

DIFERENTES MÉTODOS DE AVALIAÇÃO DO NÍVEL DE CONTAMINAÇÃO MICROBIANA DA ÁGUA DE ALTA ROTAÇÃO

DIFERENT METHODS OF EVALUATION OF MICROBIAL CONTAMINATION LEVEL OF HIGH-SPEED WATER

Evandro **WATANABE***, Fabiana Cristina **PIMENTA****, Alessandra Marçal **AGOSTINHO*****, Wilson **MATSUMOTO******, Izabel Yoko **ITO*******

*Mestre em Ciências Farmacêuticas, Doutorando pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FCFRP-USP).

**Professor Doutor do Departamento de Microbiologia, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás.

***Doutora em Odontologia pela Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FORP-USP).

****Professor Doutor do Departamento de Materiais Dentários e Prótese da FORP-USP.

*****Professor Doutor do Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas da FCFRP-USP.

Endereço para correspondência: Evandro Watanabe - Rua Barão do Amazonas, 1167, ap. 123, Centro. - Ribeirão Preto - SP. - CEP:14010-120 - Fone: (016) 3602-42-17 - E-mail: evandrowatanabe@gmail.com

RELEVÂNCIA CLÍNICA

Na odontologia, os equipamentos giratórios/rotatórios de alta velocidade são resfriados a água. No entanto, essa água na forma de aerossol pode estar contaminada com microrganismos e ter como destino a boca dos pacientes e/ou o meio ambiente. Assim, o monitoramento e controle periódico da qualidade dessa água são fundamentais para o sucesso da biossegurança.

RESUMO

A água do equipo odontológico que resfria os equipamentos giratórios/rotatórios de alta velocidade, como os de alta rotação, pode apresentar número elevado de microrganismos. Assim, os aerossóis formados são fonte de risco de disseminação/contaminação na odontologia. O objetivo desta pesquisa foi avaliar e comparar o nível de bactérias aeróbias mesófilas totais presentes em amostras de água de alta rotação (AR), de 10 equipos odontológicos da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto - USP, por meio do método tradicional/convencional pour plate e o método rápido Petrifilm™ AC (3M, St Paul, MN, USA). Cerca de 10,0ml das amostras de água foram coletadas dos AR sem as peças de mão, em tubos de ensaio (25x125mm). As amostras foram homogêneas, diluídas, semeadas e incubadas. Todas as amostras de água dos AR estavam altamente contaminadas, não havendo diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) entre o nível de contaminação encontrado pelo método tradicional, comparado com o método rápido. Em conclusão, o método rápido Petrifilm™ foi considerado mais prático que o tradicional, e totalmente adequado para monitorar a contaminação microbiana das águas dos AR que estavam acima do recomendado pela American Dental Association ($< 200\text{UFC/ml}$) e do permitido pela legislação brasileira ($< 500\text{UFC/ml}$). Então, para a melhoria da qualidade microbiológica da água de equipos odontológicos, as sugestões dos autores desse trabalho deveriam ser acatadas pelos profissionais da odontologia.

PALAVRAS CHAVE: Equipamento odontológico de alta rotação; água; contagem de colônia microbiana; biofilmes.

ABSTRACT

Dental units have cold water that supplies gyration/rotation equipments of high-speed, such as high-speed handpieces, may have a high number of microorganisms. Therefore, aerosol formation is a risk source of microbial dissemination/contamination in dentistry. The aim of this research was to evaluate and compare total aerobic bacteria contamination level in high-speed (HS) water from 10 dental units at Faculty of Dentistry of Ribeirão Preto – USP using a traditional method, pour plate and a fast method, Petrifilm™ AC (3M, St Paul, MN, USA). Approximately 10.0ml of dental unit water were collected from HS, without handpieces, in tubes (25x125mm). The samples were homogenized, diluted, inoculated and incubated. All HS water samples were highly contaminated, no having statistical difference ($p>0.05$) between contamination level got traditional and fast method. In conclusion, the fast method Petrifilm™ was considered more useful than traditional method, and totally acceptable to monitor the microbial contamination in water from HS that was higher than American Dental Association's recommendation ($<200\text{CFU/ml}$) and allowed for Brazilian legislation ($<500\text{CFU/ml}$). Thus, to improve the water microbiology quality from dental units, the authors' suggestions this work should be followed by dental professionals.

KEY WORDS: Dental high-speed equipment; water; colony count, microbial; biofilms.

