

FORMAZIONE e DECONTAMINAZIONE dei BIOFILM NEI RIUNITI ODONTOIATRICI (DENTAL UNIT WATERLINES)

M. Robert Wirthlin,* Grayson W. Marshall Jr.,† e Randall W. Rowland*

Inquadramento: I biofilm sono un fenomeno naturale negli ambienti acquatici inclusi i sistemi pubblici di acqua potabile. L'interno dei tubi di piccolo diametro all'interno delle linee idriche del riunito odontoiatrico (DUWL) sono anch'essi luoghi di formazione di biofilm. Nel lume delle tubature il flusso è minimo, e l'acqua diventa stagnante quando l'unità non è in uso. Le molecole precipitano dall'acqua sulla parete interna e favoriscono l'aderenza di microrganismi planctonici dall'acqua. Una volta diventati sessili, questi microrganismi cambiano il loro fenotipo. Dopo l'aderenza, c'è una cosiddetta fase di ritardo collegato alla superficie, dopodiché gli organismi entrano in una fase di crescita producendo esopolisaccaridi che ricoprono gli organismi con uno strato di viscidume. Dentro il biofilm, i microrganismi possono comunicare l'un l'altro, trasferire nutrienti e scambiare materiale genetico. Gli esopolisaccaridi insolubili riparano i microrganismi da spostamenti e dalla penetrazione di organismi predatori, antibiotici e disinfettanti. Lo strato esterno della superficie dei microrganismi cresce più in fretta e potrebbe staccarsi sotto forma di "sciami" di cellule.. Il distacco di microrganismi dal biofilm dell'unità dentale, che vengono dilavati nella cavità orale, potrebbe in teoria contagiare il paziente.

Metodi: Questo studio ha confrontato tre prodotti per la pulizia di DUWL (un prodotto a base di perossido alcalino, uno di biossido di cloro appena miscelato e uno di biossido di cloro stabilizzato a tampone) in 16 unità dentali con sistemi di acqua autonomi, 6 mesi dopo l'installazione, in una clinica d'insegnamento odontotecnico. Un'unità, che è stata sciacquata ed asciugata, è servita come riferimento. Sono stati prelevati quotidianamente dei campioni dalle unità per 10 giorni, usando delle piastre eterotrofiche campionatrici (HPC). Le piastre sono state incubate per 7 giorni a temperatura ambiente, e le colonie contate con 10,5x di ingrandimento. Sono stati prelevati dei campioni d'acqua all'interno dei tubi prima e dopo l'uso dei prodotti di pulizia, e sono stati elaborati ed esaminati con l'uso di un microscopio elettronico di scansione.

Risultati: La media stimata di HPC è stata calcolata, basandosi su conte originali e replicate indipendenti di due investigatori, di campioni diluiti e non diluiti, riportati come unità che formano colonie (CFU)/ml. La terapia d'urto usando il prodotto al perossido alcalino ($n=5$) ha ridotto l'HPC dal valore di base, ma nel rapporto fra le conte giornaliere di controllo c'era una larga varianza e una tendenza a ritornare ad avere valori alti col passare dei giorni. La media giornaliera delle HPC era considerevolmente meglio del riferimento per soli 3 dei 9 giorni di trattamento, e ha oltrepassato l'obiettivo di 200 per 3 giorni. Il prodotto al biossido di cloro appena miscelato ($n=4$) e il prodotto al biossido di cloro stabilizzato a tampone ($n=5$) hanno entrambi ridotto l'HPC a quasi 0 per tutti i giorni. I loro rapporti fra medie stimate giornaliere e il riferimento sono stati considerevolmente migliori tutte le volte ($p<0.001$). Confrontando i trattamenti, il prodotto al biossido di cloro appena miscelato è stato migliore ($p<0.001$) del prodotto al perossido alcalino 8 giorni su 9. Il biossido di cloro stabilizzato a tampone è risultato migliore del perossido alcalino tutte le volte. I due trattamenti al biossido di cloro avevano entrambi così tanti valori HPC = 0 che una differenza statistica significativa fra loro non è stata calcolata. Le scansioni elettroniche microscopiche dei campioni prelevati dalle tubature idriche in plastica, prima e dopo i trattamenti, hanno mostrato riduzioni nella copertura di biofilm, ma queste differenze non erano statisticamente significative.

Conclusioni: I prodotti per la pulizia delle tubature idriche al biossido di cloro sono efficaci nel decontaminare i biofilm dei DUWL. Il biossido di cloro ha dei vantaggi rispetto ad altri prodotti al cloro. Controllare il biofilm dei DUWL potrebbe avere effetti positivi sul controllo delle infezioni nosocomiali.

* Dipartimento di Stomatologia, Divisione di Periodontologia, Università di California–San Francisco, San Francisco CA

† Dipartimento di Scienze di Prevenzione e Cura, Divisione di Biomateriali e Bioingegneria, Università di California–San Francisco,

I DUWL sono luoghi dove si sviluppano biofilm di microrganismi aerobici, eterotrofi e mesofilici, che si trovano di consueto nei sistemi di acqua potabile.

Queste unità dentali contengono molte tubature di diametro sottile (Fig1).

Il diametro interno di queste tubature va da circa 1 a 2 mm, quindi il rapporto *superficie interna del lume/volume* è maggiore di quello dei tubi del sistema idrico che porta l'acqua alle unità dentali. Il flusso dell'acqua nel sistema idrico, nei tubi e nelle tubature, è laminare, quindi il flusso alla superficie del lume è quasi fermo.

In questa zona, i batteri possono muoversi tramite il flusso fluido, per moto Browniano, per sedimentazione e mediante i flagelli. Le molecole di sostanze disperse nell'acqua possono aderire alla superficie del lume tramite assorbimento fisico e chimico, formando un sottosstrato condizionato che può attrarre altre molecole, che spuntano dalle superficie dei microrganismi, tramite le forze di Van Der Waal, forze elettrostatiche, forze idrofobiche, o assorbimento chimico di fimbrie, pili o adesine batteriche.

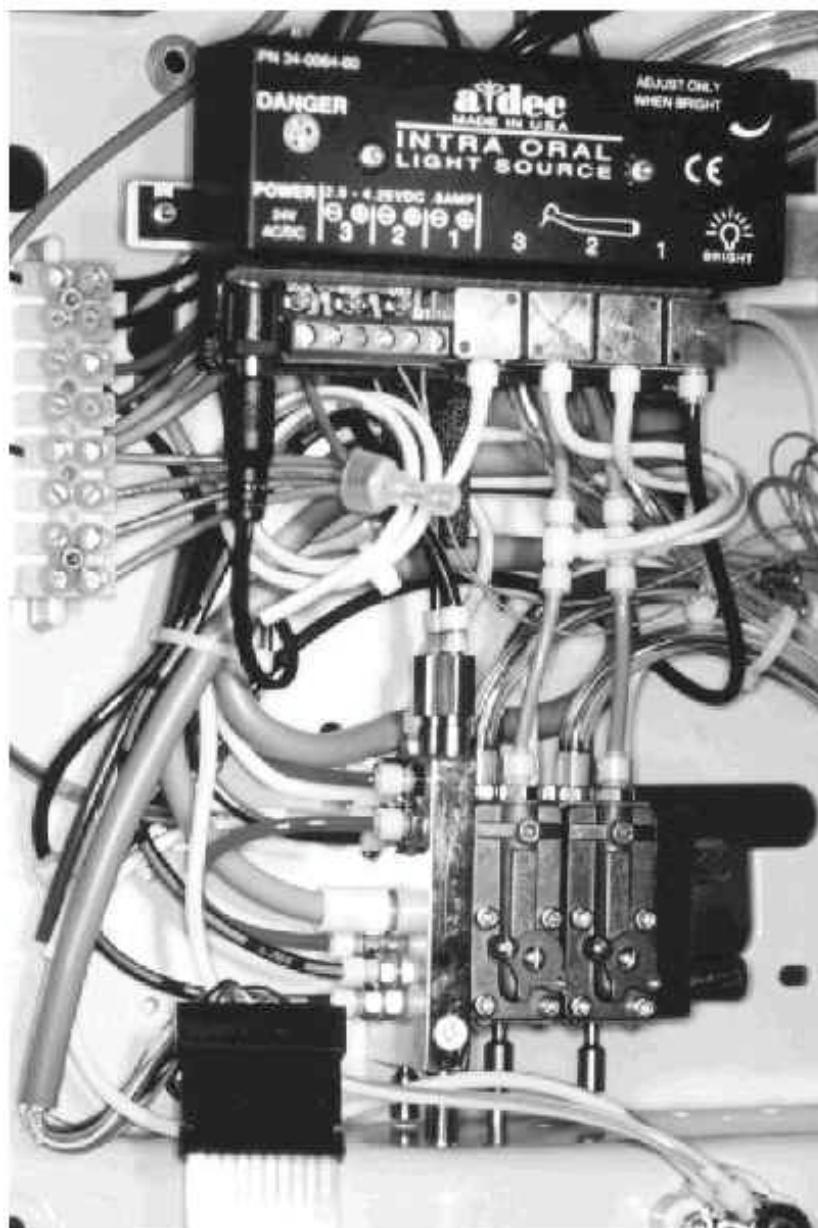


Figura 1

Parte dell'interno di un moderno riunito odontoiatrico, mostrante una parte dei molti piccoli tubi usati per distribuire aria compressa ed acqua.

I cationi bivalenti possono contribuire all'aderenza microbica poiché collegano gli anioni precipitati nel lume agli anioni dei glicocalici batterici.

Queste attrazioni iniziali possono essere considerate deboli e reversibili.

Dopo la loro aderenza iniziale su di una superficie condizionata, i microrganismi entrano in una fase calma, la cosiddetta fase di ritardo associata alla superficie, durante la quale possono cambiare l'espressione dei loro geni.

Una volta effettuato lo spostamento fenotipico e la suddivisione, i microrganismi entrano in una fase di crescita veloce, e secernono esopolisaccaridi complessi, un viscidume mucillaginoso, che cementa gli organismi alla superficie e resiste al distacco da forze fluide di taglio. Gli esopolisaccaridi formano uno strato sui batteri e una matrice fibrosa. Sedimenti e altri microrganismi possono rimanere incastriati nell' ingarbugliata matrice fibrosa o aderire, per via delle interazioni molecolari di natura legante del substrato, alla "foresta" di molecole sporgenti.

La crescita di microcolonie all'interno della matrice e la coaggregazione di altri batteri aumentano la profondità del biofilm; ciò nonostante, lo spessore potrebbe non superare 1000 µm in un contesto di flusso turbolento.

L'aderenza dei batteri aumenta la loro densità, a confronto con il loro precedente stato di libero galleggiamento planctonico, e i segnali chimici che esprimono possono diventare concentrati abbastanza da fungere da molecole autoinduttrici di segnale. In tal modo, la concentrazione può superare una certa soglia, e i batteri percepiscono che hanno un "quorum". I batteri gram negativi delle vie idriche *Pseudomonas aeruginosa*, usano i lattoni della N-acil-omoserina e segnali di tipo chinolone. I *Bacillus subtilis* e gli *Enterococchi*, entrambi gram positivi, percepiscono anch'essi il "quorum".

Si pensa che i segnali permettano la comunicazione fra specie, causando un aumento delle loro produzioni di esopolisaccaridi e dei fattori che aumentano la loro virulenza.

Gli esopolisaccaridi sono un gruppo di sostanze eterogenee, che è composto in generale da zuccheri naturali, amminozuccheri e alcuni acidi uronici.

Gli *Streptococchi* possono produrre glucani, destrosi e levani.

I batteri gram negativi producono polimeri acetilati di acidi uronici, che si chiamano alginati. La reazione degli alginati con lo ione di calcio dell'acqua causa precipitazione (come nei materiali per impronte dentali).

Gli esopolisaccaridi sono per la maggior parte non solubili in acqua.

Nella profondità del biofilm accumulato, i nutrienti si trasferiscono da una specie all'altra, ma la diffusione verso l'interno di ossigeno e altri nutrienti assorbiti cala.

Studi con microelettrodi hanno mostrato che l'ossigeno penetra non oltre 25 o 30 µm. Di conseguenza, la crescita batterica diventa molto lenta o quasi statica. Gli spazi ravvicinati dell'interno del biofilm possono facilitare la condivisione dei geni tramite coniugazione, scambio di plasmide, assorbimento di DNA dalle cellule sottoposte a lisi, o fusione cellulare di organismi come micoplasmi senza pareti.

La matrice resiste allo spostamento fisico dei batteri del biofilm, e limita la diffusione verso l'interno di agenti ostili, consumandoli attraverso le reazioni chimiche.

Il fatto che la matrice sia polianionica fa sì che resista alla diffusione di cationi e impedisce inoltre l'intrusione di anticorpi, protegge contro l'invasione di amebe e parameci (o macrofagi e neutrofili in un ospite vivente), e aumenta la concentrazione di enzimi antibiotico-neutralizzanti, come le beta-lattamasi.

Il risultato complessivo è che i microrganismi in un biofilm sono molto più resistenti alla disinfestazione che non nella loro fase planctonica.

Benché i microrganismi siano al riparo all'interno del biofilm, possono comunque avere una carenza di ferro, che possono compensare corrodendo la superficie di un substrato in metallo. Il biofilm può cominciare come una chiazza in superficie, ma man mano che dilaga e si sviluppa, può assumere la forma di colonne o di forme a fungo, così formando

dei canali che migliorano la circolazione dei nutrienti e l'eliminazione di rifiuti e tossine. In un biofilm gravemente degradato, delle pile di colonie possono estendersi fino alla massa del fluido in una forma simile ai dendriti; in un biofilm riccamente alimentato come la placca dentale, le colonie formano una membrana molto spessa e densa.

I microrganismi in superficie non sono così fortemente radicati come quelli in profondità nel biofilm, e crescono anche più in fretta.

I batteri in superficie sono più suscettibili al distacco a causa di protozoi predatori, abrasione, stress da taglio del fluido o da particelle nel flusso; periodicamente si staccano microrganismi singolarmente o a blocchi. Il distacco può essere utile alla comunità di microrganismi per dare inizio ad una nuova colonia tramite l'inseminazione delle superfici lungo la corrente, simile allo sciamare delle api.

Controllo della Contaminazione dei condotti idrici

Il distacco dei microrganismi in superficie dal biofilm nei DUWL, permette loro di uscire nel fluido di raffreddamento degli strumenti dentali ad alta velocità, nel flusso delle siringhe ad aria e acqua (AWS), e nell'attrezzatura ancillaria come gli ablatori ultrasonici del tartaro collegati alle unità dentali. Questi batteri possono quindi essere dilavati nelle bocche dei pazienti e possono essere trasportati nell'aria come aerosol e/o schizzi di goccioline.. Quando le unità non sono in uso (fra un paziente e l'altro, di notte e nei weekend), i batteri planctonici che entrano dal sistema idrico pubblico e quelli emanati dalle superficie del biofilm, si accumulano in grossi numeri. Sono stati rilevati valori altissimi, come 1.000.000 di unità formanti colonie (CFU) per ml.

E' un principio generale che, visto che i dentisti sono interessati alla salute dei loro pazienti, dovrebbero eliminare il rischio di valori alti di batteri provenienti dall'effluente delle unità dentali. L' American Dental Association (ADA) ha chiesto ai ricercatori odontoiatrici e ai produttori di apparecchiature odontoiatriche di progettare attrezzature e di introdurre delle misure per ridurre la contaminazione dei condotti idrici. L'obiettivo proclamato è stato di <200 CFU/ml, come lo standard per il fluido per dialisi renale.

Flussaggio

Far scorrere l'acqua per 2 minuti alla mattina e per 20/30 secondi fra una paziente all'altro dovrebbe essere considerata la norma per le procedure degli studi odontoiatrici, e farla scorrere per più tempo è suggerito dopo il weekend. Far scorrere dell'acqua nelle linee idriche toglie la maggior parte dei batteri accumulativi. Un risciacquo di 2 minuti alla mattina può ridurre il valore dei batteri del 99%, ma può richiedersi un risciacquo di 8 minuti per ottenere un valore di 0, e, dopo, le conti ritornano velocemente ad alti valori. I microrganismi dilavati dai DUWL sono vari. Anche se una clinica può avere più unità dentali, tutte collegate al sistema idrico pubblico, i valori e le specie identificabili saranno diversi da una unità all'altra. La Tabella 1 elenca alcune delle specie rilevate attraverso il flussaggio dei DUWL, però non tutte quelle rilevate sono vitali, e non tutte quelle vitali sono coltivabili. In più sono stati identificati funghi, protozoi e nematodi acquatici.

Tabella 1**Specie Microbiche trovate nel DUWL**

<i>Achromobacter</i> spp.	<i>Pasturella haemolyticus</i>
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	<i>Pasturella multocida</i>
<i>Actinomyces</i> spp.	<i>Pasturella pneumotrophica</i>
<i>Aeromonas</i> spp.	<i>Pseudomonas acidovorans</i>
<i>Acalignes faecalis</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>Bacillus</i> spp.	<i>Pseudomonas cepacia</i>
<i>Brevundimonas vesicularis</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
<i>Burkholderia cepacia</i>	<i>Pseudomonas maltophilia</i>
<i>Burkholderia picketii</i>	<i>Pseudomonas paucimobilis</i>
<i>Cephalosporum</i> spp.	<i>Pseudomonas picketii</i>
<i>Cladosporium</i> spp.	<i>Pseudomonas putida</i>
<i>Flavobacterium</i> spp.	<i>Pseudomonas putrefaciens</i>
<i>Legionella bozemani</i>	<i>Pseudomonas stutzeri</i>
<i>Legionella dumoffi</i>	<i>Pseudomonas vesicularis</i>
<i>Legionella longbeachae</i>	<i>Psychrobacter phenylpyruvica</i>
<i>Legionella pneumophila</i>	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>
<i>Methyllobacterium mesophilicum</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Moraxella phenylpyruvica</i>	<i>Staphylococcus cahnii</i>
<i>Moraxella urethalis</i>	<i>Staphylococcus warreni</i>
<i>Mycobacteria chelone</i>	<i>Streptococcus mitis</i>
<i>Mycobacteria flavescens</i>	<i>Streptococcus salivarius</i>
<i>Mycobacteria fortuitum</i>	<i>Xanthomonas maltophilia</i>
<i>Mycobacteria kansasi</i>	<i>Mycobacteria tenerae</i>

Filtri

E' stato consigliato l'uso di filtri alla fine della linea idrica per fermare l'efflusso di batteri dalle tubature, ma spesso i filtri si insudiciano velocemente, e dovrebbero essere cambiati ogni giorno o anche più spesso. A valle del filtro ci sarà certamente altro biofilm. I filtri intercettano solo i batteri planctonici; non fanno nulla per rimuovere il biofilm.

