a 37°C, encontrando *S. viridans*, *S. hemolyticus*, *S. aureus*, bactérias gram negativas e Actinomicetes, concluindo que “o perigo de infecção bacteriana por inalação tanto pelo dentista e paciente cresce com o uso mais frequente da seringa de ar”. Em sequência Blake em 1963 efetuou a análise da água de 7 reservatórios de equipos odontológicos de um hospital. Alíquotas das amostras *in natura* e diluições foram semeadas em placas contendo agar sangue, concluindo que a contaminação dos equipos poderia ser controlada pela adição de antimicrobianos.

Em 1977 Kelstrup, Funder-Nielsen e Theilade perceberam que a água utilizada estava com mau gosto e com odor estranho, além de flocos castanhos e pretos presentes. Exame de contraste de fase e microscopia eletrônica feitos, mostraram que os flocos eram agregados de fungos e bactérias, e que estruturas semelhantes foram encontradas aderidas na parede das linhas d'água. A identificação dessas amostras revelou a presença de fungos filamentosos, incluindo *Cladosporium sp.* e *Cephalosporium sp.*, e de bactérias como: *Pseudomonas sp.*, *Aeromonas sp.*, *Acinetobacter sp.*, *Alcaligenes sp.*, *Flavobacterium sp.*, e *Moraxella sp.* Para remoção dos micro-organismos nas paredes dos tubos foi realizada pela lavagem com solução de 4% de Tween 80 corado com Ponceau 4R.

Em 1985, Reasoner e Geldreich, formularam o meio de cultura chamado R2A utilizado para a contagem de bactérias heterotróficas em amostras de água potável. Este meio foi comparado com os meios PCA e m-SPC e com as técnicas de semeadura pour plate e membrana filtrante. Foram feitas triplicata e diluições de até 10^{-3} , as placas foram incubadas em 20°C, 28°C e 35°C e a contagem em UFC/ml foi obtida a partir do segundo dia de incubação, até um total de 168 horas. A comparação dos meios mostrou contagens superiores, independente das técnicas de inoculação ou o tempo de incubação, para o meio R2A, seguido do PCA e finalmente o meio m-SPC.

Maki et al., em 1986 formularam um meio de cultura chamado Peptona Diluída (PD), com baixo teor de nutrientes para avaliar a quantificação das bactérias heterotróficas das amostras de água clorada do Sistema Municipal de Água de Seattle coletadas entre 1981 a 1982. Foram comparados os meios de cultura SMA e R2A com a técnica de pour plate, CPS e PD com a técnica de esgotamento, as placas foram incubadas a 35°C por 48 horas, a 20°C por 28 a 30 dias respectivamente. Os resultados indicaram que o maior número de bactérias heterotróficas foi recuperado pelo meio PD, seguido do R2A, CPS e SMA, a temperatura média ideal para a incubação foi de 20°C. Constataram que, *Hyphomonas* sp foi a única espécie que cresceu no meio PD e a técnica de pour plate não deveria ser recomendada para amostras de água, por causar a morte das bactérias pelo choque térmico.

Costerton et al., em 1987, descreveram a formação de aglomerados de bactérias que inicialmente se aderem à superfície de forma reversível, seguido do processo de adesão irreversível através da ligação de polímeros de exopolissacarídeos e, quando isso acontece, entram em processo de divisão e recrutamento de bactérias planctônicas formando microcolônias aderentes, que caracterizam o biofilme.

Whitehouse et al. (1991) avaliaram a formação de biofilme em 11 tubulações de água dos equipos odontológicos. Amostras *in natura* e diluídas foram semeadas e testadas pelo método de Miles e Mistra (1938) em placas com meio Agar Nutriente e Agar Base com Extrato de Levedura que foram incubadas a 37° C por 48 horas. As bactérias endógenas foram removidas pelo escoamento da água (flushing) por 20 minutos, para que depois houvesse a recontaminação e os níveis fossem coletados e analisados 48 horas depois. Pequenos fragmentos dos ductos foram submetidos a análise microscópica e as bactérias foram identificadas em 5 espécies diferentes: *Pseudomonas paucimobilis*, *Methylobacterium mesophilica*, *Neisseria elongata*, *Pseudomonas* sp. E *Flavobacterium* sp. As tubulações antes do uso do flushing estavam todas contaminadas, após 20 minutos de escoamento a contaminação regrediu, mas não foi eliminada e sugeriram que o biofilme formado nas tubulações fosse a provável fonte de contaminação dos quipos.

Williams et al (1993), fizeram coleta de 150 equipos de 54 lugares diferentes de Washington e da Califórnia. Essas coletas foram feitas durante vários períodos do dia, associado ao uso do escoamento (flush). As diluições foram feitas e semeadas em placas com meio TSA e incubadas a 20°C por 96 horas. As amostras foram analisadas por Gram, uso do kit API e Microscopia Eletrônica. Verificaram que 72% das amostras eram impróprias para consumo humano, com uma ampla variedade de espécies de micro-organismos. Concluíram que as linhas d'água nos equipos odontológicos apresentavam alta contaminação por biofilme.

Em 1996, Barbeau et. al., analisaram as tubulações de água de 123 equipos odontológicos, mostrando que todas estavam contaminadas com micro-organismos. Para essa análise, foram coletadas de 2 a 4 ml de água das saídas das tubulações da seringa tríplice e de alta rotação, as amostras foram colhidas antes dos equipos serem usados, no início do dia e depois de 2 minutos descartando a água pela tubulação. Utilizaram o meio R2A modificado (amido 0,5g; extrato de levedura 0,5g; peptona tríptica 0,5g; glucose 0,5g; K₂HPO₄ 0,3g; MgSO₄ 0,05g; succinato 0,25g; casaminoácidos 0,5 g; ágar 7,5g; e água destilada para 500 mL.). Observaram que houve diferenças significativas entre as amostras colhidas no início do dia e as retiradas após o descarte da água por 2 minutos, também encontraram diferença entre a água das saídas das tubulações da seringa tríplice e de alta rotação e as bactérias predominantes foram *Sphingomonas paucimobilis*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Methylobacterium mesophilicum* e *Pseudomonas aeruginosa*. Concluíram que as tubulações dos equipos fossem consideradas como um ecossistema, no qual possuem patógenos oportunistas, que contaminam a água.

Puttaiah et al., em 1998 trataram 5 equipos odontológicos com solução de hipoclorito de sódio a 0,525% associado com ácido acético a 1% ou com solução de hipoclorito de sódio a 0,525% associado com água destilada ao longo de 4 semanas, e avaliaram pelo método Standard (SPC) por 5 dias a 25°C. Inicialmente observaram que os equipos sem tratamento possuíam 10⁶ UFC/ml. Após 35 dias de tratamento, constataram que não houve redução nas UFC/ml, observando que estavam acima do valor permitido pela ADA (200 UFC/ml). Perceberam que a utilização de ácido acético aumentou a corrosão do metal dos equipos e a

combinação com o cloro não melhorou e nem reduziu o biofilme, quando comparado com o hipoclorito em água destilada. Somente com mais 25 semanas de tratamento, houve redução de UFC/mL, conforme indicado pela ADA.

Arvanitidou et al em 1999 investigaram a presença de fungos em 126 amostras de água potável de torneiras (84 hospitais e 42 da comunidade) que foram cultivadas em Sabouraud dextrose Agar em temperatura ambiente por 3 a 4 semanas. Os fungos filamentosos foram isolados a partir de 104 amostras (82,5%), as leveduras de 14 (11,1%) e ambos de 14 (11,1%) amostras de água. Os gêneros predominantes foram *Penicillium* spp., *Aspergillus* spp. e *Candida* spp. Um total de 27 gêneros de fungos filamentosos e três de leveduras foram isolados. Estes resultados sugerem que a água da torneira é uma via de transmissão de fungos e pode representar um perigo para a saúde, principalmente para pessoas imunocomprometidas.

Barbeau e Buhler, em 2001 pesquisaram amebas de vida livre em água de 35 unidades dentárias (seringa) e de 18 torneiras. As amostras foram inoculadas em caldo R2A, e mantidas por 72 horas em temperatura ambiente no escuro e, para a confirmação da presença do biofilme, eles utilizaram microscópio invertido. Após, o meio de cultura foi substituído por água e prosseguiram a incubação por mais 2 semanas. Em todas as amostras de água foram detectadas a presença de amebas como: *Hartmanella* spp, *Vanella* spp, *Vahlkampfia* spp, *Naegleria* spp e *Acanthamoeba* spp. Concluíram que o biofilme favoreceu a presença de amebas de vida livre, algumas consideradas como potencial agente patogénico.

Em 2003 Hope e Wilson identificaram as regiões do biofilme que são viáveis e não viáveis e determinaram suas dimensões. O biofilme foi cultivado em condições aeróbicas em discos de hidroxiapatita e foram analisados em microscopia confocal a laser com coloração LIVE/DEAD, para a observação das bactérias viáveis e não viáveis. Observaram que o biofilme continha uma camada externa viável, em torno de um núcleo interno de bactérias inviáveis, ao fazerem a medição das dimensões e dos ângulos, constataram que a camada interna e externa continha 36,62 µm. Concluíram que com a microscopia confocal, associada a técnicas de

coloração foi possível observar os padrões de viabilidade dos biofilmes e suas medidas.

Em 2003, Walker et al., produziram biofilme *in vitro* para simular as unidades dentárias e avaliar métodos práticos e de custo benefício para a descontaminação microbiana. Utilizaram vários procedimentos para a descontaminação: como o sistema de escoamento (flushing) que não reduziu o biofilme, o uso de ozônio que eliminou 65%, clorexidina eliminou o total de bactérias viáveis, mais não removeu completamente o biofilme. Produtos à base de hidróxido resultaram na remoção total das bactérias viáveis e mais de 95% da remoção do biofilme. Concluíram uma redução suficiente das bactérias totais viáveis, não removendo necessariamente o biofilme.

Gonçalves, Paterson e Lima (2006), investigaram durante 16 meses, em Portugal, a presença de fungos filamentosos na água das torneiras. As amostras foram semeadas pela técnica de membrana filtrante e as placas foram incubadas a 25°C por 7 dias em placas contendo Agar água de torneira (TWA), Agar fubá (CMA/2), Agar rose Bengal (NGRBA) e meio seletivo para oomicotas (OSM). O material da parte interna das torneiras foi coletado por swab, as técnicas de esgotamento e de pour plate foram feitas nos quatro meios de cultura e incubados a 25°C por 7 dias. A técnica de atração, onde pedaços de pele de cobra ou de celofane foram colocados em 1 litro das amostras, foram mantidos a 25°C por 7 dias, quando os pedaços de materiais, foram semeados somente no meio OSM. Como resultado observou que houve uma alta contagem de UFC/mL de fungos em Novembro de 2003 a Fevereiro de 2004 (inverno) juntamente com uma baixa contagem de bactérias e leveduras e vice versa no período de Abril de 2003 a Outubro de 2003. Comparando os meios de cultura, as contagens foram mais baixas no TWA, CMA/2 e OSM. As espécies fúngicas encontradas foram: *Penicillium sp* (40,60%), *Acremonium sp* (38,80%), *Phialophora sp* (4,13%), *Cladosporium sp* (3,53%), *Rhizopus stolonifer* (2,94%), *Chaetomium sp* (0,60%), *Alternaria sp* (0,30%), *Aspergillus sp* (0,30%), *Mycelia sterilia* (2,64%) e não identificados (6,18%). Concluíram que, somente com este estudo é impossível tirar conclusões sobre fungos do sistema de água.

Szymańska em 2006 avaliou a presença de fungos no aerossol formado pela utilização das peças de alta rotação. Coletou amostras de 25 equipos e inoculou em placas com meio YM para leveduras e fungos, antes e depois da descontaminação do equipo com Oxygenal 6. As amostras foram incubadas por 5 dias a 30°C. Antes da desinfecção a média era de 195,6 UFC/mL e após a desinfecção esta média diminuiu para 144,4 UFC/mL. As espécies fúngicas encontradas foram: *Alternaria alternata*, *Aspergillus glaucus*, *Aspergillus terreus*, *Cladosporium cladosporioides*, *Geotrichum candidum*, *Penicillium diversum*, *Penicillium herquei*, *Penicillium roseopurpureum*, *Rhizopus nigricans* e *Rhodotorula rubra*. Concluiu que, houve presença de fungos nos aerossóis, e que, algumas espécies, poderiam ser responsáveis por alergias tendo necessidade de monitoramento microbiológico.

Em 2007, Szymańska avaliou a água nos reservatórios de 25 equipos odontológicos pela pesquisa de aeróbios e anaeróbios facultativos. Pelo método de esgotamento, as amostras de água foram inoculadas em ágar sangue e ágar eozina azul de metileno (EMB) e incubadas por 24 horas a 37°C, depois por 3 dias a 22° e a 4°C por mais 3 dias. As bactérias foram identificadas pelos testes API20E, API20 NE e GP2 MicroPlate. Como resultado, foram encontradas bactérias gram negativas como: *Brevundimonas* (*Pseudomonas*) *vesicularis*, *Moraxella lacunata*, *Moraxella* spp., *Ralstonia* (*Pseudomonas*) *pickettii*, *Sphingomonas paucimobilis*, *Stenotrophomonas* (*Xanthomonas*) *maltophilia* e cocos gram positivos como: *Micrococcus luteus*, *Micrococcus lylae*, *Staphylococcus cohnii*, *Staphylococcus hominis* ss *novobiosepticus*, *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp. e *Streptomyces albus*. A média de bactérias foi de 201,039 UFC/ml, concluindo ser necessário o monitoramento contínuo dos equipos e de realizar desinfecção nos reservatórios.

Uzel, Cogulu e Oncag em 2008, coletaram amostras de água de 20 equipos odontológicos, quantificaram em UFC/mL, identificaram as bactérias e analisaram a sensibilidade para alguns antibióticos. As amostras de água da seringa, reservatório, motor de ar e biofilme da tubulação da seringa de ar/água foram incubadas em R2A a 22°C e 37°C por 72 horas, Mitis Salivarius em condições anaeróbicas a 37°C por 72 horas, *Pseudomonas* Agar por 48 horas a 37°C, Agar Mc

Conkey a 37°C por 48 horas, Agar *Candida* ID a 37°C por 72 horas e GVPC Agar a 35°C por 2, 5, 7 e 10 dias. As bactérias foram identificadas com os testes API 20 E, API 20 NE, API 50 CHB e API Staph teste e os antibióticos testados foram, piperacilina, ampicilina, ceftazidima, meropenem, gentamicina, tetraciclina, ofloxacina e cloranfenicol. Todas as amostras tiveram alto nível de contaminação, a seringa obteve $5,36 \times 10^{-1}$, reservatórios com $4,89 \times 10^{-1}$, para as amostras do motor de ar foram $5,47 \times 10^{-1}$ e para o biofilme foi de $4,23 \times 10^{-2}$. Encontraram 20 espécies diferentes, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas sóbria*, *Alcaligenes dentrificans*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis*, *Brevundimonas vesicularis*, *Burkholderia cepacia*, *Burkholderia gladioli*, *Chryseomonas luteola*, *Comamonas acidovorans*, *Methylobacterium mesophilicum*, *Ochrabactrum anthropi*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas studzerii*, *Ralstonia pickettii*, *Sphingomonas paucimobilis* e *Staphylococcus cohnii*. Em relação aos antibióticos, não conseguiram definir o que tem melhor susceptibilidade, porém o meropenem e o ofloxacina os mais sensíveis. Este estudo enfatizou ser necessário um mecanismo efetivo para reduzir a contaminação microbiana, devido ao alto risco de contaminação cruzada.

Yabune, Imazato e Ebisu em 2008 investigaram a capacidade de tubulações revestidas com fluoreto de polivinilideno (PVDF) inibir biofilmes *in vitro*. As amostras de água foram obtidas das tubulações que estavam em uso a 2 anos e meio, sendo identificadas as bactérias predominantes com o kit ID test NF-18 para bacilos gram negativos. Para a formação do biofilme *in vitro*, eles simularam as tubulações dos equipos e incubaram as bactérias previamente identificadas. Prepararam caldo de R2A com *Sphingomonas paucimobilis*, *Acinetobacter haemolyticus*, *Methylobacterium mesophilicum*, e submergiram 10 mm de tubo de poliuretano convencional e PVDF-revestido, incubado a 25°C durante 24, 48 ou 96 horas. Após cada período de incubação, o tubo foi cortado longitudinalmente e preparado para ser observado em microscópio eletrônico de varredura. Observaram que as três bactérias aderiram a superfície interna do tubo de poliuretano em 24 horas, e a quantidade de bacilos aumentou após 48 horas, e com 96 horas, observaram características de formação de biofilme. No PVDF-revestido, apenas poucas bactérias aderiram à superfície do tubo, independente da espécie e do

tempo observado. Concluíram que, o tubo revestido de PVDF foi eficaz na prevenção da formação de biofilmes.

Watanabe et al., (2008) avaliaram o sistema Petrifilm™ para o nível de bactérias na água de seringas de ar e canetas de alta rotação de equipos odontológicos, antes e depois de escoar água pelas tubulações. Foram coletadas amostras de 12 equipos considerados novos e de 12 velhos, com 1 e 13 anos de uso respectivamente e, de 4 amostras de água de torneira, usadas para o abastecimento dos reservatórios. Foram inoculados 1 mL das amostras nos kit de Petrifilm™ AC (bactérias aeróbicas) e Petrifilm™ EC (*Escherichia coli* e coliformes totais). Nas torneiras encontraram um baixo nível de contaminação (4 e 15 UFC/ml) e todas as amostras de água dos velhos e novos equipos, antes da utilização do flushing, estava contaminadas. Após escoar água, a contagem bacteriana reduziu consideravelmente nos equipos novos quando comparado aos antigos. A presença de *E. coli* e de coliformes, não foram detectadas. Concluíram que, a utilização do sistema flushing nos equipos odontológicos, pode diminuir a contaminação microbiológica.

