

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIA E VETERINÁRIAS  
CÂMPUS DE JABOTICABAL

ANÁLISE GENÔMICA E SUSCETIBILIDADE DE *Pseudomonas*  
*aeruginosa* ISOLADAS DE REDE DE ÁGUA DE  
CONSULTÓRIOS ODONTOLÓGICOS DA CIDADE DE  
BARRETOS-SP.

Ana Claudia de Oliveira  
Cirurgiã Dentista

JABOTICABAL – SÃO PAULO - BRASIL  
Fevereiro/2010

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIA E VETERINÁRIAS  
CÂMPUS DE JABOTICABAL

ANÁLISE GENÔMICA E SUSCETIBILIDADE DE  
*Pseudomonas aeruginosa* ISOLADAS DE REDE DE ÁGUA  
DE CONSULTÓRIOS ODONTOLÓGICOS DA CIDADE DE  
BARRETOS-SP.

Ana Claudia de Oliveira

Orientador: Prof. Dr. Fernando Antônio de Ávila

Tese apresentada à faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Campus de Jaboticabal – **UNESP**, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutora em Microbiologia Agropecuária.

Jaboticabal  
Fevereiro de 2010

Oliveira, Ana Claudia  
O48a Análise Genômica E Suscetibilidade De *Pseudomonas Aeruginosa*  
Isoladas de Rede de Água de Consultórios Odontológicos da Cidade  
de Barretos-Sp./ Ana Claudia De Oliveira. -- Jaboticabal, 2010  
xiii, 39 f. : il. ; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de  
Ciências Agrárias e Veterinárias, 2010

Orientador: Fernando Antônio de Ávila

Banca examinadora: José Moacir Marim, Patricia Amoroso,  
Simone Barone Salgado Marques, Tammy Priscilla Chioda Delfino.  
Bibliografia

1. *Pseudomonas aeruginosa*. 2. Reservatório. 3. Biofilme. I.  
Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 628.163

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e  
Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação  
- UNESP, Câmpus de Jaboticabal.  
e-mail da autora: [acpressendo@gmail.com](mailto:acpressendo@gmail.com)

unesp



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
CÂMPUS DE JABOTICABAL  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS



### CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

**TÍTULO:** ANÁLISE GENÔMICA E SUSCETIBILIDADE DE *Pseudomonas aeruginosa* ISOLADAS DE REDE DE ÁGUA DE CONSULTÓRIOS ODONTOLÓGICOS DA CIDADE DE BARRETOS-SP.

**AUTORA:** ANA CLAUDIA DE OLIVEIRA

**ORIENTADOR:** Dr. FERNANDO ANTONIO DE ÁVILA

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de DOUTOR em MICROBIOLOGIA AGROPECUÁRIA pela Comissão Examinadora:

Dr. FERNANDO ANTONIO DE ÁVILA

Dr. JOSÉ MOACIR MARIN

Dra. PATRÍCIA AMOROSO

Dra. SIMONE BARONE SALGADO MARQUES

Dra. TAMMY PRISCILLA CHIODA DELFINO

Data da realização: 26 de fevereiro de 2010.

Presidente da Comissão Examinadora  
Dr. FERNANDO ANTONIO DE ÁVILA

## **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

**ANA CLAUDIA DE OLIVEIRA** - brasileira, nascida em 24 de abril de 1968, em Monte Alto-SP, é Cirurgia-dentista formada pela Fundação Educacional de Barretos, Curso de Odontologia, na cidade de Barretos – SP, em janeiro de 1993, e filiada ao Conselho Regional de Odontologia (CRO) desde 1993. Em dezembro de 2005, obteve o título de Mestre em Microbiologia Agropecuária na FCAV/UNESP de Jaboticabal.

**“A FALSA CIÊNCIA  
CRIA OS ATEUS;  
A VERDADEIRA FAZ O  
HOMEM PROSTRAR-  
SE DIANTE DA  
DIVINDADE.**

**VOLTAIRE**

***Dedico este trabalho a minha mãe Maria de Lourdes e meu pai Sergio pela dedicação, confiança e amor em todos os momentos da minha vida. Que sempre estiveram ao meu lado e me ensinaram a superar todas as dificuldades, pois o caminho percorrido para chegar até aqui não foi nada fácil e sem o apoio de vocês eu jamais conseguiria!***

## **AGRADECIMENTOS**

*À FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS – UNESP – CAMPUS DE JABOTICABAL-SP* pela pós-graduação em Microbiologia que felizmente pude ter a honra de cursar.

Ao meu orientador Prof. Dr. Fernando Antônio de Ávila, sempre solícito, disponível, mesmo com tantas responsabilidades e um grande exemplo de postura crítica em pesquisa.

Ao Amigo João Luis Quintana, obrigada pelo apoio e pelos conselhos, sempre sadios, que tivemos por todos esses anos.

À inesquecível amiga Cinthia Babá Barroso (in memorian) pelos ensinamentos, companheirismo e por me incentivar nos momentos difíceis.

À Prefeitura Municipal de Barretos, em nome do secretário da Saúde, Dr. José Luis Yunes.

Aos professores e funcionários do Departamento de Microbiologia UNESP/JABOTICABAL, que Deus abençoe cada um de vocês para que continuem sendo essas pessoas extraordinárias.

Aos amigos do Laboratório de Bacteriologia: Ariel, Renato, Elisabete, Clarissa e Lívia.

Aos amigos do Laboratório de Genética de Bactérias da FCAV-UNESP em especial as amigas Eliane, Najara e Juliana Rossi.

Aos Cirurgiões-Dentistas da cidade de Barretos, pelo apoio e compreensão e por disponibilizarem seus consultórios para a realização das coletas.

À secretária do programa de pós-graduação em Microbiologia Edna Testa D'Áquila, pela amizade, carinho e incentivo.

À minha irmã Sandra e minha sobrinha Cyntia por me apoiarem, incentivarem, pela paciência e pelos momentos de descontrações.

À minha irmã Eliana (in memorian) que mesmo distante foi incentivo pois em vida sempre acreditou na minha capacidade intelectual.

Aos amigos Laide, Patrícia e João Victor pelo incentivo nos momentos difíceis e pelos momentos de alegria desses muitos anos de amizade.



À amiga Scylla pelo ombro amigo nos momentos difíceis e incentivo incondicional nesta jornada.

Aos amigos Neide, Norberto, Gustavo, Daniel, Rosa, Sergio e Anderson pelo apoio.

Agradeço a todos que confiaram no meu senso de pesquisadora e que contribuíram direta ou indiretamente para que este trabalho fosse realizado.

Agradeço a CAPES (Fundação de Coordenação de Aperfeiçoamento de pessoa de nível superior) pela concessão de bolsa de estudo.

**SUMÁRIO**

	Página
LISTA DE TABELAS.....	ii
LISTA DE FIGURAS.....	iii
1. INTRODUÇÃO .....	01
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	04
3. OBJETIVOS.....	14
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	15
4.1 CONSULTÓRIOS ODONTOLÓGICOS.....	15
4.2 COLETA DAS AMOSTRAS.....	15
4.2.1 AMOSTRAGEM DE ÁGUA.....	17
4.2.2 COLETA DAS AMOSTRAS DE ÁGUA.....	18
4.3 COLORAÇÃO DE GRAM.....	18
4.4 TESTE PRESUNTIVO.....	19
4.5 PROVAS BIOQUÍMICAS.....	19
4.6 TESTES DE SUSCETIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS.....	19
4.7 EXTRAÇÃO DE DNA.....	20
4.8 ERIC-PCR.....	20
4.9 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA.....	20
4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	21
5. RESULTADOS.....	22
6. DISCUSSÃO.....	33
7. CONCLUSÕES .....	38
8. REFERÊNCIAS.....	39
9. ANEXOS.....	50

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1. Contagem total de *P. aeruginosa* em UFC/mL isolados em agar cetrimida das amostras de água dos 45 consultórios odontológicos de Barretos-SP, durante o período de outubro de 2008 a julho de 2009.....23
- Tabela 2: Origem e porcentagem de amostras de água colhidas nos 45 consultórios odontológicos de Barretos-SP, durante o período de outubro de 2008 a maio de 2009.....24
- Tabela 3: Nível de resistência, frente aos antimicrobianos utilizados no estudo, de isolados de *Pseudomonas aeruginosa* de amostras de água colhidas nos 45 consultórios odontológicos de Barretos-SP, durante o período de outubro de 2008 a maio de 2009.....26

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Tipos de reservatórios utilizados nos consultórios odontológicos.  
A = reservatório de chão, B = garrafa tipo Pet.....16
- Figura 2.** Coleta de amostra de água da Caneta de alta rotação (A), seringa tríplice (B), torneira de lavagem das mãos (C).....18
- FIGURA 3** Dendograma comparando os produtos da PCR dos isolados multirresistentes de *Pseudomonas aeruginosa* (amostras de DNA amplificado na presença dos primers ERIC 1 e ERIC 2) isoladas de água de consultórios odontológicos da cidade de Barretos - SP-Brasil, pelo método UPGMA, usando o índice Dice. .... 27
- FIGURA 4** Eletroforese de gel de agarose 1,5% de produto de ERIC-PCR na presença dos primers ERIC 1 e ERIC 2, utilizando o marcador de Gene Ruller 1KbDNA Ladder ≠ SM0311/2/3 - Fermentas.....29
- FIGURA 5** Eletroforese de gel de agarose 1,5% de produto de ERIC-PCR na presença dos primers ERIC 1 e ERIC 2, utilizando o marcador de Gene Ruller 1KbDNA Ladder ≠ SM0311/2/3 - Fermentas.....30
- FIGURA 6** Eletroforese de gel de agarose 1,5% de produto de ERIC-PCR na presença dos primers ERIC 1 e ERIC 2, utilizando o marcador de Gene Ruller 1KbDNA Ladder ≠ SM0311/2/3 - Fermentas.....31
- FIGURA 7:** Eletromicrografia das linhas d'água de equipamento odontológico. matrizes densas e extensas de substâncias poliméricas extracelulares. ....32

## **ANÁLISE GENÔMICA E SUSCETIBILIDADE DE *Pseudomonas aeruginosa* ISOLADAS DE REDE DE ÁGUA DE CONSULTÓRIOS ODONTOLÓGICOS DA CIDADE DE BARRETOS-SP.**

**RESUMO:** Foram estudadas 180 amostras de água de 45 consultórios odontológicos da cidade de Barretos-SP, com o objetivo de isolar, identificar, determinar a contagem de isolados de *Pseudomonas aeruginosa* UFC/mL, determinar o perfil clonal e avaliar a diversidade genômica dos isolados e a suscetibilidade das mesmas frente a diferentes antibióticos. As amostras de água foram filtradas em filtro Millipore® e a membrana colocada sobre o centro de uma placa de Petri contendo agar cetrimida, As colônias típicas de bactérias do gênero *Pseudomonas* foram identificadas pelo método de Gram, inoculação em TSI agar (Triple Sugar Iron), crescimento a 42°C, produção de pigmento, produção de alginato, oxidase, motilidade e alcalinização da acetamida. O teste utilizado para análise genômica foi o ERIC-PCR. Dos 76 (42,2%) isolados de *Pseudomonas aeruginosa*, 15 eram provenientes das amostras de torneira de lavagem das mãos, 18 de reservatório de garrafa pet, 23 de seringa tríplice e 20 do motor de alta rotação. Todos os isolados de *Pseudomonas aeruginosa* foram submetidos ao teste de suscetibilidade segundo a técnica de Kirby-Bauer. Dos antibióticos testados o que apresentou melhor resultado quanto à sensibilidade (65,8%) foi a ciprofloxacina. Quanto à similaridade genética dos isolados dos diferentes pontos analisados, foram encontrados nove “clusters” de 100% de similaridade.

**Palavras chave:** *Pseudomonas aeruginosa*, biofilme, unidade dental, linha d'água, ERIC-PCR.

## **GENOMIC ANALYSIS AND ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY OF *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* STRAINS ISOLATED FROM WATER PIPS AND DENTAL CLINICS IN THE CITY OF BARRETOS - SP**

**ABSTRACT:** The biofilm found in water supplies and lines of hospitals and dental units is extremely important because it presents a large number of bacteria, leading to risk of infection in immunocompromised patients vulnerable to opportunistic pathogens such as the *Pseudomonas aeruginosa*. One hundred eighty water samples from dental units of the city of Barretos-SP were evaluated. The water samples filtered in Millipore® filter were incubated in plates containing Cetrimide ágar. The bacteria colonies were identified through the gram-staining test, inoculation in agar T.S.I (triple sugar Iron), growth at 42 ° C, pigment production, production of alginate, oxidase acetamide alkalization and motility observation. All *Pseudomonas aeruginosa* bacteria were submitted to the susceptibility test according to the Kirby-Bauer technique. The test used for genomic analysis was the ERIC-PCR. From the total microorganisms studied, 76 (42,2%) were positive for *Pseudomonas aeruginosa*, isolates from 180 water samples, where 15 strains were from hand washing incoming local water supplies, 18 from PET bottled water, 23 from 3-in-1 syringes and 20 from the high speed handpiece. In relation to the antibiotics tested, the one presenting the best result with regard to sensibility was ciprofloxacin with 65.8%. The genetic similarity of isolates from different points analyzed, there were nine clusters of 100% similarity.

**Keywords:** *Pseudomonas aeruginosa*, biofilm, dental units, water line, ERIC-PCR

## I – INTRODUÇÃO

### ***Pseudomonas aeruginosa:***

*Pseudomonas aeruginosa*, bactéria da família *Pseudomonadaceae*, caracteriza-se como bastonete reto ou ligeiramente curvo, Gram negativo, aeróbio estrito, podendo ser observado como células isoladas, aos pares, ou em cadeias curtas, revelando mobilidade através de flagelo polar monotríqueo (POLLACK, 1995). A pioverdina e a piocianina são pigmentos fluorescentes difusíveis no meio de cultura produzidos por esta bactéria. Algumas cepas produzem um pigmento avermelhado (piorrubina) ou preto (piomelanina).

*P. aeruginosa* é uma das bactérias mais frequentemente isoladas de amostras clínicas. A infecção por este patógeno prevalece particularmente entre pacientes com feridas de queimadura, fibrose cística, leucemia aguda, transplante de órgãos e usuários de drogas intravenosas, costumam ocorrer em qualquer local que existe tendência ao acúmulo de umidade – traqueostomia, cateters de demora, queimaduras, orelha externa (“ouvido de nadador”) e feridas cutâneas exudativas (KONNEMAN et al., 2007).