Asciugatura

Dato che i biofilm sono di solito sottili (200 o 300 µm) e sono per la maggior parte acqua (>95%), sembrerebbe ragionevole asciugare il DUWL di notte e nei weekend, spurgandoli con dell'aria compressa. Furuhashi e Miyamae hanno dichiarato che l'asciugatura ad aria forniva valore nullo di CFU/ml quando effettuata in combinazione con il flussaggio di acqua e di etanolo al 70%. In altri esperimenti tuttavia, l'asciugatura da sola non sembrava essere di nessuna utilità. La matrice esopolisaccaride e le condizioni di crescita statica probabilmente proteggono i batteri dall'essiccazione.

Biocidi

I trattamenti dei DUWL con biocidi possono essere fatti come trattamenti d'urto periodici o con dei sistemi continui. Delle soluzioni di sodio ipoclorito (NaOCl), o di candeggina diluita hanno efficacemente diminuito i valori planctonici, ma i biofilm sono da 150 a 3.000 volte più resistenti all'ipoclorito. Usando una combinazione di trattamento d'urto periodico e trattamento continuo nelle unità dentali, con serbatoi indipendenti, Karpay e altri hanno ridotto l'HPC in 10 unità dentali a un valore di meno di 10 CFU/ml, 5 giorni dopo il trattamento d'urto. Esaminando al microscopio elettronico a scansione (SEM), non si notava nessuna caratteristica morfologica di biofilm in 6 unità su 10. Fiehn e Henriksen hanno dichiarato che l'uso da 1 a 2 ppm di NaOCl in dosi intermittenti ha diminuito l'HPC in ablatori ultrasonici del tartaro da 6.500 a 100 CFU/ml, mentre il trattamento continuo forniva un valore da 270 a 610 CFU/ml. Rimuovere le tubature dalle unità dentali e sottoporle ad un trattamento con candeggina al 5.25% in laboratorio per 15 ore ha eliminato i valori nell'effluente delle tubature, ma questi tendevano a ritornare dopo 15 giorni. L'uso di un cloratore in un sistema idrico dello studio per fornire un trattamento d'urto con 50 ppm alla notte, per poi distribuire 1 ppm per 4 settimane ha fallito nell'eliminare i valori esistenti di *Legionella*. L'uso di candeggina tra lo 0.5% e l'1% una volta alla settimana per 10 minuti lungo un periodo di 4 anni ha tenuto a freno la contaminazione micobica ma ha causato una corrosione lenta degli inserti in metallo delle unità dentali. Uno studio effettuato con spettroscopia dispersiva a raggi X (EDX) ha trovato delle tracce di metalli corrosi nei biofilm residui. Trattare i DUWL per 10 minuti con una soluzione 1:6 di candeggina e poi risciacquarla via, ha eliminato i batteri nell'effluente, ma c'erano problemi di praticità di applicazione nei gabinetti dentistici privati. Un altro studio in un'ambulatorio odontoiatrico ha evidenziato che la candeggina diminuiva i valori da 0 a 30 CFU/ml, ma non rimuoveva il biofilm all'interno dei tubi.

Un'altro problema con il cloro o una soluzione di ipoclorito è che reagisce con la matrice organica e produce dei sottoprodotto clorati. Le reazioni chimiche negli strati in superficie preverrebbero la sua penetrazione. Gli esami in vitro sui biofilm batterici delle linee idriche

hanno mostrato che la matrice diminuiva la penetrazione del cloro col passar del tempo. Sottoprodotti clorati come i trialometani sono considerati cancerogeni, e sono stati scoperti nell'acqua effluente dai DUWL, trattati con candeggina a una media di 40 ppb, che è sotto il limite di sicurezza di 100ppb. Cloramina e biossido di cloro non producono sottoprodotti clorati, e quindi penetrano più profondamente nei biofilm nei sistemi idrici e uccidono con più efficacia.

La nostra scuola di perfezionamento ortodontico aveva 16 poltrone nuove e delle unità dentali fissate alle stesse, montate nel marzo 2001. Il produttore consigliava che le linee del sistema idrico indipendente fossero spurate ogni notte con dell'aria, e disinfectate ogni settimana con una soluzione di candeggina casalinga 1:10, per almeno 10 ma non più di 30 minuti. Il produttore aveva anche fornito dei consigli aggiuntivi a proposito di un prodotto al perossido alcalino. I rapporti clinici indicavano che dopo 4 o 5 settimane di trattamento con il prodotto al perossido alcalino, tutte le unità avevano valori sotto 200 CFU/ml, e il biofilm sui campioni di tubature esaminate con SEM era assente o a chiazze. Il biossido di cloro è un biocida che controlla efficacemente i biofilm in tante applicazioni. Previene anche la contaminazione delle membrane per osmosi inversa ed è meno aggressivo verso le membrane del cloro. Il biossido di cloro è stato più efficace su biofilm che contenevano *Legionella pneumophila* ed *Escherichia coli*, a parità di dosaggio. In una fabbrica di carta, il biossido di cloro stabilizzato ha controllato la formazione di viscidume e si è rivelato meno tossico e irritante che il cloro. Il biossido di cloro ha controllato il biofilm più efficacemente che un antibiotico nei cateteri vascolari fissi di tubo in silicone. Sull'acciaio inossidabile e superfici in polivinile il biossido di cloro si è dimostrato efficace contro biofilm che contenevano *E. coli*. In un sistema idrico di un ospedale, il biossido di cloro stabilizzato è stato più efficace del cloro nel controllare la *Legionella*, e non ha corroso i tubi ne causato odori.

Il biossido di cloro si è mostrato anche più efficace del cloro nel controllare i biofilm su scambiatori di calore in acciaio inossidabile in un impianto di trattamento idrico, e nelle linee idriche di irrigazione a goccia. In esperimenti su biofilm che contenevano *L. pneumophila* in sistemi di linee idriche, il biossido di cloro (0.5 ppm) ha diminuito i valori di 2 o 3 log, e ha diminuito notevolmente i biofilm visto tramite SEM. Il biossido di cloro è stato più efficace che il cloro nel prevenire viscidume, odori e sapori disgustosi in un impianto di lavorazione del cibo.

In un contesto odontoiatrico, un collutorio a base di biossido di cloro stabilizzato ha diminuito i valori batterici nell'effluente di 4 DUWL testati, a meno di 200 CFU/ml, e gli inserti in metallo non hanno subito effetti negativi. In un contesto di studio privato, il biossido di cloro stabilizzato usato in serbatoi indipendenti ha diminuito considerevolmente l'HPC ($P>0.05$). Anche il collutorio al biossido di cloro stabilizzato usato per lavaggio di ablatori ultrasonici del tartaro ha diminuito considerevolmente l'HPC ($P<0.05$), più che ad un controllo dopo 4 minuti di flussaggio di acqua, ed è stato notevolmente più efficace dopo essere stato nelle linee idriche la notte; il collutorio ha lasciato considerevolmente meno biofilm rilevato via SEM su campioni delle tubature idriche.

Nel autunno del 2001, decidemmo di svolgere dei test paralleli sui prodotti per lavaggio dei DUWL nelle 16 nuove unità dentali. L'assunto iniziale fu che non ci sarebbero state differenze nella capacità dei prodotti di controllare valori di HPC e biofilm nei DUWL. Le valutazioni furono fatte per rispondere a domande logistiche come i tempo, i costi e la sicurezza.

Materiali e metodi

Le 16 unità dentali collegate a poltrone con sistemi idrici indipendenti presso la scuola specializzata d'odontoiatria dell'Università di California - San Francisco erano in uso già da 6 mesi. I loro serbatoi erano riempiti con soluzione salina sterile durante procedure chirurgiche, e riempiti con acqua negli altri casi. Le unità furono divise casualmente in 3 gruppi di trattamento: 5 furono trattate con un prodotto a perossido alcalino, altre 5 con un prodotto al biossido di cloro appena miscelato, e altre 5 con una soluzione di biossido di cloro stabilizzata. Un'unità non trattata serviva da riferimento (fig. 2). Tutte le unità furono fornite di attacchi rapidi con circa 2 metri e mezzo di tubo, da attaccare alla base della poltrona, dove si connettevano le linee d'acqua degli ablatori ultrasonici del tartaro.

Regimi di riferimento e trattamenti

Riferimento Il regime di riferimento fu quello suggerito dal produttore dell'unità dentale, ma senza usare nessun disinfettante. Ogni notte la bottiglia dell'acqua venne svuotata e reinstallata, e venne collegato l'attacco rapido. I 2 raccordi rapidi per le turbine ad aria (coi manipoli rimossi), le due siringhe aria - acqua (AWS) manuali (con le punte rimosse), e il manicotto ad attacco rapido vennero tenuti sul lavabo mentre il pedale, i pulsanti dell'acqua delle AWS, e le valvole di flussaggio vennero attivate per spurgare il DUWL dall'acqua. Ogni mattina la bottiglia dell'acqua venne riempita di acqua del rubinetto e reinstallata, l'attacco rapido collegato, i tubi e manicotti vennero tenuti sul lavabo e tutti i tubi furono sciacquati con acqua per 2 minuti. L'attacco rapido fu rimosso e il serbatoio vuoto riempito d'acqua del rubinetto o, durante il giorno, con soluzione sterile salina, come richiesto.

Trattamento 2 - Trattamento al perossido alcalino

Secondo le indicazioni del MSDS (Material Data Safety Sheet, [equivalente alle Schede di Sicurezza in uso in Italia, n.d.t.]), il prodotto al perossido alcalino per pulire le linee idriche contiene sodio carbonato, sodio carbonato perossidrato, N-alchilidimetilbenzilammonio cloruro diidrato e sale tetrasodico tetraidrato dell'acido etilendiamminotracetico. Le indicazioni di concentrazione non sono fornite. Il prodotto è facilmente solubile in acqua e forma un liquido rosato. La procedura di utilizzo del perossido alcalino fu quella stabilita dal produttore. Un pacchetto dose singola venne versato in 8 oz di acqua calda (1 Oncia liquida USA = 29,57 millilitri), mescolato fino al dissolvimento, e versato nel serbatoio dell'acqua.

Il serbatoio venne reinstallato, l'attacco rapido collegato, e i raccordi rapidi, gli AWS, e i manicotti di attacco rapido vennero tenuti sul lavabo mentre il pedale, i pulsanti dell'acqua e le valvole di flussaggio vennero messe in funzione fino a che la soluzione rosata non apparve alla fine dei tubi. L'apparecchiatura venne quindi spenta e il perossido alcalino lasciato nel DUWL per tutta la notte. Il mattino successivo il serbatoio venne svuotato, poi riempito d'acqua calda e reinstallato; l'attacco rapido collegato, e i raccordi rapidi, gli AWS, e i manicotti di attacco rapido tenuti sul lavabo mentre tutti i tubi furono risciacquati fino a che il serbatoio non fosse vuoto. L'attacco rapido venne rimosso e il serbatoio vuoto riempito d'acqua del rubinetto o, durante il giorno, con soluzione sterile salina, come richiesto.

Questo trattamento d'urto venne ripetuto nei primi tre giorni della settimana 1 e nel primo giorno della settimana 2. Negli altri giorni le unità vennero trattate come per il regime di riferimento.

Trattamento 3 – Trattamento al biossido di cloro appena miscelato

Secondo le indicazioni del MSDS, la parte A del biossido di cloro appena miscelato è clorito di sodio (il sale dell'acido clorico), e la parte B è una combinazione di acido fosforico, acido lattico, e un catalizzatore non tossico. Le indicazioni di concentrazione non sono fornite. Quattro delle cinque unità assegnate a questo prodotto furono trattate con il detergente specifico, e una fu trattata con un collutorio. Il trattamento fu quello stabilito dal produttore. La prima notte, il serbatoio fu rimosso, riempito per metà con acqua del rubinetto fredda; vennero aggiunti 60ml di parte A e 60ml di parte B e a completamento, riempito di acqua del rubinetto, e reinstallato. L'attacco rapido fu collegato, e, rimossi i manipoli, i raccordi rapidi, gli AWS, e i manicotti di attacco rapido vennero tenuti sul lavabo mentre il pedale, i pulsanti dell'acqua e le valvole di flussaggio vennero messi in funzione fino a che il serbatoio non fosse completamente vuoto. Il serbatoio poi venne riempito di acqua del rubinetto e tutti i tubi risciacquati fino a che il serbatoio non fosse di nuovo vuoto e tutti i liquidi vennero spurgati dall'apparecchiatura con aria compressa.

Il mattino seguente, il serbatoio dell'acqua venne riempito per metà di acqua del rubinetto alla quale venne aggiunto 1 ml di parte A e 1 ml di parte B. Il serbatoio venne poi completamente riempito di acqua del rubinetto, e reinstallato. L'attacco rapido fu collegato, e i raccordi rapidi, gli AWS, e i manicotti di attacco rapido vennero tenuti sul lavabo mentre il pedale, i pulsanti dell'acqua e le valvole di flussaggio vennero messi in funzione per 2 minuti.

Durante il giorno il serbatoio venne riempito al bisogno con le due dosi da 1 ml e, a completamento, acqua del rubinetto o soluzione salina sterile per le procedure chirurgiche.

Trattamento 4 – Trattamento al biossido di cloro stabilizzato

Secondo l'MSDS, il biossido di cloro è l'ingrediente attivo e gli ingredienti nell'etichetta sono biossido di cloro, fosfato trisodico e acqua purificata, senza indicazioni di concentrazione. La maggior parte del prodotto è clorito di sodio e biossido di cloro nascente si forma quando il prodotto incontra un composto reattivo o un basso pH. Il trattamento fu quello del produttore, ma la quantità usata nel trattamento d'urto iniziale fu maggiorata da 100 ml a 150 ml, per compensare il volume del manico ad attacco rapido.

Alla fine del primo giorno, l'attacco rapido venne collegato, e, rimossi i manipoli, 150 ml di concentrato venne versato nel serbatoio dell'acqua, quindi i raccordi rapidi, gli AWS, e i manicotti di attacco rapido vennero tenuti sul lavabo mentre il pedale, i pulsanti dell'acqua e le valvole di flussaggio vennero messe in funzione per 30 secondi. Quindi l'unità venne spenta, l'attacco rapido rimosso e il concentrato lasciato nel DUWL per tutta la notte. Il mattino successivo il serbatoio dell'acqua venne rimosso e vennero aggiunti 75ml di concentrato e a completamento, riempito d'acqua del rubinetto, avendo così una soluzione 1:10.

L'attacco rapido venne collegato, quindi i raccordi rapidi, gli AWS, e i manicotti di attacco rapido vennero tenuti sul lavabo mentre il pedale, i pulsanti dell'acqua e le valvole di flussaggio vennero messe in funzione per 30 secondi. Quindi l'unità venne spenta, l'attacco rapido rimosso.

Durante il giorno il serbatoio venne riempito al bisogno con la soluzione 1:10 o soluzione salina sterile per le procedure chirurgiche.

Nei giorni successivi il serbatoio dell'acqua venne riempito con soluzione 1:10 fresca, fatta scorrere per 30 secondi ogni mattina.

Tutte le apparecchiature furono utilizzate e pulite dal personale residente, che fornì inoltre i dati di durata delle procedure di pulizia dei DUWL e prese nota di anomalie di odore, sapore, eventuali irritazioni riportate da pazienti o di effetti sugli abiti.

Valutazione microbiologica

Tutti campioni vennero prelevati la mattina dall'AWS sul lato delle unità dentali dell'assistente del dentista. Furono indossati guanti sterili, una punta pulita usa e getta fu inserita nell'AWS; la linea dell'acqua dell'AWS venne sciacquata per 2 minuti. Questo risciacquo fu fatto dopo qualsiasi risciacquo richiesto dal regime di pulizia delle linee dell'acqua. Due campioni furono presi dall'AWS e inseriti in campionatori HPC, il primo campione diluito a 1:10 con acqua sterile, il secondo non diluito. La paletta del campionatore HPC venne reinserita nello stesso per 30 secondi, o finché non uscivano più bollicine d'aria dalla bocchetta di ventilazione. La paletta venne poi rimossa e la custodia svuotata. La paletta e la custodia vennero scosse per togliere gocce d'acqua, e la paletta venne reinserita nella custodia. I campionatori vennero incubati per 7 giorni a temperatura ambiente.

Terminata l'incubazione, la paletta venne tolta e tenuta leggermente angolata sotto una luce per evidenziare meglio le colonie arrotondate, visibili come un'ombra sul lato più vicino, e una luminescenza sul lato più lontano. Le colonie vennero contate sotto un microscopio per dissezione a 10.5 X ingrandimenti. La membrana filtro sulla superficie del cuscinetto di coltura ha dei quadretti segnati in inchiostro, per facilitare il conteggio. Solo i quadretti pieni vennero contati; i quadretti parzialmente riempiti sui bordi o negli angoli non vennero contati. Furono di solito sei o sette quadretti interi dall'alto in basso, e undici o dodici orizzontalmente. Le colonie vennero contate considerandole individuali se non si toccavano, o, pure se si toccavano, se erano diverse in forma e colore. Quando il cuscinetto ebbe delle zone con proliferazione di colonie, vennero contati i quadretti contenenti colonie, ed i conteggi vennero riparametrati secondo il totale di quadretti contabili. I conteggi vennero ripetuti per esattezza e vennero fatti senza avere conoscenza del numero dell'unità dentale, del regime di trattamento, o dei conteggi precedenti. Dato che il materiale del cuscinetto del campionatore assorbe 1 ml d'acqua, i conteggi vennero riportati in CFU/ml. Un secondo investigatore, anch'esso non conoscendo il numero dell'unità e il tipo di trattamento, fece una conta indipendente delle campionature.