Zanetti, De Luca e Sacchetti em 2009, investigaram o nível de contaminação de microfiltros de água e compararam a ação do ácido peracético e peróxido de hidrogênio em manter a qualidade da água. Utilizaram três microfiltros domésticos, abastecido com água potável. Dois filtros foram contaminados propositalmente com *Pseudomonas aeruginosa* e o terceiro não foi contaminado. Após um mês de utilização, a desinfecção foi primeiramente realizada com ácido peracético a 10% com diferentes tempos de contato (10, 30 e 40 minutos), em seguida com peróxido de hidrogênio a 3% por 40 minutos, e as amostras foram coletadas duas a três vezes por semana. Após um ano de tratamento 110 coletas foram feitas, totalizando 324 amostras. A técnica de filtração por membrana foi empregado para a pesquisa de coliformes totais (meio C-EC), *E. coli* (meio C-EC), Enterococcus, *P. aeruginosa* e *S. aureus*, TSA e Staph 110, respectivamente. As bactérias heterotróficas foram avaliadas por pour plate em meio PCA. Concluíram que todas as amostras de água cumpriam as exigências para água potável, no entanto, as bactérias heterotróficas tiveram um aumento para 10^3 – 10^4 UFC/mL no

filtro. O peróxido de hidrogênio a 3% foi o mais eficaz e, a limpeza periódica tornou a água com níveis aceitáveis (≤ 100 ufc / mL) de bactérias heterotróficas.

Em 2009, Vickery et al., avaliaram a limpeza com detergente enzimático e não enzimático em tubulações de endoscópio contendo biofilme. Cultivaram na tubulação do endoscópio *Pseudomonas aeruginosa* por 7 dias em caldo nutriente a 38°C, para a formação do biofilme. Após, o tubo foi lavado com água ou detergente enzimático e ficou por 10 minutos embebidos em água ou no detergente para a remoção das bactérias fracamente aderidas. Após, foram submetidos a uma descontaminação por lavagem com 2% de glutaraldeído e álcool e, o tubo foi reinserido no gerador do biofilme por mais 90 minutos, sendo este processo repetido por 20 vezes. Para analisar os resultados foram feitas microscopia eletrônica de varredura e semeadura em placa contendo agar nutriente incubado durante 48 horas a 37°C. A análise com o microscópio eletrônico de varredura mostrou que as células fracamente aderidas, foram removidas facilmente, as lavagens com o detergente enzimático retardou a remodelagem do biofilme e reduziu drasticamente o polissacarídeo extracelular. A lavagem feita com o produto não enzimático reduziu 90% do biofilme. A contagem de bactérias viáveis, mostrou estar altamente contaminado antes das lavagens, com $6,3 \times 10^6$ UFC/mL por 5 cm de tubo e, após a lavagem com glutaraldeído, não houve a recuperação nas placas. Concluíram que endoscópios lavados com o detergente removeu o biofilme estabelecido e retardou a sua remodelação, mas que ainda estudos para otimizar o uso de detergentes, se fazem necessários.

Boyle et al., (2010), demonstraram a eficácia do produto Ecasol™ na remoção do biofilme, para a limpeza nos equipos odontológicos. Neste trabalho, investigaram a citotoxicidade do Ecasol utilizando monocamadas de queratinócitos, reconstituindo o tecido epitelial bucal humano. Coletaram uma vez por semana, por 60 semanas consecutivas, amostras de água obtida da seringa de ar/água de equipos do Hospital Dental de Dublin. A água foi filtrada e tratada com 2,5 ppm de Ecasol e foram cultivadas em agar R2A por 10 dias a 20-22°C para a contagem das bactérias heterotróficas. O Ecasol foi diluído em solução de PBS até as concentrações de 2,5, 5,0, 10 e 100 ppm. A linhagem celular utilizada foi a TR146, obtida de uma biópsia de um carcinoma de células escamosas da mucosa bucal. As

células foram cultivadas em meio DMEM, suplementado com 10% de soro fetal bovino, penicilina e estreptomicina. Para fazer a reconstituição do epitélio humano (RHE), as células TR146 foram cultivadas em filtro de polycarbonato, devido a biocompatibilidade e a semelhança histológica com a cavidade bucal. A citotoxicidade do Ecasol foi avaliada em monocamadas de TR146 por dois ensaios, o Ensaio Azul Alamar (Resazurina), que avalia a viabilidade celular e o Ensaio de Exclusão de azul de Tripiano, que avalia a integridade da membrana plasmática, além dos cortes histológicos. As monocamadas de queratinócitos foram expostas ao Ecasol por 1 hora. Como resultado, o Ecasol em uma concentração maior que 5,0 ppm resultou em uma citotoxicidade significativa nos queratinócitos e nenhuma citotoxicidade foi observada nos tecidos RHE mais complexo em nenhuma das concentrações testadas de Ecasol. A contagem em UFC/mL nas placas por 60 semanas foi de 6,5 UFC/mL. Concluíra que o Ecasol presente nas tubulações dos equipos teria improvável efeitos adversos nos tecidos orais humanos.

Lin et al., em 2011, estudaram *in vitro* os diferentes efeitos de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em biofilmes e bactérias planctônicas em equipos odontológicos. Utilizaram 4 simuladores de equipos odontológicos por 12 semanas, os 3 primeiros reservatórios foram limpos semanalmente com concentrações de 1%, 2% e 3% de (H_2O_2) e após, colocaram água municipal com 0,05%, 0,15% e 0,25% de (H_2O_2) como irrigante, a unidade 4 (controle) não teve limpeza semanais e nem água municipal como irrigante. As amostras de água foram coletadas e incubadas em meio R2A a 22°C por 7 dias e feito a contagem de UFC/ml. Foram avaliadas por microscopia confocal e eletrônica de varredura 1 cm da tubulação. O teste *in vitro* foi realizado com 2%, 3% e 7% de peróxido de hidrogênio em biofilmes maduros, cada grupo tinha um frasco contendo 10 ml de H_2O_2 das respectivas concentrações e que permaneceram por 0, 5, 10, 20, 30, 60, 180, 360 e 1440 minutos. Amostras de cada grupo foram colhidas e observadas em microscopia confocal e eletrônica de varredura. A contagem da unidade de controle alcançou níveis de contaminação de 400.000 UFC/ml, enquanto as restantes obtiveram contaminação < 500 UFC/ml. Para o teste *in vitro*, não houve erradicação do biofilme maduro em 24 horas. Concluíram que, 2% de H_2O_2 como produto de limpeza periódica acrescido de 0,05% na água municipal para irrigação foi benéfica no controle do biofilme e de

bactérias planctônicas, mas, para a remoção do biofilme estruturado, só ocorreu após 2 meses.

Kramer et al., em 2012 testaram o PotoClean®, que possui a seguinte composição: cloreto de sódio <1%, hipoclorito de sódio 0,02%, 0,009% de ozônio, peróxido de hidrogênio 0,00005% e 0,0013% de oxigênio. Os pesquisadores testaram em 3 unidades dentárias (A, B e C), em suas tubulações e as análises foram feitas semanalmente, durante 7 meses. Como resultado, antes do uso do PotoClean®, na unidade A os valores foram em média de 300 UFC/ml, logo após o uso do produto, houve uma queda acentuada (0 UFC/ml), na unidade B a contagem foi semelhante ao equipo A, enquanto a unidade C, apresentou os mesmos resultados, tanto antes e após o uso do PotoClean® (0 UFC/ml). Concluíram que o PotoClean® foi mais eficaz em equipos mais novos (unidade C) do que em equipos mais antigos (A e B), e houve a redução do biofilme nos 3 casos.

Zhang, Sileika e Packman (2012), pesquisaram biofilmes com mono ou multi associação de *Pseudomonas aeruginosa* e *Flavobacterium sp*, produzidos em fluxo planar. Para isso, foi usado o meio de cultura R2A e incubados a 30°C durante 24 horas, após, uma única colônia ser transferida para 5ml de R2A e cultivado a 30°C com agitação, até a fase estacionária e para a formação das células de fluxo a temperatura foi de 25°C. Para a visualização, foi utilizado microscopia confocal. Após 5 dias de crescimento, o biofilme misto atingiu o estado estável, em fluxo lento, finas camadas das duas espécies foram detectadas, com pequenas diferenças. Quando avaliaram a distribuição vertical, mostraram que a *Pseudomonas* estava presente na base do biofilme, e a *Flavobacterium* na parte superior, sendo o componente dominante do biofilme. Quando observaram o biofilme simples, a *Pseudomonas* atingiu o estado estacionário após 4 dias e em fluxos mais lentos foi observado pequenas colônias, e biofilmes mais contínuos em fluxo mais rápido. A *Flavobacterium* atingiu após 6 dias e o biofilme observado em condições de fluxo mais rápido foi observado ser áspero e espesso e em fluxo mais lento camadas finas e descontínuas. Concluíram assim que ambas as espécies se comportam de maneira diferente, conforme a condição ambiental e a interação entre os micro-organismos, favorecendo ou não, a morfologia e a estruturação do biofilme.

Fanning e Mitchell em 2012 revisaram algumas características comuns de biofilmes fúngico. Destacaram que, o biofilme foi mais resistente a drogas antifúngicas do que as células planctônicas, sendo os fatores contribuintes: complexidade estrutural, matriz extracelular entre outros. Biofilme de *Aspergillus fumigatus* podem formar tanto em superfícies bióticas e abióticas e, as células iniciais colonizadoras que aderem ao substrato são os conídios, e os micélios (hifas) desenvolver-se conforme amadurece o biofilme.

Hageskal et al., em 2012, testaram 4 métodos de desinfecção em fungos comumente encontrados em sistemas de distribuição de água. Foram utilizados fungos na concentração de 1×10^3 esporos/mL de *Aspergillus calidoustus*, *Trichoderma viride*, *Penicillium spinulosum* e *Fusarium solani*, além do esporo de *Bacillus subtilis* como controle (1×10^4 esporos/mL). Os esporos dos fungos foram submetidos a ação de lâmpada UV (intensidade de 254 nm), ozônio (0,3-1,5 mg/L), cloro (0,2, 0,5 e 1,0 mg/L) e cloramina (0,2, 0,5 e 1,0 mg CL_2 /L), incubados por 7 dias a 25°C em meio Agar Dichloran 18% Glicerol e o esporo do *Bacillus subtilis* foi encubado a 37°C por 48 horas em meio PCA. Observaram que com a lâmpada UV (40 m Ws/cm^2), *B. subtilis* reduziu consideravelmente para $3,3 \log_{10}$, e os esporos dos fungos não sofreram ou foram levemente afetados, como os *Aspergillus calidoustus* e *Fusarium solani*. O cloro não reduziu o *B. subtilis* com tempo de contato de 30 minutos, somente reduziu *F. solani*, e os demais fungos não foram afetados. A cloramina, após tempo de contato de 3 horas, os únicos que obtiveram redução considerável foram os esporos de *F. solani* e *A. calidoustus*. O ozônio, com 10 minutos de contato com os esporos, reduziu consideravelmente o *F. solani*, *B. subtilis*, *T. viride* e *A. calidoustus*. Concluíram que o método mais eficaz foi o ozônio e que cada espécie fúngica tem suas características particulares, na qual a pigmentação pode estar ligada a sobrevivência e que o *B. subtilis* não pode ser utilizado como indicador de inativação dos esporos fúngicos após o tratamento da água.

Oliveira et al em 2013 compararam a identificação precisa dos bacilos gram negativos, por métodos molecular (16S rRNA), bioquímico (catalase, oxidase, redução de nitrato, urease, produção de indol, ornitina descarboxilase, hidrólise da esculina; glucose, sacarose, maltose, manitol e xilose) e VITEK 2 NH card

automatizado (bioMérieux). Para isso, os pesquisadores analisaram e identificaram 158 amostras, dos seguintes gêneros: *Neisseria* (n=35), *Pasteurella* (n=25), *Moraxella* (n=24), *Aggregatibacter* (n=20), *Capnocytophaga* (n=15), *Eikenella* (n=12), *Cardiobacterium* (n=6), *Actinobacillus* (n=3), *Oligella* (n=3) e *Kingella* (n=2). Por 16S rRNA, 94% foi identificado a nível de espécie, 5% a nível de gênero e 1 a nível de família. Pelo método convencional (bioquímico), 40% em nível de espécie, 13% em nível de gênero e 47% dos isolados foram identificados incorretamente quando comparado com o método de 16S rRNA. Por VITEK 2 NH card, as 80 amostras analisadas, 31% a nível de espécie e 9% a nível de gênero, o restante não foi identificado corretamente, quando comparado com o método de 16S rRNA. Concluíram, que o método 16S rRNA é mais eficaz para a identificação destas bactérias ou ser necessário integrar ambos os métodos bioquímicos e do VITEK 2 NH card para uma identificação mais precisa.

Singh, Nagaraja e Hungund em 2013, compararam os efeitos da desinfecção com 0,12% de clorexidina (CHX) – unidade A, uso de água destilada (unidade B), água de torneira (unidade C) e sistema de lavagem das tubulações (flushing) por 1 e 2 minutos – unidade D. Utilizaram meio de cultura cromogênico e incubaram a 37°C por 48 horas e utilizaram o sistema de identificação Biomerieux ID. Na primeira semana de avaliação das unidades dentárias, observaram que a unidade A não continha contaminação e as unidades B, C e D estavam com 10^3 UFC/mL. Na segunda semana, a unidade A continuava sem contaminação e a única que houve diferença estatística foi a unidade D com a utilização da lavagem do sistema por 2 minutos. As espécies bacterianas encontradas foram *Enterobacter* spp., *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Streptococcus* spp. A lavagem das tubulações por 2 minutos reduziu a contaminação, mas não foi confiável para a descontaminação e que a utilização de 0,12% CHX foi melhor para a desinfecção das unidades dentárias.

Szymańska e Sitkowska (2013) avaliaram a contaminação (quantitativa e qualitativamente) de 107 reservatórios de água de equipos odontológicos, no início do dia e antes da consulta dos pacientes. As amostras foram cultivadas em meio de cultura ágar sangue e eosina azul de metileno (EMB) e incubados por 24 horas a 37°C e em seguida durante 3 dias à temperatura ambiente (22°C) e 3 dias à 4°C. As

bactérias foram identificadas com API 20E, API 20NE e microplaca GP2™. Na avaliação qualitativa, foram encontrados bacilos Gram negativos (71,103.64 ufc/ml) como: *Acidovorax avenae* ss *cattleyae*, *Alcaligenes faecalis*, *Brevundimonas vesicularis*, *Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas chlororaphis*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas huttiensis* (*Burkholderialike*), *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas stutzeri*, *Pseudomonas syringae* pv. *aptata*, *Ralstonia pickettii*, *Sphingomonas paucimobilis*, *S. paucimobilis* B, *Sphingobacterium spiritovorum* e *Stenotrophomonas maltophilia*. Os bacilos Gram positivos (13,262.78 ufc/ml) foram: *Arthrobacter histidinovorans*, *Arthrobacter* spp., *Arthrobacter woluwensis*, *Microbacterium flavescens*, *Aureobacterium* spp., *Microbacterium testaceum*, *Brevibacterium epidermidis*, *Brevibacterium otitidis*, *Brevibacterium* spp., *Brevibacterium* spp., *Clavibacter michiganensis* ss *insidiosus*, *Corynebacterium auris*, *Corynebacterium* spp., *Corynebacterium urealyticum*, *Corynebacterium variabile*, *Brevibacterium mcbrellneri*, *Arthrobacter ilicis*, *Microbacterium laevaniformans*, *Microbacterium* spp., *Microbacterium* spp., *Rhodococcus fascians* e *Rhodococcus* spp. Os cocos Gram positivos (868,97 ufc/ml) encontrados foram: *Enterococcus casseliflavus*, *Micrococcus* spp., *Pediococcus pentosaceus*, *Staphylococcus arlettae*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus lentus*, *Staphylococcus lugdunensis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus sciuri* ss *rodentium*, *Staphylococcus* spp., *Stomatococcus mucilaginosus*, *Streptococcus acidominimus* e *Streptococcus* spp. A avaliação quantitativa da água mostrou que a média total foi 110.165, 28 UFC/mL, a concentração mínima foi de 30 UFC/mL e a máxima de 1,234,000.00 UFC/mL. Concluíram ser necessário um monitoramento constante para a limpeza destes reservatórios, devido a vasta colonização encontrada.

Um dos grandes desafios é a remoção do biofilme e Özalp et al (2013) investigaram a redução da colonização e crescimento das bactérias heterotróficas nos equipos odontológicos, utilizando peróxido de hidrogênio com prata. No total foram analisados 27 equipos (14 como controle, 6 com mais de 20 anos de uso e 7 novos, com 2 anos de uso). Durante 20 semanas, foi aplicado 250 mL de peróxido de hidrogênio a 5% com prata coloidal em 750 mL de água por 2 horas. Para a contagem em UFC/ml, as amostras foram semeadas no meio R2A e incubadas a 28°C por 7 dias. Os pesquisadores observaram que os equipos do grupo controle

tinham uma contagem mínima de $1,4 \times 10^3$ UFC/mL e estes valores elevados foram mantidos pelas 20 semanas. Os equipos antigos possuíam contagens maiores que 1×10^5 ufc/ml, e após a limpeza diminuiu para $7,5 \times 10^2$ UFC/mL e apenas 2 unidades foram capazes de atingir níveis de ≤ 200 UFC/mL. Para os equipos novos, após uma semana de tratamento, foi possível atingir níveis menores que 200 ufc/ml, mostrando assim que a desinfecção foi eficaz.

Al-gabr; Zheng; Yu, em 2013 investigaram durante um ano a frequência de fungos em água potável. As 424 amostras foram coletadas da superfície de água, ponto de ônibus, de casa, água hospitalar, água de universidade e água de tanque. A água foi inoculada em ágar extrato de malte (MEA) e ágar dextrose Sabouraud (SDA) e as placas incubadas a 28°C por 4 semanas. Alguns fungos foram identificados por microcultivo e outros por sequencia de gene de rRNA. Como resultado, encontraram *Aspergillus spp.*, *Fusarium spp.*, *Pencillium spp.*, *Trichoderma spp.*, *Mucor sp.* e *Rhizopus sp.* Os mais frequentes na água de torneira e no sistema público foram: *Fusarium sp.*, *Exophiala sp.* e *Phialophora sp.* Concluíram que as amostras de água potável possuíam um número elevado de fungos, e que alguns produziam micotoxinas.