INTRODUÇÃO

Os profissionais da área odontológica devem usar equipamentos de proteção individual (gorro, máscara, óculos, luvas e avental), pois estão mais suscetíveis a infecções microbianas, pela exposição às fontes de contaminação como fluidos, sangue e aerossóis gerados por instrumentos de alta rotação¹.

Blake² (1963), um dentista do Reino Unido, foi o primeiro a relatar a existência de elevados níveis de bactérias na água de refrigeração de alta rotação de equipos odontológicos.

Entretanto, a água que chega ao equipo odontológico, geralmente, contém pequeno número de microrganismos, uma vez que na maioria das vezes é a mesma consumida pela população. Segundo Prevost et al.³ (1995), no Japão, o limite é de 100UFC/ml, Europa de 200UFC/ml e Estados Unidos de 500UFC/ml. No Brasil, de acordo com o Ministério da Saúde, portaria número 518 de 25 de março de 2004, é de 500UFC/ml de água⁴. Além disso, a American Dental Association⁸ (ADA) lançou o desafio e recomendou que o nível de contaminação bacteriana nas águas de equipos odontológicos não excedesse mais de 200UFC/ml até o ano 2000.

A causa do encontro de elevado número de microrganismos na água de equipo odontológico é a formação de biofilme microbiano, na parede da linha d'água, pelo pequeno número proveniente da água de abastecimento público⁵.

Segundo Costerton et al.⁶ (1987), biofilme é a massa microbiana resultante da multiplicação e desenvolvimento de microrganismos aderidos na superfície de sólidos, presa na matriz de polissacáride extracelular (PEC), em ambiente que contém líquidos. Ainda, o biofilme não é uma massa compacta, mas uma massa de microrganismos desenvolvida em colunas e em andares, com canais "primitivos", onde circulam líquidos contendo nutrientes, biocidas, subprodutos e gases⁷.

Assim, a importância do monitoramento periódico da qualidade microbiológica da água pode ser realizada por um método rápido, denominado Petrifilm™ (3M), que mostrou ser de grande valia, em virtude da facilidade e rapidez de execução⁹⁻¹³.

O objetivo desta pesquisa foi avaliar e comparar o nível de bactérias aeróbias mesófilas totais nas águas de alta rotação de equipos odontológicos, com auxílio dos métodos tradicional (pour plate) e rápido (Petrifilm™ AC).

MATERIAL E MÉTODO

Nessa pesquisa foram utilizados 10 equipos odontológicos (Dabi-Atlante, Ribeirão Preto, SP, BR) da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto - USP. Aproximadamente, 10,0ml das amostras de água de cada alta rotação (AR), sem a peça de mão, foram coletadas em tubo de ensaio esterilizado (25x125mm). Além disso, amostras de água de 2 torneiras, que

abasteciam esses equipos foram coletadas.

Decorrida a coleta, as amostras foram acondicionadas em contêiner térmico com gelo, e transportadas em um tempo inferior a 30min para o Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto– USP, onde foi realizado o processamento microbiológico.

Todo o experimento foi realizado em câmara de fluxo laminar (VECO, Campinas, SP, BR).

As amostras de água foram homogeneizadas e submetidas a diluições decimais seriadas, em água destilada esterilizada, até a ordem de 10⁻⁴.

- Método Tradicional/Convencional

De acordo com o Standards Method for Water and Wastewater¹⁴ (1995) efetuou-se a semeadura por profundidade (pour plate) de alíquotas de 1,0ml das amostras de água in natura e diluídas, em placas de Petri (20x100mm) com meio de cultura Plate Count Agar (Difco, Detroit; MI, USA) a cerca de 45 C.

A incubação das placas foi realizada a 35 C por 48 horas.

- Sistema Petrifilm™ (3M, St Paul, MN, USA)

A placa Petrifilm™ AC (Aerobic Count) para

contagem de bactérias aeróbias totais é constituída de um meio de cultura pronto, que contém ágar nutriente padrão, um agente gelificante solúvel em água fria e um indicador de potencial de óxido redução, o cloreto de trifeniltetrazólio (TTC).

Para a semeadura nas placas Petrifilm™, de acordo com as instruções do fabricante 3M, suspendeu-se o filme superior do Petrifilm™ e alíquotas de 1,0ml, das amostras de água in natura e diluídas foram depositadas, com lentidão e cuidado, no centro do filme inferior das placas codificadas. O filme superior foi deixado cair sobre a amostra, evitando o aprisionamento de bolhas de ar, e em seguida pressionou-se o “difusor” de plástico, delicadamente, no centro da placa por cerca de 10 segundos. Após a remoção do “difusor”, as placas Petrifilm™ foram mantidas em repouso, por pelo menos 1 minuto para a solidificação do gel.