*P. aeruginosa* produz um polissacarídeo capsular (alginato) que permite a aderência do patógeno às superfícies epiteliais pulmonares formando um biofilme que protege a bactéria da ação de antibióticos e do sistema imune do hospedeiro, fator de virulência que é hiperproduzido por este patógeno responsável por infecções pulmonares em pacientes com fibrose cística (HEAD et al., 2004).

GOSNEY et al. (1999) relataram que a colonização bucal por bacilos aeróbios Gram negativos (AGNB) não é normal e indica geralmente um estado imunológico debilitado do hospedeiro. Postularam que a colonização bucal de um indivíduo por AGNB pode indicar uma grave infecção sistêmica.

A ceratite ulcerativa é um processo inflamatório em resposta a uma infecção bacteriana na córnea, e tem sido a doença bacteriana de maior destruição em córnea humana. Esta infecção é causada por traumas na córnea, pelo frequente uso de lentes de contato em indivíduos com predisposição à doença (LYCZAK et al., 2000).

O progresso da medicina nos últimos anos tem resultado em uma importante mudança no perfil da terapia intensiva. Entretanto, pacientes imunocomprometidos devido a graves doenças, idosos, em terapia com corticosteróides e agentes

imunossupressivos, onde há o risco de infecção causada por patógenos oportunistas, tal como *P. aeruginosa*, que possui um potencial invasivo baixo, mas uma vez que a infecção sistêmica se estabelece a mortalidade é extremamente alta às vezes chegando a 70,0% (BLOT et al., 2002).

*P. aeruginosa* é conhecida por sua versatilidade metabólica e extrema capacidade de adaptação a diferentes ambientes, inclusive aquáticos. Para desinfecção de águas, o cloro e agentes que o contêm continuam sendo os mais usados no mundo (MEDEIROS et al., 2007).

A fosfolipase C destroem a membrana citoplasmática, o surfactante pulmonar e inativa as opsoninas. A exotoxina A inibe a síntese protéica em células eucarióticas, e é produzida pela maioria das cepas de *P. aeruginosa* isoladas de espécimes clínicos e apresenta potentes efeitos locais e sistêmicos, incluindo necrose de tecidos moles e choque séptico, interrompe a atividade celular e a resposta macrofágica (POLLACK, 1983).

Dentre os fatores de virulência extracelulares, que facilitam o rompimento da integridade epitelial, podem ser citadas as elastases, protease alcalina, fosfolipase C, neuraminidase, exoenzima S, lectina e proteases como hemolisinas e exotoxinas (JAFFAR-BANDJEE et al., 1995).

*P. aeruginosa* é uma bactéria muito difundida na natureza e desperta interesse por ser descrita como o bacilo Gram negativo não fermentador mais encontrado nas infecções hospitalares, principalmente em pacientes imunocomprometidos. Apresentam elevada morbidade e mortalidade e estão no centro das preocupações da comunidade científica (DE VOS et al., 1997).

Em geral, ambientes como hospitais, onde é exercida uma grande pressão seletiva de agentes antimicrobianos, promove o aparecimento de linhagens microbianas resistentes e multirresistentes (BRETT & ELLIS, 2001). Fora de hospitais, as pressões que o ambiente exerce são: temperatura, pH, concentração de nutrientes, concentração de metais pesados e as próprias interações populacionais, entre outras (BANNING et al., 2003).

A tipagem e o estabelecimento do grau de similaridade de agentes infecciosos envolvidos em infecções nosocomiais, principalmente quando comparado a amostras isoladas em casos de infecção esporádica ou em caso de infecção comunitária, permitem a formulação de hipóteses sobre a existência de clones apresentando



características especiais de virulência e sobre a transmissão hospitalar desses agentes (OLIVE & BEAN, 1999).

GALES et al., (2003) chamaram a atenção para a similaridade e disseminação de amostras de *P. aeruginosa* com resistência a vários antimicrobianos, incluindo carbapenens, distribuídas por 12 hospitais de diferentes estados brasileiros. Nestas amostras foi observada a produção de uma enzima que hidroliza b-lactâmicos, incluindo os carbapenens, uma metalo-b-lactamase (M-bla), descrita pela primeira vez em uma amostra de São Paulo e denominada de SPM-1 (São Paulo metalo-b-lactamase) (TOLEMAN et al., 2002).

## II – REVISÃO DE LITERATURA:

*P. aeruginosa*, em cultura, pode exibir múltiplos tipos de colônias, tal qual a forma mucóide que ocorre devido à produção de grandes quantidades de um polissacarídeo extracelular, o alginato, identificado em amostras clínicas de portadores de fibrose cística (GILLIGAN, 1991).

*P. aeruginosa* podem apresentar isolados mucóides e não mucóides. Os mucóides são mais resistentes, formando colônias de agregados mais firmes que superam os mecanismos de defesa e que permitem maior aderência a superfícies celulares. A característica química (polianiônica) e física da cápsula lhe confere um poder de barreira à passagem de substâncias, inclusive aos antibióticos, que precisam saturar toda a sua superfície antes da penetração (MAI et al., 1993)

LYCZAC et al. (2000) relatam que *P. aeruginosa* é um patógeno onipresente capaz de infectar todos os tecidos de mamíferos. A grande variedade de fatores de virulência contribui para infecções em indivíduos com queimaduras graves, infecções pulmonares e infecções oculares. Os fatores de patogenicidade incluem flagelo, lipopolissacáride, protease, *quorum sensing*, exotoxina A e exoenzima secretada pelo sistema de secreção do tipo III.

### 2.1 FATORES DE VIRULÊNCIA:

Segundo KONNEMAN et al., (2008) os fatores de virulência de *Pseudomonas aeruginosa* são:

#### 2.1.1 Alginato

Polissacarídeo capsular que permite a aderência das bactérias infectantes às superfícies epiteliais pulmonares, formando biofilmes, os quais, por sua vez, protegem as bactérias contra a ação dos antibióticos e do imunológico do organismo.

#### 2.1.2 Pili

Apêndices de superfícies que permitem a aderência do microrganismo aos receptores de gangliosídeo GM-1 presentes na superfície das células epiteliais do hospedeiro.

#### 2.1.3 Neuraminidase

Remove os resíduos de ácido siálico dos receptores de gangliosídeos GM-1, facilitando a ligação dos *pilli* (fímbrias).

#### 2.1.4 Lipopolissacarídeo

Produz endotoxina e causa síndrome de sepse: febre, choque, oligúria, leucopenia ou leucocitose, coagulação intravascular disseminada, anormalidades metabólicas.

### **2.1.5 Exotoxina A**

Destruição tecidual, inibição da síntese de proteínas; interrompe a atividade celular e a resposta dos macrófagos.

### **2.1.6 Enterotoxina**

Interrompe a atividade gastrointestinal normal, resultando em diarreia.

### **2.1.7 Exoenzima S**

Inibe a síntese de proteínas

### **2.1.8 Fosfolipase C**

Destrói a membrana citoplasmática; destrói o surfactante pulmonar; inativa as opsoninas.

### **2.1.9 Elastase**

Cliva as imunoglobulinase os componentes do complemento e anula a atividade dos neutrófilos.

### **2.1.10 Leucocidina**

Suprime outras bactérias e anula a atividade ciliar respiratória; causa lesão oxidativa dos tecidos, principalmente os tecidos oxigenados, como o pulmão.

## **2.2 EQUIPO ODONTOLÓGICO: ESTUDO DA CONTAMINAÇÃO DA LINHA D'ÁGUA.**

Em 1996, a ADA recomendou ações para a manutenção da qualidade da água do tratamento odontológico, resumindo-se em:

- drenagem de água, no começo do dia de trabalho, para reduzir as bactérias que se desenvolvem durante a noite ou finais de semana;
- drenagem de 20 a 30 segundos, entre o atendimento de pacientes, para eliminar qualquer material que pudesse ter sido aspirado;
- cumprimento das orientações dos fabricantes do equipo odontológico;
- uso de solução fisiológica ou água esterilizada em procedimentos cirúrgicos, o que levou ao desenvolvimento de reservatórios e dispositivos autoclaváveis, acoplados ao equipo (MILLS, 2000);
- utilização de opções comerciais para melhorar a qualidade da água (reservatórios de água independentes, tratamento químico, filtros, válvulas anti-retracção).

Apesar de não fornecer as condições ideais para que haja a multiplicação de microrganismos, a água é uma excelente via de transmissão de patógenos para os seres humanos e animais, sendo que as áreas urbanas e rurais têm contaminado os lençóis de água utilizados em nosso meio (AMARAL, 1996).

PANKHURST & COULTER (2007) revisaram artigos que investigavam a infecção de indivíduos por microrganismos encontrados na linha d'água de equipos odontológicos no período de 1966 a 2007, relatando que a maioria dos microrganismos isolados deste ambiente são de baixa patogenicidade. No entanto, citam dados de um pequeno número de estudos descritos de infecção ou colonização do hospedeiro suscetível a *Legionella* spp., *Pseudomonas* spp. e micobactérias provenientes da linha d'água de equipos odontológicos. Um caso fatal da doença do legionário em um cirurgião dentista concluiu que as linhas d'água do equipo odontológico foi a provável fonte da infecção. A espécie dominante encontrada em unidade dentária são bactérias Gram negativas, produtoras de endotoxina, sendo que a consequência da exposição à endotoxina é o desencadeamento ou exacerbação de asma sendo relatado casos em um sub-grupo de cirurgiões dentistas nos quais a asma surgiu após o início carreira.

BARBEAU et al. (1996) concluíram que o equipo odontológico é um ecossistema em que patógenos oportunistas colonizam a superfície Interna das tubulações. Com isso há um aumento da população de patógenos na água exacerbando o potencial de risco de transmissão hídrica desses microrganismos. Esta pesquisa realizada na Universidade de Montreal demonstra que nenhuma das linhas de água fica isenta da contaminação microbiana.

SOUZA-GUGELMIM et al. (2003) demonstraram a ocorrência de contaminação microbiana na linha d'água de equipos odontológico em virtude da formação de biofilme microbiano nas tubulações deste. Verificaram a partir do teste de Wilcoxon, que o nível de contaminação das amostras de água, recuperada tanto a partir do motor de alta-rotação como da seringa tríplice, era significativamente maior que o nível de contaminação inicial da água, verificada no reservatório. A água do equipo odontológico, possivelmente, seja contaminada pelo biofilme microbiano, que com o passar do tempo, se forma em suas tubulações, uma vez sabido que, o biofilme se forma onde superfície sólida esteja em contato com água por um determinado espaço de tempo.

OLIVEIRA et al. (2008) relataram a ampla variedade de patógenos oportunistas que tem sido detectadas nos tubos de alimentação de água dos equipos odontológicos, particularmente no biofilme formado na superfície do tubo. Entre os patógenos oportunistas encontrados nos tubos de água, *P. aeruginosa* é reconhecida como uma das principais causadoras de infecções nosocomiais.

WALKER et al. (2004) avaliaram a contaminação de equipos pelo biofilme em procedimentos odontológicos em sete países europeus, Reino Unido, Irlanda, Grécia, Espanha, Alemanha, Dinamarca e Países Baixos. As linhas d'água de 51,0% das 237 amostras colhidas excederam as recomendações da American Dental Association (ADA). Concluindo que uma quantidade elevada de equipos que possuem níveis de contaminação microbiana fora dos padrões preconizados pela ADA independe do país, equipo ou fonte de água. Enfatizam a necessidade de mecanismos eficazes para reduzir a contaminação, destacando o risco de exposição ocupacional e de infecção cruzada na prática odontológica. Afirmam ainda que equipos odontológicos estão associados a patógenos oportunistas devido ao biofilme que se forma nas tubulações de água.

TUTTLEBE et al. (2002) relataram que a maioria dos procedimentos odontológicos usa grande quantidade de água, sendo para irrigação, refrigeração dos equipamentos e lavagem da cavidade bucal. Constataram também que o biofilme bacteriano em equipos odontológicos é um problema de difícil resolução, expondo assistentes e pacientes a um risco significativo de infecções, principalmente em indivíduos doentes ou imunocomprometidos. Os mesmos autores propuseram investigar a contaminação bacteriana da água de equipos odontológicos de "Dublin Dental Hospital" para verificar a eficácia de dois desinfetantes a base de peróxido de hidrogênio na tentativa de reduzir essa contaminação para 200 UFC/mL seguindo as recomendações da ADA.

OLIVEIRA et al. (2008) realçam a necessidade de um mecanismo efetivo para reduzir a contaminação bacteriana dentro dos tubos de alimentação de água dos equipos odontológicos, e o risco da exposição ocupacional e infecção cruzada na prática odontológica, em especial quando o paciente apresenta doenças que causam imunossupressão.

### **2.3 BIOFILME:**

Biofilme microbiano é definido como uma associação de células microbianas, fixadas a superfícies, bióticas ou abióticas, envolta por uma complexa matriz extracelular de substâncias poliméricas. Os biofilmes representam mais de 90% dos contaminantes existentes em sistemas aquosos, industriais, clínicos e ambientais (LUCCHESI, 2006).

A adesão de *Pseudomonas aeruginosa* à superfície é o primeiro passo para a instalação do biofilme, porém, condições ambientais como velocidade do fluxo, temperatura, pH, disponibilidade e conteúdo de nutrientes, hidrofobicidade celular,

mobilidade, estrutura celular incluindo substâncias extra polimérica (EPS) e flagelo, concentração iônica, fase de crescimento da célula, concentração de células suspensas e aspereza da superfície são capazes de influenciar na formação e propriedades do biofilme.

Na natureza, acredita-se que a maior parte da biomassa bacteriana é formada por comunidades de células aderidas chamado biofilme. *P. aeruginosa* é modelo para o estudo deste modo de crescimento. Ao longo da última década, avanços significativos foram conquistados na compreensão do desenvolvimento desse patógeno e dos mecanismos envolvidos na formação do biofilme. Dados sugerem que não existe uma forma específica para o desenvolvimento destas comunidades. A comunicação entre as células envolvidas é conhecida por “quorum sensing”, mecanismo muito utilizado por *P. aeruginosa* e que representa um desafio para se compreender a complexidade da formação do biofilme (KIEVIT, 2009).