La maggior parte dei giorni vennero fatti otto conteggi per ogni unità: due investigatori fecero conteggi ripetuti dei campioni diluiti e non diluiti. Ciò nonostante, i conteggi vennero presi da un solo investigatore il secondo giorno. Due dei trattamenti ebbero parecchi conteggi con valore di 0. Per il fatto che parecchi dei conteggi a 0 ebbero delle distribuzioni asimmetriche non poterono essere soddisfatte le ipotesi parametriche per la regressione lineare semplice. Quindi è stata usata la regressione binomiale negativa. Questa è una generalizzazione della distribuzione di Poisson, che è spesso usata per contare i dati. Per via dei diversi tempi del regime di trattamento e delle diverse conseguenze degli intervalli nei weekend, non abbiamo fornito un modello complessivo unico che comprendesse tutti i giorni, ma abbiamo analizzato ogni giorno separatamente. Per rappresentare la probabile dipendenza fra molteplici conteggi della stessa unità, abbiamo usato il metodo generalizzato per stimare le equazioni con stima robusta differenziata della varianza. Tutti i modelli comprendevano come co-varianti, 1) se il campione era diluito, 2) l'investigatore, e 3) il logaritmo del valore medio stimato del campione di riferimento del primo giorno dell'unità, prima del trattamento, (per prevedere la possibilità che alcune unità avessero più batteri degli altri). I conti pronosticati riportati sono quelli dei modelli binomiali negativi con co-varianti uguali alla media dei due investigatori, la media dei logaritmi dei conteggi prima del trattamento e nessuna diluizione. Per i conteggi di 0 nei giorni di trattamento, elenchiamo il limite di confidenza

superiore come 1, visto che la probabilità che tutte le cinque unità abbiano un valore =0 è <0.05, se la vera media fosse 1.

	Mon	Tue	Wed	Thu	Fri		Mon	Tue	Wed	Thu	Fri
Day	0	1	2	3	4		7	8	9	10	11
Alkaline peroxide (tx 2)	*	*	*	s	s		*	s	s	s	s
Mixed ClO ₂ (tx 3)	s	s-c	s-c	s-c	s-c		s-c	s-c	s-c	s-c	s-c
Buffered ClO ₂ (tx 4)	*	s-c	s-c	s-c	s-c		s-c	s-c	s-c	s-c	s-c
Control	s	s	s	s	s		s	s	s	s	s

Figura 2

Calendario del regime di trattamento delle condutture. Day 0: inizio; s: prelievo mattutino per conta batterica; *: trattamento shock serale; c: uso giornaliero di agente disinfettante diluito.

Microscopio elettronico a scansione

La settimana prima e la settimana dopo la sperimentazione clinica, vennero prese delle biopsie dalla linea idrica dell'AWS sul lato dell'assistente del dentista dell'unità dentale. Vennero tagliati con un bisturi fresco e sterile gli ultimi 5mm della linea idrica vicino all'attacco della siringa AWL, per poi esaminare il campione al SEM. I campioni di tubi vennero fissati in glutaraldeide 3% in 0.2 M di sodio cacodilato (dimetilarinsato di sodio) a tampone, e depositati in un fissativo per diverse settimane. I campioni vennero poi rimossi, lavati in acqua purificata, tagliati in sezioni, e tagliati per la lunga per esporre la superficie interna. Dopo il fissaggio, i campioni vennero disidratati mediante una serie di passaggi in alcol etilico per un minimo di un'ora per ogni fase (50%, 70%, 80%, 90%, 95% e 100% con 100% ripetuta), e poi asciugati con Esametildisilazano 100%, per minimizzare il restringimento a causa dell'asciugamento, come hanno descritto Perdigao e altri.

I campioni di tubi vennero fissati su del nastro di rame a doppia faccia, e uno strato di 10 nm d'oro venne spruzzato sui campioni. I campioni vennero esaminati con SEM ad un voltaggio operativo di 5 KeV, con un raggio di diametro pari a circa 8.5 nm, e un corrente di raggio pari a 1.5nA. Le immagini vennero prese digitalmente (1000x) al punto centrale dei condotti.

La quantità di copertura dei biofilm in ognuna delle 32 immagini risultanti venne classificata da 1 (la più bassa) a 32 (la più alta), dopodichè fu rivelata la chiave per riconoscere il codice del campione (prima o dopo il trattamento) e il gruppo di trattamento. I valori medi nei risultati di ogni gruppo vennero statisticamente analizzati per cambiamenti nella copertura di biofilm, secondo la classificazione di Wilcoxon.

Risultati

Microbiologici:

Le correlazioni intra-esaminatore dei conteggi originali e replicati furono molto alte ($r=0.998$, $P<0.0001$; e $r=0.987$, $P<0.0001$). I conteggi microbici indipendenti dei due investigatori furono in perfetto accordo (coefficiente di correlazione di Spearman di 0.894, $P<0.0001$). I risultati sono elencati in Tabella 2. I conteggi medi stimati e l'intervallo di confidenza 95% del riferimento (Trattamento 1), raramente raggiunsero l'obiettivo ADA di 200 CFU/ml. Il Trattamento 2 raggiunse l'obiettivo nei giorni subito dopo i trattamenti d'urto, ma col tempo cominciarono a ritornare al valore di riferimento. Figura 3 mostra i conteggi di questo gruppo in relazione a quelli di riferimento e agli standard per linee idriche.

I Trattamenti 3 e 4 ebbero cali drammatici dal valore di riferimento a 0 o quasi 0. Non vedemmo alcun valore maggiore di 200 per i Trattamenti 3 e 4 in qualsiasi giorno, persino dopo molteplici conteggi per ognuna delle unità. Figura 4 mostra i conteggi del Trattamento 3 in relazione a quelli di riferimento e agli standard per linee idriche.

Il Trattamento 4, dopo il trattamento d'urto iniziale, ebbe valori di 0 HPC per tutte le cinque unità trattate. Figura 5 mostra i conteggi del Trattamento 4 in relazione a quelli di riferimento e agli standard per linee idriche.

Nell'unità trattata con la variazione del collutorio a base di biossido di cloro appena miscelata, l'HPC diminuì all'incirca del 95%, dal valore di riferimento di 2.105 CFU/ml a 112 CFU/ml il giorno seguente. Comunque, ci furono numerosi valori alti, che vennero interpretati come possibili distaccamenti di chiazze di biofilm, e questi dati non furono inclusi nell'analisi.

Tabella 2

Conta media stimata al 95% di intervallo di confidenza nei riuniti odontoiatrici espressa in UFC/ml dall'inizio alla fine di due settimane lavorative (i trattamenti non furono fatti nel weekend, giorni 5 e 6).

Day	Treatment 1 (control)	Treatment 2†	Treatment 3‡	Treatment 4§
0*	992 (976-1009)	1,343 (1061-1699)	1,123 (876-1440)	1,260 (909-1746)
1	444 (289-684)	47 (3-697)	0 (0-1)	0 (0-1)
2	171 (63-468)	21 (2-190)	2 (0-33)	0 (0-1)
3	408 (162-1027)	56 (16-203)	0 (0-1)	0 (0-1)
4	290 (240-350)	575 (257-1287)	0 (0-1)	0 (0-1)
7	162 (91-291)	45 (30-68)	3 (0-17)	0 (0-1)
8	378 (228-627)	67 (11-421)	0 (0-1)	0 (0-6)
9	199 (116-342)	257 (110-600)	0 (0-1)	0 (0-1)
10	265 (167-419)	69 (24-198)	0 (0-1)	0 (0-1)
11	130 (103-163)	438 (251-765)	0 (0-1)	0 (0-1)

* Day 0 è l'inizio, prima del trattamento

† Trattamento 2, perossido alcalino

‡ Trattamento 3, biossido di cloro miscelato

§ Trattamento 4, biossido di cloro stabilizzato

La Tabella 3 presenta i risultati del confronto fra i trattamenti. I rapporti stimati dei valori per il Trattamento 2 nei confronti del valore di riferimento furono considerevoli ($P<0.05$) per solo tre giorni. I Trattamenti 3 e 4 ebbero sempre risultati migliori dei valori di riferimento ($P<0.001$).

Il trattamento 3 risultò più efficace del Trattamento 2 in otto su nove confronti. Il Trattamento 4 risultò migliore del Trattamento 2 in tutti confronti. I valori furono troppo bassi da permettere significativi calcoli statistici in entrambi i Trattamenti 3 e 4. Sembra che i risultati siano equivalenti in termini di risultati microbiologici.

Microscopio elettronico a scansione:

Una SEM venne effettuata per stabilire se i prodotti testati semplicemente ridussero le forme planctoniche di eterotrofi ammassate, o si ebbe un considerevole effetto nella rimozione del biofilm stesso. La copertura di biofilm diminuì in quattro su cinque campioni in ciascuno dei gruppi sperimentali, ma aumentò nel campione di riferimento. Prima dei trattamenti i valori medi furono paragonabili: il Trattamento 3 (ClO₂ appena miscelata), 22.8; il Trattamento 4 (ClO₂ stabilizzata), 19.8; e il Trattamento 2 (perossido alcalino), 18.8. Dopo i trattamenti, i valori medi furono più bassi; il Trattamento 2 fu 2.6 in meno; il Trattamento 3 fu 10.2 in meno; e il Trattamento 4 fu 9.0 in meno. Comunque, l'analisi statistica usando il metodo Wilcoxon non mostrò alcuna differenza significativa nella copertura per ogni gruppo. Questo fu probabilmente dovuto al ridotto numero di campioni per ogni gruppo ($n=5$) e del riferimento ($n=1$).

In generale, le immagini ottenute prima del trattamento mostravano una quasi completa copertura di biofilm con microrganismi filamentosi o a forma di stecca sia sparsi sulla superficie, sia agglomerati in masse e grumi di non riconoscibili detriti (Fig. 6 e 7). Le immagini dopo i trattamenti mostravano meno microrganismi nella superficie del biofilm, e qualche sporadica chiazza di tubo senza niente (Fig. 8 e 9).

Questioni logistiche

Per il trattamento dell'unità di riferimento, l'asciugatura e il risciacquo ci vollero 4,6 minuti la sera e 4,3 minuti la mattina. Nel gruppo con il prodotto al perossido alcalino, ognuna delle cinque unità ebbe quattro trattamenti d'urto. La durata media per il trattamento serale col prodotto fu di 4,4 minuti; il risciacquo mattutino durò in media 4,6 minuti. La cura quotidiana negli altri giorni durò in media 4,1 minuti la sera, e 4,6 minuti il mattino. Il costo giornaliero per unità, calcolato in base al prezzo di mercato del prodotto, fu di \$0,86 per ogni unità, per i 10 giorni delle prove. Non ci furono segnalazioni dai pazienti ne' di irritazioni, ne' di percezioni sgradevoli di odore o gusto. Ci fu però un po' di confusione quando la soluzione rosata schiumò fuori dall'AWS e dalle tubature dopo il trattamento d'urto. La soluzione rosata dopo ripetuti test mostrò un pH = 11.2.

Le unità trattate con biossido di cloro miscelato fresco ebbero ognuna un iniziale trattamento d'urto, seguito da una cura quotidiana col prodotto diluito.

Per il trattamento iniziale, comprensivo della miscelazione delle dosi da 60 ml di parte A e B e successivo risciacquo, ci vollero in media 17 minuti la sera e 9 il mattino seguente. La cura quotidiana col prodotto diluito richiese in media 5,9 minuti la sera e 5,9 minuti il mattino. Il costo giornaliero per unità, calcolato in base al prezzo di mercato del prodotto, fu di \$0,11. Uno degli addetti commentò che l'odore del concentrato era irritante per il naso e le altre vie aeree. La soluzione usata nel trattamento d'urto mostrò un pH = 3,6 (parte A, pH=13,2; parte B, pH1,3). La soluzione in uso per la cura quotidiana mostrò un pH=6,8.

Anche nel gruppo col trattamento al biossido di cloro stabilizzato a tampone le unità ebbero un iniziale trattamento d'urto e una cura quotidiana col prodotto diluito.

La durata media del trattamento d'urto fu di 7,7 minuti la sera e di 6,0 minuti il mattino. Per la cura quotidiana occorsero 3,6 minuti la sera e 4,1 minuti il mattino.

Il costo giornaliero per unità, calcolato in base al prezzo di mercato del prodotto, fu di \$0,35.

Solo uno degli addetti lamentò un lieve odore di cloro al dosaggio del concentrato.

Il concentrato usato per il trattamento d'urto mostrò un pH=6,8, mentre la soluzione a 1:10, usata per la cura quotidiana, un pH=7,0.

Conclusioni

I resoconti sulle contaminazioni dei DUWL e sulla loro importanza come fattore di infezioni nosocomiali in pazienti e addetti ai lavori, hanno messo l'accento sui rischi per i soggetti immuno-compromessi.

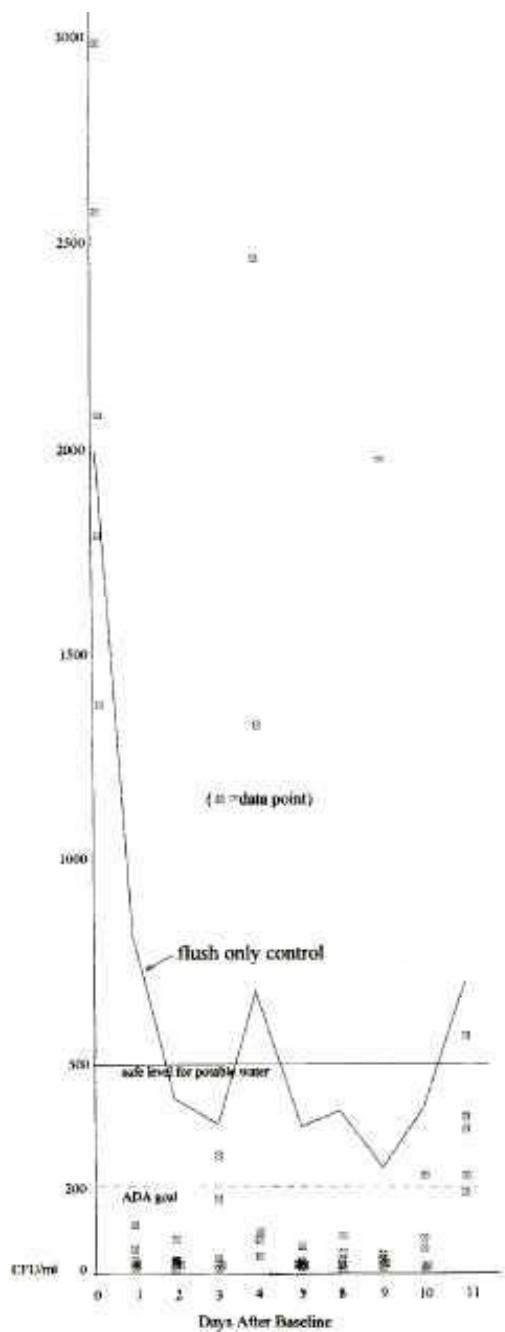


Figura 3
Grafico mostrante le conte mattutine di UFC/ml per 5 riuniti effettuate dal giorno di inizio (giorno 0) e proseguite giornalmente per 9 giorni. Un trattamento shock con perossido alcalino è stato effettuato alla sera dei giorni 0, 1, 2 e 7. La conta media giornaliera stimata è variata da 21 a 575 UFC/l nei giorni di osservazione.

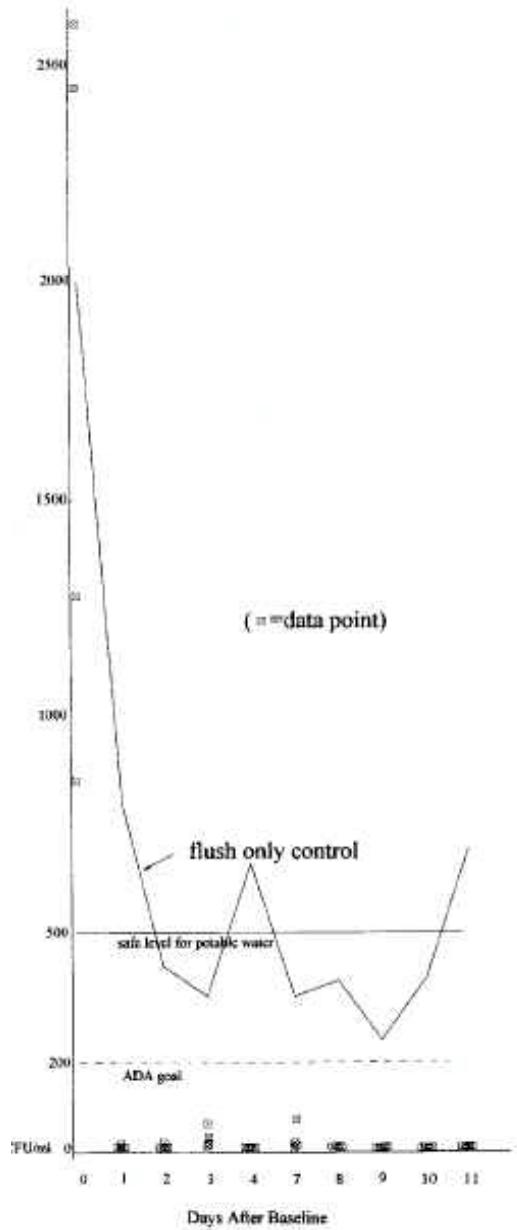


Figura 4

Grafico mostrante le conte mattutine di UFC/ml per 4 riuniti effettuate dal giorno di inizio (giorno 0) e proseguiti giornalmente per 9 giorni. Un trattamento shock con biossido di cloro appena miscelato è stato fatto la sera del giorno 0, e il trattamento in continuo con biossido di cloro diluito è stato proseguito giornalmente. La conta media giornaliera stimata è variata da 0 a 3 UFC/l nei giorni di osservazione.