Então, as placas foram acondicionadas em câmara úmida (contêiner tipo tupperware, com chumaço de algodão umedecido com água), na posição horizontal e em pilhas de até 20 unidades, e incubadas à temperatura de 35°C por 48 horas.

Tabela 1- Avaliação do nível de bactérias aeróbias mesófilas totais na água de alta rotação de equipos odontológicos, pelos métodos tradicional/convencional e rápido/Petrifilm™ AC.

Equipo	PCA UFC/ml	Petrifilm AC UFC/ml
1	14.000	24.000
2	23.000	29.000
3	77.000	74.000
4	31.000	31.000
5	3.700	5.700
6	45.000	66.000
7	54.000	126.000
8	106.000	71.500
9	54.500	76.000
10	3.350.000	1.940.000
<i>mediana</i>	<i>49.500</i>	<i>68.750</i>

UFC/ml, unidades formadoras de colônia por mililitro de água.

-Leitura das Placas de Petri e Petrifilm™

Decorrido o período de incubação, as colônias das placas de Petri e Petrifilm™ foram contadas com auxílio de estereomicroscópio (Nikon, JP), sob luz refletida, e o resultado expresso em unidades formadoras de colônia por mililitro de água (UFC/ml) in natura.

-Análise Estatística

Para comparar os dados vinculados das amostras de água dos AR obtidos por duas diferentes metodologias empregou-se o teste não paramétrico de Wilcoxon, de acordo com Siegel¹⁵ (1975). Para o teste foi utilizado o nível de significância de 5%.

RESULTADOS

O nível de contaminação por bactérias aeróbias mesófilas totais das amostras de água de AR está apresentado na Tabela 1.

Comparando o nível de contaminação da água dos AR obtido pelo método tradicional (49.500UFC/ml), com o do método rápido (68.750UFC/ml), não foi observada diferença estatisticamente significativa ($p > 0.05$) entre estes dois tipos de metodologia, de acordo com o teste pareado de Wilcoxon.

Por meio dos métodos utilizados, as amostras de água das 2 torneiras que abasteciam os equipos odontológicos apresentaram pequeno número de microrganismos (< 2 UFC/ml).

DISCUSSÃO

A partir do ano 2000 o nível de contaminação bacteriana das águas dos equipos odontológicos não deveria exceder 200UFC/ml⁸. No entanto, há relatos de contagens superiores a 100.000UFC/ml^{16,17 e 39}, 400.000UCF/ml¹³, 300.000.000UFC/ml¹⁸ e de até 610.000.000UFC/ml¹².

Nesta pesquisa, a maior contagem de bactérias aeróbias mesófilas totais em amostra de água de AR foi de 1.940.000UFC/ml pelo método tradicional e de 3.350.000UFC/ml pelo método rápido (Tabela 1).

A causa do elevado número de microrganismos na água de equipo odontológico é a linha d'água/mangueira funcionar como "sistema amplificador" do pequeno número de microrganismos presentes na água de

abastecimento público⁵.

De acordo com Mills¹⁹ (2003), este fenômeno acontece, em virtude do design/geometria do sistema de distribuição de água do equipo. As mangueiras/linhas d'água são constituídas de tubulações, com cerca de 10,0m de extensão e 0,5 a 1,0mm de diâmetro. Desta maneira, o volume de água contido neste sistema, raramente, excede 60,0ml. Para um volume fixo de fluido, a área da superfície em um cilindro (linha d'água), aumenta em progressão geométrica, com a diminuição do diâmetro. Assim, a área disponível para o desenvolvimento de biofilme na mangueira é muito grande.

No que diz respeito à avaliação do nível de contaminação das águas de equipos odontológicos, diversos métodos e meios de cultura podem ser empregados. A semeadura das amostras de água em profundidade (pour plate) é um método padrão utilizado para contagem de microrganismos aeróbios mesófilos totais em Plate Count Agar^{10,17,18,20}. Ainda, há na literatura relatos de semeaduras na superfície de placas com R2A Agar²¹⁻²³ e Trypticase Soy Agar²⁴, bem como o emprego da técnica de membrana filtrante²⁵.