Segundo DAVEY & O'TOOLE (2000), biofilme é definido como uma comunidade de microorganismos associados a uma matriz orgânica de origem microbiana e se forma naturalmente em qualquer superfície em contato com água. A matriz orgânica apresenta na sua composição polissacarídeos, proteínas, ácidos nucléicos, entre outros polímeros. O biofilme se forma seguindo um padrão de colonização no qual podem ser distinguidas quatro fases, adsorção de compostos químicos dissolvidos, macromoléculas, às superfícies por processos físicos espontâneos; colonização bacteriana: após colonizarem o substrato as bactérias começam a produzir EPS que serve de proteção contra predadores, resistência à radiação, a desidratação, entre outros fatores; colonização por eucariontes unicelulares; colonização por eucariontes multicelulares. A presença de biofilme bacteriano em equipamentos médico-hospitalar é de extrema importância pois as antibióticoterapias para combater infecções causadas por bactérias que participam da colonização desses biofilmes são pouco eficientes, frente à multiresistência desenvolvida por tais patógenos.

A contaminação das linhas d'água de equipos odontológicos é uma preocupação emergente na odontologia. SPRATT et al. (2004) avaliaram a eficácia da descontaminação de tubulações de equipos utilizando soluções de Tetracetileno diamina (TAED). Um modelo de biofilme foi usado para simular as condições clínicas, gerando três biofilmes: (1) biofilme de água, (2) biofilme de água + bactérias comensais humanos e biofilme de água contaminado por bactérias bucais

(3). As espécies utilizadas para a contaminação foram *Streptococcus oralis*, *Enterococcus faecalis* e *Staphylococcus aureus*. Concluíram que as soluções de TAED se mostraram eficazes frente a descontaminação da linha d'água de equipo odontológico.

A estrutura dos equipos odontológicos favorece a formação de biofilme e a contaminação microbiana da linha d'água que passa por essas tubulações. Tais microrganismos contaminam o ambiente por aerossóis que se formam quando o motor de alta rotação é acionado. A maioria dos isolados são de baixa patogenicidade, no entanto, para saúde pública, muitos dos microrganismos encontrados neste ambiente são de origem desconhecida, levando em conta o número crescente de pessoas imunocomprometidas que frequentam o ambiente odontológico. Enfatiza-se a necessidade de desenvolver mecanismos eficazes para reduzir esta contaminação e a formação de biofilme (SZYMANSKA et al, 2008).

Foi relatado que as DUWL são contaminadas com biofilme bacteriano que pode ser colonizado por patógenos oportunistas. YABUNE et al. (2005) objetivaram investigar a capacidade tubulação de fluoreto de polivinilideno (PVDF) para inibir a contaminação em tubulações de água de equipos odontológicos. Instalaram nas unidades dentais dois tubos, um tubo convencional de poliuretano (unidade A) e um outro tubo de PVDF (unidade B). O número de bactérias da unidade B foi inferior à da unidade A que foram colonizadas pelo biofilme após 94 dias, enquanto que no tubo da unidade B não foi observada a formação de biofilme, mesmo depois de 185 dias. Após 1 ano de uso, a unidade B apresentou uma contaminação bacteriana significativamente inferior à unidade A. Os resultados indicaram que os tubos de PVDF foram efetivos na inibição da formação do biofilme reduzindo o fluxo de bactérias na unidade dental.

O "quorum sensing systems" contribue para a habilidade da *P. aeruginosa* na formação do biofilme de importância médica e efetua o controle da produção de diferentes fatores de virulência para manipular a resposta imune do hospedeiro (LYGZAK et al., 2000).

O "Quorum sensing" é a habilidade de bactérias em iniciar a transcrição de certos genes apenas quando certa densidade da população é alcançada. É usado por uma extensa variedade de bactérias, incluindo patógenos humano. É um gene importante que potencializa a patogenicidade de *P. aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* (DONABEDIAN, 2003).

Ao longo dos últimos anos, trabalhos demonstraram que o “quorum sensing” é um mecanismo que permite que bactérias coordenem a densidade populacional de um meio, sendo que sem esse sistema seria difícil, senão impossível a sobrevivência de uma única célula bacteriana. *P. aeruginosa* é um dos patógeno oportunista amplamente estudado pela habilidade do “quorum sensing” (JUHAS et al., 2005).

WATANABE (2007) avaliou o nível de contaminação por bactérias aeróbias totais em água de equipos odontológicos e torneiras de cinco clínicas odontológicas da USP- Ribeirão Preto, determinando o nível de contaminação por *Pseudomonas* ssp., coliformes e fungos, detectando também a formação de biofilme com o auxílio de Microscopia Eletrônica de Varredura mostrando uma diversidade microbiana embutida em densas e extensas matrizes de polissacarides extracelulares.

## **2.4 MULTIRESISTENCIA À ANTIMICROBIANOS:**

LYCZAK et al. (2000) relataram que *P. aeruginosa* é um patógeno nosocomial que apresenta elevada resistência a antimicrobianos e causa graves infecções quando há alterações nos mecanismos de defesa do hospedeiro.

GUERRA et al. (2006) analisaram 413 amostras de água potável do sistema principal e do sistema secundário em Bandeirantes, Estado do Paraná, através de membrana filtrante para *P. aeruginosa* e bactérias heterotróficas. Das amostras examinadas, 10,4% estavam contaminadas por *P. aeruginosa*, sendo 23,5% das amostras do sistema de água secundário, e 8,6% das amostras do sistema de água principal. Somente uma amostra apresentou contagem de bactérias heterotróficas acima do nível máximo recomendado. *P. aeruginosa* isoladas foram testadas para sensibilidade ao cloro livre e sobreviveram a uma concentração de cloro três vezes acima da concentração mínima com concentrações definidas com base na legislação vigente no país, do ano da pesquisa.

MEDEIROS et al. (2007) avaliou a resistência de linhagens de *P. aeruginosa*, isoladas de amostras de águas de diversos ambientes, ao cloro em que foram testados diferentes tempos de contato (1, 5, 10, 20, 30 e 40 minutos) e soluções aquosas de cloro, com concentrações definidas com base na legislação vigente no país, no ano da pesquisa, para água potável: 0,5; 1,0 e 2,0 ppm, revelando que *P. aeruginosa*, isoladas de diferentes fontes de água, têm a habilidade de sobreviver a diferentes concentrações de cloro. Na concentração de 1 ppm, a maioria das



linhagens não foram inibidas. As linhagens mais resistentes ao cloro também apresentaram relação de multirresistência à maioria dos antibióticos testados.

*P. aeruginosa* podem colonizar o trato intestinal de indivíduos que foram submetidos a intervenções cirúrgicas. É um dos patógenos mais frequentes em hospitais, sendo associados ao surgimento de focos de infecção pulmonar, infecção do trato urinário, infecções biliares e septicemia em indivíduos com doenças graves, sendo de difícil tratamento devido a sua multirresistência (SASAKI et al., 2004). É uma bactéria emergente e um importante patógeno nosocomial, especialmente para pacientes neutropênicos e imunocomprometidos. (VIDAL & MENSA, 1996).

ZAMBRANO & HERRERA, (2004) determinaram a suscetibilidade antimicrobiana de cepas de *P. aeruginosa* isoladas de pacientes atendidos no Hospital Regional de Antofagasta (Chile), sendo que 48,0% dos isolados eram provenientes de pacientes com infecções graves e 52,0% de pacientes com predisposição a infecções. Os isolados mostraram-se resistentes a amicacina (36,8%), ceftazidima (36,8% e ciprofloxacina (68,4%), moderadamente resistentes a imipenem (26,3%) e pouco resistentes a piperacilina/tazobactam (5,3%) e cefoperazona/sulbactam (15,8%).

TOLEMAN et al. (2002) relataram que uma paciente pediátrica, internada em um hospital da cidade de São Paulo, apresentava quadro de neutropenia com episódios de febre alta. O tratamento empírico foi feito com ceftriaxona e amicacina, sendo posteriormente substituído pela ceftazidima. Uma cultura pura de *P. aeruginosa* suscetível apenas a polimixina B foi isolada da urina da paciente, o que promoveu a substituição da ceftazidima pela polimixina B. Após cinco dias, foi isolada *P. aeruginosa*, a partir de hemocultura com o mesmo perfil de suscetibilidade, mas um choque séptico levou a paciente ao óbito, sendo posteriormente identificado um novo gene produtor de Mbla, diferente dos anteriormente identificados que codificam as enzimas IMP e VIM. Este novo gene, com características próprias, foi denominado blaSPM-1 (São Paulo metalo- $\beta$ -lactamase).

Durante a última década foram identificadas enzimas de *Pseudomonas aeruginosa* que promovem a hidrólise das cefalosporinas e dos carbapenens, que pertencem à classe B de Ambler e são denominadas de carbapenases. Foram descobertos quatro tipos: IMP-1; VIM-1; VIM-2; e SPM-1. Inicialmente foram detectadas amostras produtoras de IMP-1, frequentemente isoladas no Japão, China, Europa e no Canadá, posteriormente foi detectada na Itália, França, Coréia do Sul e na Grécia denominadas de VIM-1 e VIM-2. Recentemente foi identificada em cepas de *P. aeruginosa*, isoladas na cidade de São Paulo a enzima SPM-1 (GALES et al., 2003). Além da enzima SPM-1, foi relatada por SADER et al. (2005) a presença das enzimas IMP-1 e VIM-2 em cepas isoladas na cidade de São Paulo.

*P. aeruginosa* apresenta resistência a uma variedade de antimicrobianos, como a maioria dos  $\beta$ -lactâmicos, tetraciclina, cloranfenicol e grande parte das fluoroquinolonas e aminoglicosídeos. Destacam-se dentre os mecanismos responsáveis a baixa permeabilidade da membrana externa, sistema de efluxo, produção de enzimas inativadoras de aminoglicosídeos, alteração do alvo das fluoroquinolonas e produção da enzima  $\beta$ -lactâmase (LI et al., 1995).

## 2.5 ERIC-PCR

A descoberta de que genomas procariotos contêm seqüências repetitivas como a ERIC (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus), tem expandido o uso da biologia molecular, útil para avaliar a variabilidade genética de vários isolados bacterianos, inclusive *E. coli* (VERSALOVIC et al., 1991). ERIC-PCR são seqüências de palíndromos imperfeitos de 127 pb que ocorrem em múltiplas cópias no genoma das bactérias entéricas e víbrios (WILSON et al., 2006). A ERIC-PCR possui uma boa capacidade discriminatória e pode substituir o RAPD-PCR ou RFLP, os quais são requeridos para demonstrar pequenos níveis de variabilidade genética (MAURER et al., 1998).

LIPMAN et al. (1995) citam que a genotipagem pelo método de ERIC-PCR é mais prático, simples e rápido. Esta técnica é baseada na análise de seqüências cromossômicas repetidas, que tem sido usada para a caracterização clonal de diferentes espécies de enterobactérias e para o estudo da relação genética entre isolados (COSTA et al., 2006).

Visando uma maior precisão da tipagem de microrganismos, técnicas moleculares foram desenvolvidas, apresentando elevada importância entre as cepas envolvidas em casos de infecção hospitalar, pois se aproximaram da possibilidade de erradicação de fontes ambientais, prevenção de infecções cruzadas e monitoramento da eficácia da terapia antimicrobiana (POH, 1992).

De 24 isolados hospitalares de *P. aeruginosa* provenientes de Recife, Brasil, 15 (62%) produziram metalo- $\beta$ -lactamase. Tais isolados foram resistentes às principais drogas anti-*Pseudomonas*, exceto polimixina B e aztreonam. A enzima responsável pela resistência aos carbapanêmicos pertence à classe SPM-1 e o gene envolvido, *blaspm-1*, provavelmente é plasmidial (MAGALHÃES et al., 2005).

Estas técnicas baseiam-se na análise do DNA cromossômico ou extra-cromossômico, e fornecem um poder discriminatório maior que os parâmetros fenotípicos. Estudos mostram que estas técnicas permitem a identificação de cepas endêmicas e de surtos, assim como, a identificação de um clone entre cepas de uma mesma espécie, antibiotipo, sorotipo e fagotipo (GOERING, 1993).

SCHELSTRAETE et al. (2008) investigaram a origem de isolados de *P. aeruginosa* de pacientes fibrocísticos por comparação genética de recém infectados com o genótipo de isolados do ambiente e de outros pacientes tratados no “Cistic Fibrous Centre” (França) chegando a um total de total de 50 novos casos.

### III- OBJETIVOS:

Os objetivos do presente trabalho foram:

1. Isolar e identificar cepas de *P. aeruginosa* de água (torneira de lavagem das mãos, reservatório, seringa tríplice, caneta de alta rotação) de consultórios odontológicos da cidade de Barretos/SP.

2. Determinar a contagem em UFC/mL de *P. aeruginosa*.

3. Determinar a suscetibilidade das cepas de *P. aeruginosa* isoladas frente a diferentes antibióticos.

4. Avaliar a diversidade genômica dos isolados através da técnica molecular de ERIC-PCR.

5. Observar, utilizando a técnica de Microscopia Eletrônica de Varredura, a presença de biofilme no interior de tubulações de água de equipamentos odontológicos.

## **IV- MATERIAIS E MÉTODOS:**

### **4.1- CONSULTÓRIOS ODONTOLÓGICOS**

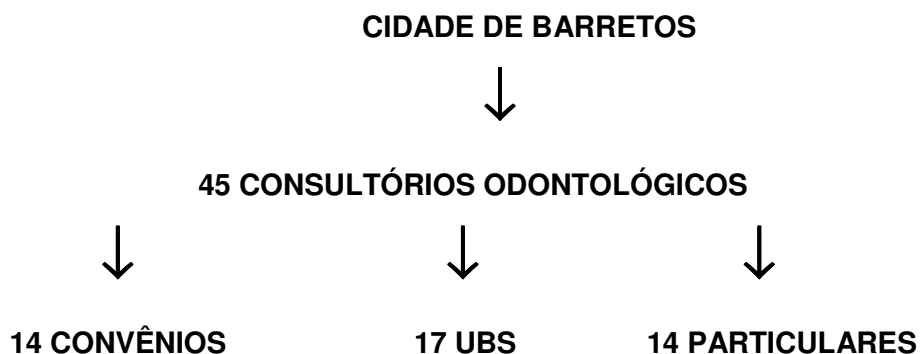
Para a realização deste estudo, foram selecionados aleatoriamente, 40 consultórios odontológicos, localizados em diferentes bairros da cidade de Barretos, SP, situados em pontos estratégicos, de modo que as amostragens de água analisadas, representassem todo o município de Barretos, durante o período de outubro de 2008 a maio de 2009.