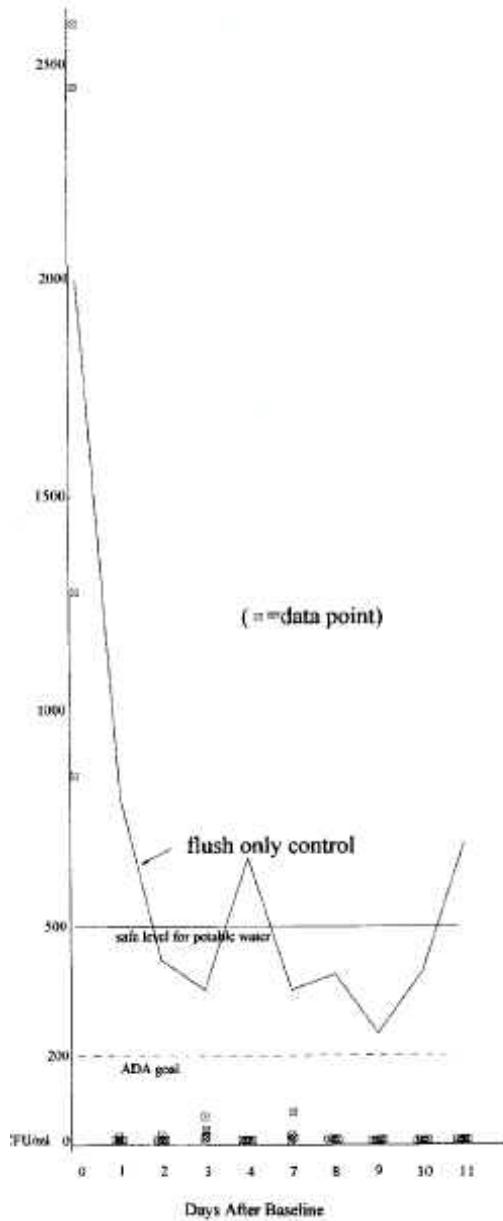


Figura 5

Grafico mostrante le conte mattutine di UFC/ml per 5 riuniti effettuate dal giorno di inizio (giorno 0) e proseguiti giornalmente per 9 giorni. Un trattamento shock con biossido di cloro stabilizzato è stato fatto la sera del giorno 0, e il trattamento in continuo con biossido di cloro stabilizzato diluito è stato proseguito giornalmente. La conta media giornaliera stimata è variata da 0 a 1 UFC/l nei giorni di osservazione.

Tabella 3
Comparazione dei trattamenti dei riuniti

Day	Treatment 2/Control		Treatment 3/Control*	
	Effect (95% CI)	P	Effect (95% CI)	P
1	0.11 (0.01-1.16)	0.066	0 (0-0.001)	<0.001
2	0.12 (0.01-2.8)	0.19	0.01 (0.001-0.09)	<0.001
3	0.14 (0.02-0.99)	0.049	0 (0-0)	<0.001
4	1.99 (0.86-4.6)	0.11	0†	<0.001
7‡	0.28 (0.11-0.70)	0.007	0.017 (0.003-0.081)	<0.001
8	0.18 (0.02-1.7)	0.13	0†	<0.001
9	1.29 (0.54-3.1)	0.57	0 (0-0)	<0.001
10	0.26 (0.07-1.04)	0.058	0 (0-0)	<0.001
11	3.4 (1.7-6.6)	<0.001	0 (0-0)	<0.001

Gli effetti valutati sono i rapporti tra i conteggi del primo trattamento elencato e quello del secondo elencato. I conteggi dei trattamenti 3 e 4 hanno avuto troppi zero per permettere comparazioni di questi trattamenti.

* Il valore “0” indica un valore < 0,001

† Intervallo di confidenza non disponibile per parametro di stima infinito. I valori P sono rapporti di probabilità.

‡ Campioni non prelevati nel weekend, giorni 5 e 6.

Tabella 3 (CONTINUAZIONE)
Comparazione dei trattamenti dei riuniti

	Treatment 4/Control*		Treatment 3/Tx 2*		Treatment 4/Tx 2*	
	Effect (95% CI)	P	Effect (95% CI)	P	Effect (95% CI)	P
	0 (0-0)	<0.001	0.003 (0-0.043)	<0.001	0 (0-0)	<0.001
	0†	<0.001	0.08 (0.001-10.0)	0.31	0†	<0.001
	0 (0-0.002)	<0.001	0 (0-0)	<0.001	0.002 (0-0.013)	<0.001
	0†	<0.001	0†	<0.001	0†	<0.001
	0 (0-0.001)	<0.001	0.06 (0.007-0.48)	0.008	0 (0-0.06)	<0.001
	0.002 (0.001-0.01)	<0.001	0†	<0.001	0.01 (0-0.42)	0.014
	0.001 (0.0-0.007)	<0.001	0 (0-0)	<0.001	0.001 (0-0.005)	<0.001
	0.001 (0.0-0.004)	<0.001	0 (0-0)	<0.001	0.004 (0.00-0.018)	<0.001
	0.003 (0.001-0.012)	<0.001	0 (0-0)	<0.001	0.001 (0-0.004)	<0.001

I microrganismi trovati negli effluenti delle DUWL sono da considerarsi di bassa patogenicità, e ci sono poche prove che uno qualunque di essi abbia direttamente causato un'infezione in un essere umano. Sono plausibili infezioni opportunistiche da forme planctoniche di questi batteri. La *Pseudomonas cepacia* può essere associata con la fibrosi cistica, la *Pseudomonas aeruginosa* con le ustioni, e la *Legionella pneumophila* con la "polmonite del Legionario" o la "febbre di Pontiac"; microbatteri non tubercolotici sono considerati patogeni emergenti.

Ci sono parecchie segnalazioni, in pazienti ospedalizzati, di infezioni causate da questi organismi che crescono sotto forma di biofilm presente nei sistemi idrici degli ospedali, in apparecchiature mediche e persino nelle soluzioni antisettiche.

Un altro motivo di preoccupazione è però di particolare rilevanza per la pratica quotidiana della periodontia. La "periodontite refrattaria" è la maledelineata diagnosi per indicare una periodontite che non risponde alle pratiche di igiene orale convenzionali, detartraggio in profondità e piallatura delle radici, chirurgia gengivale e terapia di mantenimento di routine. Studi successivi negli studi ortodontici hanno descritto dai 4% ai 28% di pazienti "in peggioramento" o "estremamente in peggioramento"; alla maggior parte di essi furono associate tasche più profonde nei molari.

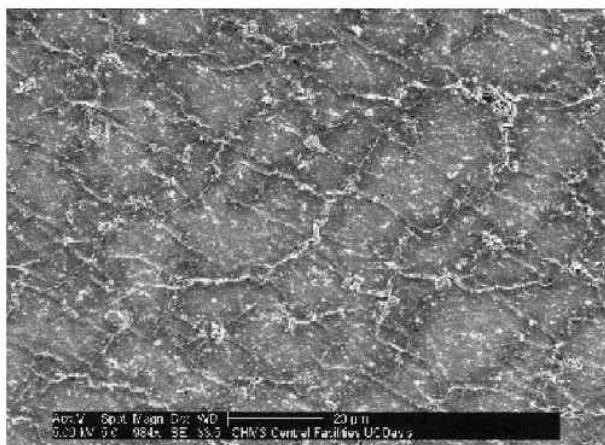


Figura 6
SEM (Microscopia Elettronica a Scansione) della superficie interna del condotto idrico del riunito dal lato dell'assistente prima del trattamento. C'è uno strato aderente continuo di biofilm. Bastoncelli e organismi filamentosi di varie dimensioni punteggiano la superficie. (ingrandimento originale x1.000)

Rapporti su casi e studi clinici riguardo alla periodontite refrattaria, hanno avuto problemi per i vaghi criteri di quelle diagnosi, e studi su microrganismi associati con le malattie refrattarie, hanno cercato legami con patogeni periodontici putativi. Lo screening della microflora sottogengivale per i 40 taxa riconosciuti, trovò che l'unica differenza statistica rilevante fra casi refrattari e casi curati fu nei livelli di *Prevotella nigrescens*. Bastoncelli enterici sono stati segnalati in casi di periodontite in soggetti umani; in uno studio su 500 pazienti che ebbero la perdita ricorrente d'attaccamento refrattaria alle terapie inclusi antibiotici, lieviti furono identificati in 84 pazienti, e bastoncelli enterici o pseudomonadi in 51 pazienti. Furono identificati: *Achromobacter spp.*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Alcaligenes spp.*, *Citrobacter freundii*, *Cladosporium*, *Enterobacter aerogenes*, *E. agglomerans*, *E. cloacae*, *Escherichia coli*, *Flavobacterium spp.*, *Klebsiella oxytoca*, *K. Pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas acidovorans*, *P. aeruginosa*, *P. cepacia*, *P. maltophilia*, and *Serratia marcescens*.

Parecchi di questi organismi sono stati trovati nei DUWL (Tabella 1)

La maggior parte di questi ceppi Gram negativi a bastoncello, isolati in casi di periodontite refrattaria, furono resistenti a trattamenti meccanici rigorosi e anche a tetraciclina, penicillina, e eritromicina. Una terapia sistematica con Ciprofloxacin richiese 10 giorni di regime. La resistenza all'antibiotico di questi organismi indica che potrebbero essere stati

inoculati nelle cavità periodontali dai DUWL contaminati, per poi stabilirsi sotto forma di biofilm nel nuovo ambiente.

In aggiunta alle possibili inoculazioni di microrganismi nelle cavità periodontali in pazienti sottoposti a cura, si deve prendere in considerazione il male che potrebbe essere inflitto a causa dell'instillazione di endotossine diffuse da questi eterotrofi Gram negativi. Il livello di (EU), l'unità di endotossina media, in campioni d'effluente dai DUWL, è stato misurato a 80.7 EU/ml, che è abbastanza da causare la febbre in un paziente sano e normale. Nei campioni prelevati da 11 unità dentali con contaminazione da biofilm estesa, e anche valori vitali alti, il livello di endotossine fu 2.560 EU/ml, prima del risciacquo. La correlazione fra HPC ai livelli di endotossine fu considerevole ($r=0.69$, $P>0.05$). Anche dopo 10 minuti di risciacquo, il livello di endotossine fu 220 EU/ml. I filtri non fermarono il flusso di endotossine. L'uso di soluzione salina sterile in un sistema idrico indipendente di un'unità, non fermò il flusso di eterotrofi e di endotossine dai biofilm situati a valle del serbatoio.

I biomateriali costituiscono un rischio per la creazione di biofilm e le infezioni croniche susseguenti. Le suture e impianti ortopedici possono acquisire i semi d'un biofilm al momento della chirurgia, o possono arrivare dopo l'impianto dagli sciami di eterotrofi rilasciati dai biofilm sui cateteri o sui pacemaker. L'esame diretto su osso necrotico rimosso da due pazienti che ebbero l'osteomielite, dopo terapia per fratture alla gamba, rilevò dei biofilm composti da batteri Gram positivi e Gram negativi, all'interno d'un glicocalice positivo al rosso rutenio sulla superficie dell'osso; (vedi lista di batteri). Furono anche isolate delle colture dai campioni d'osso.

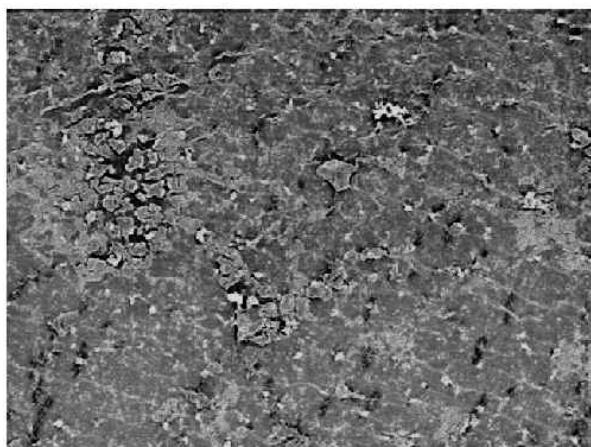


Figura 7
SEM (Microscopia Elettronica a Scansione) della superficie interna della tubazione plastica della siringa aria/acqua del riunito dal lato dell'assistente prima del trattamento. La superficie è punteggiata di detriti e di grappoli di bastoncelli e filamenti. (ingrandimento originale x1.000)

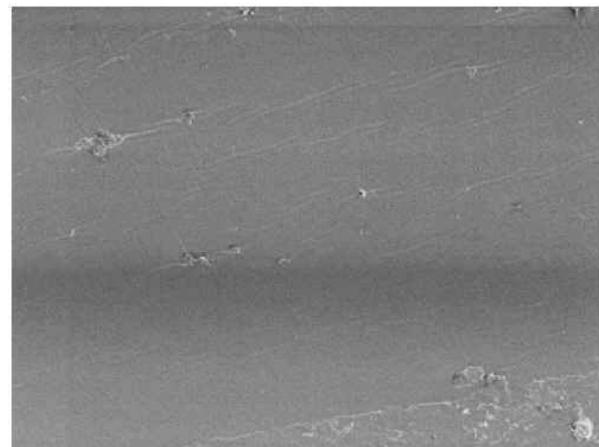


Figura 8
SEM (Microscopia Elettronica a Scansione) della superficie interna del condotto idrico del riunito dal lato dell'assistente dopo il trattamento con perossido alcalino. Sono visibili meno bastoncelli e filamenti e alcune parti della superficie del tubo sono visibili. (ingrandimento originale x1.000)

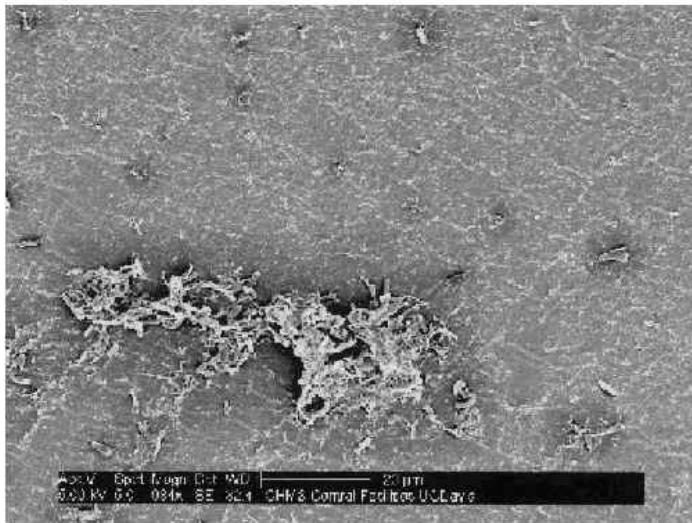


Figura 9
SEM (Microscopia Elettronica a Scansione) della superficie interna della tubazione plastica della siringa aria/acqua del riunito dal lato dell'assistente dopo il trattamento con biossido di cloro stabilizzato. C'è una pressoché completa rimozione del biofilm. Restano solo pochi microorganismi e detriti. Questo campione è l'unico che abbia presentato questo risultato. La maggior parte delle immagini erano simili alle figure 6, 7 ed 8. (ingrandimento originale x1.000)

Il succo per i clinici è che non possono permettere che la contaminazione dai DUWL causi "periodontite refrattaria" nei loro pazienti, ne' l'eventuale rimozione d'un impianto dentale indebolito che è stato inserito con cura e capacità. I clinici hanno bisogno di rimedi sicuri per il controllo dei biofilm nelle linee idriche delle unità dentali. Un prodotto che è solamente parzialmente efficace può causare valori HPC ancora più alti di quelli che esistevano prima dal trattamento dei DUWL.

Risciacquare le linee d'acqua per 2 minuti prima del trattamento dei pazienti, e disidratate le unità quando non sono in uso, come avvenne nella nostra unità di riferimento, furono metodi inefficaci e inconsistenti nel ridurre il HPC a livelli accettabili. Trattamenti al perossido alcalino potrebbero avere effetti positivi, dato che il perossido di idrogeno è stato consigliato e la chelazione dei cationi tramite EDTA è un possibile strategia di trattamento. I livelli di HPC, in questo studio, dopo l'uso del prodotto al perossido alcalino, furono troppo inconsistenti per essere accettabili; il costo fu maggiore d'altri agenti testati; e nonostante il tempo per svolgere le procedure richieste non fu diverso dal quello di riferimento, c'è una questione di sicurezza riguardo l'alto livello di pH del prodotto e il suo maneggiamento da parte del personale ausiliario.

I prodotti al biossido di cloro furono molto efficaci nel ridurre i livelli di HPC .

Dal punto di vista dell'efficacia, non ci fu nessuna differenza considerevole ne' nei valori CFU/ml che ottennero, ne' nei valori medi delle immagini SEM. Il prodotto al biossido di cloro appena miscelato ebbe un costo iniziale a gallone maggiore del prodotto al biossido di cloro stabilizzato a tampone, ma visto che ne viene usato meno quotidianamente, si risparmia nel tempo. Comunque, entrambi i trattamenti d'urto e la cura quotidiana del prodotto al biossido di cloro appena miscelato richiesero più tempo del trattamento con il prodotto al biossido di cloro stabilizzato a tampone. L'alto valore pH della parte A, il basso valore pH della parte B, e il basso valore pH e gli odori sgradevoli del biossido di cloro appena miscelato, sono fattori negativi per la sua accettazione.

Tutto sommato, le valutazioni di questo studio sostengono l'uso di biossido di cloro stabilizzato a tampone nel controllo dei biofilm nei DUWL per i seguenti motivi: non è costoso, richiede meno tempo, ha un valore pH neutro, e si è dimostrato molto efficace nel ridurre il CFU/ml dalle linee d'acqua delle unità dentali.