Siqueira e Lima em 2013 avaliaram a capacidade da formação do biofilme de fungos e a sua caracterização morfológica e fisiológica. Utilizaram os seguintes fungos: *Aspergillus sp.* (seção *Nigrí*), *Aspergillus sp.* (seção *Flavi*), *Alternaria sp.*, *Botrytis sp.*, *Cladosporium sp.* e *Penicillium sp.*, recuperado de biofilmes do sistema de água. Para a formação do biofilme, suspensões dos esporos de cada fungo, foram inoculadas em caldo MEB, caldo de R2A e água de torneira em placas de microtitulação e incubadas a 30°C por 24 horas. O biofilme foi quantificado pela técnica de cristal violeta (biofilme total - biomassa) e pelo ensaio MTT (células viáveis), após 4, 8, 12 e 24 horas, lidos em um leitor de placas de microtitulação. Observaram uma relação direta entre a biomassa e parâmetros morfológicos do biofilme (EPS e monocamada), não ocorrendo entre a biomassa e células viáveis. Em água, os biofilmes mostraram quantidades mais elevadas de células viáveis nas primeiras 4 horas, e inferior ao longo do tempo. Em R2A e MEB, biomassa e atividade das células apresentaram valores mais elevados ao longo do tempo. Observaram que, *Alternaria sp.* e *Botrytis sp.* foram os fungos que formaram biofilme

em água e *Penicillium* sp. mostrou adesão dos esporos após 24 horas. Em R2A, biofilmes foram formados principalmente após 12 horas e a produção de EPS foi observada após 24 horas em *Aspergillus* spp., *Alternaria* sp. e *Botrytis* sp. No MEB, após 8 horas, os fungos formaram biofilme estruturado, com exceção do *Cladosporium* sp. que se mostrou maduro após 12 horas. O meio de cultura MEB mostrou ser o mais eficiente para a formação do biofilme fúngico. Concluíram a capacidade de fungos para formar biofilmes e a necessidade emergente de padronizar métodos para novas pesquisas nesta área.

Dallolio et al., (2014), selecionaram 5 equipos odontológicos de clínicas comunitárias do Serviço Nacional Italiano e compararam a eficácia de diferentes métodos de desinfecção em relação à qualidade da água e a presença de biofilme. Uma unidade dentária, não possuía sistema de desinfecção e usada como controle, duas unidades sofreram desinfecção intermitente com peróxido/ácido peracético 0,26 % e os outros dois equipos restantes, sofreram desinfecção contínua com peróxido de hidrogénio 0,02% com íons de prata e dióxido de cloro estabilizado a 0,22%. Após 3 meses, 90 amostras de água foram coletadas e as bactérias foram isoladas pela técnica de pour plate no meio PCA a 36°C por 48 horas e a 22°C por 72 horas. Para isolar *Legionella* spp as amostras foram inoculadas em meio seletivo MWY Agar e incubadas a 35°C em microaerofilia por 14 dias. O método de membrana filtrante foi utilizado para a detecção de *S. aureus* em meio Baird Parker Agar, *Streptococcus* β -Hemolítico no meio Columbia CNA-CV sangue Agar, *P. aeruginosa* em agar seletivo e esporos de *Clostridium* em Agar Sulfito A em anaerobiose, todos encubados a 36°C por 48 a 72 horas. Pedacos das tubulações (15 mm) da seringa de ar/água foram cortados e recolhidos antes (T0) e após as desinfecções (T1), para a análise em microscopia eletrônica de varredura. No controle foi detectadas bactérias, na desinfecção intermitente houve 27,8% de *P. aeruginosa* enquanto nenhuma UFC/mL foi constatada na desinfecção contínua. Em relação a microscopia de varredura no T0 o biofilme nos tubos de controle estavam distribuídas homogeneamente formando agregados em massa. No momento T1 nenhuma mudança significativa foi observada no controle, enquanto que as características do biofilme após a desinfecção intermitente reduziu de 37% para 3 % e contínua de 65% para 8%. Concluíram que sistema de desinfecção contínua foi mais eficaz do que o sistema intermitente em reduzir a contaminação da água,

atingindo as diretrizes preconizadas pelo da CDC, e que o biofilme era mais espesso e mais friável nas unidades dentárias com desinfecção intermitentes do que naqueles com desinfecção contínua.

3 PROPOSIÇÃO

3 PROPOSIÇÃO

Os objetivos deste estudo foram:

- Avaliar a presença de bactérias e de fungos nos reservatórios e tubulações das canetas de alta rotação das 7 clínicas da Faculdade de Odontologia de Bauru, FOB-USP.
- Avaliar a detecção bacteriana dos meios de cultura, Plate Count Agar (PCA), R2A e Peptona Diluída (PD) e de fungos pelo Sabouraud Dextrose Agar (SDA).
- Avaliar a eficácia das técnicas de isolamento abordadas: esgotamento, gota e pour plate.
- Identificar as bactérias e fungos provenientes dos reservatórios e tubulações.
- Verificar a ação do detergente enzimático (Riozyme IV E Neutro Gold, Rioquímica LTDA) na limpeza dos reservatórios e tubulações de água na Clínica de Dentística.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Coleta das Amostras

A Faculdade de Odontologia de Bauru – FOB/USP apresenta 9 clínicas para uso de alunos de graduação e pós-graduação, sendo selecionadas 7 (Dentística/Endodontia, Multidisciplinar, Odontopediatria, Ortodontia, Pós-graduação, UBAs e Urgência), das quais, um total de 12 equipos foram usados para a coleta das amostras de água, do reservatório e das tubulações das canetas de alta rotação. A FOB preconiza em seu Manual de Biossegurança 2000 (143.107.25.4/adm/comissoes/bioseseg/index.htm) cuidados para a manutenção do sistema “flush” e reservatórios de água.

Durante o período em que as amostras de água foram coletadas, alguns reservatórios foram abastecidos com água destilada ou provenientes de torneira (poço semi artesiano). A clínica de Odontopediatria, apenas um equipo selecionado não tinha a presença de água por 30 dias, enquanto na Pós-Graduação, 2 equipos estavam sem água por 60 dias. Na clínica de Ortodontia (2 equipos) e Urgência (1 equipo) os reservatórios estavam com água destilada, enquanto a clínica de Unidade Básica de Saúde (UBAs), 2 equipos, os reservatórios estavam com água de torneira.

A clínica multidisciplinar (1 equipo), apresentava água em quantidade suficiente para análise microbiológica, pois até então, a clínica não estava em uso. Esta possui equipos com a nanotecnologia B-Safe® desenvolvida pela empresa Dabi Atlante, cuja tecnologia é composta por nanopartículas de prata coloidal implantada no estofamento da cadeira do equipo, engates de baixa e alta rotação, seringa, capa de ultrassom, sugadores, painel de controle, apoio de pontas, bacia de cuspeira, reservatórios e todas as tubulações.

Na clínica de Dentística, 3 equipos foram utilizados numa primeira coleta (sem limpeza) e estavam sem a presença de água por 2 semanas e, estes foram

submetidos a limpezas com detergente enzimático (Anexo A e B), seguido por coletas semanais.

Todos os equipos que apresentavam água no interior do reservatório esta (Ortodontia, Urgência, UBAs e Multidisciplinar) coletada, assim como na tubulação da caneta de alta rotação, para detectar a presença de bactérias e fungos. Os equipos que estavam mantidos sem água (Odontopediatria, Pós-Graduação e Dentística), antecedendo a coleta, foram preenchidos com 500 mL de água destilada estéril, acionamos para que passasse pela tubulação por 30 segundos, 24 horas antes das coletas serem obtidas.

4.2 Processamento microbiológico

O período entre as coletas e o início do processamento microbiológico foi de aproximadamente 30 minutos. O experimento foi realizado em câmara de fluxo laminar (VECO, Campinas, SP, BR) e 10 mL das amostras de água dos reservatórios e tubulações das canetas de alta rotação foram homogeneizadas em vortex (Mistron) por 1 minuto em potência máxima e, em seguida, alíquotas de 1,0 mL foram transferidas para tubos contendo 9,0 mL de solução salina, obtendo diluições de 10^{-1} a 10^{-4} .

Foram utilizadas três técnicas de semeadura para a obtenção das unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL) sendo elas: gota, esgotamento e pour plate.

Para a técnica da gota (WESTERGREN; KRASSE, 1978) alíquotas de 25µl das amostras de água *in natura* e das diluições (Figura 1), provenientes dos reservatórios e das tubulações, foram semeadas em cinco pontos equidistantes em placa de petri contendo os meios de cultura Plate Count Agar - PCA (Difco™, USA), R2A Agar (Difco™, USA) e Peptona Diluída – PD (Maki et al., 1986), formulados de acordo com as especificações do fabricante.

Para a técnica de esgotamento, com o auxílio de alça de Drigalski 100µl das amostras *in natura* e diluições (reservatório e tubulação) foram espalhadas na superfície dos meios de cultura PCA, R2A e PD.

A técnica de pour plate, foi usada somente para o meio PCA, sendo, 100µl das amostras de água *in natura* e das diluições depositadas em placas de petri esterilizadas e após, foi vertido cerca de 20 mL do referido meio de cultura, resfriado a 55°C de acordo com o preconizado pela American Public Health Association (APHA, 1999), as placas foram homogeneizadas em movimentos circulares e deixadas geleificar. Todas as placas, após a semeadura foram incubadas a 24°C por 72 horas.

Para a pesquisa de fungos, as técnicas de esgotamento (100µl) e gota (25µl) foram utilizadas no Sabouraud Dextrose Agar – SDA (Difco™, USA) com Cloranfenicol a 1%, seguidas de incubação a 24°C por 4 a 7 dias.

Todas as contagens foram expressas em unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/ml) e a presença de bactérias foi avaliada conforme a portaria nº 2.914, de 12 de dezembro de 2011 (BRASIL, 2011) e o preconizado pela ADA (KOHN et al., 2003), que indica o valor de 500 UFC/mL, para o consumo humano e uso em equipamentos odontológicos, respectivamente.

Figura 1 – Ilustração da técnica da gota.

4.2.1 R2A Agar

O R2A Agar (Difco™, USA) foi desenvolvido para a contagem de bactérias heterotróficas em água, conforme proposto por Reasoner e Geldreich em 1985. Para cada 18,2 gramas do meio de cultura foram adicionados 1000 mL de água destilada, após esterilização em autoclave a 121°C por 15 minutos, alíquotas

de 20 mL do meio foram distribuídas em placas de petri (60x13mm) esterilizadas (anexo C).

4.2.2 Plate Count Agar – PCA

O Plate Count Agar (Difco™, USA) indicado para a contagem total de bactérias de alimentos e água. Para cada 23,5 gramas do meio de cultura foram adicionados 1000 mL de água destilada (anexo D). Após esterilização em autoclave a 121°C por 15 minutos, alíquotas de 20 mL do meio foram distribuídas em placas de petri (60x13mm) esterilizadas. Alíquotas de 20 mL foram mantidas em tubos em banho maria para a técnica de pour plate.

4.2.3 Peptona Diluída - PD

O Agar Peptona Diluída é um meio de cultura recomendado para a contagem de micro-organismos existentes na água, sendo formulado segundo as especificações propostas por Maki et al., (1986). Após esterilização em autoclave a 121°C por 15 minutos, alíquotas de 20 mL do meio foram distribuídas em placas de petri (60x13mm) esterilizadas (anexo E).

4.2.4 Sabouraud Dextrose Agar - SDA com Cloranfenicol a 1%

O Sabouraud Dextrose Agar - SDA (Difco™, USA), utilizado para o isolamento de fungos filamentosos, leveduriformes, saprófitos e patogênicos. Para cada 65,0 gramas do meio de cultura foram adicionados em 1000 mL de água destilada e autoclavado a 121°C por 15 minutos (anexo F). Após resfriar a 55°C, foi acrescentado Cloranfenicol até obter a concentração final de 1%, para a inibição do crescimento bacteriano. Alíquotas de 20 mL do meio foram distribuídas em placas de petri esterilizadas (60x13mm).

4.3 Estocagem das bactérias e fungos

As colônias foram selecionadas pela sua pigmentação (amarelas, rosas ou brancas) e pelo seu isolamento nos meios de cultura. As colônias foram

transferidas, para placas de petri contendo o R2A Agar, pela técnica de esgotamento, para à confirmação de culturas axênicas e da morfologia celular. Confirmada as características morfológicas das colônias, as mesmas foram transferidas em criotubos, devidamente identificados, com capacidade de 2 mL com fundo plano, onde foi dispensado 1,5ml de agar R2A. Para garantir a transferência destes micro-organismos foram feitos quatro perfurações no Agar em pontos equidistantes e deixados em estufa por 72 horas a 24°C. Confirmado o crescimento as amostras foram estocadas em freezer a -20°C, para posterior identificação.

Para os fungos selecionados, pequenos pedaços das colônias foram transferidas para tubos de penicilina, contendo 6 mL de água destilada estéril. Feito a transferência, os tubos foram encubados a 24°C por 4 dias, e após, conservados em temperatura ambiente, até a realização do microcultivo.

4.4 Reativação das amostras bacterianas

As 539 amostras estocadas foram retiradas do freezer a -20°C, descongeladas a 37°C por 30 minutos e semeadas, pela técnica de isolamento, em placas de petri contendo o meio de cultura R2A Agar. As placas foram incubadas por 3 dias a 24°C, para a identificação.

4.5 Identificação das bactérias

Após a reativação das amostras, os isolados bacterianos foram submetidos aos testes de oxidase e catalase. As bactérias foram inoculadas ao sistema de identificação bioquímico Bactray® (Laborclin) composto de três conjuntos de provas, I e II, para a identificação de bactérias Gram-negativas oxidase negativa e III, para bactérias Gram-negativas oxidase positiva.

Os procedimentos foram realizados de acordo com as instruções do fabricante. Resumidamente, as colônias com oxidase negativa, foram suspensas em 2,0 mL água destilada estéril, até se obter a turvação semelhante à escala 0,5 de McFarland. Para o Bactray® I, transferir 1,0 mL desta suspensão para o kit e o 1,0 mL restante, foi para o Bactray® II, que é considerado complementar ao Bactray® I.

Cada suspensão foi distribuída igualmente nos compartimentos que contém os reagentes desidratados para a realização das provas no kit I, sendo elas: hidrólise da β -galactosidase (ONPG) e da arginina (ADH); descarboxilação da lisina (LDC) e da ornitina (ODC), produção de ácido sulfídrico (H₂S), indol (IND) e urease (URE); utilização da glicose e produção de acetoina (VP), desaminação da fenilalanina (PD); e utilização do citrato como única fonte de carbono (CIT); enquanto o Bactray® II, contem as seguintes provas: utilização do malonato (MAL), rhamnose (RHA), adonitol (ADO), salicina (SAL), arabinose (ARA), inositol (INO), sorbitol (SOR), sacarose (SAC), manitol (MAN) e rafinose (RAF). O óleo mineral esterilizado foi adicionado às provas de ADH, LDC, ODC, H₂S e URE, os kits foram incubados a 24°C por 24 horas.

O mesmo procedimento de suspensão bacteriana foi realizado para o kit Bactray® III, que identifica bactérias oxidase positiva, composto pelos testes cetrimide (CET), acetamida (ACE), malonato (MAL), citrato (CIT), maltose (MLT), esculina (ESC), L-arginina (ARG), controle (CTL), uréia (URE) e indol (IND). O óleo mineral esterilizado foi adicionado às provas de CTL, ARG e URE e o conjunto foi incubado a 24°C por 24 horas. Todas as identificações seguiram o programa disponibilizado no site pelo fabricante (www.laborclin.com.br), que forneceu a porcentagem de confiabilidade da identificação realizada pelo kit.

Figura 2 – Kit Bactray® I, II e III.

4.6 Reativação das amostras fúngicas

Os fungos estocados foram transferidos para placas de petri (50x10mm) contendo 5 mL do meio Sabouraud Dextrose Agar – SDA (Difco™, USA). Apenas um repique foi realizado no centro da placa, incubada a 24°C por 4 a 7 dias, para a confirmação da pureza e morfologia colonial.

4.7 Identificação dos fungos

Para a identificação dos fungos filamentosos foi realizada a técnica do microcultivo (RIDEELL, 1950), pois revela o arranjo dos conídios ou esporos *in situ*. Consiste em um sistema estéril, em que uma lâmina apoiada sobre um suporte de vidro em V, e com um pequeno bloco de Agar Batata Dextrose (Difco™, USA) (anexo F) depositado sobre essa lâmina foi colocado em placas de petri (60x13mm) previamente esterilizadas. O fungo foi inoculado nas bordas do agar e coberto com lamínula. Esse sistema foi mantido úmido com um algodão embebido em água destilada estéril. As placas de petri foram vedadas com fita adesiva para que não houvesse perda da umidade e incubadas à 24°C por 4 a 7 dias, para o crescimento fúngico na lamínula (Sidrim; Moreira, 1999).

Depois do crescimento fúngico (hifas) as placas foram abertas e foi colocada uma gota de formol sobre o algodão. O vapor do formol, além de inativar o fungo, auxiliou na fixação das estruturas microscópicas. Após aproximadamente 24 horas retirou-se a lamínula que cobriu o agar, com o auxílio de uma pinça e sobre uma lâmina limpa com uma gota de corante lactofenol azul de algodão (Cotton Blue) (anexo H), depositou esta lamínula com crescimento. Descartando o pedaço de agar que estava sobre a lâmina, colocou-se uma gota de lactofenol azul de algodão e recobriu-a com uma lamínula limpa, obtendo duas lâminas para a observação microscópica. A identificação foi feita, observando-se as estruturas fúngicas, como tipo e cor das hifas, forma, disposição e formação de esporos.

Além da observação microscópica das estruturas de frutificação dos fungos, as características macroscópicas das colônias, em relação ao tempo de

crescimento, formato das colônias, coloração, textura, relevo e bordos foram observados.

Figura 3 – Modelo do microcultivo para a identificação dos fungos.

4.8 Análise Estatística

Foi empregado o teste de análise de variância (ANOVA) e de Tukey, para ter a diferenciação de 4 critérios: eficácia dos meios de cultura PCA, R2A, PD e SDA, diferença entre as clínicas, local de coleta (reservatório e tubulações de água da caneta de alta rotação) e métodos de isolamento empregados (esgotamento, gota e pour plate).

5 RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 Presença de bactérias e fungos (UFC/mL)

A presença de bactérias e fungos, foi detectada nos reservatórios (R) e tubulações (T) de água em todas as 7 clínicas avaliadas, indicando que a qualidade da água estava fora do padrão para o consumo humano ou o recomendado para o uso em equipos odontológicos (500 UFC/mL). Na clínica de Odontopediatria, os equipos permaneceram secos por 30 dias e houve presença bacteriana em todos os meios de cultura e técnicas de isolamento usadas. Em relação aos fungos, a presença foi detectada somente no reservatório pelas duas técnicas de isolamento (apêndice A). Os valores médios bacterianos no reservatório foram de 46.957 UFC/mL e na tubulação de 214.705 UFC/mL (tabela 1) e, a média dos fungos, no reservatório, foi de 410 UFC/mL e na tubulação foi zerada (tabela 2).