Em cada consultório escolhido para a pesquisa, foi analisado:

1. tipo de equipo,
2. tipo de reservatório utilizado
3. fonte de água utilizada
  - 3.a) se era filtrada;
  - 3.b) do sistema de abastecimento municipal;
  - 3.c) destilada, para o abastecimento dos mesmos.
4. tempo de uso do equipamento.

### **4.2- COLETA DAS AMOSTRAS.**

Os consultórios analisados foram divididos conforme a quantidade presente em cada região e da autorização do cirurgião-dentista para a realização da coleta. Do total dos consultórios pesquisados, 14 pertenciam a convênios, 17 ao Sistema Único de Saúde (SUS) e 14 a consultórios particulares.



#### **4.2.1- AMOSTRAGEM DE ÁGUA**

Foram analisadas 180 amostras de águas distribuídas em quatro pontos distintos (caneta de alta rotação, torneira de lavagem das mãos, reservatório e seringa tríplice), sendo que os equipos não foram submetidos à desinfecção prévia e as coletas foram realizadas no período da tarde, após quatro horas de uso do equipo. Em cada consultório escolhido para a pesquisa, foram analisados: tipo de reservatório (todos eram de garrafa de plástico tipo Pet), fonte da água (filtrada, sistema de abastecimento municipal ou destilada), e tempo de uso do equipo.

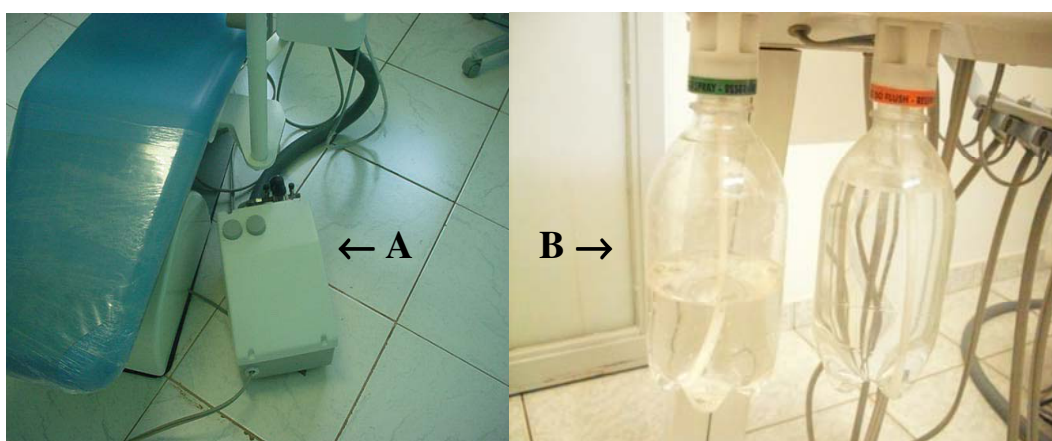


Figura 1. Tipos de reservatórios utilizados nos consultórios odontológicos.  
A = reservatório de chão, B = garrafa tipo Pet.

#### **4.2.2- Coleta Das Amostras De Água**

Foram colhidas 200 mL de cada amostra, que foram acondicionadas em frascos com capacidade de 250 mL, previamente esterilizados, com tampa rosqueável e identificados. As amostras foram coletadas pelo mesmo pesquisador e no mesmo período. Para colher as amostras de água dos reservatórios do tipo garrafa Pet, foram esvaziadas no próprio frasco de coleta até completar o volume de 200 mL. As amostras de água coletadas das canetas de alta rotação foram realizadas, acionando o pedal e vertendo o fluxo no frasco de coleta, sendo que o primeiro fluxo foi desprezado por 30 segundos. A água da seringa tríplice foi drenada, diretamente, dentro do frasco de coleta após o acionamento da mesma, sendo que o primeiro fluxo foi desprezado por 1 minuto, as amostras das torneiras de lavagem das mãos foram coletada diretamente no frasco sem que este tocasse na superfície da torneira. Em todas as amostras de água foram adicionados 0,5 mL de tiosulfato de sódio, na concentração final de 10mg/L para que houvesse precipitação dos sais e íons da água (APHA-AWWA-WEF, 1999). Em momento algum, os frascos de coleta, tocaram as superfícies dos pontos de coleta. As amostras foram armazenadas em caixas de isopor com gelo e transportadas, em um período de duas horas, para o laboratório de Microbiologia do Departamento de Patologia Veterinária da FCAVUNESP.

No laboratório, todo o experimento foi realizado em câmara de fluxo laminar. As amostras de água foram filtradas em filtro Millipore® de 0,45 µm, num total de 200mL. Em seguida, cada filtro foi depositado no centro de placas de Petri, contendo ágar Cetrimida e foram incubadas em estufa à temperatura de 42°C por 24- 48 horas.

Após a incubação das placas, contendo os filtros das amostras de água, foi realizada a contagem de bactérias na forma de unidades formadoras de colônia (ufc/mL). Para a contagem, utilizou-se um contador de colônias modelo EC. 550A(Phoenix).

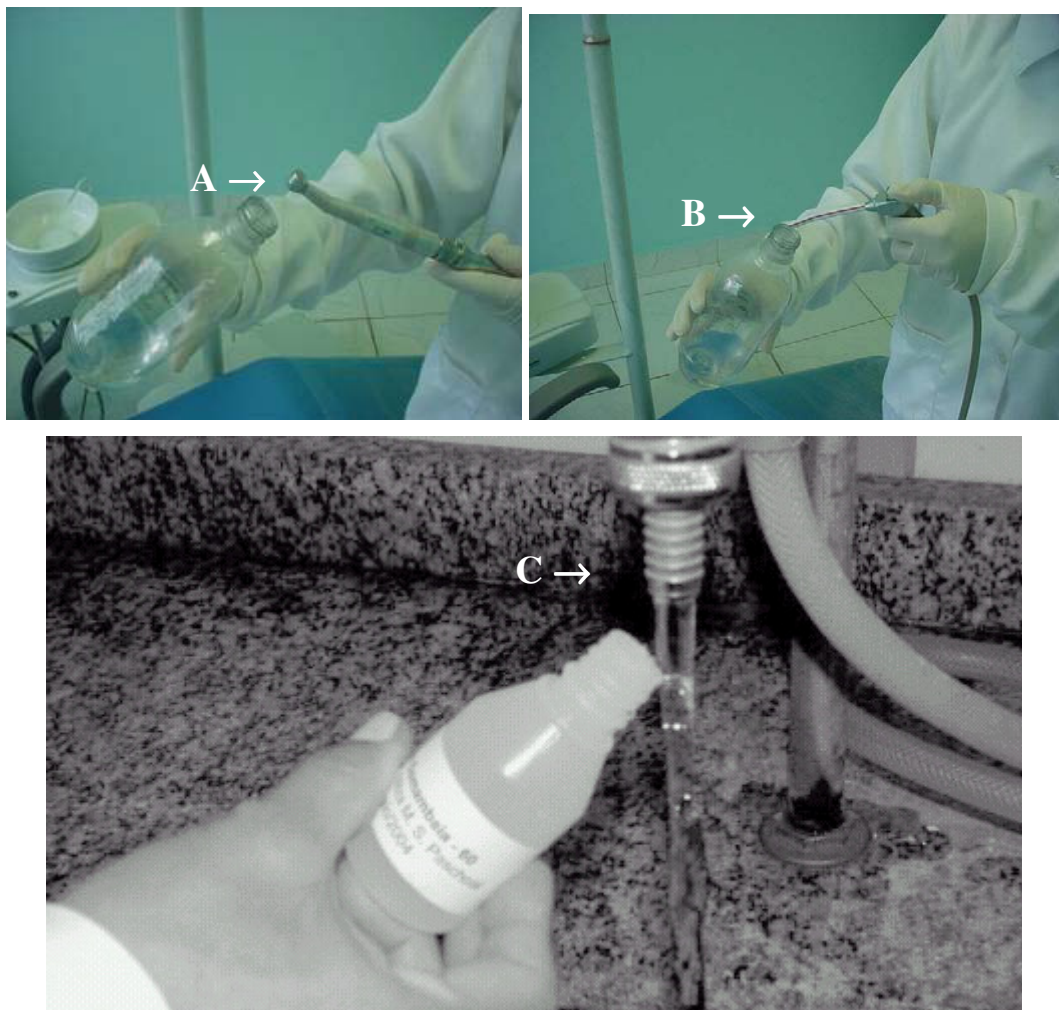


Figura 2. Coleta de amostra de água da Caneta de alta rotação (A), seringa tríplice (B), torneira de lavagem das mãos (C).

#### 4.3- Coloração pelo método de Gram

Colônias suspeitas de pertencerem ao gênero *Pseudomonas*, com pigmentação azul ou verde com odor característico, foram coradas pelo método de Gram, para observação de suas características morfotintoriais. As lâminas foram observadas em microscópio óptico com objetiva de imersão (10x).



#### **4.4- TESTE PRESUNTIVO:**

As colônias com características morfológicas positivas para o gênero *Pseudomonas* eram inoculadas com auxílio de estilete de níquel-cromo em tubos contendo ágar TSI (Tríplice Açúcar Ferro) e incubados a 37°C por 24 à 48 horas.

#### **4.5- PROVAS BIOQUÍMICAS:**

O crescimento presente nos tubos de ágar TSI, com características compatíveis às do gênero *Pseudomonas*, foram submetidas à testes de identificação bioquímica através da alcalinização da acetamida, oxidase, observação da motilidade, crescimento a 42°C, produção de alginato e produção de pigmento.

#### **4.6-TESTES DE SUSCETIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS**

O método de difusão de discos em ágar foi realizado segundo Kirby & Bauer (1966), e descrito pelo “National Commite for Clinical Standards” (NCCLS, 2003), atualmente denominado “Clinical and Laboratory Standard Institute” (CLSI), responsável por estabelecer os critérios e a padronização de “breakpoints” para os diferentes antimicrobianos.

Uma suspensão bacteriana contendo  $10^6$  UFC/mL em caldo Mueller-Hinton (MH) incubado a 37°C por 6 horas, foi semeada com o auxílio de um suabe estéril. A semeadura realizada era contínua em três a quatro direções (horizontal, vertical e diagonal), de forma a obter um crescimento uniforme em toda superfície da placa de ágar Mueller-Hinton. Passados aproximadamente 15 minutos, os discos de antimicrobianos foram depositados e levemente comprimidos sobre o ágar com o auxílio de uma pinça esterilizada e incubados a 35°C por 18-24 horas. Após este período, com o auxílio de um paquímetro, foram medidos os diâmetros dos halos de inibição (em mm) do crescimento bacteriano presentes ao redor dos discos de antimicrobianos e comparados aos valores de referência fornecidos pelo NCCLS.

Os antibióticos utilizados foram escolhidos com base em dados da literatura: ciprofloxacina, meropenem, gentamicina, polimixina B, piperacilina + tazobactam e cefepima.

#### 4.7- EXTRAÇÃO DE DNA:

O DNA bacteriano, de todos os isolados, foi extraído segundo a técnica proposta por KESKIMAKI et al. (2001), onde a colônia isolada de *P. aeruginosa* foi semeada por 12 horas em um tubo de ensaio contendo 1 mL de meio BHI (Brain Heart Infusion), depois transferida para um tubo eppendorf e centrifugado a 14.000 rpm para a sedimentação das células e descarte do sobrenadante. As células sedimentadas foram ressuspensas em 250µL de água Millique estéril e agitada em vortex por 30 segundos. A cultura bacteriana foi novamente sedimentada e repetido o processo de lavagem. Após duas lavagens com água ultra-pura, o tubo eppendorf contendo as células bacterianas foi colocado por 10 minutos na água fervente (100° C). Após esse tempo, os sedimentos dos debris celulares foram sedimentados através de centrifugação a 14.000 rpm durante 30 segundos. Do tubo foi retirado uma alíquota de 150µL do sobrenadante fervido e transferida para outro tubo eppendorf. Em seguida esse material foi estocado em freezer a -20° C até o momento de uso.

#### 4.8- ERIC-PCR

A técnica de ERIC-PCR foi realizada em 76 isolados de *P. aeruginosa*. O DNA genômico foi amplificado por PCR (39 ciclos de 94°C por 1 minuto, 50°C por 1 minuto, 72°C por 2 minutos, com extensão final de 72°C por 10 minutos), utilizando como iniciadores as sequências ERIC 1 (5'- ATGTA ACTCTGGGGATTAC-3') e ERIC2 (5'- TAAGTGACTGGGGTGAGCG-3') descritos por VERSALOVIC et al. (1991).

O produto da reação amplificado foi observado em gel de eletroforese contendo 10 µL do produto de PCR e 1,5% de gel de agarose. Foi utilizado o marcador molecular Gene Ruler 1 Kb DNA Ladder ≠ SM0311/2/3 (Fermentas). A matriz de similaridade foi construída através do programa Freetree (versão 0.9.1.50) e a árvore foi obtida e visualizada pelo programa Tree View (versão 1.30).

#### 4.9- MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA:

Foram utilizados fragmentos das linhas d'água de equipos odontológicos de aproximadamente 10 mm de comprimento retiradas da extremidade proximal da seringa tríplice e alta rotação e como controle um fragmento de 10 mm de tubulação sem uso, acondicionadas em tubos *Eppendorf* (1.5 ml) para fixação em Glutaraldeído a 3% por 48 horas, em seguida procedeu-se a lavagem em solução tampão para remover o excesso do glutaraldeído. Na pós fixação foi utilizado teróxido de ósmio a

3% overnight. A desidratação dos fragmentos foi através de série crescente de álcoois, 30%; 50%; 70%; 80%; 90% com intervalo de 20 minutos, finalizando com desidratação de alcool 100% nuama série de 3 vezes com intervalo de 20 minutos (SANTOS, 1992).

A secagem das amostras foi realizada em secador de ponto crítico e na metaliza o dos fragmentos foi utilizado ouro 1000 por 120 segundos.