Formation and Decontamination of Biofilms in Dental Unit Waterlines

M. Robert Wirthlin,* Grayson W. Marshall Jr.,† and Randal W. Rowland*

Background: Biofilms are a natural occurrence in aquatic environments, including community drinking water systems. The interior of small-diameter tubings in dental unit waterlines (DUWL) are also sites of biofilm formation. In the lumen of the tubings, the flow is minimal, and the water becomes stagnant when the units are not in use. Molecules precipitate from the water onto the interior wall and promote the adherence of planktonic microorganisms from the water. Once they become sessile, the microorganisms change their phenotype. After adherence, there is a so-called surface-associated lag time, and the organisms then enter a growth phase and produce exopolysaccharides that coat the organisms in a slime layer. Within the biofilm, the microorganisms can signal one another, transfer nutrients, and exchange genetic material. The insoluble exopolysaccharides shield the microorganisms from displacement and from penetration by predator organisms, antibiotics, and disinfectants. The external surface layer of microorganisms is faster growing and may detach as "swarmer" cells. Detachment of microorganisms from dental unit biofilm flushed into the oral cavity could theoretically infect the patient. Splatter and aerosols from dental procedures may possibly infect health care personnel.

Methods: This study compared three DUWL cleaners (an alkaline peroxide product, a freshly mixed chlorine dioxide product, and a buffer-stabilized chlorine dioxide product) in 16 dental units with self-contained water systems, 6 months after installation in a periodontal teaching clinic. One unit treated by flushing and drying served as a control. Units were sampled daily for 10 days with heterotrophic plate count (HPC) sampler plates. The plates were incubated for 7 days at room temperature, and colonies were counted at 10.5 \times magnification. Samples of internal water tubing before and after the use of waterline cleaners were processed and examined by scanning electron microscopy.

Results: The estimated mean HPC was derived from original and replicate independent counts of two investigators of undiluted and diluted samples, reported as colony forming units (CFU)/ml. Shock treatments with the alkaline peroxide product ($n = 5$) reduced the HPC from baseline, but in the ratio of daily counts to control, there was a large variance and a trend to return of high counts as days passed. The mean daily HPC was significantly better than the control for only 3 of the 9 days of treatment and exceeded the goal of 200 on 3 days. Freshly mixed chlorine dioxide ($n = 4$) and the buffer-stabilized chlorine dioxide ($n = 5$) both reduced HPC to near 0 on all days. Their ratios of daily estimated means to that of the control were significantly ($P < 0.001$) better at all times. In comparing treatments, the freshly mixed chlorine dioxide was better ($P < 0.001$) than the alkaline peroxide on 8 of 9 days. The buffered chlorine dioxide treatment was better than the alkaline peroxide at all times. The two chlorine dioxide treatments each had so many HPC counts of 0 that a meaningful statistical difference between them was not calculated. Scanning electron microscopy of plastic waterline tubing samples taken before and after treatments showed reductions in biofilm coverage, but the differences were not statistically significant.

Conclusions: Chlorine dioxide waterline cleaners are effective in decontaminating DUWL biofilm. Chlorine dioxide has advantages over other chlorine products. Controlling DUWL biofilm may have beneficial effects on nosocomial infections. *J Periodontol* 2003;74:1595-1609.

KEY WORDS

Biofilms; cleansing agents; comparison studies; dental equipment; infection control; risk factors; water pollution/prevention and control.

* Department of Stomatology, Division of Periodontology, University of California-San Francisco, San Francisco, CA.

† Department of Preventive and Restorative Sciences, Division of Biomaterials and Bioengineering, University of California-San Francisco.

Dental unit waterlines (DUWL) are sites for the development of biofilms of aerobic, mesophilic, heterotrophic microorganisms commonly found in fresh drinking water systems.¹ Dental units contain many fine-diameter tubings (Fig. 1). The inside diameter of these tubings is about 1 to 2 mm, so the intraluminal surface-to-volume ratio is greater than in the water mains and pipes that bring the water to the units.¹ The flow of water in the mains, pipes, and tubings is laminar; therefore, the flow at the lumen surface is almost at a standstill.² In this zone, the bacteria may move by fluid flow, Brownian motion, sedimentation, and flagellae. Molecules in the water may adhere to the lumen surface by physical adsorption and chemisorption, providing a conditioned substratum that can attract other molecules projecting from the surface of the microorganisms by means of van der Waal's forces, electrostatic forces, hydrophobic forces, or chemisorption.

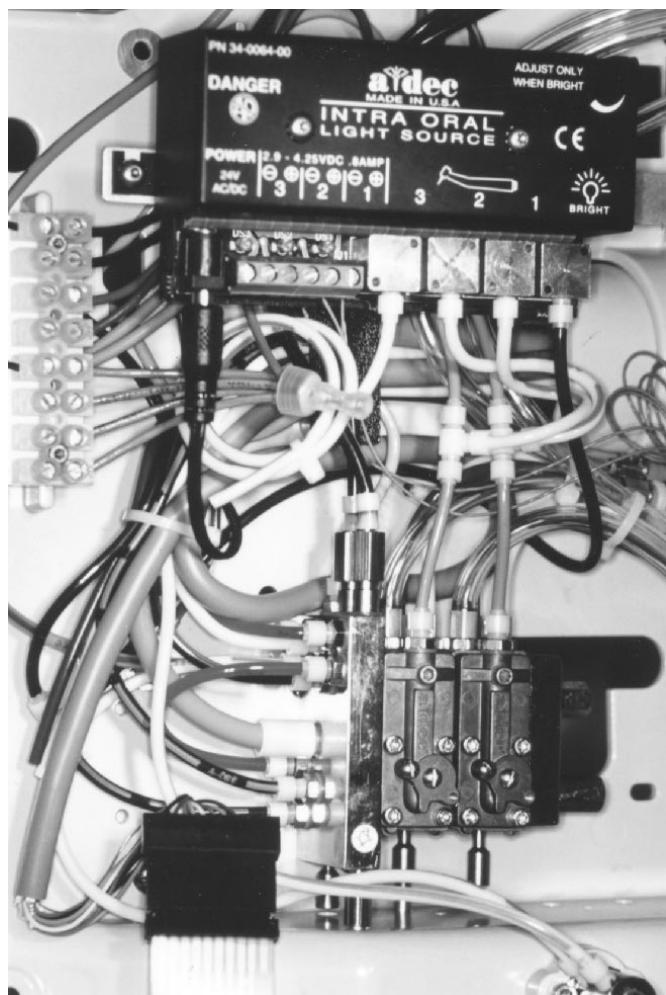


Figure 1.

Part of the interior of a modern dental unit, showing a portion of the many small tubings used to distribute compressed air and water.

tion of bacterial fimbriae, pili, or adhesins.³⁻⁵ Divalent cations may contribute to microbial adherence as they "bridge" anions precipitated on the lumen to those on the bacterial "fuzzy coat" or glycocalyx. These initial attractions may be considered weak and reversible.

After their initial adherence on a conditioned surface, the microorganisms enter a quiet phase, termed the surface-associated lag time, during which they may be changing the expression of their genes.^{6,7} Once they make the phenotypic shift and divide, the microorganisms enter a rapid growth phase and begin to secrete complex exopolysaccharides, a mucilaginous slime that cements the organisms to the surface and resists detachment by fluid shear forces.⁸ The exopolysaccharides form a coating on the bacteria and a fibrous matrix. Silt and other microorganisms may be trapped in the tangled matrix or adhere by the molecular interactions of ligand-substrate nature to the "forest" of protruding molecules.⁹

The growth of microcolonies within the matrix and the coaggregation of other bacteria increase the depth of the biofilm; however, it might not exceed 1,000 µm in thickness in a turbulent flow setting.¹⁰ The adherence of bacteria increases their density compared to their former free-floating planktonic state, and the signals they express may become concentrated enough to serve as autoinducer signal molecules.¹¹ Thereby the concentration may exceed a threshold, and the bacteria sense they have a "quorum."^{12,13} Gram-negative waterline bacteria *Pseudomonas aeruginosa* use N-acyl homoserine lactones and quinolone type signals. Gram-positive *Bacillus subtilis* and *Enterococcus faecalis* are also quorum-sensing. The signals are thought to allow cross-talk between species, causing them to increase their production of exopolysaccharide and the factors that increase their virulence.¹⁴ The exopolysaccharides are a heterogeneous group of substances consisting in general of neutral sugars, amino sugars, and some uronic acids. Streptococci may make glucans, dextrans, and levans.¹⁵ Gram-negative bacteria make acetylated polymers of uronic acids termed alginates. The reaction of the alginates with calcium ion in the water causes precipitation¹⁶ (as in dental impression materials). The exopolysaccharides are mostly insoluble in water.

Deep inside the accumulated biofilm, nutrients are transferred from one species to another, but the inward diffusion of oxygen and absorbed nutrients decreases. Studies with microelectrodes showed that oxygen penetrated no deeper than 25 or 30 µm.¹⁷ As a result, bacterial growth becomes very slow or almost static. The close quarters of the interior of biofilms may expedite gene sharing through conjugation, plasmid transfer, absorption of DNA from lysed cells, or cellular fusion of organisms like mycoplasma without walls.¹⁸ The matrix resists the physical displacement of biofilm bacteria, and it limits the inward diffusion of adverse agents

by consuming them through chemical reactions. Because the matrix is polyanionic, it resists the diffusion of cations; it also prevents the intrusion of antibodies, protects against invasion of amoebae and paramecia (or macrophages and neutrophils, in a living host), and increases the concentration of antibiotic-neutralizing enzymes such as beta-lactamase. The overall result is that microorganisms in a biofilm are many times more resistant to disinfection than in their planktonic phase.²

Although sheltered within the biofilm, the microorganisms may be iron-starved and compensate by corroding the surface of a metal substratum.⁷ The biofilm may start as a surface patch, but as it spreads and develops, it may take on the form of pillars or mushroom-like shapes, forming channels that improve the circulation of nutrients and the discharge of wastes and toxins.^{19,20} In a severely starved biofilm, stacks of colonies may extend up into the fluid bulk like dendrites; in a richly fed biofilm such as dental plaque, the colonies form a thick, dense film.²¹

Microorganisms on the surface are not as strongly embedded as those deep within the biofilm and are faster growing. Surface bacteria are susceptible to detachment by predator protozoans, abrasion or shear of fluids or particles in the stream, and periodically slough individuals or clumps.²² The detachment may serve the community of microorganisms by seeding downstream surfaces with the start of a new colony,²³ much like the swarming of bees.

CONTROL OF WATERLINE CONTAMINATION

Detachment of surface microorganisms from the biofilms in DUWL allows them to exit in the coolant of high-speed dental handpieces, in the flow of air-water syringes (AWS), and from ancillary equipment such as ultrasonic scalers attached to the dental units. These bacteria can then be flushed into the mouths of dental patients and become airborne as aerosols and droplets of splatter. When the dental units are not in use—between patients, at night, over weekends—the planktonic bacteria entering from the city water distribution system and those shed from the biofilm surfaces accumulate in large numbers. Counts as high as 1,000,000 colony forming units (CFU)/ml have been recorded.²⁴

It is a general principle that since dentists are entrusted with the care of their patients, they should eliminate the risk of high counts of bacteria from the effluent of their dental units. The American Dental Association (ADA) has called for dental researchers and dental manufacturers to design equipment and measures to reduce waterline contamination. The announced goal was to match the standards for kidney dialysate, or 200 CFU/ml.²⁵

Flushing

Flushing for 2 minutes in the morning and for 20 to 30 seconds between patients should be considered the

norm for dental office procedures, and longer flushing is suggested after weekends.²⁶ Flushing the waterlines removes the bulk of amassed bacteria. A 2-minute flush in the morning can reduce bacterial counts by 99%,²⁴ but it might take 8 minutes of constant flushing to get a count of 0,^{27,28} and the counts quickly return to high levels.²⁹ The microorganisms that are flushed from DUWL are varied. Even though a clinic may have multiple dental units all connected to the same community water system, counts and identifiable species will differ from unit to unit. Table 1 lists some of the species recovered by flushing from DUWL.^{24,29-42} However, not all of those recovered are viable, and not all of those viable are cultivable.³¹ In addition, fungi, protozoa, and aquatic nematodes have been identified.¹

Table I.

Microbial Species Isolated from DUWL^{24,29-32}

<i>Achromobacter</i> spp.	<i>Pasturella haemolyticus</i>
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	<i>Pasturella multocida</i>
<i>Actinomyces</i> spp.	<i>Pasturella pneumotrophica</i>
<i>Aeromonas</i> spp.	<i>Pseudomonas acidovorans</i>
<i>Alcaligenes faecalis</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>Bacillus</i> spp.	<i>Pseudomonas cepacia</i>
<i>Brevundimonas vesicularis</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
<i>Burkholderia cepacia</i>	<i>Pseudomonas maltophilia</i>
<i>Burkholderia picketii</i>	<i>Pseudomonas paucimobilis</i>
<i>Cephalosporum</i> spp.	<i>Pseudomonas picketii</i>
<i>Cladosporium</i> spp.	<i>Pseudomonas putida</i>
<i>Flavobacterium</i> spp.	<i>Pseudomonas putrefaciens</i>
<i>Legionella bozemani</i>	<i>Pseudomonas stutzeri</i>
<i>Legionella dumoffii</i>	<i>Pseudomonas vesicularis</i>
<i>Legionella longbeachae</i>	<i>Psychrobacter phenylpyruvica</i>
<i>Legionella pneumophila</i>	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>
<i>Methyllobacterium mesophilicum</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Moraxella phenylpyruvica</i>	<i>Staphylococcus cohnii</i>
<i>Moraxella urethalis</i>	<i>Staphylococcus warneri</i>
<i>Mycobacteria chelone</i>	<i>Streptococcus mitis</i>
<i>Mycobacteria flavescens</i>	<i>Streptococcus salivarius</i>
<i>Mycobacteria fortuitum</i>	<i>Xanthomonas maltophilia</i>
<i>Mycobacteria kansasii</i>	<i>Mycobacteria terrae</i>

Filters

To stop the effluent of waterline bacteria, filters near the end of a waterline have been recommended,⁴³ but they often foul rapidly and may have to be changed daily or more often. Downstream from the filter, there is almost certain to be more biofilm.⁴⁰ Filters trap the planktonic bacteria only; they do nothing to remove the biofilm.

Drying

Since biofilms are usually thin (200 or 300 µm) and are mostly water (>95%), drying the DUWL at night and on weekends by purging the waterlines with compressed air would seem to be rational. Furuhashi and Miyamae reported that air drying resulted in no CFU/ml when used in combination with flushing and 70% ethanol.⁴⁴ In other tests, however, drying alone seemed to offer no benefit.^{45,46} The exopolysaccharide matrix and the static growth conditions probably protect the bacteria from dessication.

Biocides

Treatment of DUWL biofilms with biocides may be done as periodic shock treatments or by continuous treatment systems.¹ Sodium hypochlorite solutions (NaOCl), or diluted bleach, have effectively reduced planktonic counts, but biofilms are 150 to 3,000 times more resistant to hypochlorite.⁴⁷ Using a combination of periodic shock and continuous treatment in dental units with independent reservoirs, Karpay et al.⁴⁸ reduced the heterotroph plate counts (HPC) in 10 dental units to less than 10 CFU/ml 5 days after the shock treatment. Examination by scanning electron microscopy (SEM) showed no morphological features of biofilm in six of 10 units. Fiehn and Henriksen⁴⁹ reported that the use of 1 to 2 ppm NaOCl in intermittent doses reduced the HPC in ultrasonic scalers to 100 to 6,500 CFU/ml, while continuous treatment resulted in 270 to 610 CFU/ml. Removal of tubings from dental units and treatment in the laboratory with 5.25% bleach for 15 hours eliminated counts in the tubing effluent, but they tended to recur by 15 days.³⁷ In a clinic water distribution system, use of a chlorinator to provide a shock treatment with 50 ppm overnight and then to dispense 1 ppm for 4 weeks failed to eliminate counts or resident *Legionella*.⁴⁰ The use of 0.5% to 1% bleach once a week for 10 minutes over a 4-year period kept microbial contamination in check but caused a slow corrosion of metal fittings in the dental units. An energy dispersive x-ray study found traces of the corroded metals in residual biofilms.⁵⁰ Treating DUWL for 10 minutes with 1:6 bleach solution and then flushing it out eliminated bacteria in the effluent, but there were compliance problems in private practice settings.⁵¹ Another study in a school clinic found that bleach reduced counts to

0 to 30 CFU/ml but did not remove the biofilm within the tubings.⁵²

Another problem with chlorine or its hypochlorite solution is that it reacts with the organic matrix to create chlorinated by-products. The chemical reactions in the surface layers of the biofilm would prevent its penetration. In vitro tests on biofilms of waterline bacteria showed that the matrix reduced the penetration of chlorine over time.^{47,53} Chlorinated by-products such as trihalomethanes are considered carcinogenic⁵⁴ and were detected in effluent water from DUWL treated with bleach at an average of 40 ppb, which is less than the 100 ppb safe standard.⁴⁸ Chloramine and chlorine dioxide do not form chlorinated by-products, and therefore penetrate deeper into biofilms in water systems and kill more effectively.⁴⁷

Our periodontal postgraduate teaching clinic had 16 new chairs and chair-mounted dental units[‡] installed in March 2001. The manufacturer recommended that the waterlines of the self-contained water system be purged nightly with air and disinfected weekly with 1:10 solution of household bleach for at least 10 but never more than 30 minutes. The manufacturer also issued supplemental advice on an alkaline peroxide product. Clinical reports indicated that after 4 or 5 weeks of treatment with alkaline peroxide, all units had counts under 200 CFU/ml,⁵⁵⁻⁵⁸ and the biofilm on tubing samples examined by SEM was absent⁵⁶ or spotty.⁵⁸

Chlorine dioxide is a biocide that effectively controls biofilm in many applications. It prevents the fouling of reverse osmosis membranes and is kinder to the membranes than chlorine.⁵⁹ Dose for dose, chlorine dioxide was more effective than chlorine on biofilms containing *Legionella pneumophila* and *Escherichia coli*.^{60,61} In a papermill, stabilized chlorine dioxide controlled slime, and was less toxic and irritating than chlorine.⁶² In in-dwelling silicone tubing vascular catheters, chlorine dioxide controlled biofilms more effectively than an antibiotic.⁶³ On stainless steel and polyvinyl surfaces, chlorine dioxide was effective against biofilms containing *E. coli*.⁶⁴ In a hospital water supply, stabilized chlorine dioxide was more effective than chlorine in controlling *Legionella* and did not corrode pipes or cause odors.⁶⁵

Chlorine dioxide was also more effective than chlorine in controlling biofilms on stainless-steel heat exchangers in a water treatment plant⁶⁶ and in drip irrigation water-lines.⁶⁷ In trials on biofilms containing *L. pneumophila* in waterline systems, chlorine dioxide (0.5 ppm) reduced counts by 2 to 3 logs and significantly reduced biofilm as seen by SEM.⁶⁸ Chlorine dioxide was more effective than chlorine in preventing slime, odors, and foul tastes in a food-processing plant.⁶⁹

[‡] Adec, Newberg, OR.