Na clínica de Ortodontia, foi utilizada água destilada para o preenchimento do reservatório dos equipos, houve presença de bactérias em todos os meios de cultura (PCA, R2A, PD), todas as técnicas de isolamento e local de coleta (reservatório e tubulações da caneta de alta rotação). No meio SDA, os fungos foram detectados na tubulação e pelas duas técnicas de isolamento (apêndice B). A presença média bacteriana foi de 1.612.310 UFC/mL nos reservatórios e, nas tubulações foram de 1.984.190 UFC/mL (tabela 1), para os fungos, a média foi de 1.000 nos reservatórios e 405 UFC/mL nas tubulações, independente das técnicas de isolamento ou dos meios de cultura utilizados (tabela 2).

Na clínica de Pós-Graduação, os equipos estavam secos por 60 dias e, mesmo assim, houve presença bacteriana, sendo constatado maior UFC/mL nas tubulações da caneta de alta rotação, do que nos reservatórios. Os fungos estavam presentes, tanto na tubulação, detectados pela técnica de esgotamento, como no reservatório pela técnica da gota (apêndice C). A média bacteriana foi de 3.398 UFC/mL nos reservatórios de 121.892 UFC/mL nas tubulações (tabela 1), para os fungos, nos reservatórios, a média foi de 10 UFC/mL e nas tubulações de 15

UFC/mL, independente das técnicas de isolamento ou dos meios de cultura utilizados (tabela 2). Os valores médios quantificados nas clínicas de odontopediatria e pós-graduação demonstram que a permanência sem água nos equipos favoreceu a diminuição dos fungos, mas não das bactérias.

Na clínica de unidade básica de saúde (UBAs), os equipos eram preenchidos com água de torneira, houve presença de bactérias, sendo detectado maior número de UFC/mL no reservatório do que na tubulação. Em relação aos fungos, a quantidade de UFC/mL foi elevada e a presença foi detectada tanto no reservatório quanto na tubulação (apêndice D). Obteve valores médios bacterianos de 1.248 UFC/mL nos reservatórios e de 11,43 UFC/mL nas tubulações (tabela 1), para fungos, a média foi de 21.758 UFC/mL nos reservatórios e de 61.193 nas tubulações (tabela 2).

Na clínica de Urgência, os reservatórios estavam preenchidos com água destilada e, houve maior presença de UFC/ml nas tubulações do que nos reservatórios, tanto para bactérias, quanto para os fungos (apêndice E). Obteve valores médios bacterianos de 168 UFC/mL no reservatório e de 1.526 na tubulação (tabela 1), para os fungos, o reservatório estava zerado e na tubulação o valor médio foi de 235.000 UFC/mL (tabela 2).

Na clínica Multidisciplinar, cujos equipos dispunham da nanotecnologia B-Safe®, a presença de bactérias e fungos foi constatada em todos os meios de cultura, independente da técnica de isolamento e local (apêndice F). Observamos valores médios bacterianos no reservatório de 180.365 UFC/mL e na tubulação de 32.274 UFC/mL (tabela 1), para os fungos, a média no reservatório foi de 8.267 e na tubulação foi de 670 UFC/mL (tabela 2).

A clínica de Dentística apresentou bactérias e fungos nos reservatórios e tubulações, sendo que na primeira coleta (sem limpeza), tivemos uma recuperação média de 417.619 UFC/mL para bactérias e de 64.642 UFC/mL para fungos. Após as quatro limpezas com o uso do detergente enzimático, houve redução na contagem de bactérias para 135.924 UFC/mL e dos fungos para 23.627 UFC/mL. Para as bactérias a redução ficou evidente nos reservatórios, quando comparados à

tubulação, para os meios PCA, R2A e PD, pela técnica da gota, a partir da 3º e 4º limpeza. Para a presença de fungos, a redução ficou evidente a partir da segunda limpeza, não havendo crescimento, tanto no reservatório quanto na tubulação (apêndice G).

Tabela 1 – Médias das bactérias em UFC/mL nas 7 clínicas avaliadas, e da clínica de Dentística, sem e com limpeza, nos meios de culturas, reservatórios (R) e tubulações (T) e, nas técnicas de isolamento esgotamento (E), gota (G) e pour plate (PP).

Clínicas	PCA	R2A	PD	R	T	E	G	PP	Total
Odontopediatria	13.511	357.375	80.267	46.957	214.705	56.167	245.544	10.683	128.151
Ortodontia	605.667	2.751.250	2.634.125	1.612.310	1.984.190	1.858.750	1.889.667	1.342.500	1.834.807
Pós-Graduação	37.975	81.671	80.625	3.398	121.892	80.761	59.591	17.462	60.422
UBAs	21,67	2.149,50	22,50	1.248	11,43	1.414	53,34	5	615,68
Urgência	607,50	920,75	1.132	168	1.526	589	953,90	1.300	899,64
Multidisciplinar	111.481	173.813	31.085	180.365	32.274	122.510	123.590	5.938	97.632
Dentística (s/I)	646.416	220.398	183.603	32.814	752.114	152.407	468.413	884.790	417.619
Total	202.240	512.511	430.123	268.180	443.816	324.657	398.259	323.240	

Clínicas	PCA	R2A	PD	R	T	E	G	PP	Total
Dentística (s/I)	646.416	220.398	183.603	32.814	752.114	152.407	468.413	884.790	417.619
Dentística (c/I)	32.513	365.973	76.618	135.070	145.707	202.965	122.642	5.900	135.924
Total	339.465	293.186	130.111	83.942	448.911	177.686	295.528	445.345	

Tabela 2 – Médias dos fungos em UFC/mL nas 7 clínicas avaliadas, e da clínica de Dentística, sem e com limpeza, nos meios de culturas, reservatórios (R) e tubulações (T) e, nas técnicas de isolamento esgotamento (E), gota (G) e pour plate (PP).

Clínicas	SDA	R	T	E	G	Total
Odontopediatria	205	410	0	270	140	205
Ortodontia	702,50	1.000	405	5	1.400	702,50
Pós-Graduação	12,50	10	15	15	10	12,50
UBAs	41.475	21.758	61.193	22.751	60.200	41.475
Urgência	117.500	0	235.000	215.000	20.000	117.500
Multidisciplinar	4.469	8.267	670	6.107	2.830	4.469
Dentística (s/l)	64.642	4.285	124.999	45.881	83.403	64.642
Total	32.715	5.104	60.326	41.433	23.998	

Clínicas	SDA	R	T	E	G	Total
Dentística (s/l)	64.642	4.285	124.999	45.881	83.403	64.642
Dentística (c/l)	23.627	33.554	13.700	23.909	23.345	23.627
Total	44.135	18.920	69.350	34.895	53.374	

5.2 Identificação das bactérias e fungos

Foram selecionadas 539 colônias, nos diferentes meios de cultura (PCA, PD e R2A), tanto dos reservatórios, como das tubulações, provenientes das 7 clínicas. A morfologia celular foi de bacilos ou coco-bacilos gram negativo. Destas 539 colônias, 151 (28,02%) não foram recuperadas da estocagem, enquanto 388 (71,98%) foram identificadas em 22 espécies diferentes, conforme apresentadas na tabela 3.

Tabela 3 – Espécies encontradas nas 7 clínicas avaliadas.

Espécie	Quantidade	%
<i>Acinetobacter baumannii/calcoaceticus</i>	197	50,78
<i>Aeromonas hydrophila</i>	1	0,26
<i>Alcaligenes xylosoxidans denitrificans</i>	8	2,06
<i>Brevundimonas vesicularis</i>	7	1,80
<i>Burkholderia cepacia</i>	55	14,17
<i>Burkholderia pseudomallei</i>	13	3,35
<i>Chromobacterium violaceum</i>	1	0,26
<i>Hafnia alvei</i>	5	1,28
<i>Hafnia alvei</i> (Biogrupo 1)	5	1,28
<i>Ochrobactrum anthropi</i>	4	1,04
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	4	1,04
<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	1	0,26
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	2	0,51
<i>Pseudomonas luteola</i>	22	5,67
<i>Pseudomonas oryzihabitans</i>	4	1,04
<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>	34	8,76
<i>Pseudomonas putida</i>	8	2,06
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	2	0,51
<i>Serratia liquefaciens</i>	1	0,26
<i>Serratia plymuthica</i>	3	0,77
<i>Sphingobacterium multivorum</i>	4	1,04
<i>Tatumella ptyseos</i>	7	1,80
Total	388	100

As bactérias com maior prevalência nos meios de cultura foram *A. baumannii/calcoaceticus* em primeiro lugar com 48,30% (PCA), 47,29% (R2A) e 54,54% (PD), *B. cepacia* em segundo lugar com 18,36% (PCA), 9,30% (R2A) e 16,16% (PD) e a bactéria com mais prevalência, em terceiro lugar, no PCA foi *P. pseudoalcaligenes* com 14,28%, no R2A com 6,97% as bactérias *B. pseudomallei*,

P. luteola e *P. pseudoalcaligenes* e no PD foi *P. luteola* com 10,10%. No meio SDA, as únicas bactérias que foram resistentes à ação do Cloranfenicol foram *Acinetobacter baumannii/calcoaceticus* com 84,61%, *Pseudomonas aeruginosa* e *P. luteola* com 7,69%. As bactérias *Acinetobacter baumannii/calcoaceticus*, *Burkholderia cepacia* e *P. pseudoalcaligenes* também foram prevalentes nas canetas de alta rotação, reservatórios, na técnica de gota, esgotamento e pour plate, apresentados na tabela 4.

Tabela 4 – Número e porcentagem das espécies bacterianas encontradas nos meios PCA, R2A, PD e SDA, nos reservatórios (R), tubulações (T), e nas técnicas de isolamento esgotamento (E), gota (G) e pour plate (PP).

Espécies	PCA	R2A	PD	SDA	R	T	E	G	PP	Total
<i>A. baumannii/calcoaceticus</i>	71 (48,30%)	61 (47,29%)	54 (54,54%)	11 (84,61%)	86 (58,11%)	111 (46,25%)	118 (50,86%)	56 (49,56%)	23 (53,49%)	197
<i>A. hydrophila</i>	1 (0,68%)	-	-	-	-	1 (0,42%)	-	-	1 (2,32%)	1
<i>A. xylosoxidans denitrificans</i>	4 (2,72%)	1 (0,78%)	3 (3,03%)	-	3 (2,03%)	5 (2,09%)	6 (2,58%)	2 (1,78%)	-	8
<i>B. vesicularis</i>	1 (0,68%)	4 (3,10%)	2 (2,02%)	-	3 (2,03%)	4 (1,67%)	4 (1,72%)	3 (2,66%)	-	7
<i>B. cepacia</i>	27 (18,36%)	12 (9,30%)	16 (16,16%)	-	16 (10,81%)	39 (16,25%)	23 (9,92%)	26 (23,01%)	6 (13,96%)	55
<i>B. pseudomallei</i>	2 (1,36%)	9 (6,97%)	2 (2,02%)	-	6 (4,05%)	7 (2,91%)	6 (2,58%)	7 (6,19%)	-	13
<i>C. violaceum</i>	-	-	1 (1,01%)	-	-	1 (0,42%)	1 (0,44%)	-	-	1
<i>H. alvei</i>	2 (1,36%)	1 (0,78%)	2 (2,02%)	-	2 (1,36%)	3 (1,25%)	2 (0,86%)	2 (1,78%)	1 (2,32%)	5
<i>H. alvei</i> (Biogrupo 1)	3 (2,05%)	1 (0,78%)	1 (1,01%)	-	3 (2,03%)	2 (0,83%)	1 (0,44%)	2 (1,78%)	2 (4,65%)	5
<i>O. anthropi</i>	-	2 (1,55%)	2 (2,02%)	-	1 (0,67%)	3 (1,25%)	3 (1,29%)	1 (0,88%)	-	4
<i>P. aeruginosa</i>	1 (0,68%)	1 (0,78%)	1 (1,01%)	1 (7,69%)	1 (0,67%)	3 (1,25%)	3 (1,29%)	1 (0,88%)	-	4
<i>P. alcaligenes</i>	1 (0,68%)	-	-	-	1 (0,67%)	-	-	1 (0,88%)	-	1
<i>P. fluorescens</i>	1 (0,68%)	1 (0,78%)	-	-	-	2 (0,83%)	2 (0,86%)	-	-	2
<i>P. luteola</i>	2 (1,36%)	9 (6,97%)	10 (10,10%)	1 (7,69%)	8 (5,40%)	14 (5,83%)	18 (7,76%)	3 (2,66%)	1 (2,32%)	22
<i>P. oryzihabitans</i>	1 (0,68%)	3 (2,32%)	-	-	-	4 (1,67%)	2 (0,86%)	1 (0,88%)	1 (2,32%)	4
<i>P. pseudoalcaligenes</i>	21 (14,28%)	9 (6,97%)	4 (4,04%)	-	10 (6,75%)	24 (10,00%)	23 (9,92%)	5 (4,42%)	6 (13,96%)	34
<i>P. putida</i>	1 (0,68%)	6 (4,65%)	1 (1,01%)	-	2 (1,36%)	6 (2,50%)	7 (3,02%)	1 (0,88%)	-	8
<i>P. stutzeri</i>	1 (0,68%)	1 (0,78%)	-	-	2 (1,36%)	-	2 (0,86%)	-	-	2
<i>S. liquefaciens</i>	1 (0,68%)	-	-	-	-	1 (0,42%)	1 (0,44%)	-	-	1
<i>S. plymuthica</i>	1 (0,68%)	2 (1,55%)	-	-	1 (0,67%)	2 (0,83%)	2 (0,86%)	1 (0,88%)	-	3
<i>S. multivorum</i>	3 (2,05%)	1 (0,78%)	-	-	3 (2,03%)	1 (0,42%)	2 (0,86%)	-	2 (4,65%)	4
<i>T. pytyseos</i>	2 (1,36%)	5 (3,87%)	-	-	-	7 (2,91%)	6 (2,58%)	1 (0,88%)	-	7
Total	147 (100%)	129 (100%)	99 (100%)	13 (100%)	148 (100%)	240 (100%)	232 (100%)	113 (100%)	43 (100%)	388
Espécies (n)	20	18	13	3	16	20	20	16	9	

Analisando a recuperação qualitativa nos meios de cultura, observamos que o PCA recuperou 20 espécies bacterianas, o R2A foram 18 e o PD foram 13 espécies. Sendo que o PCA foi o único meio que isolou as espécies *A. hydrophila*, *P. alcaligenes* e *S. liquefaciens*. O PCA e o R2A foram os que isolaram as espécies *P. fluorescens*, *P. oryzae*, *P. stutzeri*, *S. plymuthica*, *S. multivorum* e *T. putrescentiae*. O R2A e o PD foram os únicos meios que isolaram a espécie *O. anthracis*. E o PD foi o único meio que recuperou a espécie *C. violaceum*. Quando comparamos as técnicas de isolamento bacteriano qualitativamente, observamos que a de esgotamento recuperou 20 espécies, a técnica da gota foram 16 espécies e a de pour plate foram somente 9 espécies isoladas, sendo assim, a técnica de pour plate também não é efetiva tanto para a contagem de UFC/mL quanto para o isolamento das espécies. Nas tubulações foram encontradas 20 espécies bacterianas e nos reservatórios foram 16 (tabela 4).

A presença de bactérias e espécies por clínicas pode ser observada na tabela 5, onde verificamos a presença de 16 espécies na clínica de pós-graduação com prevalência das *A. baumannii/calcoaceticus*, *B. cepacia* e *P. luteola*. Na clínica de odontopediatria, foram 13 espécies bacterianas, com prevalência das *A. baumannii/calcoaceticus*, *B. cepacia* e *P. putida*, sendo assim, a quantidade de variedade das espécies isoladas nestas duas clínicas, foram muito superiores quando comparadas com as clínicas que estavam com água nos equipamentos. A clínica de ortodontia obteve 9 espécies, como as *A. baumannii/calcoaceticus*, *P. luteola* e *B. cepacia*. A clínica UBAs foram encontradas 3 espécies, sendo elas, *A. baumannii/calcoaceticus*, *B. cepacia* e *P. pseudoalcaligenes*. Na clínica de urgência, a presença de 3 espécies, *A. baumannii/calcoaceticus*, *B. cepacia* e *O. anthracis*. Na clínica multidisciplinar foram somente 2 espécies encontradas, sendo elas: *A. baumannii/calcoaceticus* e *P. pseudoalcaligenes*, isto pode ser devido à prata coloidal presente nos equipamentos, selecionando somente algumas espécies que são mais propícias para a formação do biofilme. E na Dentística sem a limpeza, foram 11 espécies, sendo as prevalentes: *B. cepacia*, *A. baumannii/calcoaceticus* e *P. luteola* e com a limpeza, houve desestruturação do biofilme e a variedade de espécies aumentou para 16, com prevalência das *A. baumannii/calcoaceticus*, *B. cepacia* e *B. pseudomallei*.

Tabela 5 – Presença de bactérias, total de espécies e total de colônias coletadas nas 7 clínica avaliadas.

Espécies	Odontopediatria	Ortodontia	Pós-Graduação	UBAs	Urgência	Multidisciplinar	Dentística (s/l)	Dentística (c/l)
<i>A. baumannii/calcoaceticus</i>	17	29	23	9	7	30	12	70
<i>A. hydrophila</i>	0	0	1	0	0	0	0	0
<i>A. xylosoxidans denitrificans</i>	3	2	1	0	0	0	1	1
<i>B. vesicularis</i>	0	0	1	0	0	0	3	3
<i>B. cepacia</i>	10	3	11	1	1	0	14	15
<i>B. pseudomallei</i>	3	2	1	0	0	0	2	5
<i>C. violaceum</i>	0	0	1	0	0	0	0	0
<i>H. alvei</i>	0	0	1	0	0	0	0	4
<i>H. alvei</i> (Biogrupo 1)	3	2	0	0	0	0	0	0
<i>O. anthropi</i>	0	0	1	0	1	0	0	2
<i>P. aeruginosa</i>	0	1	0	0	0	0	2	1
<i>P. alcaligenes</i>	1	0	0	0	0	0	0	0
<i>P. fluorescens</i>	1	0	1	0	0	0	0	0
<i>P. luteola</i>	1	5	4	0	0	0	8	4
<i>P. oryzihabitans</i>	1	0	1	0	0	0	0	2
<i>P. pseudoalcaligenes</i>	3	0	1	1	0	28	0	1
<i>P. putida</i>	5	0	1	0	0	0	1	1
<i>P. stutzeri</i>	0	0	0	0	0	0	1	1
<i>S. liquefaciens</i>	0	0	0	0	0	0	0	1
<i>S. plymuthica</i>	0	0	0	0	0	0	1	2
<i>S. multivorum</i>	2	1	1	0	0	0	0	0
<i>T. ptyseos</i>	1	1	2	0	0	0	1	2
Total de espécies	13	9	16	3	3	2	11	16
Total de colônias	51	46	52	11	9	58	46	115

Em relação aos fungos, foram selecionadas 87 colônias, nos diferentes meios de cultura (PCA, R2A, PD e SDA), tanto dos reservatórios, como das tubulações, sendo identificados 12 gêneros diferentes, proveniente das 7 clínicas avaliadas (tabela 6).