#### **4.10- ANALISE ESTATÍSTICA:**

A compara o da eficiência entre as duas técnicas para o isolamento de *P. aeruginosa* foi realizada pelo teste Qui-quadrado ( $\chi^2$ ).

## V- RESULTADOS

Das 180 amostras de água de consultórios odontológicos analisadas, durante o período de outubro de 2008 a maio de 2009, 76 (42,2%) isolados foram positivos para *P. aeruginosa*.

Dos 14 consultórios pertencentes a convênios, 11 utilizavam água filtrada e 3 utilizavam água da torneira da rede de abastecimento municipal. Os 16 consultórios do sistema único de saúde utilizavam água da torneira proveniente da rede de abastecimento municipal e 1 utilizava água filtrada. Os 14 consultórios particulares utilizavam água filtrada e todos utilizavam reservatório do tipo garrafa Pet de 500 mL.

Em relação ao tempo de uso dos consultórios, 21 (46,7%) tinham menos de cinco anos de uso e 24 (53,3%) mais de cinco anos.

De acordo com a procedência das amostras 15 isolados eram provenientes de amostras água de torneira de lavagem das mãos, 18 das amostras de água do reservatório para equipos (de garrafa PET), 23 de água de seringa tríplice e 20 de água de motor de alta rotação (Tabela 1).

**TABELA 1** Contagem total de *P. aeruginosa* em UFC/mL isolados em agar cetrimida das amostras de água dos 45 consultórios odontológicos de Barretos-SP, durante o período de outubro de 2008 a maio de 2009.

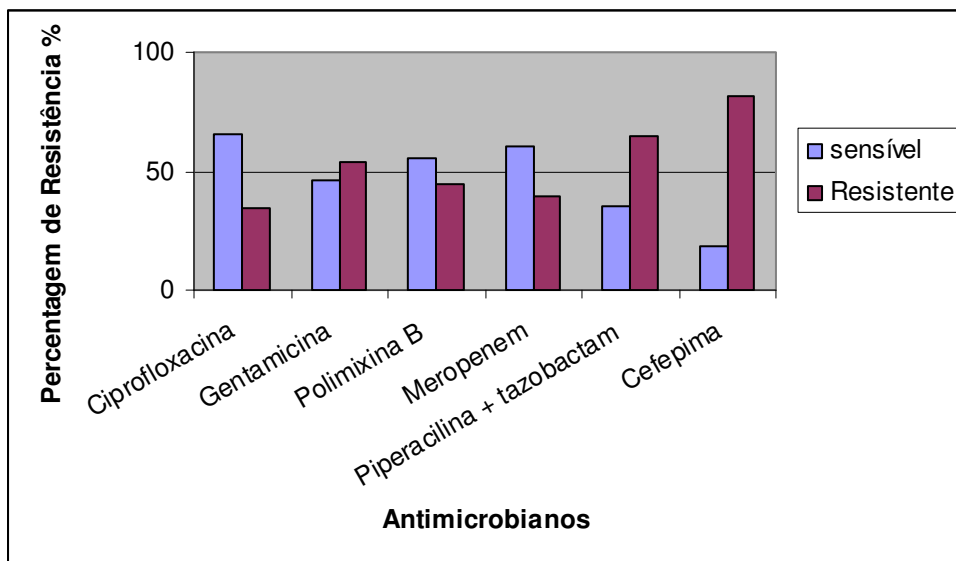
<b>Níveis de contaminação em UFC/mL</b>			
<b>Local de coletas</b>	<b>0 - 200</b>	<b>201 - 2000</b>	<b>Total</b>
Torneira	15	25	45
Reservatório	18	27	45
Seringa tríplice	7	38	45
Alta rotação	13	32	40

Em relação à contagem de isolados para *P. aeruginosa* em UFC/mL, das amostras de água dos 14 consultórios particulares foi encontrado 57,1% das amostras de torneiras de lavagem das mãos estavam acima das 200 UFC/mL recomendado pela ADA (American Dental Association), assim como, 50,0% dos reservatórios de água, 78,6% das seringas tríplice e 64,3% de motor alta rotação. Dos 14 consultórios de convênios foram encontradas 42,9% das amostras de torneiras de lavagem das mãos, 50,0% dos reservatórios, 85,7% das seringas tríplice e 64,3% de motor de alta rotação acima das 200 UFC/mL. As amostras dos 17 consultórios do sistema único de saúde estavam acima das 200 UFC/mL, 76,5% das torneiras de lavagem das mãos, 76,5% dos reservatórios, 88,2% das seringas tríplice e 82,4% de motor de alta rotação (Tabela 2).

**TABELA 2:** Origem e porcentagem de amostras de água colhidas nos 45 consultórios odontológicos de Barretos-SP, durante o período de outubro de 2008 a maio de 2009.

<b>Origem das amostras</b>	<b>amostras</b>	<b>contaminadas</b>	<b>Número Total de</b>
		<b>%</b>	<b>Consultórios</b>
Torneira:			45
Particulares		57,1	14
Convênios		42,9	14
UBS		76,5	17
Reservatório:			45
Particulares		50,0	14
Convênios		50,0	14
UBS		76,5	17
Seringa tríplice:			45
Particulares		78,6	14
Convênios		85,7	14
UBS		88,2	17
Alta rotação:			45
Particulares		64,3	14
Convênios		64,3	14
UBS		82,4	17

O Gráfico 1 mostra os resultados dos testes de antibiograma com os isolados de *P. aeruginosa* frente aos nove antibióticos testados. O antibiótico ciprofloxacina foi o que apresentou melhor resultado com 65,9.% das cepas testadas sensíveis.



Perfil de sensibilidade e resistência aos antimicrobianos de cepas de *P. aeruginosa* isoladas de 45 consultórios odontológicos de Barretos-SP, durante o período de outubro de 2008 a julho de 2009.

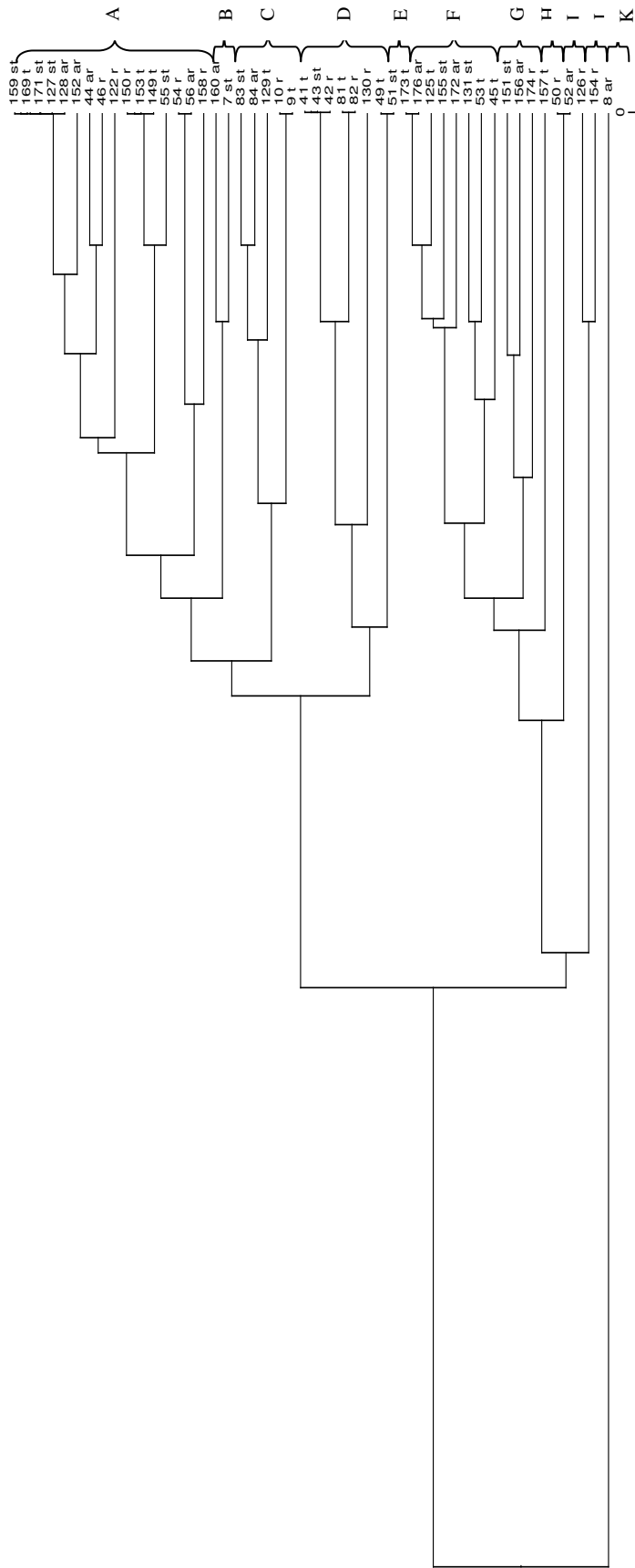
A Tabela 3 mostra os resultados do nível de resistência desses isolados frente aos antimicrobianos utilizados.

**Tabela 3** Nível de resistência, frente aos antimicrobianos utilizados no estudo, de isolados de *Pseudomonas aeruginosa* de amostras de água colhidas nos 45 consultórios odontológicos de Barretos-SP, durante o período de outubro de 2008 a maio de 2009.

Resistência	Torneira	Reservatório	Seringa tríplice	Motor de alta rotação
	N°/%	N°/%	N°/%	N°/%
1 princípio ativo	2/2,8	3/4,2	-	2/2,8
2 princípios ativos	2/2,8	4/5,3	1/1,3	1/1,3
3 princípios ativos	3/4,2	4/5,3	6/7,9	4/5,3
4 princípios ativos	3/4,2	6/7,9	8/10,5	9/11,8
5 princípios ativos	3/4,2	6/7,9	4/5,3	-
6 princípios ativos	1/1,3	1/1,3	2/2,8	4/5,3



A figura 3 apresenta o dendograma de similaridade gerado dos 59 isolados de *P. aeruginosa* que apresentaram multirresistência aos diferentes antimicrobianos utilizados.



**FIGURA 3** Dendograma comparando os produtos da PCR dos isolados multirresistentes de *Pseudomonas aeruginosa* (amostras de DNA amplificado na presença dos primers ERIC 1 e ERIC 2) isoladas de água de consultórios odontológicos da cidade de Barretos - SP-Brasil, pelo método UPGMA, usando o índice Dice.

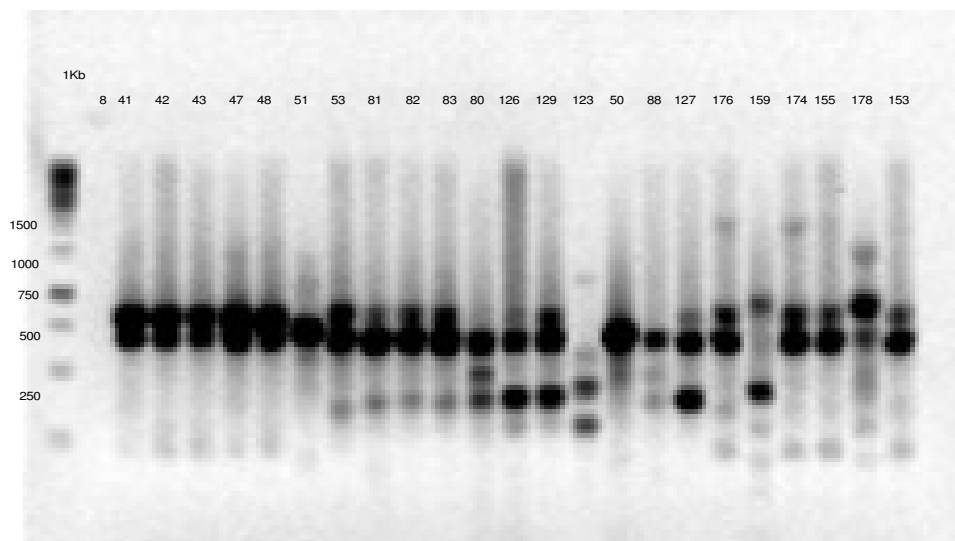
No cluster A encontramos 16 isolados sendo que no consultório n° 43 os isolados de torneira e seringa tríplice apresentaram 100% de similaridade em relação aos isolados da seringa tríplice e caneta de alta rotação do consultório n° 32, que se encontra a algumas quadras de distância. Esse fato nos leva a crer, que neste caso, a possível fonte de disseminação clonal seja a rede de distribuição de água desta região, que se localiza no centro da cidade. As amostras de torneira e reservatório do consultório n° 38 apresentaram 100% de similaridade genética com as amostras de torneira do consultório n° 39, estas se encontravam no mesmo prédio e os consultórios compartilham a mesma caixa de água, podendo ser o biofilme-linha d'água a fonte de disseminação clonal. No cluster B, duas amostras, uma de caneta de alta rotação do consultório n° 40 e uma de seringa tríplice do consultório n° 2, apresentaram 85% de similaridade genética.

No cluster C, foram encontrados cinco isolados, desses um de torneira e um de reservatório do consultório n° 3 apresentaram 100% de similaridade genética. No consultório 21 os isolados de seringa tríplice e alta rotação apresentaram 91% de similaridade genética entre si. No cluster D, isolados de torneira, reservatório e seringa tríplice do consultório n° 11 apresentaram 100% de similaridade, e isolados de torneira e reservatório do consultório n° 21 apresentaram 100% de similaridade genética.