In the dental setting, 0.1% stabilized chlorine dioxide mouthrinse reduced bacterial counts in the effluent of four simulated DUWL to less than 200 CFU/ml and did not adversely affect metal fittings.⁷⁰ In a private practice setting, stabilized chlorine dioxide used in independent reservoirs reduced HPC significantly ($P < 0.05$).⁷¹ Stabilized chlorine dioxide mouthrinse used as a lavage with ultrasonic scalers also reduced HPC counts significantly ($P < 0.05$) more than a water lavage control after 4 minutes of flushing, and significantly more than water controls after being held in the waterlines overnight; the mouthrinse product also left significantly less biofilm as seen by SEM of waterline tubing samples.⁷²

In the fall of 2001, we decided to conduct parallel tests of DUWL cleaning products in the 16 new dental units. The null hypothesis was that there would be no differences in the ability of products to control HPC counts and biofilm in the DUWL. Evaluations were designed to answer logistical questions of time, cost, and safety.

MATERIALS AND METHODS

The 16 chair-mounted dental units with self-contained water systems in the University of California-San Francisco postgraduate periodontology clinic had been in use for 6 months. Their reservoirs were filled with sterile saline during surgical procedures and with tap water at other times. The units were randomly divided into three DUWL treatment groups: five were treated with an alkaline peroxide product,[§] five with a freshly mixed chlorine dioxide solution,^{||} and five with a stabilized chlorine dioxide solution.[¶] One unit served as an untreated control (Fig. 2). All units were provided with a quick-connect fitting and about 8 feet of tubing to be attached to the base of the chair where ultrasonic scaler waterlines are connected.

Control and Treatment Regimens

Control. The control regimen was that suggested by the dental unit manufacturer, except that no disinfectant was used. Each night, the water bottle was emptied and reinstalled, and the quick-connect was attached. The two air turbine handpiece hoses (handpieces removed), the two air-water spray (AWS) handpieces (tips removed), and the quick-connect hose were held over the sink while the foot control, the water buttons on the AWS, and the unit flush valve were depressed to purge the DUWL of water. Each morning, the bottle was filled with tap water and reinstalled, the quick-connect was attached, the lines and hoses were held over the sink, and all lines were flushed with water for 2 minutes. The quick-connect was removed, and the empty bottle was filled with tap water or sterile saline during the day as required.

Treatment 2. Alkaline peroxide treatment. According to the material safety data sheet (MSDS), the

alkaline peroxide waterline cleaner contains sodium carbonate, sodium carbonate peroxy-hydrate, N-alkyl-dimethylbenzylammonium chloride dihydrate, and tetra-sodium salt of ethylenediamine-tetracetic acid tetrahydrate. The concentrations were not given. It is readily soluble in water to form a pink liquid. The alkaline peroxide regimen was that stated by the manufacturer. One single-unit dose packet was emptied into 8 oz of hot water, stirred until dissolved, and put into the water bottle. The bottle was reinstalled, the quick-connect was attached, and the handpiece hoses, AWS, and quick-connect hose were held over the sink while the foot control, water buttons, and unit flush valve were operated until the pink solution appeared at the ends of the lines. The unit was then shut off, and the alkaline peroxide allowed to stand in the DUWL overnight. The next morning the bottle was emptied, filled with hot water, and reinstalled; the quick-connect was attached, and the handpiece hoses, AWS, and quick-connect hose were held over the sink while all lines were flushed with water until the bottle was empty. The quick-connect was removed, and the bottle was filled with tap water or sterile saline during the day as required. This shock treatment was repeated on the first 3 days of week 1 and on the first day of week 2. On the remaining days, the units were treated with the control regimen.

Treatment 3. Freshly mixed chlorine dioxide treatment. According to the MSDS, part A of the freshly mixed chlorine dioxide product is sodium chlorite (the salt of chlorous acid), and part B is a combination of phosphoric acid, lactic acid, and a non-toxic catalyst. The concentrations were not given. The concentration of the active chlorine dioxide created by acidifying the chlorite was not given. Four of the five units allotted to this product were treated with the waterline cleaner, and one was treated with a related product designed for use as a mouthrinse.[#] The treatment was that stated by the manufacturer. On the first night, the bottle was removed and half filled with cool tap water; 60 ml of part A and 60 ml of part B were added, and the bottle was filled with tap water and reinstalled. The quick-connect was attached, the handpieces were removed, and the quick-connect hose, handpiece hoses, and AWS were held over the sink while the foot control, AWS buttons, and unit flush valve operated until the bottle was empty. The bottle was then refilled with tap water, all lines were flushed until the bottle was empty, and all fluids were purged from the unit with compressed air. The next morning, the water bottle was

[§] Ultra (formerly Ultra-Kleen), cat. no. 513P, Sterilex, Owings Mills, MD.
^{||} DioxIClear (formerly Ciderm Disinfectant), Frontier Pharmaceutical, Melville, NY.

[¶] MicroClear Dental Unit Waterline Cleaner, Rowpar Pharmaceuticals, Scottsdale, AZ.
[#] DioxIRinse, Frontier Pharmaceutical Inc., Melville, NY.

half filled with tap water, and 1 ml of part A and 1 ml of part B were added. The bottle was filled with water and reinstalled, the quick-connect was attached, and the handpiece hoses, AWS, and quick-connect hose were held over the sink while the foot control, AWS water buttons, and flush valve were operated for 2 minutes. As required during the day, the bottle was refilled with the two 1 ml doses and tap water or with sterile saline for surgical procedures.

Treatment 4. Stabilized chlorine dioxide treatment. According to the MSDS, chlorine dioxide is the active ingredient, and the ingredients listed on the label are chlorine dioxide, trisodium phosphate, and purified water. The active chlorine dioxide concentration was not given. The bulk of the product is sodium chlorite, and nascent chlorine dioxide is formed when the product meets a reactive compound or a low pH. The regimen was that of the manufacturer, except that the amount used in the initial shock treatment was increased from 100 ml to 150 ml, to compensate for the volume of the quick-connect hose. At the end of the first day, the unit was turned off, the handpieces were removed, the quick-connect was attached, and 150 ml of the concentrate was put into the water bottle. The handpiece hoses, AWS, and quick-connect hose were held over a sink, and the foot control, AWS water buttons, and flush valve were operated for 30 seconds. The unit was turned off, the quick-connect was removed, and the concentrate was allowed to sit in the DUWL overnight. The next morning, the water bottle was removed, 75 ml of concentrate was added, and the bottle was filled with tap water, making a 1:10 dilution. The quick-connect was attached, and the handpiece hoses, AWS, and quick-connect hose were held over a sink while the foot control, AWS water buttons, and unit flush valve were operated for 30 seconds. The unit was turned off, and the quick-connect was removed. During the day, the bottle was refilled with the 1:10 dilution as it was emptied, or sterile saline used for surgical procedures. On subsequent days, the water bottle was filled with fresh 1:10 dilution and flushed for 30 seconds each morning.

The units were operated and cleaned by the periodontal residents. They also kept a log of the time to complete the waterline cleaning procedures and noted any unusual incidents of odor, taste, or irritation reported by patients, or effects on clothing.

Microbiological Evaluation

All samples were taken in the morning from the AWS on the dental assistant's side of the dental units. Clean examination gloves were put on; a clean, disposable tip was inserted into the AWS; and the AWS waterline was flushed for 2 minutes. This flush was done after any flush required by the waterline cleaning regimen. Two samples were taken from the AWS into HPC den-

tal samplers,** the first a 1:10 dilution with sterile water, and the second undiluted. The HPC sampler paddle was then reinserted for 30 seconds or until bubbles of air no longer exited from the vent. The paddle was removed and the case emptied, the paddle and case were shaken to remove drops of water, and the paddle was reinserted into the case. The samplers were incubated for 7 days at room temperature.

After the incubation was complete, the paddle was removed and held at a slight angle under a spotlight so that any rounded colonies would be easier to see by a highlight on the far side and a shadow on the near side. The colonies were counted under a dissecting microscope at 10.5 \times magnification. The membrane filter on the surface of the culture pad has inked squares to facilitate counting. Only full squares were counted; partial squares on the edges or corners were not counted. There were usually six or seven complete squares from top to bottom and 11 or 12 across. Colonies were counted as individuals if they did not touch or if they touched, but differed in form or color. When the pad had areas of colony spread, squares with distinct colonies were counted, and the counts were adjusted for the total countable squares. The counts were repeated for accuracy and were made without reference to the dental unit number, treatment regimen, or previous count. Since the media pad of the sampler absorbs 1 ml of water, counts were reported as CFU/ml. A second investigator, also blind to the unit number and waterline treatment, did an independent count of samplers.

On most days, each unit had eight counts performed: two investigators made replicate counts of the diluted and undiluted samplers. However, on the second day, counts were made by only one investigator. Two of the treatments had many counts of 0. Because of skewed distributions with the many 0 counts, parametric assumptions for simple linear regression were not met. We therefore used negative binomial regression.^{††} This is a generalization of Poisson distribution, which is often used for count data. Because of the different timing of the treatment regimens and differing impacts of gaps over the weekend, we did not fit one overall model including all days but instead modeled each day separately. To account for likely dependence among the multiple counts from the same unit, we used the generalized estimating equations method with robust variance estimation.⁷³ All models included as covariates 1) whether the sample was diluted, 2) investigator, and 3) the logarithm of the unit's pretreatment estimated mean count of the first day baseline sample (to control for the possibility that some units were more bacteria-laden than others). Predicted counts

** HPC Dental Sampler, cat. no. MHPD 100 25, Millipore, Bedford, MA.

†† Stata 7.0, Stata Corporation, College Station, TX.

shown are from the negative binomial models with covariates equal to the mean of the two investigators, the mean of the logarithms of the pretreatment counts, and no dilution. For counts on treated days with all 0s, we list the upper confidence bound as 1, because the chance of all five units showing 0 counts is <0.05 if the true mean were 1.

Scanning Electron Microscopy

The week before and the week after the clinical testing, biopsies were taken from the AWS waterline on the assistant's side of the dental unit. The terminal 5 mm of the waterline adjacent to the barb fitting and its sleeve were cut off with a fresh sterile scalpel blade

and processed for SEM. The tubing samples were fixed in 3% glutaraldehyde in 0.2 M sodium cacodylate buffer and stored in the fixative for several weeks. The samples were then removed, washed in purified water, cut into sections, and split lengthwise to expose the interior surface. After fixation, the specimens were dehydrated in a series of ethyl alcohol, with a minimum of 1 hour at each step (50%, 70%, 80%, 90%, 95%, and 100%, and 100% repeated), and dried with 100% hexamethyldisilazane to minimize shrinkage due to drying, as described by Perdigão et al.⁷⁴

The tubing samples were mounted on double-sided copper tape, and a 10 nm layer of gold was sputtered onto the samples. The samples were examined by SEM^{††} at an operation voltage of 5 KeV, a beam diameter of about 8.5 nm, and a beam current of 1.5 nA. The images were digitally captured (1,000 \times) at the midpoint of the tubing.

The amount of biofilm coverage in each of the resulting 32 images was scored from 1 (lowest) to 32 (highest). After scoring, the key was opened that described the specimen code (before treatment or after treatment) and the treatment group. The means of the scores of each group were statistically analyzed for change in biofilm coverage with the Wilcoxon signed-rank test.

RESULTS

Microbiological

The intraexaminer correlations of original and replicate counts were very high ($r = 0.998, P < 0.0001$; and $r = 0.987, P < 0.0001$). The independent microbial counts of the two investigators were in excellent agreement (Spearman rank correlation coefficient of 0.894, $P < 0.0001$).

Day	Mon	Tue	Wed	Thu	Fri	Mon	Tue	Wed	Thu	Fri
Alkaline peroxide (tx 2)	0	1	2	3	4	7	8	9	10	11
	s	*	s	s	s	*	s	s	s	s
Mixed ClO ₂ (tx 3)	*	s-c								
Buffered ClO ₂ (tx 4)	s	s-c								
Control	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s

Figure 2.

Timeline for waterline treatment regimen. Day 0, baseline; s, morning HPC sample; *, evening shock treatment; c, daily use of diluted agent.

The results are presented in Table 2. The estimated mean counts and 95% confidence interval (CI) of the control (treatment 1) seldom made the ADA goal of 200 CFU/ml. Treatment 2 met the goal on days just after shock treatments, but with time began to revert toward baseline. Figure 3 shows the counts of this group in relation to those of the control and waterline standards.

Treatments 3 and 4 had dramatic drops from baseline to 0 or near to 0. We did not see any counts of 200 or more for treatments 3 or 4 on any day, even after multiple counts on each of the units. Figure 4 shows the counts of treatment 3 in relation to those of the control and waterline standards.

Treatment 4, after the initial shock treatment, had all five treated units with HPC values of 0. Figure 5 shows the counts of treatment 4 in relation to those of the control and waterline standards.

In the unit treated with the mouthrinse variation of freshly mixed chlorine dioxide, the HPC decreased by about 95% from its baseline level of 2,105 CFU/ml to 112 CFU/ml the following day. However, there were several high counts, which were interpreted as possible sloughing of patches of biofilm, and these data were not included in the analyses.

Table 3 presents the results of treatment comparisons. The estimated ratios of counts for treatment 2 versus the control were significant ($P < 0.05$) on only 3 days. Treatments 3 and 4 always performed better than the control ($P < 0.001$).

Treatment 3 was better than treatment 2 in eight of nine comparisons. Treatment 4 was better than treatment 2 in all comparisons. Counts were too low in both

†† XL-30sFEG, FEI Co., Hillsboro, OR.

Table 2.

Estimated Mean Counts and 95% Confidence Interval of DUWL in CFU/ml from Baseline Through 2 Work Weeks (treatments were not done on the weekend [days 5 and 6])

Day	Treatment 1 (control)	Treatment 2†	Treatment 3‡	Treatment 4§
0*	992 (976-1009)	1,343 (1061-1699)	1,123 (876-1440)	1,260 (909-1746)
1	444 (289-684)	47 (3-697)	0 (0-1)	0 (0-1)
2	171 (63-468)	21 (2-190)	2 (0-33)	0 (0-1)
3	408 (162-1027)	56 (16-203)	0 (0-1)	0 (0-1)
4	290 (240-350)	575 (257-1287)	0 (0-1)	0 (0-1)
7	162 (91-291)	45 (30-68)	3 (0-17)	0 (0-1)
8	378 (228-627)	67 (11-421)	0 (0-1)	0 (0-6)
9	199 (116-342)	257 (110-600)	0 (0-1)	0 (0-1)
10	265 (167-419)	69 (24-198)	0 (0-1)	0 (0-1)
11	130 (103-163)	438 (251-765)	0 (0-1)	0 (0-1)

* Day 0 is baseline, prior to treatments.

† Treatment 2 = alkaline peroxide.

‡ Treatment 3 = mixed ClO₂.

§ Treatment 4 = buffered ClO₂.

treatment 3 and treatment 4 to allow meaningful statistical calculations. They would appear to be equivalent in terms of microbiological results.

Scanning Electron Microscopy

SEM was performed to determine whether the test agents merely reduced the amassed planktonic forms of the heterotrophs or had a significant effect on removal of the biofilm itself. Biofilm coverage decreased in four of the five samples in each of the experimental groups, but increased in the control sample. Before treatments, the mean scores were comparable: treatment 3 (freshly mixed ClO₂), 22.8; treatment 4 (stabilized ClO₂), 19.8; and treatment 2 (alkaline peroxide), 18.8. After treatments, the mean scores were lower: treatment 2 was 2.6 less; treatment 3 was 10.2 less; and treatment 4 was 9.0 less. However, statistical analysis with the Wilcoxon signed-rank test showed no significant difference in coverage for any group. This was most likely due to the small number of samples in each group ($n = 5$) and control ($n = 1$).

In general, images obtained before treatment showed a nearly complete covering of biofilm, which had rod-shaped or filamentous microorganisms either scattered on the surface or clumped in masses and bits of unrecognizable debris (Figs. 6 and 7). Images after treatment showed fewer surface microorganisms on the biofilm, and occasional patches of bare tubing (Figs. 8 and 9).