Tabela 6 – Quantidade de gêneros de fungos encontrados nas 7 clínicas.

Gêneros	Quantidade.	%
<i>Acremonium sp</i>	4	4,59
<i>Alternaria sp</i>	2	2,30
<i>Aspergillus sp</i>	10	11,49
<i>Cladosporium sp</i>	22	25,28
<i>Curvularia sp</i>	4	4,59
<i>Exophiala sp</i>	1	1,15
<i>Fonsecaea sp</i>	2	2,30
<i>Fusarium sp</i>	5	5,74
<i>Paecilomyces sp</i>	15	17,24
<i>Penicillium sp</i>	19	21,84
<i>Rhinochlamydia sp</i>	2	2,30
<i>Verticillium sp</i>	1	1,15
Total	87	100

No meio Sabouraud Dextrose Agar (SDA), seletivo para fungos foram recuperadas 51 (58,62%) colônias, com 9 gêneros diferentes, entretanto no PCA foram obtidas 15 (17,24%) colônias, no PD 9 (10,34%) e no R2A 12 (13,79%) colônias, sendo os gêneros: *Alternaria sp* isolado somente nos meios PD e PCA; *Exophiala sp* e *Fonsecaea sp* foram isolados somente no meio R2A (tabela 7).

O meio de cultura SDA recuperou 9 gêneros, sendo que *Alternaria sp* foi recuperado somente no PD e no PCA e, *Exophiala sp* e *Fonsecaea sp* foi somente no R2A. A técnica de esgotamento isolou todos os 12 gêneros, na gota foram 7 e no de pour plate, consequentemente que cresceram no meio PCA, foram somente 2 gêneros. Nas tubulações foram 9 gêneros e 11 nos reservatórios, apresentados na tabela 7.

Tabela 7 – Número e porcentagem dos gêneros fúngicos encontrados nos meios PCA, R2A, PD e SDA, reservatórios (R), tubulações (T), e nas técnicas de isolamento esgotamento (E), gota (G) e pour plate (PP).

Gêneros	PCA	R2A	PD	SDA	R	T	E	G	PP	Total
<i>Acremonium</i> sp	-	-	1 (11,11%)	3 (5,88%)	2 (4,08%)	2 (5,26%)	4 (6,66%)	-	-	4
<i>Alternaria</i> sp	1 (6,66%)	-	1 (11,11%)	-	1 (2,04%)	1 (2,63%)	2 (3,33%)	-	-	2
<i>Aspergillus</i> sp	2 (13,33%)	-	-	8 (15,68%)	4 (8,16%)	6 (15,79%)	6 (10%)	4 (16,66%)	-	10
<i>Cladosporium</i> sp	5 (33,33%)	8 (66,66%)	2 (22,22%)	7 (13,73%)	11 (22,44%)	11 (28,94%)	14 (23,33%)	6 (25%)	2 (66,66%)	22
<i>Curvularia</i> sp	1 (6,66%)	-	-	3 (5,88%)	3 (6,12%)	1 (2,63%)	4 (6,66%)	-	-	4
<i>Exophiala</i> sp	-	1 (8,33%)	-	-	1 (2,04%)	-	1 (1,67%)	-	-	1
<i>Fonsecaea</i> sp	-	2 (16,66%)	-	-	2 (4,08%)	-	1 (1,67%)	1 (4,16%)	-	2
<i>Fusarium</i> sp	-	-	2 (22,22%)	3 (5,88%)	1 (2,04%)	4 (10,52%)	4 (6,66%)	1 (4,16%)	-	5
<i>Paecylomices</i> sp	1 (6,66%)	-	1 (11,11%)	13 (25,49%)	11 (22,44%)	4 (10,52%)	10 (16,66%)	5 (20,83%)	-	15
<i>Penicillium</i> sp	5 (33,33%)	1 (8,33%)	2 (22,22%)	11 (21,56%)	11 (22,44%)	8 (21,05%)	12 (20%)	6 (25%)	1 (33,33%)	19
<i>Rhinochlamydia</i> sp	-	-	-	2 (3,92%)	2 (4,08%)	-	1 (1,67%)	1 (4,16%)	-	2
<i>Verticillium</i> sp	-	-	-	1 (1,96%)	-	1 (2,63%)	1 (1,67%)	-	-	1
Total	15	12	9	51	49	38	60	24	3	87
Gêneros (n)	6	4	6	9	11	9	12	7	2	

A presença de fungos por clínicas pode ser observada na tabela 8, onde verificamos que na clínica de odontopediatria, foram 6 gêneros isolados, com prevalência do *Paecylomices sp*. A clínica de ortodontia obteve 4 gêneros, com prevalência do *Penicillium sp*. Foram 2 gêneros na clínica de pós-graduação, sendo eles: *Acremonium sp* e *Verticillium sp*. A clínica UBAs foram encontradas 5 gêneros, sendo os três primeiros: *Cladosporium sp*, *Penicillium sp* e *Curvularia sp*. Na clínica de urgência, foram 3 gêneros: *Aspergillus sp*, *Paecylomices sp* e *Penicillium sp*. Na clínica multidisciplinar também foram 3 gêneros encontrados, sendo eles: *Penicillium sp*, *Paecylomices sp* e *Aspergillus sp*. Na Dentística sem a limpeza, foram 4 gêneros, sendo os prevalentes: *Penicillium sp* e *Cladosporium sp*, seguido do *Fusarium sp* e *Fonsecaea sp*. Com a limpeza, ocorreu o aumento para 9 gêneros, sem os três primeiros: *Cladosporium sp*, *Paecylomices sp* e *Aspergillus sp*.

Tabela 8 – Presença de fungos, total de gêneros e total de colônias coletadas nas 7 clínica avaliadas.

Gêneros	Odontopediatria	Ortodontia	Pós-Graduação	UBAs	Urgência	Multidisciplinar	Dentística (s/l)	Dentística (c/l)
<i>Acremonium sp</i>	1	0	1	0	0	0	0	2
<i>Alternaria sp</i>	0	0	0	0	0	0	0	1
<i>Aspergillus sp</i>	1	0	0	0	3	1	0	5
<i>Cladosporium sp</i>	1	1	0	5	0	0	4	11
<i>Curvularia sp</i>	0	0	0	3	0	0	0	1
<i>Exophiala sp</i>	0	0	0	1	0	0	0	0
<i>Fonsecaea sp</i>	0	1	0	0	0	0	1	0
<i>Fusarium sp</i>	1	0	0	0	0	0	3	1
<i>Paecilomyces sp</i>	2	1	0	2	2	1	0	7
<i>Penicillium sp</i>	1	2	0	4	2	3	4	3
<i>Rhinochlamydia sp</i>	0	0	0	0	0	0	0	2
<i>Verticillium sp</i>	0	0	1	0	0	0	0	0
Total de gêneros	6	4	2	5	3	3	4	9
Total de colônias	7	5	2	15	7	5	12	34

Figura 4 – Macro e microcultivo da colônia de *Acremonium* sp.

Figura 5 – Macro e microcultivo da colônia de *Alternaria* sp.

Figura 6 – Macro e microcultivo da colônia de *Aspergillus* sp.

Figura 7 – Macro e microcultivo da colônia de *Cladosporium* sp.

Figura 8 – Macro e microcultivo da colônia de *Curvularia* sp.

Figura 9 – Macro e microcultivo da colônia de *Exophiala* sp.

Figura 10 – Macro e microcultivo da colônia de *Fonsecaea* sp.

Figura 11 – Macro e microcultivo da colônia de *Fusarium* sp.

Figura 12 – Macro e microcultivo da colônia de *Paecilomyces* sp.

Figura 13 – Macro e microcultivo da colônia de *Penicillium* sp.

Figura 14 – Macro e microcultivo da colônia de *Rhinocladiella* sp.

Figura 15 – Macro e microcultivo da colônia de *Verticillium* sp.

6 DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

Todas as sete clínicas avaliadas na FOB/USP apresentavam micro-organismos, independentes das técnicas de isolamento, meios de cultura e local amostrado (R e T), as contagens bacterianas variaram de 0 a 3.882.667 UFC/mL e, para os fungos, variaram de 0 a 430.000 UFC/mL, que confirmam os dados do trabalho inicial de Scaky e Sulitzeanu (1962), que relatou primeiro a presença microbiana no entanto, outros estudos verificaram o elevado número de bactérias, com contagens descritas de 1.200.000 UFC/mL (WILLIAMS et al., 1993), entre 500 a 3.330.000 UFC/mL (PREVOST et al., 1995), 252.000 UFC/mL (BARBEAU et al., 1996), 32.000 UFC/mL (NOCE; DI GIOVANNI; PUTNINS, 2000), 5.020.000 UFC/ml e 1.960 UFC/mL (WATANABE et al., 2006; WATANABE et al., 2007) 201,039 UFC/ml (SZYMAŃSKA, 2007), 400.000 UFC/ml (LIN et al., 2011), 110.165,28 UFC/mL (SZYMAŃSKA; SITKOWSKA, 2013), 1×10^5 UFC/mL (ÖZALP et al., 2013), semelhante ao que foi constatado em nossa pesquisa. Nas clínicas avaliadas, o meio R2A apresentou contagem média de 512.511 UFC/mL, seguido do PD com 430.123 e por último o PCA com 202.240, o que demonstra que os meios utilizados foram efetivos em demonstrar a presença bacteriana.

A American Dental Association (ADA, 1996), propôs que a concentração máxima de bactérias heterotróficas, em equipos odontológicos, fosse de 200 UFC/mL, entretanto esse valor foi revisto pela American Public Health Association - APHA e a American Water Works Association - AWWA, que elevaram para 500 UFC/mL, indicando ser necessário o monitoramento das unidades dentárias, para assegurar o cumprimento destas normas (KOHN et al., 2003). Para a ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária – segundo a portaria nº 2.914, a presença de bactérias na água para consumo humano é 500 UFC/ml (BRASIL, 2011), mas para as unidades dentárias não há norma preconizada.

Embora os equipos odontológicos possam ser abastecidos com água destilada (MURDOCH-KINCH et al., 1997), em nosso estudo, apenas as clínicas de Ortodontia e Urgência este procedimento foi aplicado, entretanto contagens

elevadas de bactérias e fungos foram detectadas. Na clínica UBAs, em que os reservatórios foram preenchidos com água proveniente de poço semi artesiano (torneira), a contagem bacteriana apresentou valores médios menores (615,68 UFC/mL), confirmando que se o abastecimento dos reservatórios for acoplado ao abastecimento municipal ou feito manualmente (WHITEHOUSE et al., 1991; CARDOSO et al., 1999; LINGER et al., 2001; SZYMAŃSKA, 2007; SZYMAŃSKA; SITKOWSKA, 2013), ou água estéril (DEPAOLA et al., 2002), a presença de micro-organismos estabelecidos não seriam reduzidos ou eliminados, além do fato da manipulação da água e os períodos em que fica estagnada nos reservatórios e tubulações, favorece o desenvolvimento do biofilme (ZHANG et al., 2007; BERMEJO, 2012), fato que fora constatado com o uso de água destilada esterilizada ou não (MARAIS; BRÖZEL, 1999; DEPAOLA et al., 2002).

Durante o período de férias em que as clínicas não foram utilizadas para o atendimento de pacientes, os reservatórios permaneceram sem água por 30 (Odontopediatria) ou 60 dias (Pós-Graduação), onde observamos que a presença de bactérias continuou alta, diferente dos fungos, em que a contagem foi bem reduzida. A ausência de água nos equipos, por períodos prolongados (30 a 60 dias) é inviável na rotina, e não foi suficiente para reduzir a presença de micro-organismos para valores preconizados, tanto pela ADA quanto pela ANVISA (KOHN et al., 2003; BRASIL, 2011).

A prata tem sido usada cada vez mais para o controle microbiológico sendo, como prata coloidal, embutidas nos equipos odontológicos ou juntamente com o peróxido de hidrogénio (Dabi Atlante®; ÖZALP et al., 2013; DALLOLIO et al., 2014), ocorrendo a redução das bactérias, mas não a eliminação total. A clínica Multidisciplinar, única avaliada com a tecnologia B-safe® (Dabi Atlante®) apresentou valores elevados de UFC/mL. Estes resultados confirmam que, se não houver limpeza periódica nos reservatórios, não há como evitar a colonização microbiana, mesmo os equipos possuindo formas de retardar a colonização, como a prata coloidal. Os equipos possuem sistema de distribuição de água, com tubulações com longa extensão, com 0,5 a 1,0 mm de diâmetro, propiciando uma área grande e favorável para o biofilme se desenvolver (DOLCI; MONTEBUGNOLI, 2000; MILLS; KARPAY, 2002; MILLS, 2003). Os valores detectados nas tubulações confirmam

que estes locais foram mais propícios para o desenvolvimento do biofilme, do que os reservatórios (WHITEHOUSE et al., 1991; UZEL; COGULU; ONCAG, 2008). Sendo assim, não há como manter o controle microbiológico se as tubulações juntamente com os reservatórios não sofrerem limpeza ou desinfecção e, além de serem mantidos secos pelo esgotamento da água que fica estagnada nas tubulações.

A contaminação dos reservatórios de água (SZYMAŃSKA, 2007; WATANABE et al., 2008; SZYMAŃSKA; SITKOWSKA, 2013) como das tubulações das canetas de alta rotação (WHITEHOUSE et al., 1991; BARBEAU et. al., 1996) descritos na literatura, foram confirmados em nosso estudo onde, observamos que, quando foi obtida alta contagem bacteriana, ocorreu uma baixa contagem fúngica e vice versa, independente do local de coleta, sendo o mesmo contatado por Bermejo em 2012, que encontrou uma média fúngica de 52,4 UFC/mL e bacteriana de 174.828 UFC/mL.

A quantidade de 12 equipos avaliados por nós, para verificar a presença de micro-organismos nos reservatórios e nas tubulações, em outros trabalhos, também apresentou uma ampla variedade de unidades avaliadas, como por Blake em 1963 que coletou somente de 7 reservatórios, Whitehouse et al., (1991) amostras de 11 tubulações, Williams et al., (1993) que coletaram de 150 equipos, Barbeau et. al., (1996) de 123 equipos, Szymańska em 2006 e 2007 que coletou amostras de 25 equipos, Uzel; Cogulu; Oncag em 2008 coletou de 20 equipos, Watanabe et al., (2008), coletaram de 12 equipos, Kramer et al., em 2012 coletaram de 3 equipos, Özalp et al. (2013) de 27 equipos e Dallolio et al., (2014) selecionou amostras de 5 equipos, sendo assim, a quantidade de equipos avaliados, não interferiram na detecção de micro-organismos.

O meio de cultura Plate Count Agar - PCA, considerado padrão para a detecção de micro-organismos nos alimentos e água (REASONER; GELDREICH, 1985; FANTINATO et al., 1992; AGUIAR; PINHEIRO, 1999; APHA, 1999; NOCE; DI GIOVANNI; PUTNINS, 2000; SOUZA-GUGELMIN et al., 2003, PETTI; TARSITANI 2006; ZANETTI; DE LUCA; SACCHETTI, 2009; HAGESKAL et al., 2012; DALLOLIO et al., 2014), apresentou menor recuperação de UFC/mL, quando comparados com os meios R2A ou PD, fato que também foi constatado por Reasoner e Geldreich em 1985 e por Massa et al., em 1998.

O meio de cultura R2A e PD foram desenvolvidos especialmente para a contagem de bactérias totais da água (REASONER; GELDREICH, 1985; MAKI et al., 1986; BARBEAU; BUHLER, 2001; UZEL; COGULU; ONCAG, 2008; BOYLE et al., 2010; ZHANG; SILEIKA; PACKMAN, 2012; ÖZALP et al., 2013). Estes dois meios, quando comparados com o PCA, possuem menor quantidade de nutrientes, sendo assim, o PCA com maior teor, seguido do R2A e por último o PD. Observamos que os meios de cultura com menor teor de nutrientes, demonstraram melhor recuperação de UFC/mL, confirmando o que foi visto por Reasoner e Geldreich (1985) que recuperaram 1.200 UFC/mL no R2A e somente 210 UFC/mL no PCA.

O R2A foi usado em vários estudos para a avaliação microbiológica da água (BARBEAU et al., 1996; BARBEAU; BUHLER, 2001; YABUNE; IMAZATO; EBISU, 2008; BOYLE et al., 2010; ZHANG; SILEIKA; PACKMAN, 2012), a presença de bactérias foi detectada em 100% das coletas nas clínicas de Odontopediatria, Ortodontia, Pós-Graduação, Multidisciplinar e Dentística (sem limpeza), assim como Walker et al., em 2000, que ao avaliarem 55 reservatórios, detectou a presença de bactérias também em todos os casos.

A maioria dos trabalhos somente avaliou a presença dos micro-organismos na água (REASONER; GELDREICH, 1985; PUTTAIAH et al., 1998; LIN et al., 2011; KRAMER et al., 2012; ÖZALP et al., 2013) e quando analisou qualitativamente, os meios de cultura não foram específicos para água ou específicos para certas espécies bacterianas ou fúngicas e, o emprego de meios diferentes do PCA, R2A e PD (MAKI et al., 1986; WHITEHOUSE et al., 1991; GONÇALVES; PATERSON; LIMA, 2006; SZYMAŃSKA, 2006; SZYMAŃSKA, 2007; UZEL; COGULU; ONCAG, 2008; SINGH; NAGARAJA; HUNGUND, 2013; SZYMAŃSKA; SITKOWSKA, 2013), dificultou a comparação entre os vários estudos e nossa pesquisa.