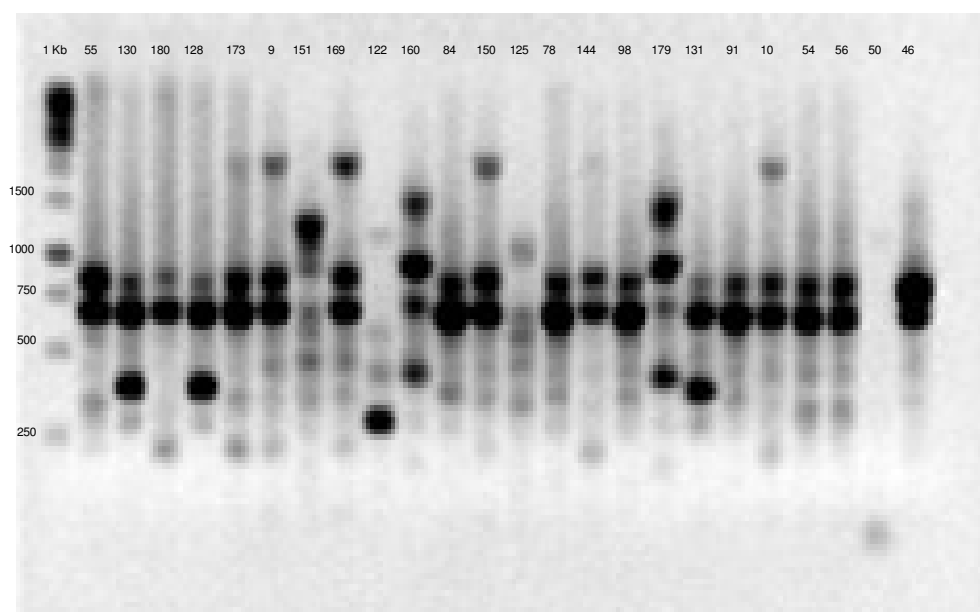
Os isolados do Cluster E de torneira e seringa tríplice do consultório n° 13 apresentaram 100% de similaridade genética. No Cluster F os isolados de oito pontos de coleta apresentaram 72% de similaridade genética sendo que nas amostras de torneira e alta rotação do consultório n° 44, estas apresentaram 100% de similaridade. No Cluster G, dos três isolados, um era de seringa tríplice do consultório n° 38 e um do consultório n° 39, e esses apresentaram 85% de similaridade. Os dois consultórios se situam no mesmo prédio.

Em relação ao Cluster I, os isolados de reservatório e caneta de alta rotação do consultório n° 13 apresentaram 100% de similaridade. No Cluster J, duas amostras de reservatório do consultório n° 32 e reservatório do consultório n° 39 apresentaram 85% de similaridade genética.

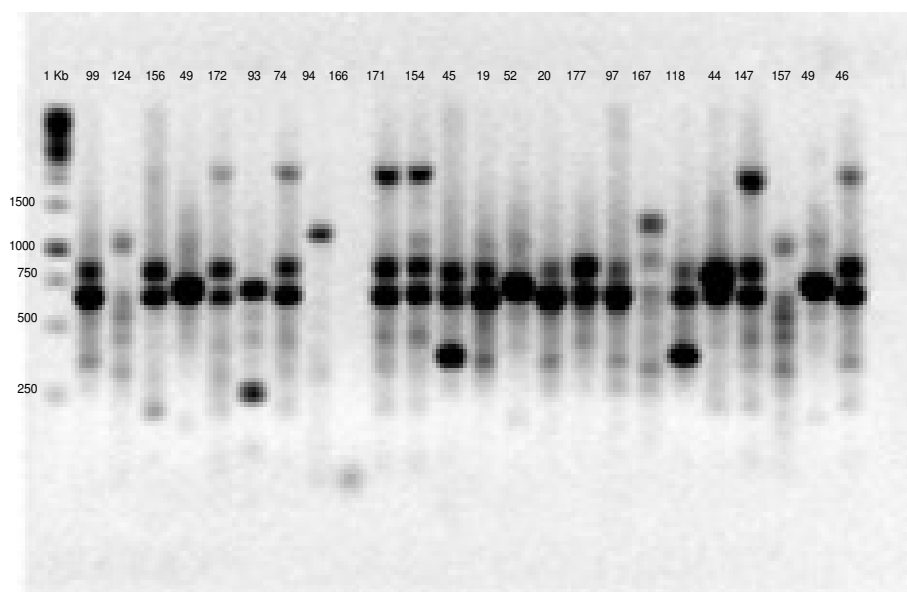
As figuras 4, 5 e 6 nos apresentam a eletroforese do gel de agarose 1,5% de produto de PCR, onde podemos observar as bandas formadas pelo ERIC de todos os genes pesquisados dos isolados de *Pseudomonas aeruginosa*.



**Figura 4** Eletroforese de gel de agarose 1,5% de produto de ERIC-PCR na presença dos primers ERIC 1 e ERIC 2, utilizando o marcador de Gene Ruller 1KbDNA Ladder ≠ SM0311/2/3 - Fermentas.

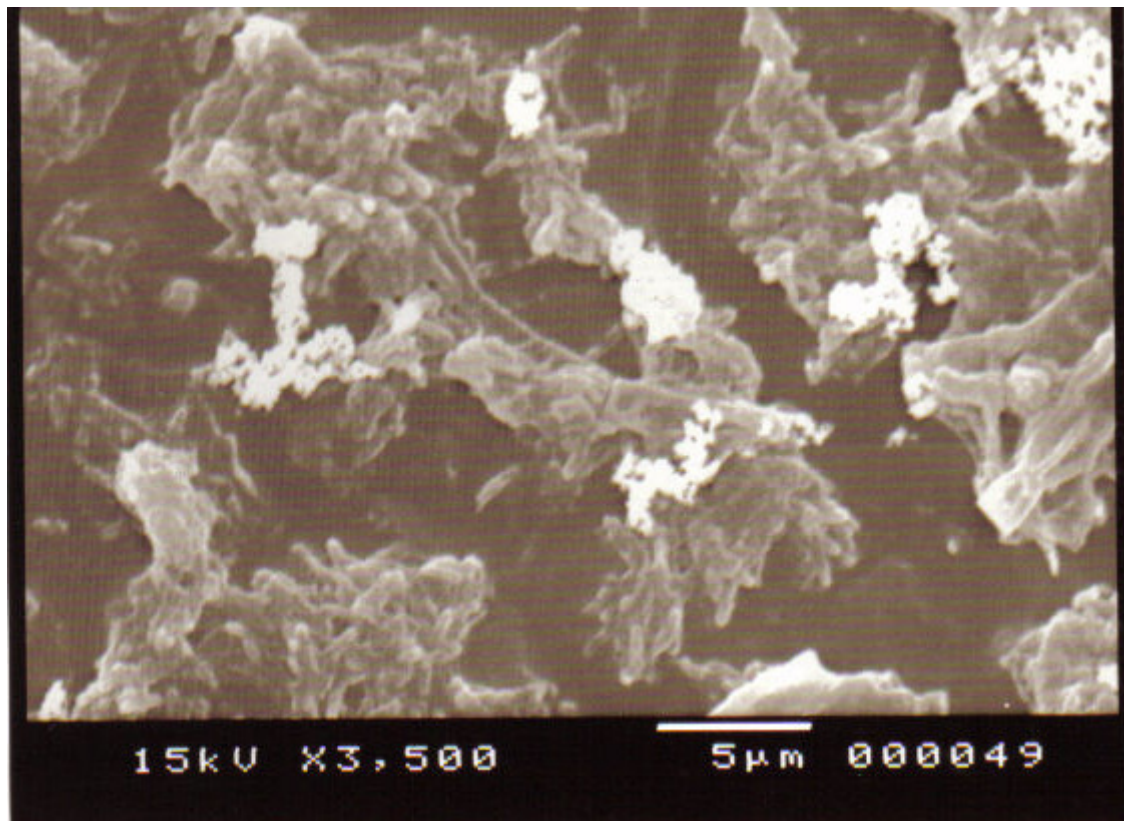


**Figura 5** Eletroforese de gel de agarose 1,5% de produto de ERIC-PCR na presença dos primers ERIC 1 e ERIC 2, utilizando o marcador de Gene Ruller 1KbDNA Ladder ≠ SM0311/2/3 - Fermentas.



**Figura 6** Eletroforese de gel de agarose 1,5% de produto de ERIC-PCR na presença dos primers ERIC 1 e ERIC 2, utilizando o marcador de Gene Ruller 1KbDNA Ladder ≠ SM0311/2/3 - Fermentas.

A figura 7 nos apresenta a microscopia eletrônica de varredura de amostras das linhas d'água de equipamentos odontológicos.



**Figura 7:** Eletromicrografia das linhas d'água de equipamento odontológico. matrizes densas e extensas de substâncias poliméricas extracelulares.

## VI- DISCUSSÃO

No Reino Unido, BLAKE (1963), um cirurgião dentista, foi o primeiro a relatar a existência de elevados níveis de bactérias na água que refrigerava o motor de alta rotação.

A relação de uma infecção sistêmica com tratamento odontológico é difícil, devido à falta de uma conexão óbvia entre o período variável de incubação das doenças e a inexistência de programas de vigilância que registrem complicações pós-operatórias (MILLS, 2003).

Conforme preconiza a ADA (American Dental Association) o nível de contaminação das águas de equipos odontológicos não deve exceder a 200 UFC/mL. No presente trabalho, mais de 42,2% das amostras de água estudadas, das diferentes procedências, estavam acima deste padrão.

Quanto ao tempo de uso dos equipamentos odontológicos, variam de recém instalados (WILLIAMS et al., 1995); um ano (SHEPHERD e FRENCH, 2001); cinco anos (SMITH et al., 2002); 10 anos (FIEHN & LARSEN, 2002), 20 anos (MARAIS & BRÖZEL, 1999), neste estudo o tempo de uso dos equipos variaram de 6 meses a 15 anos.

Diversos métodos e meios de cultura podem ser empregados para avaliações da contaminação dessas águas, tais como: semeadura das amostras em profundidade (*pour plate*), método utilizado para contagem de bactérias aeróbias totais em *Plate Count agar* (NOCE, et al., 2000; SOUZA-GUGELMIM et al., 2003), semeaduras na superfície de ágar sangue (CARDOSO et al., 1999), agar simples (CARDOSO et al., 1999), R2A agar (BARBEAU et al., 1996 e OLIVEIRA ET. al., 2008), *Brain Heart Infusion* suplementado com vitamina K e hemina (PREVOUST et al., 1995), *Trypcase Soy Agar* (CHIBEBE et al., 2002; COBB et.al., 2002), *Tryptose Blood Ágar* suplementado com extrato de levedura (WHITEHOUSE et al., 1991), emprego da membrana filtrante (KETERING et al., 2002; PORTEOUS et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2008)

WATANABE (2003) usando a técnica de Petri-Film, relatou que o número de bactérias mesófilas totais encontradas em uma amostra de água

proveniente de motor de alta rotação foi de  $6,1 \times 10^8$  UFC/mL e de seringa tríplice com  $8,1 \times 10^7$  UFC/mL. Outros autores, como WALKER et al. (2000) relataram contagens menores ( $2,9 \times 10^3$  UFC/mL), BARBEAU et al. (1996)  $1,1 \times 10^5$  UFC/mL pela técnica de diluição decimal e SOUSA-GUGELMIM et al (2003) até  $3,0 \times 10^5$  UFC/mL pela técnica de diluição em APHA. Neste trabalho realizado pelo método de filtração em Millipore<sup>®</sup>, em ágar Cetrimida a contagem foi superior a  $2,0 \times 10^3$  UFC/mL de isolados de *Pseudomonas aeruginosa*.

A adição de tiosulfato de sódio nas amostras coletadas é de fundamental importância para inativar o cloro residual (NOCE et al., 2000), Em todas as amostras de água deste trabalho foram adicionados 0,5 mL de tiosulfato de sódio, na concentração final de 10mg/L (APHA-AWWA-WEF, 1999)

Em relação ao tempo de *flush*, na literatura variam de um a 20 minutos: um minuto (PUTNINS et al., 2001), dois minutos ( NOCE et al., 2000; BARBEAU & BUHLER, 2001), cinco minutos ( PUTNINS et al., 2001), 10 minutos (PUTININS et al., 2001) 15 minutos (SCHEID et al., 1990), 20 minutos (WHITEHOUSE et al., 1991). Neste estudo, as coletas dos equipos foram realizados após o procedimento de *flush* contínuo. Para seringa tríplice foram realizados *flush* de dois minutos e para as canetas de alta rotação o *flush* foi de um minuto, essa diferença é devido ao fluxo de água ser maior na caneta de alta rotação em relação a seringa tríplice . Uma vez que *flush* é o sistema contínuo de lavagem com água.

WATANABE (2003) não encontrou *P. aeruginosa* em água de equipos odontológicos. Em 2007, esse mesmo autor relatou a presença de *P. aeruginosa* em apenas uma amostra de água de motor de alta rotação, em discordância com este trabalho no qual se isolou de 20 diferentes pontos de motor de alta rotação, enquanto que O'DONNEL et al (2005) encontraram uma prevalência de 43,0% das amostras contaminadas pela bactéria, OLIVEIRA et al (2008) isolaram 44,4% e neste trabalho a frequência de isolados foi de 42,2%, havendo, pois, uma ligeira diminuição, uma vez que a pesquisa foi realizada na mesma cidade de Barretos/SP.



KOHNO et al (2004), verificaram que apesar da água de abastecimento de reservatório apresentar excelente qualidade, a coleta a partir de seringas tríplice e canetas de alta rotação, excederam em mais de cinco vezes a contaminação tolerada para o consumo humano em concordância com este trabalho.

No ano de 2005, entre os meses de janeiro a junho, foi realizado um estudo da água de 40 consultórios odontológicos da cidade de Barretos-SP em que no Sistema Único de Saúde e alguns consultórios de Convênios foram encontrados reservatórios de água que ficavam sobre o chão que, devido a sua estrutura, impossibilitava a sua higienização (OLIVEIRA et al., 2008). No presente trabalho, realizado entre os meses de outubro de 2008 a maio de 2009 todos os consultórios estudados na cidade de Barretos-SP utilizavam reservatórios do tipo garrafa Pet, pois foi realizada a troca destes equipamentos antigos por equipamentos novos. Na comparação dos resultados entre o nível de contaminação das águas entre os dois trabalhos, não foram encontradas diferenças entre os diversos modelos de equipos odontológicos estudados, independente se esses sistemas eram de garrafa Pet, tanques ou se vinham direto da rede de abastecimento municipal de água, este resultado foi bastante semelhante ao encontrado por WALKER et al.(2000), entretanto, no presente trabalho foram investigados apenas reservatórios do tipo Pet.

Este fato leva a crer que o biofilme, formado na parede interna das mangueiras de água do equipo, seja a causa da contaminação da seringa tríplice (84,0%) e caneta de alta rotação (71,0%), visto que a água utilizada era potável, confirmando os dados relatados por WILLIAMS et al. (1994).