Logistical Matters

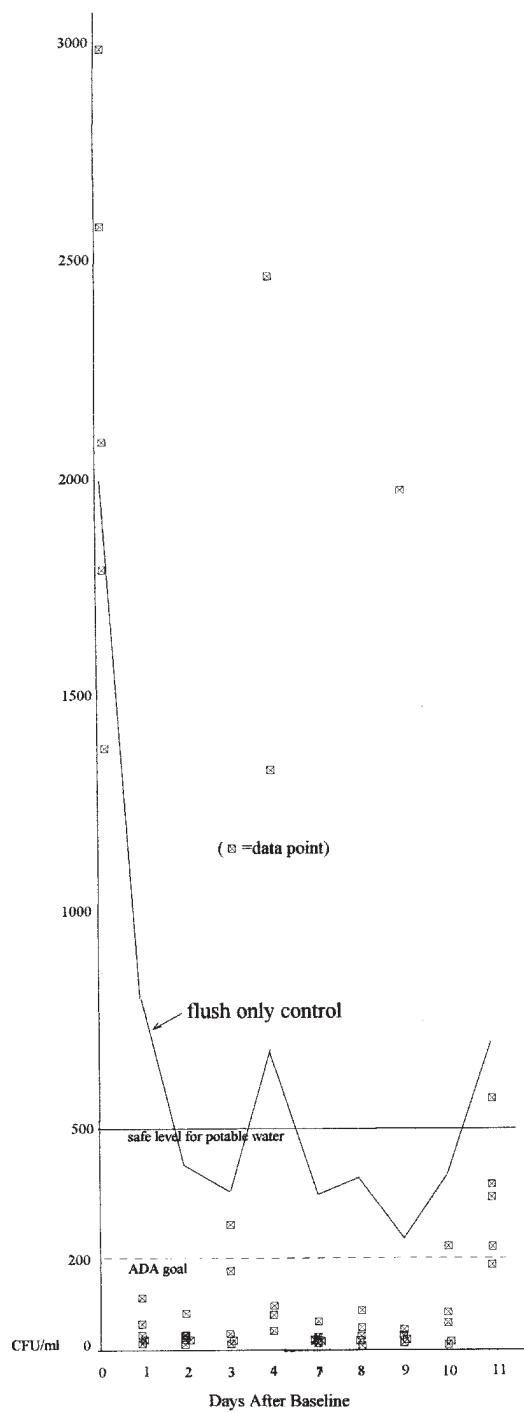
Treatment of the control unit by drying and flushing required 4.6 minutes in the evening and 4.3 minutes in the morning. In the alkaline peroxide group, each of the five units had four shock treatments. The average time for the evening administration of the product was 4.4 minutes, and the morning flush averaged 4.6 minutes. Daily care on other days averaged 4.1 minutes in the evening and 4.6 minutes in the morning. Based on the retail price of the product, the daily cost per unit was \$0.86 for the 10-day trial. There were no reports of odor, taste, or irritation by patients. However, there was some mess when the pink product foamed out of the AWS or handpiece lines after the shock treatment. Repeated tests of the pink solution showed it had a pH of 11.2.

The units treated with freshly mixed chlorine dioxide each had an initial shock treatment, followed by daily care with diluted product. The average time of the initial treatment, including the administration of the 60 ml doses of parts A and B and the succeeding flush, was 17 minutes in the evening and 9 minutes the next morning. Daily care with diluted product required an average of 5.9 minutes in the evening and 5.9 minutes in the morning. Based on the retail price, the daily cost per unit was \$0.11. One of the residents commented that the odor of the concentrate was irritating to nasal and air passages. The solution used in the shock treatment had a pH = 3.6 (part A, pH = 13.2; part B, pH = 1.3). The solution used for daily care had a pH of 6.8.

In the buffer-stabilized chlorine dioxide group, the units also had an initial shock treatment and daily care with diluted product. The average time for the shock treatment was 7.7 minutes in the evening and 6.0 minutes in the morning. Thereafter, daily care took 3.6 minutes in the evening and 4.1 minutes in the morning. Based on the retail price, the daily cost per unit was \$0.35. Only one resident remarked on a slight chlorine scent when dispensing the concentrate. The concentrate used for the shock treatment had a pH of 6.8. The 1:10 dilution used for daily care had a pH of 7.0.

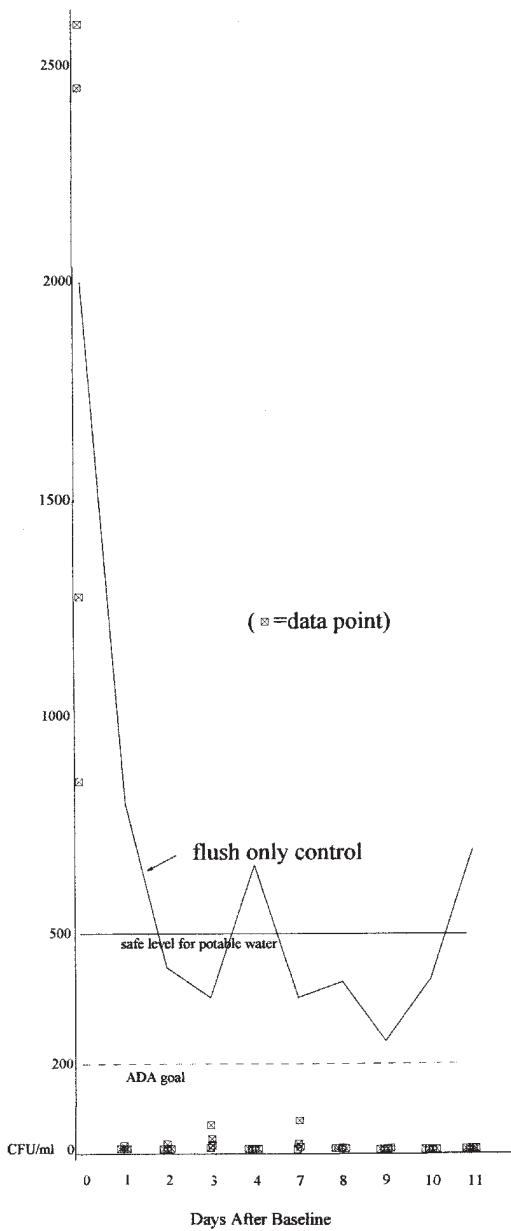
DISCUSSION

Reviews of DUWL contamination and its significance as a factor in nosocomial infection of patients and health

**Figure 3.**

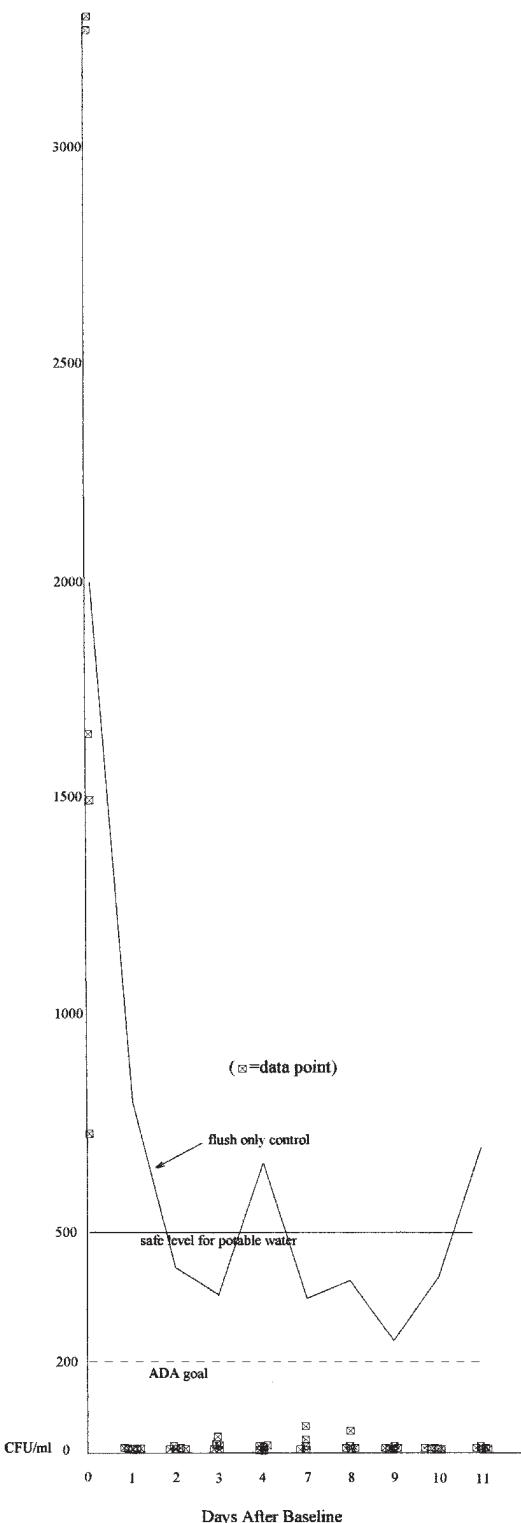
A graph plotting the morning HPC (CFU/ml) of five dental units assessed at baseline (day 0), and daily for 9 days. Alkaline peroxide shock treatments were done in the evening on days 0, 1, 2, and 7. The estimated mean daily HPC ranged from 21 to 575 CFU/ml on treated days.

care workers have stressed the threat to immunocompromised persons. The microorganisms found in the DUWL effluent have been considered to be of low pathogenicity, and there is little evidence that any have

**Figure 4.**

A graph plotting the morning HPC (CFU/ml) of four dental units assessed at baseline (day 0), and daily for 9 days. A shock treatment with freshly mixed chlorine dioxide was done the evening of day 0, and continuous diluted treatments were done daily. The estimated mean daily HPC ranged from 0 to 3 CFU/ml on treated days.

directly caused a human infection.^{75,76} Opportunistic infections by the planktonic forms of these bacteria (Table 1) are conceivable. *Pseudomonas cepacia* may be associated with cystic fibrosis, *Pseudomonas aeruginosa* with burns, and *Legionella pneumophila* with Legionnaire's pneumonia or Pontiac fever; non-tuberculous mycobacteria are considered emerging pathogens. There are many reports of infections in hospitalized patients from these organisms growing as

**Figure 5.**

A graph plotting the morning HPC (CFU/ml) of five dental units assessed at baseline (day 0), and daily for 9 days. Shock treatment with a buffer-stabilized chlorine dioxide was done on the evening of day 0, and continuous diluted treatments were done daily. The estimated mean daily HPC ranged from 0 to 1 CFU/ml.

Table 3.
Comparison of DUWL Treatments

Day	Treatment 2/Control		Treatment 3/Control*	
	Effect (95% CI)	P	Effect (95% CI)	P
1	0.11 (0.01-1.16)	0.066	0 (0-0.001)	<0.001
2	0.12 (0.01-2.8)	0.19	0.01 (0.001-0.09)	<0.001
3	0.14 (0.02-0.99)	0.049	0 (0-0)	<0.001
4	1.99 (0.86-4.6)	0.11	0†	<0.001
7‡	0.28 (0.11-0.70)	0.007	0.017 (0.003-0.081)	<0.001
8	0.18 (0.02-1.7)	0.13	0†	<0.001
9	1.29 (0.54-3.1)	0.57	0 (0-0)	<0.001
10	0.26 (0.07-1.04)	0.058	0 (0-0)	<0.001
11	3.4 (1.7-6.6)	<0.001	0 (0-0)	<0.001

Estimated effects are the ratios of counts from the first treatment listed to those from the second listed; counts had too many 0s in treatments 3 and 4 to allow comparison of those treatments.

* Entries of "0" indicate a value <0.001.

† Confidence intervals not available due to infinite parameter estimates.

P values are from likelihood ratio tests.

‡ Samples not taken over weekend days 5 and 6.

biofilms in hospital water systems, medical devices, and even in antiseptic solutions.^{75,76}

Another concern may be more relevant to the daily practice of periodontics. "Refractory periodontitis" has been an ill-defined diagnosis, generally meaning a type of periodontitis that does not respond to conventional oral hygiene instruction, deep scaling and root planning, gingival surgery, and routine maintenance therapy.⁷⁷ Retrospective studies of practices have described 4% to 28% of patients as "downhill" or "extreme downhill";⁷⁸⁻⁸⁰ these categories were especially associated with deeper pockets in molars.

Case reports and clinical studies of refractory periodontitis have had problems with the vague criteria for that diagnosis, and investigations of microorganisms associated with refractory disease have sought relationships to putative periodontal pathogens. Screening the subgingival microflora for 40 recognized taxa found that the only statistically significant difference between refractory and successfully treated cases was in the levels of *Prevotella nigrescens*.⁸¹ Enteric rods have been reported in cases of human periodontitis; in a study of 500 patients with recurrent loss of attachment refractory to therapy including antibiotics, yeasts were isolated in 84 patients and enteric rods or pseudomonads in 51 patients.⁸² The reported isolates included *Achromobacter* spp., *Acinetobacter calcoaceticus*, *Alcaligenes* spp., *Citrobacter freundii*, *Cladosporium*, *Enterobacter aerogenes*, *E. agglomerans*,

Table 3. (continued)
Comparison of DUWL Treatments

Treatment 4/Control*		Treatment 3/Tx 2*		Treatment 4/Tx 2*	
Effect (95% CI)	P	Effect (95% CI)	P	Effect (95% CI)	P
0 (0-0)	<0.001	0.003 (0-0.043)	<0.001	0 (0-0)	<0.001
0†	<0.001	0.08 (0.001-10.0)	0.31	0†	<0.001
0 (0-0.002)	<0.001	0 (0-0)	<0.001	0.002 (0-0.013)	<0.001
0†	<0.001	0†	<0.001	0†	<0.001
0 (0-0.001)	<0.001	0.06 (0.007-0.48)	0.008	0 (0-0.06)	<0.001
0.002 (0.001-0.01)	<0.001	0†	<0.001	0.01 (0-0.42)	0.014
0.001 (0.0-0.007)	<0.001	0 (0-0)	<0.001	0.001 (0-0.005)	<0.001
0.001 (0.0-0.004)	<0.001	0 (0-0)	<0.001	0.004 (0.00-0.018)	<0.001
0.003 (0.001-0.012)	<0.001	0 (0-0)	<0.001	0.001 (0-0.004)	<0.001

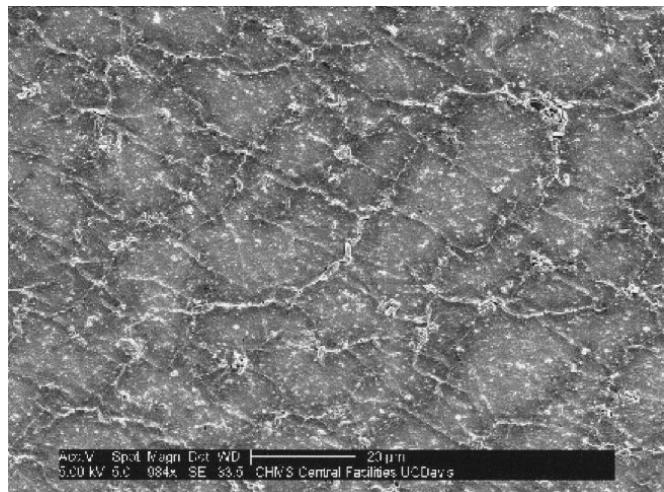


Figure 6.
SEM of DUWL inner surface of plastic tubing from the dental assistant's side of the dental unit before treatment. There is a continuous sheet of adherent biofilm. Rods and filamentous microorganisms of various sizes are scattered on the surface. (Original magnification $\times 1,000$.)

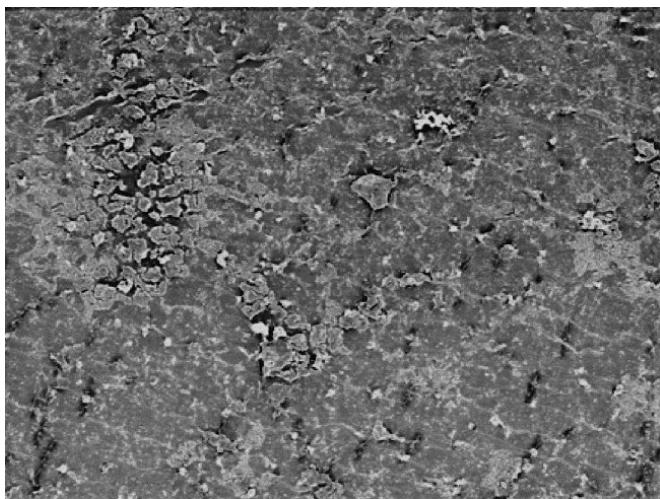
E. cloacae, *Escherichia coli*, *Flavobacterium* spp., *Klebsiella oxytoca*, *K. pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas acidovorans*, *P. aeruginosa*, *P. cepacia*, *P. maltophilia*, and *Serratia marcescens*.⁸²⁻⁸⁶ Many of these organisms have been found in DUWL (Table 1).

The majority of these Gram-negative, facultative rod strains isolated from cases of refractory periodontitis were resistant to thorough mechanical treatment and to tetracycline, penicillin, and erythromycin.⁸⁷ Ciprofloxacin systemic therapy required a 10-day regimen.^{83,84} The antibiotic resistance of these microorganisms suggests that they may have been inoculated into periodontal pockets from contaminated DUWL and taken up residence as a biofilm in their new site.

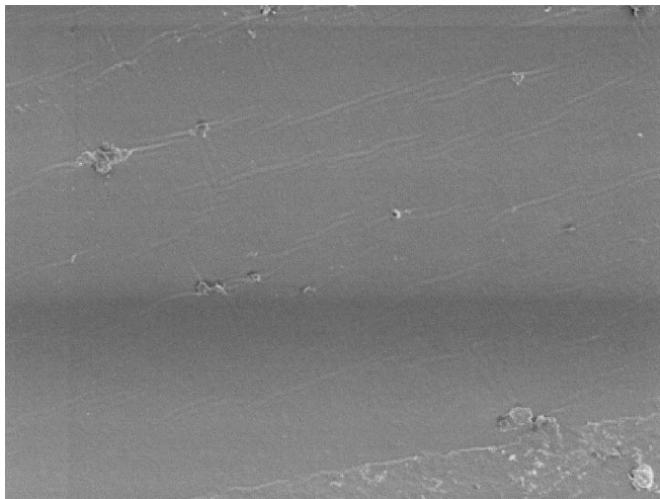
In addition to the possible inoculation of microorganisms into periodontal pockets in patients undergoing treatment, one needs to consider the harm that might occur from the instillation of endotoxins released by these Gram-negative heterotrophs. The mean endotoxin unit (EU) level in samples of DUWL effluent has been measured at 80.7 EU/ml, which is considered enough to cause a fever in a normal, healthy patient.⁸⁸ In samples from 11 dental units with extensive biofilm contamination and high viable counts, the endotoxin level was 2,560 EU/ml before flushing. The correlation of HPC to endotoxin levels was significant ($r = 0.69$, $P < 0.05$). Even after 10 minutes of flushing, the endotoxin level was 220 EU/ml.⁸⁹ Filters would not stop the flow of endotoxin. Using sterile saline in a self-contained dental unit water system would not prevent the flow of heterotrophs and endotoxin from biofilms located downstream from the reservoir bottle.