De acordo com Schraft e Watterworth²⁶ (2005) as placas Petrifilm™ AC têm sido utilizadas para contagem de bactérias aeróbias totais em alimentos, pois contém, segundo o fabricante (3M™), ágar nutriente padrão. Ainda, a literatura vem mostrando a utilização desse método rápido na análise de amostras de água^{9,13 e 26}.

O meio de cultura padrão Plate Count Agar/Standard Methods Agar (Plate Count Agar; Tryptose Glucose Yeast Agar) feito de acordo com a American Public Health Association (APHA) é usado para contagem de microrganismos presentes em amostras de leite e seus derivados, alimentos, água e outros materiais de importância sanitária¹⁴.

A quantidade de nutrientes é a diferença entre o meio de cultura padrão Plate Count Agar e, por exemplo, o R2A Agar (Difco, Detroit; MI, USA), desenvolvido mais recentemente por Reasoner e Geldreich²⁷ (1985) para contagem de bactérias aeróbias totais em água potável tratada.

Com maior quantidade de nutrientes o meio de cultura Plate Count Agar, permite o desenvolvimento de bactérias de crescimento rápido, porém, pode não permitir o

desenvolvimento de bactérias de crescimento lento, “estressadas” e tolerantes ao cloro, que são encontradas em águas tratadas^{28,29}. Da mesma maneira que pode acontecer com o método Petrifilm™.

A incubação realizada nesse estudo foi a mesma preconizada pela U. S. Environmental Protection Agency (EPA), em amostras de água semeadas por pour plate, para contagem de bactérias aeróbias mesófilas totais (35 C por 48h), no entanto, a incubação de 20 a 28°C por 5 a 7 dias aumenta o número de microrganismos recuperados nessas amostras de água¹⁴.

De acordo Yabune et al.³⁰ (2005) o nível de contaminação microbiana máxima recomendada pela ADA (200UFC/ml) deveria ser convertido para 20.000UFC/ml, quando o meio de cultura R2A Agar fosse utilizado, uma vez que ele apresenta cerca de 100 vezes mais sensibilidade para a detecção/recuperação de microrganismos.

Com relação à metodologia empregada para a avaliação do nível de contaminação das águas, as placas Petrifilm™ apresentam vantagens em relação aos métodos convencionais, como conveniência, pois estão prontas para o uso, eliminando as etapas de preparação dos meios de cultura e vidrarias necessárias; ocupam menos espaço nas estufas incubadoras (até 20 placas empilhadas), geladeiras, armários; descartes mais fáceis, não quebram, não derramam, podem ser armazenadas em refrigerador, para contagem posterior ou reanálise. Por outro lado, a praticidade do método permite que as análises sejam realizadas em qualquer localidade (no consultório odontológico), necessitando apenas da montagem de uma zona asséptica com lamparinas, pissetas descartáveis e uma estufa adaptada, onde o acesso da implantação de um laboratório tradicional é difícil. Assim, fundamentado ao custo/benefício, sugere-se o emprego do método Petrifilm™ para análise da qualidade microbiológica da água de equipos odontológicos.

Então, algumas sugestões para a manutenção da qualidade microbiológica da água de equipos odontológicos deveriam ser acatadas pelos profissionais, como:

- No final de todo expediente de trabalho drenar completamente a água estagnada nas linhas d'água (seringas tríplexes e alta rotação) e deixar

todos os reservatórios sem água (vazios) para reduzir a multiplicação microbiana e a formação de biofilme;

- No início de todo expediente de trabalho preencher os reservatórios com água de boa qualidade (<500UFC/ml). De preferência com água de torneira e/ou filtrada do sistema de abastecimento público, visto que a água mineral apresenta um custo mais elevado e não é adicionada de cloro, o que pode levar a maior proliferação microbiana. Ainda, não tocar com as mãos a boca ou o gargalo das garrafas (reservatórios) para evitar a contaminação pela microbiota das mãos;

- Realizar drenagem (flush) de água nas seringas tríplexes e alta rotação antes do início do expediente, depois e entre o atendimento dos pacientes por no mínimo 20 a 30 segundos^{1, 8}. Embora o flush não remova o biofilme formado nas linhas d'água dos equipos, ele pode reduzir temporariamente a contaminação microbiana da água, bem como retirar fluidos orais que por ventura tenham entrado via refluxo da boca dos pacientes;

- Usar equipos com válvulas anti-refluxo de fluidos orais para evitar contaminação cruzada dos pacientes para as linhas d'água e da água para os pacientes, profissionais e equipe odontológica;