TALL et al. (1995) tentaram solucionar o problema da contaminação da linha d' água substituindo as mangueiras de equipos para monitorar a dinâmica da formação do biofilme constatando que em oito horas já se observava colonização bacteriana. BARBEAU et al. (1996) verificaram que, menos de uma semana após a instalação de equipos novos na Universidade de Montreal, a água afluyente de equipos já apresentava contaminação superior a  $2,0 \times 10^5$  ufc/mL.

O biofilme é uma matriz complexa, na qual uma variedade de comunidades bacterianas pode coexistir em cooperação, estruturadas em

matriz sólida, com ramificação de canais, por onde circula a água (COSTERTON & WILSON, 2004). O biofilme é formado com o passar do tempo nas tubulações, a partir de polímeros extracelulares excretados por uma variedade de bactérias, compondo uma camada orgânica na qual bactérias, algas, protozoários e compostos orgânicos e inorgânicos convivem ( ARMON et al., 1997).

WATANABE (2007) utilizando a técnica de MEV (Microscopia Eletrônica de Varredura) visualizou a presença da formação de biofilme no interior das tubulações de alimentação de água de equipo odontológico o que também foi observado neste trabalho utilizando a mesma técnica.

A resistência intrínseca de *P. aeruginosa* aos antimicrobianos é bem conhecida, mas o aparecimento de novos mecanismos de resistência a antimicrobianos anti-*Pseudomonas* é considerado alarmante. OIE et al. (1999) avaliaram os efeitos *in vitro* de várias combinações de cinco tipos de antibióticos usados no tratamento de infecções por *P. aeruginosa*: piperacilina, meropenem, ceftazidima, astreonam e amicacina, na combinação de três tipos de  $\beta$ -lactâmicos tiveram um resultado melhor do que quando utilizado dois ou apenas um antibiótico. Esses mesmos autores em 2003 no tratamento de infecções causadas por *P. aeruginosa* multi-resistentes, combinaram os antibióticos ciprofloxacina, meropenem, piperacilina, aztreonam, ticarcilina + ácido clavulônico e ceftazidima, o melhor resultado foi a combinação ciprofloxacina + aztreonam + amikacina. SCHEFFER (2008) relatou em seu estudo que as amostras de *P. aeruginosa* resistentes aos carbapenêmicos apresentaram 96,7% de sensibilidade para piperacilina/tazobactam. Kiffer e colaboradores descreveram uma taxa de suscetibilidade a piperacilina/tazobactam de 63,8% (KIFFER et al., 2005).em discordância com este trabalho em que foram encontrados 35,5% de sensibilidade a este antimicrobiano.

ZELENITZK et al. (2003) concluíram em seu trabalho utilizando antibióticos aminoglicosídeos, ciprofloxacina, piperacilina, e ceftazidima que a combinação entre aminoglicosídeos + ciprofloxacina tiveram melhor resultado. OLIVEIRA et al (2008) trabalhando com os antibióticos ciprofloxacina, meropenem, piperacilina, aztreonam, ticarcilina + ácido clavulônico e

ceftazidima relataram que o melhor resultado entre os fármacos utilizados foi a ciprofloxacina com 51,0% das amostras sensíveis, enquanto no presente trabalho, o resultado foi bem mais elevado com 65,8% dos isolados sensíveis a este fármaco e bem próximo do percentual de 68,4% encontrado por ZAMBRANO (2004).

Quanto a diversidade genômica dos isolados, os resultados encontrados mostram que existe uma similaridade genética em 59 isolados e, portanto, foi encontrado uma disseminação clonal de *P. aeruginosa* nos diferentes pontos analisados. Foram encontrados nove “clusters” com 100% de similaridade, devendo-se destacar que a maioria desses isolados apresentaram multirresistência aos antimicrobianos utilizados. Foram encontrados clones nos isolados de torneira de lavagem das mãos, nos de reservatórios, nos de seringas tríplice e nos de alta rotação. HEO *et al* (2008) realizaram estudo em estirpes de *P. aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Acinetobacter* spp isolados de biofilme dental e lavado broncoalveolar de pacientes de UTI e observaram similaridade superior a 95,0% através da técnica ECP. VAN DAELE *et al*. (2006) encontraram 75,0% de similaridade genética em pacientes portadores de fibrose cística colonizado por *P. aeruginosa* e SCHELSTRAETE *et al*. (2008) observaram 72,0% de similaridade genética entre isolados deste patógeno de pacientes fibrocísticos e o ambiente em que vivem utilizando a técnica de ERIC-PCR.

## VII- CONCLUSÃO:

A fonte de contaminação da água da seringa tríplice e caneta de alta rotação pode ser em função da presença de *Pseudomonas aeruginosa* no biofilme formado na tubulação de água.

A determinação da contagem de *Pseudomonas* spp na água, pelo método de filtração em Millipore®, mostrou que 68% não atenderam ao padrão de potabilidade estabelecidos pela American Dental Association.

Dos antibióticos testados nos testes de suscetibilidade a ciprofloxacina foi o que apresentou a melhor sensibilidade.

Foram encontrados 9 clusters de 100% de similaridade genética em amostras multirresistentes.

A análise por Microscopia Eletrônica de Varredura do biofilme formado nas linhas d'água mostrou uma diversidade microbiana embutida densas e extensa de polissacarídeos extracelulares.

Diante de tais fatos, sugere-se que aos órgãos competentes pelo exercício da odontologia, adotarem medidas de controle de contaminação da água do consultório odontológico e que novos estudos devem ser realizados para solucionar o problema biofilme-linha d'água para garantir melhores condições de segurança aos dentistas, auxiliares e pacientes.

### VIII- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

AMERICAN DENTAL ASSOCIATION. Council on Scientific Affairs and ADA council on dental practice. Infection control recommendations in the dental office. **J. Am. Dent. Assoc.**, v.127, n.5, p.672-680, 1996.

ADA Council on Scientific Affairs. Dental unit waterlines: approaching the year 2000. **J. Am. Dent. Assoc., Chicago**, v. 130, n. 11, p. 653-664, Nov. 1999.

AMARAL LA. Controle da Qualidade microbiológica da água utilizada em avicultura. In: MACARI M. (Ed.). Água na avicultura industrial. Jaboticabal: Funep 1996. p. 93-117.

APHA-AWWA-WEF, STANDARD METHODS FOR EXAMINATION OF WATER AND WASTEWATER. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environ. Fed. 20th Edition, 9.29-9.30, 1998.

ARMON R; STAROSVETZKY, J.; ARBEL, T.; GREEN, M. Survival of *Legionella pneumophila* and *Salmonella Typhimurium* in biofilms systems. *Water Science Technology*, Kindlington, v. 35, n. 11-12, p. 293-300, 1997.

BANNING N, TOZE S, MEE BJ. Persistence of biofilm-associated *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* in groundwater and treated effluent in a laboratory model system. **Microbiology**, v. 149, p. 47-55, 2003.

BARBEAU, J.; TANGUAY, R.; FAUCHER, E.; AVEZARD, C.; TRUDEL, L.; CÔTÉ, L.; PRÉVOST, A. P. 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**, v. 152, p. 753-760, 2001.

BLAKE, G. C. The incidence and control of bacterial infection in dental spray reservoirs. **Braz. Dent. J.**, Ribeirão Preto, v. 115, p. 413-446, 1963.

BLOT, S.; VANDEWOUDE, E.; HOSTE, E.; COLARDYN, F. Reappraisal of attributable mortality in critically ill patients with nosocomial bacteremia involving *Pseudomonas aeruginosa*. **J. Hosp. Inf.**, v. 53, p. 18-24 Nov 2002.

BRETT M, ELLIS PEGLER R. Surveillance of antimicrobial resistance in New Zealand. **N Z Pub Health report**, v. 8, p 17-24, 2001.

BRITO D V D; OLIVEIRA E J; DARINI A L C; ABDALLAH V O S; GONTIJO P P F, Nosocomial Outbreaks Due To *Pseudomonas Aeruginosa* And *Acinetobacter Baumannii* In A Neonatal Intensive Care Unit (Nicu) Of The Uberlândia Federal University Hospital, **Brazilian Journal of Microbiology**, n. 34 (Suppl.1), p. 27-28, 2003.

CARDOSO, O. *et al.* Carbapenem-hidrolozing from clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in Portugal. **J. Antimicrob. Chemother**, n. 44, p. 135-8, 1999.

CHIBEBE P. C. A; UENO, M.; PALLOS, D. Biossegurança: Avaliação da Contaminação Da Água De Equipamentos Odontológicos. **Rev. biociênc., Taubaté**, v.8, n.1, p.53-59, jan.-jun.2002.

COBB, C. M.; MARTEL, C. R.; MCKNIGHT, S. A.; PASLEY-MOWRY C.; FERGUSON, B. L.; WILLIAMS K. How does time-dependent dental unit waterline flushing affect planktonic bacteria levels? **J Dent Educ**, v. 66, p. 549-555, 2002.

COSTA, MM; SILVA, MS; SPRICIGO, DA; WITT, NM; MARCHIORO, SB; KOLLING, L.; VARGAS, APC. Caracterização epidemiológica, molecular e perfil de resistência aos antimicrobianos de *Escherichia coli* isoladas de criatórios suínos do sul do Brasil. **Pesq Vet Bras** n.26, p.5-8, 2006.

COSTERTON, W. J.; WILSON, M. Introducing biofilms. **Biofilms**, Cambridge, v. 1, p. 1-4, 2004.

DAVEY, M. E.; TOOLE, G A. O. Microbial Biofilms: from Ecology to Molecular Genetics. Vol. 64, n. 4, p. 847–867, 2000.

DE VOS D, LIMA JR A, PIRNAY JP, DUINSLAEGER L, REVETS H, VANDERKELEN A, HAMERS R, CORNELIS P. Analysis of epidemic *Pseudomonas aeruginosa* isolates by isoelectric focusing of pyoverdine and RAPD-PCR: modern tools for an integrated anti-nosocomial infection strategy in burn wound centers. **Burns**, n. 23, p. 379-386, 1997.

DONABEDIAN, H. *Quorum sensing* and its relevance to infectious diseases. **Journal of Infection**, v.46, p.207-14, 2003.

GALES, A. C.; MENEZES, L. C.; SILBERT, S.; SADER, H. S. Dissemination in distinct Brazilian regions of an epidemic carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM metallo- $\beta$ -lactamase. **J Antimicrobio Chemother**, v. 52, p. 699-702, 2003.

GILLIGAN, P. H. Microbiology of airway disease in patients with cystic fibrosis. **Clin Microbiol Rev**; v. 4, n. 1,p.35-51, 1991.

GUERRA NMM; OTÊNIO MH ; SILVA MEZ ; GUILHERMETTI M ; NAKAMURATU; MAKAMURA CV ; DIAS FILHO, BP . Ocorrência de *Pseudomonas aeruginosa* em água potável. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 28, p. 13-18, 2006.

GOERING, R.V. Molecular epidemiology of nosocomial infection: analyses of chromosomal restriction fragments patterns by pulsed-field gel eletrophoresis. **Infect Control Hosp Epidemiol**, v. 14, p. 595-600, 1993.

GOSNEY, M. A.; PRESTON, A. J; CORKHILL, J.; MILLS, B.; MARTIN, M. V. *Pseudomonas aeruginosa* septicaemia from an oral source. **Br Dent J**. v. 187, n.12 p.639-40, Dec.1999.

HEAD, N.E, YU, H. Cross-Sectional Analysis of Clinical and Environmental Isolates of *Pseudomonas aeruginosa*: Biofilm Formation, Virulence, and Genome Diversity. **Infection and Immunity**. vol. 72, n. 1, p 133-144, Jan 2004.

HEO, SM Genetic Relationships between Respiratory Patogens Isolated from dental plaque and bronchoalveolar lavage fluid from patients in the Intensive Care Unit undergoing mechanical ventilation. **Clinical Infectious Disease**, n 47, p 1562-1570, 2008.

FIEHN, N. E.; LARSEN, T. The effect of drying de. **Int. Dent. J.**, Dental unit waterline biofilms on the bacterial load of dental unit water. London, v. 52, n. 4, p. 251-254, Aug. 2002.

JAFFAR-BANDJEE, M. C.; LAZDUNSKI, A.; BALLY, M.; CARRERE, J.; CHAZLETTE, J. P.; GALABERT, C. Production of elastase, exotoxin A, and alkaline protease in sputa during pulmonary exacerbation of cystic fibrosis in patients chronically infected by *Pseudomonas aeruginosa*. **J Clin Microbiol**, v. 33, p. 924-929, 1995.

JUHAS M, EBERL L & TUMMLER B Quorum sensing: the power of cooperation in the world of *Pseudomonas*. **Environ Microbiol** v.7, p. 459–471, 2005.

KETTERING, J. D.; STEPHENS, J. A.; MUNOZ-VIVEROS, C, A.; NAYLOR, W. P. *Pseudomonas aeruginosa* causing a right carotid artery mycotic aneurysm after a dental extraction procedure. **Mayo Clinic Proc.**,v.77, n.10, p.1125-30, Oct 2002.

KESKIMAKI, M.; MATTILA, L.; PELTOLA, H.; SIITONEN, A. EPEC, EAC and STEC in stool specimens: Prevalence and molecular epidemiology of isolates. **Diag Microbiol Infect Dis**. n.40, p. 151-156, 2001.

KIEVIT TR, Quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **Environmental microbiology** v.11, n. 2, p279-88, 2009.



KIFFER C, HSIUNG A, OPLUSTIL C et al - Antimicrobial susceptibility of Gram-negative bacteria in Brazilian hospitals: the MYSTYC Program Brazil 2003. **Braz J Infect Dis**; v. 9, p. 216-224, 2005.

KOHNO S, KAWATA T, KAKU M, FUITA T, TSUTSUI K, OHTANI J, TENJO K, MOTOKAWA M, TOHMA Y, SHIGEKAWA M, KAMATA H, TANNE K. Bactericidal effects of acidic electrolyzed water on the dental unit waterline. **Jpn J Infect Dis**. n. 57, vol. 2, p. 52-4, Apr 2004.

KONEMAN, E.W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; SCHRECKENBERGER, P. C.; WINN JR, W. C. - *Diagnóstico Microbiológico: texto e atlas colorido*. 5. ed. Guanabara Koogan : Rio de Janeiro, 2007.