Empregamos três técnicas de isolamento para bactérias: esgotamento (WILLIAMS et al., 1993; BARBEAU et al., 1996; SZYMAŃSKA, 2007; SZYMAŃSKA; SITKOWSKA, 2013) gota (WESTERGREN; KRASSE, 1978; WATANABE, 2007) e pour plate (REASONER; GELDREICH, 1985; ARVANITIDOU et al., 1999; SOUZA-GUGELMIN et al., 2003; ZANETTI; DE LUCA; SACCHETTI, 2009) e detectamos

micro-organismos em todas, com maior média para a técnica da gota (398.259 UFC/mL), seguido do esgotamento (324.657 UFC/mL) e por último o pour plate (323.240 UFC/mL). A técnica de pour plate recuperou menor número de UFC/mL que as outras técnicas, fato que poderia ser decorrente da temperatura de 55°C, que poderia subestimar a contagem de UFC/mL (REASONER; GELDREICH, 1985; MAKI et al., 1986; MASSA et al., 1998, XAVIER et al., 2000). Para o isolamento fúngico, a maior média foi obtida pela técnica de esgotamento (41.433 UFC/mL) seguido da técnica da gota (23.998 UFC/mL).

A técnica da gota por ser mais econômica e não ser estatisticamente diferente das outras técnicas em contagem de UFC/mL poderia ser indicada para avaliar os equipos odontológicos, pelo fato da economia nos meios de cultura e por facilitar uma amostragem maior, pois Bermejo em 2012 utilizou esta técnica nos meios PCA, R2A e PD para a contagem de bactérias nos equipos odontológicos, obtendo resultados semelhantes ao de nosso estudo.

A temperatura e o tempo de incubação são fundamentais para o desenvolvimento microbiano e variam conforme os estudos, para as bactérias entre 20°C a 37°C em períodos de 24 horas até 30 dias (REASONER; GELDREICH, 1985; MAKI et al., 1986; BARBEAU et al., 1996; SZYMAŃSKA, 2007; YABUNE; IMAZATO; EBISU, 2008) e, em nosso estudo empregamos a temperatura de 24°C por 72 horas. Para os fungos, as temperaturas variam entre 25°C a 30°C em tempos de incubação entre 5 dias a 4 semanas (ARVANITIDOU et al., 1999; GONÇALVES; PATERSON; LIMA, 2006; SZYMAŃSKA, 2006; AL-GABR; ZHENG; YU, 2013; SIQUEIRA; LIMA, 2013) sendo que empregamos a temperatura de 24°C por 4 a 7 dias de incubação. Optamos por 24°C por ser a temperatura ambiente semelhante a encontradas nas clínicas, mantendo assim as características de incubação para as bactérias e os fungos, em relação ao tempo, deixamos por 72 horas para as bactérias e por 4 a 7 dias para os fungos por apresentarem o máximo de UFC/mL e, observamos que se ultrapassado esse tempo de incubação, as colônias somente aumentaram em relação o tamanho, mas não em quantidade.

Observamos apenas à presença de coco-bacilos ou bacilos gram negativos, em nosso estudo a detecção destes morfotipos poderia ser decorrente do bom

funcionamento da válvula retrátil, não havendo refluxo da boca do paciente para os reservatórios, diferente do que encontrado por Walker et al., (2004), Watanabe (2007) e Szymańska; Sitkowska (2013) que isolaram hemácias, *Candida* spp., estreptococos, bacilos e cocos gram negativos e positivos. O biofilme pode se mostrar misto (heterogêneo) com a presença de cocos, bacilos, espiroquetas, além de fungos filamentosos (KELSTRUP; FUNDER-NIELSEN; THEILADE, 1977; MURDOCH-KINCH et al., 1997; MARAIS; BRÖZEL, 1999; KIM; CEDERBERG; PUTTAIAH, 2000; NOCE; DI GIOVANNI; PUTNINS, 2000; PUTNINS; DI GIOVANNI; BHULLAR, 2001; COBB et al., 2002; GONÇALVES; PATERSON; LIMA, 2006; SZYMAŃSKA, 2006; SZYMAŃSKA, 2007; WATANABE, 2007; AL-GABR; ZHENG; YU, 2013; SZYMAŃSKA; SITKOWSKA, 2013).

A *Acinetobacter baumannii/calcoaceticus* foi a bactéria mais prevalente (50,78%) sendo detectado em todas as clínicas, independente dos meios de cultura, local de coleta ou técnicas de isolamento (WILLIAMS et al., 1993; TALL et al., 1995; BARBEAU et al., 1996). Foram descritas no ambiente e associadas a infecções hospitalares, a resistência de antibióticos como o imipenem e meropenem, aderência bacteriana, descolamento de substrato e a citólise (TAYABALI et al., 2012; HAKYEMEZ et al., 2013).

Burkholderia cepacia (*Pseudomonas cepacia*) teve prevalência de 14,17%, e não foi isolada somente na clínica Multidisciplinar, sendo detectada independente dos meios de cultura, local de coleta ou técnicas de isolamento (MILLS; LAUDERDALE; MAYHEW, 1986; WILLIAMS et al., 1993; ZANETTI; DE LUCA; STAMPI, 2000), geralmente isoladas de fontes de água, pode estar associada a infecções urinárias, sepse, conjuntivite, peritonite, infecções pulmonares em pacientes imunocomprometidos, resistentes a ceftazidima, (TRABULSI et al., 2005; MIHAILA; BLAGA, 2013).

Entre as 22 espécies de bactérias, *Pseudomonas pseudoalcaligenes* foi detectada com 8,76%, e tem sido associada com peritonite em pacientes da diálise peritoneal ambulatorial crônica (HAGE; SCHOCH; CUNHA, 2013), *Pseudomonas luteola* com 5,67%, considerada oportunista, encontrada na água, solo e outros

ambientes úmidos. Geralmente suscetível à terceira geração de cefalosporinas, aminoglicosídeos, ureidopenicilinas e ciprofloxacina, foram relatadas em um caso fatal de bacteremia causada por *P. luteola*, resistente a imipenem e amicacina (NGOH et al., 2011; OTTO et al., 2013; GABALDON; WIGGINS; TZAMALOUKAS, 2013). *Burkholderia pseudomallei* com 3,35% tem sido reconhecida como a causadora da melioidoses por pouco mais de um século na Ásia e Austrália. A infecção natural pode ocorrer pela inoculação percutânea, inalação ou ingestão, e também é de interesse como uma potencial arma biológica. (LIMMATHUROTSAKUL et al., 2013; MASSEY et al., 2014).

Entre as outras 17 espécies que detectamos: *Aeromonas hydrophila*, *Alcaligenes xylosoxidans denitrificans*, *Brevundimonas vesicularis*, *Chromobacterium violaceum*, *Hafnia alvei*, *Hafnia alvei* (Biogrupo 1), *Ochrobactrum anthropi*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas alcaligenes*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas oryzihabitans*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas stutzeri*, *Serratia liquefaciens*, *Serratia plymuthica*, *Sphingobacterium multivorum* e *Tatumella ptyseos*, também foram relatadas em outros estudos, em que amostras de água foram analisadas (KELSTRUP; FUNDER-NIELSEN; THEILADE, 1977; MILLS; LAUDERDALE; MAYHEW, 1986; WILLIAMS et al., 1993; TALL et al., 1995; BARBEAU et al., 1996; SHEPHERD et al., 2001; SZYMAŃSKA, 2007; WATANABE, 2007; UZEL; COGULU; ONCAG, 2008; SINGH; NAGARAJA; HUNGUND, 2013; SZYMAŃSKA; SITKOWSKA, 2013; DALLOLIO et al., 2014).

O meio de cultura SDA, é específico para o isolamento de fungos sendo utilizado com a adição de Cloranfenicol a 1%, para a inibição do crescimento bacteriano. Cloranfenicol é um antibiótico bacteriostático, que inibe a síntese de proteínas da subunidade ribossomal 50S (YAO; MOELLERING, 2011), entretanto pudemos detectar *Acinetobacter baumannii/calcoaceticus* (84,61%), *Pseudomonas aeruginosa* e *P. luteola* (7,69%) embora outros estudos demonstrem sua resistência ao medicamento (WIECZOREK et al., 2008; RICCIARDI; RICCIARDI; DANZI, 2009; LIN et al., 2010; ALLYDICE-FRANCIS; BROWN, 2012; MORITA; TOMIDA; KAWAMURA, 2014).

O gênero *Cladosporium* sp foi o mais prevalente com 25,28%, independente dos meios de cultura, local de coleta ou técnicas de isolamento (KELSTRUP; FUNDER-NIELSEN; THEILADE, 1977; GONÇALVES; PATERSON; LIMA, 2006; SIQUEIRA; LIMA, 2013), está associado a feohifomicose que é uma infecção rara e lentamente progressiva, como são fungos dematiáceos estão frequentemente ligados a doença em imunocomprometidos, sendo mais comum em infecção na pele e trato respiratório e estão cada vez mais sendo reconhecido como patógenos oportunistas em receptores de transplantes de órgãos, como de pulmão (SINGH et al., 1997; SILVEIRA; HUSAIN, 2008; CASTRO; OLIVEIRA; LOPES, 2013).

Penicillium sp teve prevalência de 21,84%, e não foi isolado somente na clínica de pós-graduação, mas foi detectado independente dos meios de cultura, local de coleta ou técnicas de isolamento (ARVANITIDOU et al., 1999; GONÇALVES; PATERSON; LIMA, 2006; SZYMAŃSKA, 2006; HAGESKAL et al., 2012; SIQUEIRA; LIMA, 2013). A espécie *Penicillium marneffe* foi associada a pneumonia intersticial (FURUSAWA et al., 2014) e *Penicillium* spp foram isolados em água de hospital, após infecções com *Fusarium solani* (MESQUITA-ROCHA et al., 2013), outros gêneros fúngicos prevalentes foram, *Paecylomices* sp (17,24%) e *Aspergillus* sp (11,49%), que foram isolados em equipos odontológicos, além do *Aspergillus* sp, ser associado a infecções em paciente com câncer de pulmão (KADAIFCILER; ÖKTEN; SEN, 2014; CARPAGNANO et al., 2014).

Entre os outros 8 gêneros que detectamos: *Acremonium* sp, *Alternaria* sp, *Curvularia* sp, *Exophiala* sp, *Fonsecaea* sp, *Fusarium* sp, *Rhinochlamydia* sp e *Verticillium* sp, também foram citados em outros estudos, em que amostras de água foram analisadas (KELSTRUP; FUNDER-NIELSEN; THEILADE, 1977; ARVANITIDOU et al., 1999; KELLEY et al., 2003; GONÇALVES; PATERSON; LIMA, 2006; SZYMAŃSKA, 2006; SAMMON et al., 2010; HEDAYATI et al., 2011; BERMEJO, 2012; AL-GABR; ZHENG; YU, 2013; SIQUEIRA; LIMA, 2013).

A multiplicação e desenvolvimento de população microbiana nos reservatórios de água favorecem a estruturação do biofilme, que nestas condições, apresentam maior resistência aos agentes antimicrobianos e dificultam a remoção do biofilme, conforme verificamos em nosso estudo, sendo a produção de polissacarídeo um

fator de importância para isso (COSTERTON et al., 1987; COSTERTON; LEWANDOWSKI, 1997; COSTERTON; COOK; LAMONT, 1999; MARSH; MARTIN, 2005; AUGSPURGER et al., 2010; FLEMMING; WINGENDER, 2010).

Utilizamos a clínica de Dentística para avaliar a limpeza dos equipamentos e a eficácia do detergente enzimático contra o biofilme por ser um produto que não deixa resíduo ou corrói as peças de metal dos equipamentos. Os valores detectados em nosso estudo (tabela 1 e 2) foram semelhantes ao de Vickery et al., em 2009, que quantificaram $6,3 \times 10^6$ UFC/mL antes da utilização do detergente, em tubulações de endoscópio, que possuem diâmetro semelhante às tubulações dos equipamentos (diâmetro interno de 4 mm) e após, observaram a limpeza total ou a desestruturação de 90% do biofilme, com redução do polissacarídeo extracelular e a constatação da retardação da sua remodelação.

Quando as contagens fúngicas de UFC/ml foram zeradas (Dentística), não indicou que houve remoção total do biofilme. Conforme Hope e Wilson (2003) o biofilme possui duas camadas, a viável (camada externa) e a não viável (camada interna) e, conforme aplicamos o detergente enzimático, a camada externa (viável) do biofilme poderia ser removida restando a camada interna, em que os microrganismos, não mais estão viáveis, fato que podemos inferir de nossos resultados, onde a presença de bactérias foi detectada, porém com valores menores.

Vários protocolos foram sugeridos para reduzir a contaminação da água dos equipamentos odontológicos, como a adição de hipoclorito de sódio (1:10) e posterior fluxo de 30 segundos (SCHAEFER, 1990), uso de água estéril ou solução salina nos reservatórios para procedimentos cirúrgicos e desinfecção das unidades de água uma vez por semana (WILLIAMS et al., 1993) e a instalação de válvulas anti-refluxo (SHEARER, 1996). Em 1998, Puttaiah et al., avaliaram hipoclorito de sódio a 0,525% associado com ácido acético a 1% e hipoclorito de sódio a 0,525% associado com água destilada, constatando que a ação do ácido acético aumentou a corrosão do metal, não sendo eficiente para a remoção do biofilme, quando comparado com o hipoclorito em água destilada. Independente do procedimento a ser realizado, Araújo; Lopes-Silva (2002) sugeriram que os cirurgiões-dentistas devem adotar medidas para manter a qualidade da água dos equipamentos odontológicos

e reduzir o risco da presença microbiana. Zanetti, De Luca e Sacchetti em 2009, compararam a ação do ácido peracético a 10% e peróxido de hidrogênio a 3% e concluíram que o peróxido de hidrogênio foi o mais eficaz e, que associado a limpeza periódica foi possível obter água em níveis aceitáveis (≤ 100 UFC/mL) de bactérias heterotróficas. Em 2013, Singh, Nagaraja e Hungund, compararam os efeitos da desinfecção com 0,12% de clorexidina, uso de água destilada, água de torneira e sistema de drenagem das tubulações (flushing) e observaram que a utilização de clorexidina a 0,12% foi confiável para a desinfecção das unidades dentárias.

Um protocolo de limpeza nos reservatórios e tubulações e manutenção da qualidade microbiológica da água dos equipamentos odontológicos poderia ser adotado pelos profissionais: utilizar uma vez por mês, 25 mL de hipoclorito de sódio a 1% em 475 mL de água para a limpeza dos reservatórios e tubulações; utilizar o detergente enzimático, uma vez por semana, nos reservatórios e nas tubulações, com o tempo e a quantidade preconizada pelo fabricante, além de lavar os reservatórios com escova; ao final do expediente de trabalho e, nos finais de semana ou feriados, drenar completamente a água das tubulações e manter os reservatórios completamente secos; no início do expediente preencher os reservatórios com água de boa qualidade, de preferência vinda do abastecimento municipal (torneira), visto que possui tratamento com cloro, evitando a proliferação microbiana; fazer uso do sistema flushing entre cada paciente, por 20 a 30 segundos (KOHN et al., 2003); seguir as recomendações do fabricante do equipamento, para a limpeza e manutenção e monitorar periodicamente a qualidade microbiológica da água, conforme o descrito na literatura (WATANABE, 2007; BERMEJO, 2012).

Para erradicar o biofilme dos reservatórios e tubulações de água dos equipamentos odontológicos, mais protocolos poderiam ser desenvolvidos e estudos se fazem necessários, visando novos produtos que não deixem resíduos ou que danifiquem as peças metálicas.

7 CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos permitem concluir que:

- Todas as clínicas apresentaram a presença de bactérias e fungos tanto nos reservatórios como nas tubulações de água dos equipos odontológicos;
- Para quantificar as UFC/mL o meio de cultura R2A, seguido do PD foi melhor que o PCA e, para detectar diferentes espécies o meio PCA (20/22 espécies) foi superior ao R2A (18/22 espécies) e PD (13/22 espécies);
- Para quantificar, a técnica da gota foi melhor do que a de esgotamento e pour plate para as bactérias, enquanto a de esgotamento foi superior para os fungos;
- Foram identificados 22 espécies de bactérias, todas gram negativas, sendo 20 nas tubulações e 16 nos reservatórios, enquanto para os 12 gêneros de fungos, 11 foram encontrados nos reservatórios e 9 nas tubulações;
- O detergente enzimático foi eficaz para a desestruturação do biofilme, reduzindo os fungos a partir da segunda limpeza.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

AGUIAR, C. M.; PINHEIRO, J. T. Avaliação de tratamento químico da água dos equipos odontológicos. **Rev Assoc Paul Cir Dent**, São Paulo, v. 53, n. 3, p. 228-235, maio/jun. 1999.

AL-GABR, H. M.; ZHENG, T.; YU, X. Occurrence and quantification of fungi and detection of mycotoxigenic fungi in drinking water in Xiamen City, China. **Sci Total Environ**, Amsterdam, v. 446/467, p. 1103-1111, Jan. 2014.

ALLYDICE-FRANCIS, K.; BROWN, P. D. Diversity of antimicrobial resistance and virulence determinants in *Pseudomonas aeruginosa* associated with fresh vegetables. **Int J Microbiol**, Cairo, v. 2012, ID 426241, 2012. Disponível em: <<http://www.hindawi.com/journals/ijmicro/2012/426241/>>. Acesso em: 25 abr. 2014.

AMERICAN DENTAL ASSOCIATION. ADA statement on dental unit waterline. **J Am Dent Assoc**, Chicago, v. 127, n. 11, p. 185-186, Nov. 1996.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. Microbiological examination of water. In: Standards Method for water and Wastewater. 20th ed. Washington: APHA, 1999.

AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION. Microbiological examination of water. In: Standards Method for water and Wastewater. 20th. Washington: APHA, 1999.

ARAÚJO, C. M.; LOPES-SILVA, A. M. S. Análise da qualidade da água de reservatórios de equipamentos odontológicos. **Rev Biociênc**, Taubaté, v.8, n. 1, p. 21-28, jan./jun. 2002.

ARVANITIDOU, M. et al. The occurrence of fungi in hospital and community potable Waters. **Lett Appl Microbiol**, Oxford, v. 29, n. 2, p. 81-84, Aug. 1999.