- Fazer uso de equipos com reservatórios de água independentes e de pequeno volume (garrafas de 500,0ml), visto que possibilitam a troca periódica de água, higienização interna mais fácil e permitem a adição de substâncias químicas para o tratamento das linhas d'água;

- Pelo menos uma vez por semana lavar com escova e sabão o interior das paredes dos reservatórios para remoção do biofilme;

- Seguir as recomendações do fabricante do equipo para o tratamento químico das linhas d'água (ele deve apresentar soluções para esse problema). Ex: Sistema de Assepsia Flush da Dabi-Atlante (flush de água clorada a 1:500). No Brasil, ainda não há nenhum produto comercial aprovado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) para o tratamento das linhas d'água de equipos odontológicos. No entanto, nos Estados Unidos há uma variedade desses produtos regulados pela Food Drug Administration (FDA) e registrados pela Environmental Protection Agency (EPA);

- Monitorar periodicamente a qualidade

microbiológica da água, visto que é a única maneira de se ter certeza que o tratamento das linhas d'água está surtindo efeito desejado, e que a água está própria para ser utilizada na prática odontológica. Embora o tratamento químico seja efetuado, fatores como falha do produto, uso inapropriado do produto, ou contaminação da água dos reservatórios podem acontecer. No mercado, diversas empresas produzem kits para a análise da qualidade microbiológica da água. Além disso, algumas universidades públicas e privadas, bem como empresas oferecem esse tipo de serviço;

- Usar apenas soro fisiológico esterilizado em procedimentos cirúrgicos, ao invés da água dos equipos (evitar contaminação/infecção com a água de seringa tríplice ou alta rotação);

- Trocar diariamente os filtros das pontas das linhas d'água (0,2µm de diâmetro), se os equipos fizerem uso.

CONCLUSÃO

As águas de alta rotação de equipos odontológicos podem servir como meio de disseminação/veiculação de microrganismos, provavelmente pela formação do biofilme mangueira/linha d'água, visto que a água da fonte abastecedora dos equipos era potável, com pequeno número de microrganismos.

O monitoramento periódico deste nível de contaminação é de suma importância para a biossegurança dos profissionais e pacientes, sendo as placas Petrifilm™ úteis para este propósito, em virtude da facilidade, rapidez de desempenho, economia e não diferença estatística significativa entre os resultados, quando comparado com o método tradicional.

Então, para a melhoria da qualidade microbiológica da água de equipos odontológicos, as sugestões dos autores desse trabalho deveriam ser acatadas pelos profissionais da odontologia.

REFERÊNCIAS

1. CDC. 2003 CDC infection control recommendations for dental health-care settings. *Compend Contin Educ Dent*. 2004; 25(1 Suppl): 43-8, 50-3.
2. Blake GC. The incidence and control of bacterial infection in dental spray reservoirs. *Br Dent J*. 1963; 115(3): 413-6.
3. Prevost AP, Robert M, Charland R, Barbeau J. Doctor, would you drink water from your dental unit? *N Y State Dent J*. 1995; 61(12): 22-8.
4. Brasil. Ministério da Saúde. Portaria nº 518, de 25 de março de 2004. Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, e dá outras providências. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/e-legis/>. Acesso em: 29 jun. 2006.
5. Dolci G, Montebugnoli L. The cross-infection control in medical devices for dentistry. In: *Anais do VII Congresso Nazionale Del "Collegio Dei Docenti Di Odontoiatria"*; 2000. Roma, Itália. Proceedings from a Symposium in Rome, Italy; 2000. Vol II p. 11-34.
6. Costerton JW, Cheng KJ, Geesey GG, Ladd TI, Nickel JC, Dasgupta M, Marrie TJ. Bacterial biofilms in nature and disease. *Annu Rev Microbiol*. 1987; 41: 435-64.
7. Costerton JW, Cook G, Lamont R. The community architecture of biofilms: dynamic structures and mechanisms. In: Newman HN, Wilson M (eds). *Dental plaque revisited: oral biofilms in health and disease*. London, Cardiff: Boline; 1999. p. 5-13. ISBN 0-9520432-7-0.
8. ADA Council on Scientific Affairs. Dental unit waterlines: approaching the year 2000. *J Am Dent Assoc*. 1999; 130(11): 653-64.
9. Ito IY, Mian H, Pimenta FC, Gonçalves M, Agostinho AM. Biossegurança: Petrifilme™ no exame microbiológico da água de equipo odontológico. In: *Anais da 16ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica*; 1999; Águas de São Pedro (SP). Águas de São Pedro: Divisão Brasileira da IADR; 1999. p. 7.
10. Sant'Ana AS, Conceição C, Azeredo DRP. Comparação entre os métodos rápidos Simplate® TCI-CI e Petrifilm® AC e os métodos convencionais de contagem em placas, para a enumeração de aeróbios mesófilos em sorvetes. *Rev Hig Aliment*. 2002; 16(95): 82-7.
11. Beloti V, Souza JA, Barros MAF, Nero LA, Mattos MR, Gusmão VV, Moraes LB. Evaluation of Petrifilm™ EC and HS for total coliforms and *Escherichia coli* enumeration in water. *Braz J Microbiol*. 2003; 34(4): 301-4.
12. Watanabe E. Avaliação do nível de contaminação da água de equipo odontológico