LYCZAH, B. J.; CANNON, C. L.; PIER, G. B. Establishment of *Pseudomonas aeruginosa* infection: lessons from a versatile opportunist. **Mic. and Inf.**, Boston, v. 2, n. 9, p. 1051-1060 Oct 2000.

LI, X; NIKAIDO, H.; POOLE, K. Role of MexA-MexB-OprM in antibiotic efflux in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 39, p. 1948-1953, 1995.

LIPMAN, LJA; NIJS, A; LAM, TJG M.; GASTRA, W. Identification of *Escherichia coli* strains from cows with clinical mastitis by serotyping and DNA polymorphism patterns with REP and ERIC primers. **Vet Microbiol**. n. 43, p.13-19, 1995.

LUCCHESI, E. G., Desenvolvimento de sistema de obtenção de biofilmes in vitro e a avaliação de sua susceptibilidade a biocidas. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia), UNICAMP, Campinas, 2006.

MAGALHÃES, V; LINS A. K.; MAGALHÃES M. Metallo-B-Lactamase Producing *Pseudomonas Aeruginosa* Strains Isolated In Hospitals In Recife, Pe, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology** n. 36, p. 123-125, 2005.

MAI, G.T., MCCORMACK, J. G., SEOW, W. K., PIER, G. B., JACKSON, L. A., THONG, Y. H. Inhibition of adherence of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* by alginase, specific monoclonal antibodies, and antibiotics. **Infect Immun**; n. 61, v.10, p 4338-43, 1993.

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.

MAURER, J. J.; LEE, M. D.; LOBSINGER, C.; BROWN, T.; MAIER, M.; THAYER, S. G. Molecular typing of avian *Escherichia coli* strains isolated by random amplification of polymorphic DNA. **Avian Dis.** n.42, p.431-451, 1998.

MILLS, SE. The dental unit waterline controversy: defusing the myths, defining the solutions, **J Am Dent Assoc.** 2000, 131 (9):1427-1441.

MILLS, SE. Waterborne pathogens and waterline. **Dent Clin North Am**, 2003, 47(3), 545-557.

MEDEIROS L.V., VASCONCELOS U., CALAZANS G.M.T. Ocorrência de linhagens de *Pseudomonas aeruginosa* cloro resistentes em águas de diferentes origens. **Acta Sci. Biol. Sci.** v. 29, n. 3, p. 309-313, 2007.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. Performance standards for antimicrobial susceptibility tests. **Twelfth informational supplement.** NCCLS. USA. Publication M100-S12; 2003.

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

O'DONNELL. M. J.; TUTTLEBEE, C. M.; FALKINER, F. R. Coleman DC. Bacterial contamination of dental chair units in a modern dental hospital caused by leakage from suction system hoses containing extensive biofilm. **J. Hosp. infec.** v. 59, p.348-360, Jan. 2005.

OIE, S.; SAWA, A.; KAMIYA, A.; MIZUNO, H. *In-vitro* effects of antipseudomonal antibiotics against mult-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa*. **J. Antim. Chemot.** v. 44, p. 689-691, Apr. 1999.

OIE, S.; UEMATSU, T.; SAWA, A.; HIDEKAZU, M.; TOMITA, M. *In-vitro* effects of combinations of antipseudomonal agents against seven strains of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. **J. Antim. Chemot.** v. 52, n.6, p. 911-914, Oct. 2003.

OLIVE, D. M.; BEAN, P. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. **J Clin Microbiol**, v. 37, p. 1661-1669, 1999.

OLIVEIRA AC; MALUTA RP; STELLA AE ; RIGOBELLO EC ; MARIN JM, ÁVILA FA . Isolation of *Pseudomonas aeruginosa* strains from dental office environments and units in Barretos, state of São Paulo, Brazil, and analysis of their susceptibility to antimicrobial drugs. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, p. 579-584, 2008.

PANKHURST C.L., COULTER W.A. Do contaminated dental unit waterlines pose a risk of infection? **Journal of Dentistry**, v. 35, n. 9, pp. 712-720, 2007.

POH, C. L.; YEO, C. C.; TAY, L. Genome fingerprint by pulsed field gel electrophoresis and ribotyping to differentiate *Pseudomonas aeruginosa* serotype O11 strains. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v. 11, p. 817-822, 1992.

POLLACK, M. The role of exotoxin A in *Pseudomonas* disease on immunity. **Rev Infect Dis**, v. 5, p. 979-984, 1983.

POLLACK, M. *Pseudomonas aeruginosa*. In: Mandell, D.; Benneths, J.; Dolin, R. (eds.). **Principles and practice of infections diseases**, 1995.

PREVOST, AP, ROBERT, M, CHARLAND, R, BARBEAU, J. Doctor, Would you drink water from your dental unit? **N.Y. State Dent J.** v. 61, n 12, p 22-28, 1995.

PUTNINS, E. E.; DI GIOVANI, 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.

SANTOS, J. M. Microscopia Eletrônica de Varredura aplicada às Ciências Biológicas. FUNEP/CAVJ(UNESP), 27 p (Apostila), Jaboticabal, 1992.

SASAKI, M.; HIYAMA, E.; TAKESUE, Y.; KODAIRA, M.; SUEDA, T. Clinical surveillance of surgical imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infection in a Japanese hospital. **J. Hosp. Infect.** v. 56, p. 111-118, Oct. 2004.

SADER, H. S.; CASTANHEIRA, M.; MENDES, R. E.; TOLEMAN, M.; WALSH, T. R.; JONES, R. N. Dissemination and diversity of metallo- $\beta$ -lactamase in Latin America: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. **Int J Antimic Agents**, v. 25, p. 57-61, 2005.

SCHEFFER, M. C. Genotipagem e pesquisa de metalo-beta-lactamases em isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes aos carbapenêmicos. Dissertação de Mestrado, UFPR, 2008.

SCHELSTRAETE P., VAN DAELE S., DE BOECK K., PROESMANS M., LEBECQUE P., LECLERCQ-FOUCART J., MALFROOT A., VANEECHOUTTE M. AND DE BAETS F. *Pseudomonas aeruginosa* in the home environment of newly infected cystic fibrosis patients. **Eur Respir J**; n. 31, p. 822–829, Apr 2008.

SHEID, R. C.; ROSEN, S.; BECK, F. M. Reduction of CFUs in high-speed handpiece water lines over time. **Clin. Prev. Dent.**, Philadelphia, v. 12, n. 2, p. 9-12. June/July, 1990.

SHEPERD, P. A.; SHOJAEI, M. A.; ELEAZER, P. D. VAN STEWART, A. Clearance of biofilms from dental unit waterlines through the use of hydroperoxide ion-phase transfer catalysts. **Quintessence Int.**, Berlin, v. 32, n. 10, p. 755-761, Nov./Dec. 2001.

SMITH, A. J.; HOOD, J.; BAGG, J.; BURKE, F. T. Water, water everywhere but not a drop to drink? **Br. Dent. J.**, London, v. 193, n. 10, p. 593-596, Nov. 2002.

SOUZA-GUGELMIN MC; LIMA CDT.; LIMA SM; MIAN, H; ITO, IY Microbial contamination in dental unit waterlines. **Braz Dent J.** Ribeirão Preto, v. 14, n.1, p. 55-57 , Mar.2003.S

SPRATT D.A., LATIF, J., MONTEBUGNOLI, L.L., WILSON, M. In vitro modeling of dental water line contamination and decontamination. **FEMS Microbiology Letters.** n. 235, p. 363–367, 2004.

STANDARD METHODS FOR EXAMINATION OF WATER AND WASTEWATER. AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, American Water Works Association, Water Environment Federation. 20<sup>th</sup> Edition 1998 p. 9.29-9.30.

SZYMAŃSKA J.; SITKOWSKA J.; DUTKIEWICZ J. Microbial Contamination of Dental Unit Waterlines. **Ann Agric Environ Med**, v. 15, 173–179, 2008.

TALL, B.D.; WILLIAMS, H.N.; GEORGE K. S.; GRAY, R. T.; WALCH M. Bacterial succession within a biofilm in water supply lines of dental air-water syringes. **Can J Microbiol.** V. 41 n.7 , p.647-654, Jul 1995.

TOLEMAN, M. A.; SIMM, A. M.; MURPHY, T. A.; GALES, A. C.; BIEDENBACH, D. J.; JONES, R. N.; WALSH, T. R. Molecular characterization of SPM-1, a novel metallo-beta-lactamase isolated in Latin America: report from the SENTRY antimicrobial surveillance program. **J Antimicrob Chemother**, v. 50, p. 673-679, 2002.

TUTTLEBEE, C. M., O'DONELL, M. J.; KEANE, C. T.; RUSSELL, J. R.; SULLIVAN, D. J. Effective control of dental chair unit waterline biofilm and marked reduction of bacterial contamination of output water using two peroxide-based disinfectants. **J. Hosp. Infect.** v. 52, p. 192-205, 2002.

VAN DAELE S, VANEECHOUTTE M, DE BOECK K, *et al.* Survey of *Pseudomonas aeruginosa* genotypes in colonised cystic fibrosis patients. **Eur Respir J**; v. 28, p. 740–747, 2006.

VERSALOVIC J; KOEUTH T; LUPSKI JR. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. **Nucleic Acids Res.**; v.19, p. 6823-6831, 1991.

VIDAL, F.; MENSA, J. Epidemiology and outcome of *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia, with special emphasis on the influence of antibiotic treatment: analysis of 189 episodes. **Arc. Int. Med.** v.156 n. 18, p. 2121-2126, Oct.1996.

ZAMBRANO A.; HERRERA N. Susceptibilities antimicrobianas de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* aisladas en el laboratorio del Hospital Regional Dr. Guzman de Antofagasta, Chile. **Revista Chilena de Infectologia**, v. 21, n. 2, p. 117-124, 2004.

ZELENITSKY, S. A. ; HARDING, G. K. M; SUN, S.; UBHI, K.; ARIANO, R. E. Treatment and outcome of *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia: an antibiotic pharmacodynamic analysis. **J. Antiml Chemot.** v.52, p. 608-674, 2003.

WALKER, J. T.; BRADSHAW, D. J.; BENNETT, A. M.; FULFORD, M. R.; MARTIN, M. V. Microbial biofilm formation and contamination of dental-unit water systems in general dental practice. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v. 66, n. 8, p. 3363-3367, Aug. 2000.

WALKER, J. T.; BRADSHAW, D. J.; FINNEY, M.; FULFORD, M. R.; FRANDSEN, E.; OSTERGARD, E. Microbiological evaluation of dental unit water systems in general dental practice in Europe. **Eur J Oral Sci** v.112 n. 5 p. 412-8, Oct. 2004

WATANABE, E. Avaliação do nível de contaminação da água de equipo odontológico, Dissertação de Mestrado, FCFRP, USP Ribeirão Preto, 2003.

WATANABE, E. Água do equipo odontológico: técnicas convencionais e modernas para avaliar a contaminação microbiana, Tese de Doutorado, FCFRP, USP Ribeirão Preto, 2007.

WILLIAMS, H. N.; QUINBY, H.; ROMBERG, E. Evaluation and use of a low nutrient medium and reduced incubation temperature to study bacterial contamination in the water supply of dental units. **Can. J. Microbiol.** V. 40, p. 127-131, 1994

WILLIAMS, H. N.; JOHNSON, A.; KELLEY, J. I.; BAER, M. L.; KING, T. S.; MITCHELL, B.; HASLER, J. F. Bacterial contamination of the water supply in newly installed dental units. **Quintessence Int., Berlin**, v. 26, n. 5, p. 331-337, May, 1995

WHITEHOUSE, R. L. S.; PETRES, E.; LIZONETTE, J.; LILCE, C. Influence of biofilms on microbial contamination in dental unit water. **J. Dent.**, Bristol, v. 19, n. 5, p. 290-295, Oct. 1991.

WILSON, L. A.; SHARP, P. M. Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus (ERIC) sequences in *Escherichia coli*: evolution and implications for ERIC-PCR. **Mol Biol Evol.** n. 23, v.6, p.1156-1168, 2006.

YABUNE T; IMAZATO S; EBISU S. Inhibitory effect of PVDF tubes on biofilm formation in dental unit waterlines. **Dent Mater.**; v. 2, n. 8, p. 780-786. 2005.

**ANEXO:****Anexo 1.****Ágar Nutriente**

Extrato de carne (Difco) .....	10,0g
Peptona (Difco) .....	10,0g
Cloreto de Sódio.....	5,0g
Agar-ágar (Fisher) .....	15,0g
Água destilada.....	1000mL

Final pH 7,5 ±0,2

Os componentes do meio de cultura foram diluídos em água destilada e o meio foi esterilizado a 121°C por 30 minutos e resfriado à aproximadamente 50 °C. A seguir a solução (Alíquotas de 20,0 mL) foi distribuída em placas de Petri de 20x100 mm esterilizadas.

**BHI – Brain heart broth (Difco)**

Infusão de cérebro bovino.....	200g
Infusão de coração bovino .....	250g
Protease peptona .....	10g
Bacto-dextrose .....	2g
Cloreto de sódio .....	5g
Fosfato dissódico .....	2,5g
Água destilada.....	1000mL

**Cetrimida Agar Base**

Peptona.....	20 g
Cloreto de Magnésio.....	1,4g
Sulfato de Potássio.....	10 g
Cetrimida (Bromuro de cetiltrimetilamonio).....	0,3 g
Bacto Agar.....	13,6 g

pH final 7,2 ± 0,2 a 25° C

**TSI**

Extrato de Carne .....	3,0g
Extrato de levedura .....	3,0g
Peptona.....	20,0g
Cloreto de Sódio.....	5,0g
Lactose.....	10,0g
Sacaros.....	10,0g
Glicose .....	1,0g
Citrate de Ferro .....	0,3g



Tiosulfato de Sódio .....	0,3g
Vermelho de fenol.....	0,024g
Agar.....	12,0g
Água destilada.....	1000mL

### **Teste Bioquímico:**

#### **Meio motilidade teste**

Bacto Triptose .....	10g
Cloreto de Sódio.....	5g
Bacto Agar.....	5g
PH final.....	7,2
Água destilada.....	1000mL

### **Acetamida**

Acetamida.....	10,0g
Fosfato Monopotassio.....	0,73g
Vermelho de Fenol.....	0,012g
Cloreto se Sódio.....	5,0g
Fosfato Dipotassio.....	1,39g
Final pH 7,0±0,2	