AUGSPURGER, C. et al. Drivers of bacterial colonization patterns in stream biofilms. **FEMS Microbiol Ecol**, Amsterdam, v. 72, n.1, p. 47-57, Apr. 2010.

BARBEAU, J. et al. Multiparametric analysis of waterline contamination in dental Units. **Appl Environ Microbiol**, Washington, v. 62, n. 11, p. 3954-3959, Nov. 1996.

BARBEAU, J.; BUHLER, T. Biofilms augment the number of free-living amoebae in dental unit waterlines. **Res Microbiol**, Paris, v. 152, p. 753-760, Oct. 2001.

BAYS, L. R.; BURMAN, N. P.; LEWIS, W. M. Taste and odor in water supplies in Great Britain: a survey of the present position and problems for the future. **Water Treat Exam**, Chesterfield, v. 19, n. 2, p. 136-160, 1970.

BERMEJO, L. J. **Ação do ultrassom na remoção do biofilme dos reservatórios de água dos equipos odontológicos da Faculdade de Odontologia de Bauru**. 2012. 82 p. Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, Bauru, 2012.

BLAKE, G. C. The incident and control of bacterial infection in dental spray reservoirs. **Brit Dent J**, London, v. 115, n. 3, p. 413-416, Nov. 1963.

BOYLE, M. A. et al. Lack of cytotoxicity by trustwater Ecasol TM used to maintain good quality dental unit waterline output water in keratinocyte monolayer and reconstituted human oral epithelial tissue models. **J Dent**, Bristol, v. 38, n. 11, p. 930-940, Nov. 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 2.914, de 12 de dezembro de 2011. Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. **Diário Oficial da União**, Brasília, 14 dez. 2011. Seção 1, p. 39-46.

BRYERS, J. D. Medical biofilms. **Biotechnol Bioeng**, New York, v. 100, n. 1, p. 1-8, May 2008.

CARDOSO, M. L. et al. Qualidade microbiológica da água utilizada em turbinas de alta rotação em três condições clínicas diferentes. **Rev Assoc Paul Cir Dent**, São Paulo, v. 53, n. 5, p. 387-393, set./out. 1999.

CARPAGNANO, G. E. et al. Aspergillus spp. colonization in exhaled breath condensate of lung cancer patients from Puglia region of Italy. **BMC Pulm Med**, London, v. 14, n. 22, Feb. 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/1471-2466-14-22>>. Acesso em: 25 abr. 2014.

CAST - Council for Agricultural Science and Technology. **Mycotoxins**: risks in plant, animal, and human systems. Iowa: Council for Agricultural Science and Technology, 2003. 199 p. Disponível em:

<http://www.trilogylab.com/uploads/Mycotoxin_CAST_Report.pdf>. Acesso em: 25 abr. 2014.

CASTRO, A. S.; OLIVEIRA, A.; LOPES, V. Pulmonary phaeohyphomycosis: a challenge to the clinician. **Eur Respir Rev**, Copenhagenm v. 22, n. 128, p. 187-192, June 2013.

CHARACKLIS, W. G.; MARSHALL, K. C. **Biofilms**. New York: John Wiley & Sons, 1990. 816 p.

CHAVES, L. C. D. **Estudo da cinética de formação de biofilmes em superfícies em contacto com água potável**. 2004. 156 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia do Ambiente) - Universidade do Minho, 2004. Disponível em: <<http://repositorium.sdum.uminho.pt/bitstream/1822/925/1/Tese%20Completa.pdf>>. Acesso em: 25 abr. 2014.

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

COSTERTON, J. W. et al. Bacterial biofilms in nature and disease. **Annu Rev Microbiol**, Palo Alto, v. 41, p. 435-464, 1987.

COSTERTON, J. W.; COOK, G.; LAMONT, R. The community architecture of biofilms: dynamic structures and mechanisms. In: NEWMAN, H. N.; WILSON, M. (ed.). **Dental plaque revisited: oral biofilms in health and disease**. London: Boline, 1999. p. 5-13.

COSTERTON, J. W.; LEWANDOWSKI, Z. The biofilm lifestyle. **Adv Dent Res**, Washington, v. 11, n. 2, p. 192-195, Apr. 1997.

DALLOLIO, L. et al. Effect of different disinfection protocols on microbial and biofilm contamination of dental unit waterlines in community dental practices. **Int J Environ Res Public Health**, Basel, v. 11, n. 2, p. 2064-2076, Feb. 2014.

DEPAOLA, L. G. et al. A review of the science regarding dental unit waterlines. **J Am Dent Assoc**, Chicago, v. 133, n. 9, p. 1199-1206, Sept. 2002.

DOLCI, G.; MONTEBUGNOLI, L. The cross-infection control in medical devices for dentistry. In: DOLCI, G.; MONTEBUGNOLI, L. (ed.). CONGRESSO NAZIONALE

DEL “COLEEGIO DEI DOCENTI DI ODONTOIATRIA”, 7., 2000, Roma. **Proceedings**. Rome, 2000. v. 2, p. 11-34.

DONLAN, R. M.; COSTERTON, J. W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clin Microbiol Rev**, Washington, v. 15, n. 2, p. 167-193, Apr. 2002.

FANNING, S.; MITCHELL, A. P. Fungal biofilms. **PLoS Pathogens**, San Francisco, 8, n. 4, ID1002585, Apr. 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1002585>. Acesso em: 25 abr. 2014.

FANTINATO, V. et al. Exame bacteriológico da água em clínica odontológica. **Rev Assoc Paul Cir Dent**, São Paulo, v. 46, n. 4, p. 829-831, 1992.

FLEMMING, C. H.; WINGENDER, J. The biofilm matrix. **Nat Rev Microbiol**, London, v. 8, n. 9, p. 623-633, Sept. 2010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro2415>. Acesso em: 25 abr. 2014.

FURUSAWA, H. et al. *Penicilliosis marneffei* complicated with interstitial pneumonia. **Intern Med**, Tokyo, v. 53, n. 4, p. 321-323, 2014.

GABALDON, D.; WIGGINS, B.; TZAMALOUKAS, A. H. *Pseudomonas luteola* peritonitis with favorable outcome in continuous peritoneal dialysis. **Int Urol Nephrol**, Amsterdam, v. 45, n. 6, p. 1827-1828, Dec. 2013.

GONÇALVES, A. B.; PATERSON, R. R. M.; LIMA, N. Survey and significance of filamentous fungi from tap water. **Int J Hyg Environ Health**, Jena, v. 209, n. 3, p. 257-264, May 2006.

HAGE, J. E.; SCHOCH, P. E.; CUNHA, B. A. *Pseudomonas pseudoalcaligenes* peritoneal dialysis-associated peritonitis. **Perit Dial Int**, New York, v. 33, n. 2, p. 223-224, Mar./Apr. 2013.

HAGESKAL, G. et al. No simple solution to waterborne fungi: various responses to water disinfection methods. **Water Sci Technol**, Oxford, v. 12, n. 2, p. 220-226, 2012.

HAGESKAL, G.; LIMA, N.; SKAAR, I. The study of fungi in drinking water. **Mycol Res**, Cambridge, v. 113, p. 165-172, Feb. 2009.

HAKYEMEZ, I. N. et al. Nosocomial *Acinetobacter baumannii* infections and changing antibiotic resistance. **Pak J Med Sci**, Karachi, v. 29, n. 5, p. 1245-1248, Sept. 2013.

HAWKSWORTH, D. L. Fungal diversity and its implications for genetic resource collections. **Stud Mycol**, Baarn, v. 50, p. 9-18, 2004.

HEDAYATI, M. T. et al. Study on fungal flora of water as a potencial reservoir of fungi in hospitals in Sari city, Iran. **J Mycol Med**, Paris, v. 21, n. 1, p. 10-14, Mar. 2011.

HOPE, C. K.; WILSON, M. Measuring the thickness of an outer layer of viable bacteria in an oral biofilm by viability mapping. **J Microbiol Methods**, Amsterdam, v. 54, n. 3, p. 403-410, Sept. 2003.

KADAIKIL, D. G.; ÖKTEN, S.; SEN, B. Mycological contamination in dental unit waterlines in Istanbul, Turkey. **Braz J Microbiol**, Rio de Janeiro, v. 44, n. 3, p. 977-981, Jan. 2013.

KARPAY, R. I.; PLAMONDON, T. J.; MILLS, S. E. Comparison of methods to enumerate bacteria in dental unit water lines. **Curr Microbiol**, New York, v. 38, n. 2, p. 132-134, Feb. 1999.

KELLEY, J. et al. **Identification and control of fungi in distribution systems**. Denver: AWWA Research Foundation an American Water Works Association, c2003. 150 p.

KELSTRUP, J.; FUNDER-NIELSEN, T. D.; THEILADE, J. Microbial aggregate contamination of water lines in dental equipment and its control. **Acta Pathol Microbiol Scand B**, Copenhagen, v. 85, n. 3, p. 177-183, June 1977.

KIM, P. J.; CEDERBERG, R. A.; PUTTAIAH, R. A pilot study of 2 methods for control of dental unit biofilms. **Quintessence Int**, Berlin, v. 31, n. 1, p. 41-48, Jan. 2000.

KOHN, W. G. et al. Guidelines for Infection Control in Dental Health-Care Settings--2003. **MMWR Recomm Rep**, Atlanta, v. 52 (RR-17), p. 1-61, Dec. 2003.

KRAMER, A. et al. Evaluation of the PotoClean® decontamination technology for reprocessing of water supply lines in dental units during routine work. **GMS Krankenhaushygiene Interdisziplinär**, Düsseldorf, v. 7, n. 1, 2012. Disponível em:

<<http://www.egms.de/static/pdf/journals/dgkh/2012-7/dgkh000194.pdf>>. Acesso em: 25 abr. 2014.

LIMMATHUROTSAKUL, D. et al. Activities of daily living associated with acquisition of melioidosis in northeast thailand: a matched case-control study. **PLoS Negl Trop. Dis**, San Francisco, v. 7, n. 2, ID e2072, 2013. Disponível em: <<http://www.plosntds.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pntd.0002072>>. Acesso em: 28 abr. 2014.

LIN, M. F. et al. Role of integrons in antimicrobial susceptibility patterns of *Acinetobacter baumannii*. **Jpn J Infect Dis**, Tokyo, v. 63, n. 6, p. 440-443, 2010.

LIN, S. M. et al. Effects of hydrogen peroxide on dental unit biofilms and treatment water contamination. **Eur J Dent**, Ankara, v. 5, n. 1, p. 47-59, Jan. 2011.

LINGER, J. B. et al. Evaluation of hydrogen peroxide disinfectant for dental unit waterline. **J Am Dent Assoc**, Chicago, v. 132, n. 9, p. 1287-1291, Sept. 2001.

LOUSSERT, C. et al. In vivo biofilm composition of *Aspergillus fumigatus*. **Cell Microbiol**, Oxford, v. 12, n. 3, p. 405-410, Mar. 2010.

MAKI, J. S. et al. Recovery and diversity of heterotrophic bacteria from chlorinated drinking waters. **Appl Environ Microbiol**, Washington, v. 51, n. 5, p. 1047-1055, May 1986.

MARAIS, J. T.; BRÖZEL, V. S. Electro-chemically activated water in dental unit water lines. **Br Dent J**, London, v. 187, n. 3, p. 154-158, Aug. 1999.

MARSH, P.; MARTIN, M. V. **Microbiologia oral**. São Paulo: Livraria Santos Editora, 2005. v. 4, p. 58.

MASSA, S. et al. Comparision of plate count agar and R2A medium for enumeration of heterotrophic bacteria in natural mineral water. **World J Microbiol Biotechnol**, Oxford, v. 14, n. 5, p. 727-730, May 1998.

MASSEY, S. et al. Comparative *Burkholderia pseudomallei* natural history virulence studies using na aerosol murine model of infection. **Sci Rep**, v. 4, ID 4305, Mar. 2014. Disponível em: <<http://www.nature.com/srep/2014/140307/srep04305/full/srep04305.html>>. Acesso em: 28 abr. 2014.

MESQUITA-ROCHA, S. et al. The water supply system as a potential source of fungal infection in paediatric haematopoietic stem cell units. **BMC Infect Dis**, v. 13, n. 1, ID 289, 2013. Disponível em: <<http://www.biomedcentral.com/1471-2334/13/289>>. Acesso em: 28 abr. 2014.

METZGER, W. J. et al. Sauna-takers disease. Hypersensitivity due to contaminated water in a home sauna. **JAMA**, Chicago, v. 236, n. 19, p. 2209-2211, Nov. 1976.

MIHAILA, R. G.; BLAGA, L. *Burkholderia cepacia* septicemia in a patient with acute

MILLS, S. E. Waterborne pathogens and dental waterlines. **Dent Clin North Am**, Philadelphia, v. 47, n. 3, p. 545-557, July 2003.

MILLS, S. E.; KARPAY, R. I. Dental waterlines and biofilm-searching for solutions. **Compend Contin Educ Dent**, Lawrenceville, v. 23, n. 3, p. 237-258, Mar. 2002.

MILLS, S. E.; LAUDERDALE, P. W.; MAYHEW, R. B. Reduction of microbial contamination in dental units with povidone-iodine 10%. **JAMA**, Chicago, v. 113, n. 2, p. 280-284, Aug. 1986.

MORITA, Y.; TOMIDA, J.; KAWAMURA, Y. Responses of *Pseudomonas aeruginosa* to antimicrobials. **Front Microbiol**, Lausanne, v. 4, ID 422, Jan. 2014. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/Journal/10.3389/fmicb.2013.00422/full>>. Acesso em: 28 abr. 2008.

MORTON, L. H. G. et al. Consideration of some implications of the resistance of biofilms to biocides. **Int Biodeterior Biodegradation**, Barking, v. 41, n. 3/4, p. 247-259, 1998.

MOWAT, E. et al. The characteristics of *Aspergillus fumigatus* mycetoma development: is this a biofilm? **Med Mycol**, Oxford, v. 47, p. 120-126, 2009. Supplement 1. Disponível em: <<http://informahealthcare.com/doi/abs/10.1080/13693780802238834>>. Acesso em: 28 abr. 2014.

MURDOCH-KINCH, C. A. et al. Comparison of dental water quality management procedures. **JAMA**, Chicago, v. 128, n. 9, p. 1235-1243, 1997.

NGOH, E. et al. A fatal case of *Pseudomonas luteola* infection. **Med Mal Infect**, Paris, v. 41, n. 7, p. 399-400, July 2011.

NOCE, L.; DI GIOVANNI, D.; PUTNINS, E. E. An evaluation of sampling and laboratory procedures for determination of heterotrophic plate counts in dental unit waterlines. **J Can Dent Assoc**, Ottawa, v. 66, n. 5, p. 262-268, May 2000.

O'DONNELL, M. J. et al. Management of dental unit waterline biofilms in the 21st century. **Future Microbiol**, London, v. 6, n. 10, p. 1209-1226, Oct. 2011.

OLIVEIRA, M. G. M. et al. Accurate identification of fastidious Gram-negative rods: integration of both conventional phenotypic methods and 16S rRNA gene analysis. **BMC Microbiology**, London, v. 13, ID 162, July 2013. Disponível em: <<http://www.biomedcentral.com/1471-2180/13/162>>. Acesso em: 28 abr. 2014.

OTTO, M. P. et al. Severe catheter related bacteremia due to *Pseudomonas luteola*. **Med Mal Infect**, Paris, v. 43, n. 4, p. 170-171, Apr. 2013.

ÖZALP, M. et al. The effect of hydrogen peroxide/colloidal silver on reducing the colonization and growth of heterotrophic bacteria in dental unit waterlines. **Turk J Biol**, Ankara, v. 37, p. 336-341, 2013.

PATERSON, R. R. M. et al. Occurrence, problems, analysis and removal of filamentous fungi in drinking water. In: DE COSTA, P., BEZERRA, P. (Ed.). **Fungicides: chemistry, environmental impact and health effects**. New York: Nova Science Publishers, 2009. p. 379-399, 2009.

PETTI, S.; TARSITANI, G. Detection and quantification of dental unit water line contamination by oral streptococci. **Infect Control Hosp Epidemiol**, Chicago, v. 27, n. 5, p. 504-509, May 2006.

PREVOST, A. P. et al. Doctor, would you drink water from your dental unit? **N Y State Dent J**, New York, v. 61, n. 10, p. 22-28, Dec. 1995.

PUTNINS, E. E.; DI GIOVANNI, D.; BHULLAR, A. S. Dental unit waterline contamination and its possible implications during periodontal surgery. **J Periodontol**, Chicago, v. 72, n. 3, p. 393-400, Mar. 2001.

PUTTAIAH, R. et al. Dental unit water line treatment with sodium hypochlorite and acetic acid. **Microchem J**, New York, v. 59, n. 2, p. 333-340, June 1998.

RAJENDRAN, R. et al. Azole resistance of *Aspergillus fumigatus* biofilms is partly associated with efflux pump activity. **Antimicrob Agents Chemother**, Washington, v. 55, n. 5, p. 2092-2097, May 2011.

REASONER, D. J.; GELDREICH, E. E. A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water. **Appl Environ Microbiol**, Washington, v. 49, n. 1, Jan. 1985.

RICCIARDI, R.; RICCIARDI A. M.; DANZI, G. In vitro activity of tigecycline against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. **Infez Med**, Roma, v. 17, n. 4, p. 236-239, Dec. 2009.

RIDELL, R. W. Permanent stained mycological preparation obtained by slide culture. **Mycologia**, New York, v. 42, n. 2, p. 265-270, 1950.

SAMMON, N. B. et al. Incidence and distribution of microfungi in a treated municipal water supply system in sub-tropical Australia. **Int J Environ Res Public Health**, Basel, v. 7, n. 4, p. 1597-1611, Apr. 2010.

SCAKY, I.; SULITZEANU, A. Importance of dental units in the mechanical transfer of oral bacteria. **J Dent Res**, Chicago, v. 41, p. 714, May/June 1962.

SCHAEFER, M. E. Infection control, OSHA and hazards communication program. **J Calif Dent Assoc**, Sacramento, v. 18, n. 8, p. 53-58, Aug. 1990.

SEDLACEK M. J.; WALKER, C. Antibiotic resistance in an *in vitro* subgingival biofilm model. **Oral Microbiol Immunol**, Copenhagen, v. 22, n. 5, p. 333-339, Oct. 2007.