[Dissertação de Mestrado]. Ribeirão Preto: Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo; 2003.

13. Agostinho AM. Biocidas na desinfecção de linhas d'água de equipos odontológicos: avaliação química, microbiológica e por MEV [Tese de Doutorado]. Ribeirão Preto: Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo; 2004.

14. American Public Health Association (APHA), 1995. Standards Method for Water and Wastewater, 19th ed. APHA, Washington, DC.

15. Siegel S. Estatística não paramétrica para a ciência do comportamento. São Paulo: McGraw-Hill do Brasil; 1975.

16. Walker JT, Bradshaw DJ, Bennett AM, Fulford MR, Martin MV, Marsh PD. Microbial biofilm formation and contamination of dental-unit water systems in general dental practice. *Appl Environ Microbiol.* 2000; 66(8): 3363-7.

17. Smith AJ, McHugh S, McCormick L, Stansfield R, McMillan A, Hood J. A cross sectional study of water quality from dental unit water lines in dental practices in the West of Scotland. *Br Dent J.* 2002; 193(11): 645-8.

18. Souza-Gugelmin MCM, Lima CDT, Lima SNM, Mian H, Ito IY. Microbial contamination in dental unit waterlines. *Braz Dent J.* 2003; 14(1): 55-7.

19. Mills SE. Waterborne pathogens and dental waterlines. *Dent Clin N. Am.* 2003; 47(3): 545-57.

20. Aguiar CM, Pinheiro JT. Avaliação de tratamento químico da água dos equipos odontológicos. *Rev Assoc Paul Cir. Dent.* 1999; 53(3): 228-35.

21. O'donnell MJ, Shore AC, Coleman DC. A novel automated waterline cleaning system that facilitates effective and consistent control of microbial biofilm contamination of dental chair unit waterlines: A one-year study. *J Dent.* 2006; 955: 1-14.

22. Linger JB, Molinari JA, Forbes WC, Farthing CF, Winget WJ. Evaluation of a hydrogen peroxide disinfectant for dental unit waterlines. *J Am Dent Assoc.* 2001; 132(9): 1287-91.

23. Putnins EE, Di Giovanni D, Bhullar AS. Dental unit waterline contamination and its possible implications during periodontal surgery. *J Periodontol.* 2001; 72(3): 393-400.

24. Williams JF, Johnston AM, Johnson B, Huntington MK, Mackenzie CD. Microbial contamination of dental unit waterlines: prevalence, intensity and microbiological characteristics. *J Am Dent Assoc.* 1993; 124(10): 59-65.

25. Kettering JD, Stephens JA, Munoz-Viveros CA, Naylor WP. Reducing bacterial counts in dental unit waterlines: tap waters vs. distilled water. *J Contemp Dent Pract.* 2002; 3(3): 1-11.

26. Schraft H, Watterworth LA. Enumeration of heterotrophs, fecal coliforms and *Escherichia coli* in water: comparison of 3M™ Petrifilm™ plates with standard plating procedures. *J Microbiol Methods.* 2005; 60(3): 335-42.

27. Reasoner DJ, Geldreich EE. A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water. *Appl Environ Microbiol.* 1985; 49(1): 1-7.

28. Fiksdal L, Vik EA, Mills A, Staley JT. Non standard methods for enumerating bacteria in drinking water. *J Am Water Works Assoc.* 1982; 6: 313-18.

29. Williams HN, 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.* 1994; 40(2): 127-31.

30. Yabune T, Imazato S, Ebisu S. Inhibitory effect of PVDF tubes on biofilm formation in dental unit waterlines. *Dent Mater.* 2005; 21(8): 780-6.