SEIDLER, M. J.; SALVENMOSER, S.; MÜLLER, F. M. *Aspergillus fumigatus* forms biofilms with reduced antifungal drug susceptibility on bronchial epithelial cells. **Antimicrob Agents Chemother**, Washington, v. 52, n. 11, p. 4130-4136, Nov. 2008.

SHEARER, B. G. Biofilm and the dental office. **JAMA**, Chicago, v. 127, n. 2, p. 181-189, 1996.

SHEPHERD, P. A. et al. Clearance of biofilms from dental unit waterlines through the use of hydrogen peroxide ion-phase transfer catalysts. **Quintessence Int**, Berlin, v. 32, n. 10, p. 755-761, Nov/Dec. 2001.

SILVEIRA, F.; HUSAIN, S. Fungal infections in lung transplant recipients. **Curr Opin Pulm Med**, Philadelphia, v. 14, n. 3, p. 211-218, May 2008.

SINGH, N. et al. Infections due to dematiaceous fungi in organ transplant recipients: case report and review. **Clin Infect Dis**, Chicago, v. 24, n. 3, p. 369–374, Mar. 1997.

SINGH, S.; NAGARAJA, C.; HUNGUND S. A. A study of different modes of disinfection and their effect on bacterial load in dental waterlines. **European J Gen Dent**, Mumbai, v. 2 n. 3, p. 246-251, 2013.

SIQUEIRA, V. M.; LIMA, N. Biofilm formation by filamentous fungi recovered from a water system. **J Micol**, New York, v. 2013, ID 152941, 2013. Disponível em: <<http://www.hindawi.com/journals/jmy/2013/152941/>>. Acesso em : 28 abr. 2014.

SOUZA-GUGELMIN, M. C. M. et al. Microbial contamination in dental unit waterlines. **Braz Dent J**, Ribeirão Preto, v. 14, n. 1, p. 55-57, 2003.

SZYMAŃSKA, J. Bacterial contamination of water in dental unit reservoirs. **Ann Agric Environ Med**, Lublin, v. 14, n. 1, p. 137-140 , 2007.

SZYMAŃSKA, J. Exposure to airborne fungi during conservative dental treatment. **Ann Agric Environ Med**, Lublin, v. 13, n. 1, p. 177-179, 2006.

SZYMAŃSKA, J.; SITKOWSKA, J. Evaluation of activities aimed at preventing microbiological risks in dental practice. **Med Pr**, Warsaw, v. 64, n. 1, p. 11-17, 2013.

TALL, B. D. et al. Bacterial succession within a biofilm in water supply lines of dental air-water syringes. **Can J Microbiol**, Ottawa, v. 41, n. 7, p. 647-654, July 1995.

TAYABALI, A. F. et al. Comparison of the virulence potential of *Acinetobacter* strains from clinical and environmental sources. **Plos One**, San Francisco, v. 7, n. 5, ID 37024, 2012. Disponível em: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0037024>>. Acesso em: 28 abr. 2014.

TRABULSI, L. R. et al. **Microbiologia**. 4. ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2005. 718 p.

UZEL, A.; COGULU, D.; ONCAG, O. Microbiological evaluation and antibiotic susceptibility of dental unit water systems in general dental practice. **Int J Dent Hyg**, Oxford, v. 6, n. 1, p. 43-47, Feb. 2008.

VAN DER WENDE, E.; CHARACKLIS, W. G. Biofilms in potable water distribution systems. In: MCFETERS, G. A. (Ed.) **Drinking water microbiology**. New York: Springer-Verlag, 1990. p. 250-268.

VICKERY, K. et al. The effect of multiple cycles of contamination, detergent washing, and disinfection on the development of biofilm in endoscope tubing. **Am J Infect Control**, Saint Louis, v. 37, n. 6, p. 470-475, Aug. 2009.

WALKER, J. T. et al. Microbiological evaluation of a range of disinfectant products to control mixed-species biofilm contamination in a laboratory - Model of a dental unit water system. **Appl Environ Microbiol**, Washington, v. 69, n. 6, p. 3327–3332, June 2003.

WALKER, J. T. et al. Microbiological evaluation of dental unit water systems in general dental practice in Europe. **Eur J Oral Sci**, Copenhagen, v. 112, n. 5, p. 412-418, Oct. 2004.

WATANABE, E. **Água do equipo odontológico: técnicas convencionais e modernas para avaliar a contaminação microbiana**. 2007. 112 p. Tese (Doutorado em Biociências Aplicadas à Farmácia) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.

WATANABE, E. et al. Avaliação do nível de contaminação microbiana da água de equipos odontológicos pelo método Petrifilm™. **Rev Biocienc**, Taubaté, v. 12, n. 1-2, p. 68-75, 2006.

WATANABE, E. et al. Dental unit water: bacterial decontamination of old and new dental units by flushing water. **Int J Dent Hyg**, Oxford, v. 6, n. 1, p. 56–62, Feb. 2008.

WELIN-NEILANDS J.; SVENSATER G. Acid tolerance of biofilm cells of *Streptococcus mutans*. **Appl Environ Microbiol**, Washington, v. 73, n. 17, p. 5633-5638, Sept. 2007.

WESTERGREN, G.; KRASSE, B. Evaluation of a micro method for determination of *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus* infection. **J Clin Microbiol**, Washington, v. 7, n. 1, p. 82-83, Jan. 1978.

WHITEHOUSE, R. L. S. et al. Influence of biofilms on microbial contamination in dental unit water. **J Dent**, Kidlington, v. 19, n. 5, p. 290-295, Oct. 1991.

WIECZOREK, P. et al. Multidrug resistant *Acinetobacter baumannii* – the role of AdeABC (RND family) efflux pump in resistance to antibiotics. **Folia Histochem. Cytobiol**, Warszawa, v. 46, n. 3, p. 257-267, 2008.

WILLIAMS, J. F. et al. Microbial contamination of dental unit waterlines: prevalence, intensity and microbiological characteristics. **J Am Dent Assoc**, Chicago, v. 124, n. 10, p. 59-65, Oct. 1993.

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

YABUNE, T.; IMAZATO, S.; EBISU, S. Assessment of inhibitory effects of fluoride-coated tubes on biofilm formation by using the in vitro dental unit waterline biofilm model. **Appl Environ Microbiol**, Washington, v. 74, n. 19, p. 5958–5964, Oct. 2008.

YAO, J. D. C.; MOELLERING, J. R. Antibacterial agentes. In: VERSALOVIC, J. (Ed.). **Manual of clinical microbiology**. 10th ed, Washington: ASM Press, 2011. v. 1, p. 1043-1081.

ZANETTI, F.; DE LUCA, G.; STAMPI, S. Recovery of *Burkholderia pseudomallei* and *B. cepacia* from drinking water. **Int J Food Microbiol**, Amsterdam, v. 59, n. 1/2, p. 67–72, July 2000.

ZANETTI, F.; DE LUCA, G.; SACCHETTI, R. Control of bacterial contamination in microfiltered water dispensers (MWDs) by disinfection. **Int J Food Microbiol**, Amsterdam, v. 128, n. 3, p. 446-452, Jan. 2009.

ZHANG, W. et al. Evaluation of Sterilox for controlling microbial biofilm contamination of dental water. **Compend Contin Educ Dent**, Lawrenceville, v. 28, n. 11, p. 586-592, Nov. 2007.

ZHANG, W.; SILEIKA, T.; PACKMAN, A. I. Effects of fluid flow conditions on interactions between species in biofilms. **FEMS Microbiol Ecol**, Amsterdam, v. 84, n. 2, p. 344-354, May 2012.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Valores em UFC/mL da presença de bactérias e fungos, no reservatório e tubulação de água na clínica de Odontopediatria, nos meios de cultura e técnicas de isolamento.

Meio de Cultura	Esgotamento	Gota	Pour Plate	Local
PCA	9.900	9.200	2.100	Reservatório
PCA	20.600	20.000	19.266	Tubulação
PD	23.000	135.000	-	Reservatório
PD	30.000	133.066	-	Tubulação
R2A	53.500	96.000	-	Reservatório
R2A	200.000	1.080.000	-	Tubulação
SDA	540	280	-	Reservatório
SDA	0	0	-	Tubulação

APÊNDICE B – Valores em UFC/mL da presença de bactérias e fungos, no reservatório e tubulação de água na clínica de Ortodontia, nos meios de cultura e técnicas de isolamento.

Meio de Cultura	Esgotamento	Gota	Pour Plate	Local
PCA	314.500	114.000	117.500	Reservatório
PCA	240.500	280.000	2.567.500	Tubulação
PD	1.807.500	3.882.667	-	Reservatório
PD	2.755.000	2.091.333	-	Tubulação
R2A	2.480.000	2.570.000	-	Reservatório
R2A	3.555.000	2.400.000	-	Tubulação
SDA	0	2.000	-	Reservatório
SDA	10	800	-	Tubulação

APÊNDICE C – Valores em UFC/mL da presença de bactérias e fungos, no reservatório e tubulação de água na clínica de Pós-Graduação, nos meios de cultura e técnicas de isolamento.

Meio de Cultura	Esgotamento	Gota	Pour Plate	Local
PCA	210	300	75	Reservatório
PCA	86.417	106.000	34.850	Tubulação
PD	170	400	-	Reservatório
PD	212.500	109.433	-	Tubulação
R2A	21.688	947	-	Reservatório
R2A	163.583	140.467	-	Tubulação
SDA	0	20	-	Reservatório
SDA	30	0	-	Tubulação

APÊNDICE D – Valores em UFC/mL da presença de bactérias e fungos, no reservatório e tubulação de água na clínica de UBAs, nos meios de cultura e técnicas de isolamento.

Meio de Cultura	Esgotamento	Gota	Pour Plate	Local
PCA	20	100	0	Reservatório
PCA	0	0	10	Tubulação
PD	10	60	-	Reservatório
PD	0	20	-	Tubulação
R2A	8.408	140	-	Reservatório
R2A	50	0	-	Tubulação
SDA	43.316	200	-	Reservatório
SDA	2.185	120.200	-	Tubulação

APÊNDICE E – Valores em UFC/mL da presença de bactérias e fungos, no reservatório e tubulação de água na clínica de Urgência, nos meios de cultura e técnicas de isolamento.

Meio de Cultura	Esgotamento	Gota	Pour Plate	Local
PCA	0	0	0	Reservatório
PCA	775	270	2.600	Tubulação
PD	1.136	40	-	Reservatório
PD	60	3.293	-	Tubulação
R2A	0	0	-	Reservatório
R2A	1.563	2.120	-	Tubulação
SDA	0	0	-	Reservatório
SDA	430.000	40.000	-	Tubulação

APÊNDICE F – Valores em UFC/mL da presença de bactérias e fungos, no reservatório e tubulação de água na clínica de Multidisciplinar, nos meios de cultura e técnicas de isolamento.

Meio de Cultura	Esgotamento	Gota	Pour Plate	Local
PCA	10.125	600.000	5.750	Reservatório
PCA	32.887	14.000	6.125	Tubulação
PD	11.416	13.266	-	Reservatório
PD	43.883	55.773	-	Tubulação
R2A	600.000	22.000	-	Reservatório
R2A	36.750	36.500	-	Tubulação
SDA	11.334	5.200	-	Reservatório
SDA	880	460	-	Tubulação

APÊNDICE G – Valores em UFC/mL da presença de bactérias e fungos, no reservatório e tubulação de água na clínica de Dentística, sem e com as limpezas, nos meios de cultura e técnicas de isolamento.

COLETAS	TÉCNICAS	MEIOS DE CULTURA				LOCAL
		PCA	R2A	PD	SDA	
Sem limpeza	E	5.743	121.441	69.032	8.430	R
		311.911	342.122	64.194	83.333	T
	G	4.020	11.540	16.742	140	R
		1.787.244	406.489	584.444	166.666	T
	PP	1.180	-	-	-	R
		1.768.400	-	-	-	T
1° limpeza	E	63.550	96.222	39.933	45.601	R
		191.219	379.777	396.589	2.833	T
	G	24.400	418.000	96.800	153.347	R
		126.044	640.889	524.889	33.413	T
	PP	4.583	-	-	-	R
		10.900	-	-	-	T
2° limpeza	E	11.794	17.333	34.624	7	R
		97.055	398.167	90.708	20	T
	G	5.333	41.311	6.960	0	R
		60.667	811.555	26.867	0	T
	PP	1.050	-	-	-	R
		14.767	-	-	-	T
3° limpeza	E	3.366	1.666.667	13	66.680	R
		44.000	25.033	7.648	48.338	T
	G	0	0	0	0	R
		24.933	47.111	840	0	T
	PP	0	-	-	-	R
		3.950	-	-	-	T
4° limpeza	E	30	1.250.000	0	2.800	R
		25.132	32.317	0	25.000	T
	G	0	0	0	0	R
		55.600	31.190	21	0	T
	PP	0	-	-	-	R
		11.955	-	-	-	T

E, Esgotamento; G, Gota; PP, Pour Plate; R, Reservatório; T, Tubulação.

ANEXOS

ANEXO A – Protocolo utilizado na primeira limpeza da clínica de Dentístina.

Foram feitos testes na clínica IV, para comprovação da eficácia da peza manual das garrafas utilizadas como reservatório para o equipo e a o sistema flush.

Para o teste foram utilizados os seguintes procedimentos:

Box 01

- Foi colocado 2,5 ml de detergente enzimático*
- Essa solução ficou "agindo" por 5 minutos*
- Após utilizamos limpeza mecânica com escova de mamadeira por 1 minuto*
- A garrafa foi colocada novamente no equipo e foi acionada a caneta de alta rotação para que a solução de detergente enzimático passasse por toda a mangueira*
- A garrafa foi repassada e colocada no equipo novamente para que a água circulasse também por toda a mangueira*
- A água foi retirada da garrafa e a mesma foi acondicionada em cima da pia com um papel em cima.*

Box 02

- Foi colocado 5 ml de detergente enzimático*
- Essa solução ficou "agindo" por 10 minutos*
- Após utilizamos limpeza mecânica com escova de mamadeira por 30 segundos*
- A garrafa foi colocada novamente no equipo e foi acionada a caneta de alta rotação para que a solução de detergente enzimático passasse por toda a mangueira*
- A garrafa foi repassada e colocada no equipo novamente para que a água circulasse também por toda a mangueira*
- A água foi retirada da garrafa e a mesma foi acondicionada em cima da pia com um papel em cima.*

Box 03

- Foi colocado 15 ml de detergente enzimático*
- Essa solução ficou "agindo" por 15 minutos*
- Após utilizamos limpeza mecânica com escova de mamadeira por 1 minuto e 30 segundos*
- A garrafa foi colocada novamente no equipo e foi acionada a caneta de alta rotação para que a solução de detergente enzimático passasse por toda a mangueira*
- A garrafa foi repassada e colocada no equipo novamente para que a água circulasse também por toda a mangueira*
- A água foi retirada da garrafa e a mesma foi acondicionada em cima da pia com um papel em cima.*

ANEXO B – Protocolo utilizado a partir da segunda a última limpeza da clínica de Dentístina.

Foram feitos testes na clínica IV, para comprovação da eficácia da limpeza manual das garrafas utilizadas como reservatório para o equipo e para o sistema flush.

Para o teste foram utilizados os seguintes procedimentos:

Box 01

- Foi colocado 5 ml de detergente enzimático*
- Essa solução ficou “agindo” por 15 minutos*
- Não foi feita limpeza mecânica (escova de mamadeira)*
- A garrafa foi colocada novamente no equipo e foi acionada a caneta de alta rotação para que a solução de detergente enzimático passasse por toda a mangueira*
- A garrafa foi repassada e colocada no equipo novamente para que a água circulasse também por toda a mangueira*
- A água foi retirada da garrafa e a mesma foi acondicionada em cima da pia com um papel em cima.*

Box 02

- Foi colocado 5 ml de detergente enzimático*
- Essa solução ficou “agindo” por 20 minutos*
- Não foi feita limpeza mecânica (escova de mamadeira)*
- A garrafa foi colocada novamente no equipo e foi acionada a caneta de alta rotação para que a solução de detergente enzimático passasse por toda a mangueira*
- A garrafa foi repassada e colocada no equipo novamente para que a água circulasse também por toda a mangueira*
- A água foi retirada da garrafa e a mesma foi acondicionada em cima da pia com um papel em cima.*

Box 03

- Foi colocado 5 ml de detergente enzimático*
- Essa solução ficou “agindo” por 25 minutos*
- Não foi feita limpeza mecânica (escova de mamadeira)*
- A garrafa foi colocada novamente no equipo e foi acionada a caneta de alta rotação para que a solução de detergente enzimático passasse por toda a mangueira*
- A garrafa foi repassada e colocada no equipo novamente para que a água circulasse também por toda a mangueira*
- A água foi retirada da garrafa e a mesma foi acondicionada em cima da pia com um papel em cima.*

ANEXO C – Componentes do meio de cultura R2A Agar.

Extrato de levedura.....	0,50g
Peptona protease n.º 3.....	0,50g
Ácidos casamínos.....	0,50g
Dextrose.....	0,50g
Amido solúvel.....	0,50g
Piruvato de sódio.....	0,30g
Difosfato de potássio.....	0,30g
Sulfato de magnésio.....	0,05g
Ágar.....	15,00g
Água destilada.....	1000,00ml

ANEXO D – Componentes do meio de cultura Plate Count Agar – PCA.

Digesto Pancreático de Caseína.....	5,00g
Extrato de Levedura.....	2,50g
Dextrose.....	1,00g
Ágar.....	15,00g
Água destilada.....	1000,00ml

ANEXO E – Componentes do meio de cultura Peptona Diluída - PD.

Peptona.....	0,01g/%
Mg SO4 7H2O.....	0,06g/%
Fe CL3.....	0,002g/%
Ágar.....	2g
Água Destilada.....	1000ml

ANEXO F – Componentes do meio de cultura Sabouraud Dextrose Ágar – SDA.

Digesto Enzimático de Caseína.....	10,0g
Dextrose.....	40,0g
Ágar.....	15,0g
Água Destilada.....	1000ml

ANEXO G – Componentes do meio de cultura Agar Batata.

Amido de batata (infusão*).....	4g
Dextrose.....	20g
Agar.....	15g
Água destilada.....	1000ml

*Aproximadamente 200g de infusão de batata

ANEXO H – Componentes da coloração Lactofenol Azul de Algodão.

Ácido Láctico.....	20g
Cristais de Fenol.....	20g
Glicerina.....	20g
Azul Algodão.....	0,05g
Água destilada.....	20ml