Biomaterials pose a risk for the creation of biofilms and subsequent chronic infections. Sutures and orthopedic implants may acquire the seeds of a biofilm at the time of surgery, or they could arrive after placement by swarms of heterotrophs released from the biofilms on a catheter or pacemaker.⁹⁰ Direct examination of necrotic bone removed from two patients with osteomyelitis after treatment for leg fractures revealed biofilms consisting of Gram-positive and Gram-negative bacteria within a ruthenium red-positive glycocalyx on the bony surface; *Bacteroides melaninogenicus*, *Clostridium clostridiforme*, *Corynebacterium*, *Enterococcus*, *Fusobacterium*, *Proteus mirabilis*, and *Streptotoccus morbillorum* were isolated from cultures of the bone samples.⁹¹

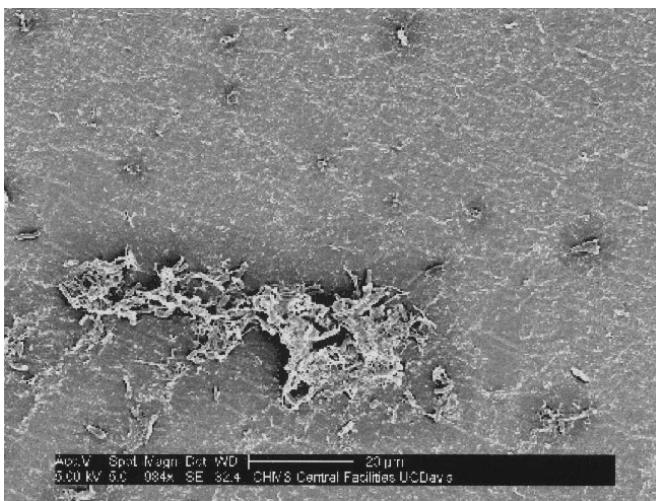
The bottom line for clinicians is that they cannot risk letting DUWL contamination cause "refractory peri-

**Figure 7.**

SEM of DUWL inner surface of plastic tubing from the AWS on dental assistant's side of the dental unit before treatment. On its surface are scattered bits of debris and a cluster of rods and filaments. (Original magnification $\times 1,000$.)

**Figure 9.**

SEM of DUWL inner surface of plastic tubing from the AWS of dental assistant's side of the dental unit after stabilized chlorine dioxide treatment. There is a nearly complete sloughing of biofilm. Only a few microorganisms and bits of debris remain. This specimen was the only one with such an effect; most of the images were similar to Figures 6, 7, and 8. (Original magnification $\times 1,000$.)

**Figure 8.**

SEM of DUWL inner surface of plastic tubing from the AWS on dental assistant's side of the dental unit after alkaline peroxide treatment. Fewer rods and filaments are visible, and some patches of tubing surface are exposed. (Original magnification $\times 1,000$.)

odontitis" in their patients, or possibly the removal of a failing dental implant that has been carefully and skillfully placed. Clinicians need a sure remedy for control of biofilms in dental unit waterlines. An agent that is only partly effective may cause even higher HPC than existed before the DUWL treatment.⁹²

Flushing the waterlines for 2 minutes before patients were treated and dehydrating the units when they were not in use, as done in our control unit, were ineffective and inconsistent in reducing HPC to

acceptable levels. Alkaline peroxide treatments might be beneficial, as hydrogen peroxide has been recommended,^{3,34,93} and chelation of cations by EDTA is a possible treatment ploy.³ The HPC levels in this study after use of the alkaline peroxide cleaner were too inconsistent to be acceptable; the cost was higher than other agents tested; and although the time for carrying out the required procedures did not differ from the control, there is a safety concern about the high pH of the product and its handling by auxiliary personnel.

The chlorine dioxide products were very effective in lowering the HPC. From the standpoint of efficacy, there was no significant difference in the CFU/ml they achieved or in the mean scores of SEM images. The freshly mixed chlorine dioxide product had a higher initial cost per gallon than the buffer-stabilized chlorine dioxide, but less is used each day, so there is eventually some savings. However, both the shock treatment and daily care for the freshly mixed chlorine dioxide took longer than treatment with the buffer-stabilized chlorine dioxide. The high pH of part A, the low pH of part B, and the low pH and irritating odors of the freshly mixed chlorine dioxide are negative factors in its acceptance.

Overall, the evaluations of this study favor the use of the buffer-stabilized chlorine dioxide to control biofilms in DUWL. It was not expensive, took the least time to implement, had a neutral pH, and was very effective in reducing dental unit waterline CFU/ml.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are indebted to Grace Nonomura for SEM specimen preparation, to Michael Dunlap of the University of California-Davis for assistance with scanning electron microscopy, and to Dr. Peter Bacchetti, PhD, of UCSF for statistical assistance. The chlorine dioxide products used were gifts from their respective manufacturers; the alkaline peroxide product was purchased by the authors. The authors have no financial relationship with the manufacturer of any product used or mentioned in this article.

REFERENCES

- ADA Council on Scientific Affairs. Dental unit waterlines: Approaching the year 2000. *J Am Dent Assoc* 1999;130:1653-1664.
- Fletcher M. The physiological activity of bacteria attached to solid surfaces. *Adv Microb Physiol* 1991;32: 53-85.
- Carpentier B, Cerf O. Biofilms and their consequences, with particular reference to hygiene and the food industry. *J Appl Bacteriol* 1993;75:499-511.
- O'Toole GA, Kolter R. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol Microbiol* 1998;30:295-304.
- Pratt LA, Kolter R. Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: Roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. *Mol Microbiol* 1998;30:285-293.
- Sauer K, Camper AK. Characterization of phenotypic changes in *Pseudomonas putida* in response to surface-associated growth. *J Bacteriol* 2001;183:6579-6589.
- Rice AR, Hamilton MA, Camper AK. Apparent surface associated lag time in growth of primary biofilm cells. *Microb Ecol* 2000;41:8-15.
- Zobell CE. The effect of solid surfaces upon bacterial activity. *J Bacteriol* 1943;46:39-56.
- Costerton JW, Cheng K-J, Geesey GG, et al. Bacterial biofilms in nature and disease. *Annu Rev Microbiol* 1987; 41:435-464.
- Characklis WG. Fouling biofilm development: A process analysis. *Biotechnol Bioeng* 1981;23:1923-1960.
- DeKievil TR, Iglesias BH. Bacterial quorum sensing in pathogenic relationships. *Infect Immun* 2000;68: 4839-4849.
- Rashid MH, Rumbaugh K, Passador L, et al. Polyphosphate kinase is essential for biofilm development, quorum sensing, and virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 2000;97:9636-9641.
- del Pulcini E. Biofilms: Sensing and signaling. *CDA J* 2001; 29:351-353.
- Eberl L. N-acyl homoserine lactone-mediated gene regulation in Gram-negative bacteria. *Syst Appl Microbiol* 1999;22:493-506.
- Sutherland IW. Biosynthesis and composition of Gram-negative bacterial extracellular and wall polysaccharides. *Annu Rev Microbiol* 1985;39:243-270.
- Hoyle BD, Alcantara J, Costerton JW. *Pseudomonas aeruginosa* biofilm as a diffusion barrier to penicillin. *Antimicrob Agents Chemother* 1992;36:2054-2056.
- Wimpenny JW, Coombs JP. Penetration of oxygen into bacterial colonies. *J Gen Microbiol* 1983;129:1239-1242.
- Roberts AP, Pratten J, Wilson M, Mullany P. Transfer of a conjugative transposon, Tn 5397 in a model oral biofilm. *FEMS Microbiol Lett* 1999;177:63-66.
- Costerton JW, Lewandowski Z, DeBeer D, Caldwell D, Korber D, James G. Biofilms, the customized microniche. *J Bacteriol* 1994;176:2137-2142.
- Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR, Lappin-Scott HM. Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol* 1995;49:711-745.
- Wimpenny JWT. A unifying hypothesis for the structure of microbial films based on cellular automation models. *FEMS Microbiol Ecol* 1997;22:1-16.
- Rittman BE. Detachment from biofilms. In: Characklis WG, Wilderer PA, eds. *Structure and Function of Biofilms*. Chichester, UK: John Wiley & Sons; 1989:49-58.
- Costerton JW. The etiology and persistence of cryptic bacterial infections: A hypothesis. *Rev Infect Dis* 1984; 6(Suppl. 3):S608-S616.
- Abel LC, Miller RL, Micik RE, Ryge G. Studies on dental aerobiology: IV. Bacterial contamination of water delivered by dental units. *J Dent Res* 1971;50:1567-1569.
- American Dental Association. ADA Statement on Dental Unit Waterlines. *J Am Dent Assoc* 1996;127:185-186.
- ADA Council on Dental Materials and Devices, and Council on Dental Therapeutics. Infection control in the dental offices. *J Am Dent Assoc* 1978;97:673-677.
- Beierle JW. Dental operatory water lines. *CDA J* 1993; 21:13-15.
- Scheid RC, Rosen S, Beck FM. Reduction of CFUs in high-speed handpiece water lines over time. *Clin Prev Dent* 1990;12:9-12.
- Santiago JL, Huntington MK, Johnston AM, Quinn RS, Williams JF. Microbial contamination of dental unit waterlines: Short- and long-term effects of flushing. *Gen Dent* 1994;42:528-535.
- Atlas RM, Williams JF, Huntington MK. *Legionella* contamination of dental-unit waters. *Appl Environ Microbiol* 1995;61:1208-1213.
- Barbeau J, Tanguay R, Faucher E, Trudel L, Cote L, Prevost AP. Multiparametric analysis of waterline contamination in dental units. *Appl Environ Microbiol* 1996; 62:3954-3959.
- Challacombe SJ, Fernandes LL. Detecting *Legionella pneumophila* in water systems: A comparison of various dental units. *J Am Dent Assoc* 1995;126:603-608.
- Furuhashi M, Miyamae T. Prevention of bacterial contamination of water in dental units. *J Hosp Infect* 1985;6: 81-88.
- Kelstrup J, Funder-Nielsen TD, Theilade J. Microbial aggregate contamination of water lines in dental equipment and its control. *Acta Pathol Microbiol Scand* 1977;85(Sect. B):177-183.
- Lück PC, Bender L, Ott M, Helbig JH, Witzleb W, Hacker J. Analysis of *Legionella pneumophila* serogroup 6 strains isolated from dental units. In: Barbaree JM, Breiman RF, Dufour AP, eds. *Legionella Current Status and Emerging Perspectives*. Washington, DC: American Society for Microbiology; 1993:240-242.
- Martin MV. The significance of the bacterial contamination of dental unit water systems. *Br Dent J* 1987;163: 152-154.
- Meiler TF, Depaola LG, Kelley JI, Baqui AA, Turng B-F, Falkler WA. Dental unit waterlines: Bio films, disinfection and recurrence. *J Am Dent Assoc* 1999;130:65-72.
- Mills SE, Lauderdale PW, Mayhew RB. Reduction of microbial contamination in dental units with povidone-iodine. *J Am Dent Assoc* 1986;113:280-284.
- Oppenheim BA, Sefton AM, Gill ON, et al. Widespread *Legionella pneumophila* contamination of dental stations

- in a dental school without apparent human infection. *Epidemiol Infect* 1987;99:159-166.
- 40. Pankhurst CL, Philpott-Howard JN, Hewitt JH, Casewell MW. The efficacy of chlorination and filtration in the control and eradication of *Legionella* from dental chair water systems. *J Hosp Infect* 1990;16:9-18.
 - 41. Schulze-Robbecke R, Feldman C, Fischeder R, Janning B, Exner M, Wahl G. Dental units: An environmental study of sources of potentially pathogenic mycobacteria. *Tuber Lung Dis* 1995;76:318-323.
 - 42. Tall BD, Williams HN, George KS, Gray RT, Walch M. Bacterial succession within a biofilm in water supply lines of dental air-water syringes. *Can J Microbiol* 1995; 41:647-654.
 - 43. Murdoch-Kinch C, Andrews NL, Atwan S, Jude R, Gleason MJ, Molinari JA. Comparison of dental water quality management procedures. *J Am Dent Assoc* 1997; 128:1235-1243.
 - 44. Furuhashi M, Miyamae T. Prevention of bacterial contamination of water in dental units. *J Hosp Infect* 1985;6: 81-88.
 - 45. Fiehn NE, Larsen T. Effect of drying dental unit water lines on bacterial contamination. *J Dent Res* 2000;79 (Spec. Issue):567(Abstr. 3392).
 - 46. Wang MY, Wirthlin MR, Hoover CI. Evaluation of air-purging and ClO₂ treatment on dental unit waterlines. *J Dent Res* 2001;80(Spec. Issue):622(Abstr. 762).
 - 47. LeChevalier MW, Cawthon CD, Lee RG. Inactivation of biofilm bacteria. *Appl Environ Microbiol* 1988;54: 2492-2499.
 - 48. Karpay RI, Plamondon TJ, Mills SE, Dove SB. Combining periodic and continuous sodium hypochlorite treatment to control biofilms in dental unit water systems. *J Am Dent Assoc* 1999;130:957-965.
 - 49. Fiehn NE, Henriksen K. Methods of disinfection of the water system of dental units by water chlorination. *J Dent Res* 1988;67:1499-1504.
 - 50. Sherman LR, Mills SE, Plamondon TJ. Identification of mineralization in clean and biofilm contaminated dental unit water lines. *J Penn Acad Sci* 1995;69:31-34.
 - 51. Williams HN, Kelley J, Folino D, Williams GC, Hawley CL, Sibiski J. Assessing microbial contamination in clean water dental units and compliance with disinfection protocol. *J Am Dent Assoc* 1994;125:1205-1211.
 - 52. Williams HN, Johnson A, Kelley JI, et al. Bacterial contamination of the water supply in newly installed dental units. *Quintessence Int* 1995;26:331-337.
 - 53. deBeer D, Srinivasan R, Stewart PS. Direct measurement of chlorine penetration into biofilms during disinfection. *Appl Environ Microbiol* 1994;60:4339-4344.
 - 54. Bull RJ, Birnbaum LS, Cantor KP, et al. Water chlorination: Essential process or cancer hazard? *Fundam Appl Toxicol* 1995;28:155-166.
 - 55. Shojaei M, Staat RH. Disinfection of dental unit water lines using hydroperoxide: Preliminary data. *J Dent Res* 1997;76(Spec. Issue):435(Abstr. 3372).
 - 56. Leonard RH, Tart ND, Simmons E, Ambrose WW, Caplan DJ. Controlling DUWL bacterial contamination and biofilm by chemical biocides. *J Dent Res* 2000;79(Spec. Issue):567(Abstr. 3388).
 - 57. Sims CA, Young JM, Dodge W, et al. Antimicrobial and corrosion effects of three dental unit waterline treatments. *J Dent Res* 2000;79(Spec. Issue):568(Abstr. 3394).
 - 58. 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;132:1287-1291.
 - 59. Adams WR. The effects of chlorine dioxide on reverse osmosis membranes. *Desalination* 1990;78:439-453.
 - 60. Berg JD, Hoff JC, Roberts PV, Matin A. Disinfection resistance of *Legionella pneumophila* and *Escherichia coli* grown in continuous and batch culture. In: Jolley RL, Bull RJ, Davis WP, Katz S, Roberts MH Jr., Jacobs VA, eds. *Water Chlorination Chemistry, Environmental Impact and Health Effects*, vol 5. Chelsea, MI: Lewis Publ.; 1985:603-613.
 - 61. Berg JD, Hoff JC, Roberts PV, Matin A. Resistance of bacterial populations to disinfection by chlorine dioxide. *J Am Water Works Assoc* 1988;80:115-119.
 - 62. Cravens BB. Stabilized chlorine dioxide for microorganism control. *TAPPI* 1966;49:53A-55A.
 - 63. Dennis MB, Jones DR, Tenover FC. Chlorine dioxide sterilization of implanted right atrial catheters in rabbits. *Lab Animal Sci* 1989;39:51-55.
 - 64. Foshino R, Nervegna I, Motta A, Galli A. Bactericidal activity of chlorine dioxide against *Escherichia coli* in water and on hard surfaces. *J Food Prot* 1998;61:668-672.
 - 65. Hamilton E, Seal DV, Hay J. Comparison of chlorine and chlorine dioxide disinfection for control of *Legionella* in a hospital potable water supply. *J Hosp Infect* 1996;32:56-60.
 - 66. Mayack LA, Soracco RJ, Wilde EW, Pope DH. Comparative effectiveness of chlorine and chlorine dioxide biocide regimens for biofouling control. *Water Res* 1984; 18:593-599.
 - 67. Rav-Acha C, Kummel M, Salaman I, Adin A. The effect of chemical oxidants on effluent constituents for drip irrigation. *Water Res* 1995;29:119-129.
 - 68. Walker JT, Roberts AD, Lucas VJ, Roper MA, Brown RG. Quantitative assessment of biocide control of biofilms including *Legionella pneumophila* using total viable counts, fluorescence microscopy, and image analysis. *Methods Enzymol* 1999;310:629-637.
 - 69. Welch JL, Folinazzo JF. Use of chlorine dioxide for cannery sanitation and water conservation. *Food Technol* 1959;13:179-182.
 - 70. Puttaiah R, Sargent CM, Anderson K, Spears R, Cederberg R, Matheson K. Effects of a ClO₂ based mouthwash on dental unit waterline contamination. *J Dent Res* 2000;79 (Spec. Issue):227(Abstr. 666).
 - 71. Matheson K, Brannon MD. The effects of stabilized chlorine dioxide on bacterial concentrations in dental unit water. *J Dent Res* 2000;79(Spec. Issue):568(Abstr. 3398).
 - 72. Wirthlin MR, Marshall GW. Evaluation of ultrasonic scaling unit waterline contamination after use of chlorine dioxide mouthrinse lavage. *J Periodontol* 2001;72:401-410.
 - 73. Liang K-Y, Zeger SL. Longitudinal data analysis using generalized linear models. *Biometrika* 1986;73:13-22.
 - 74. Perdigao J, Lambrechts P, van Meerbeek B, Tome AR, Vanherle G, Lopes AB. Morphological field emission-SEM study of the effect of six phosphoric acid etching agents on human dentin. *Dent Mater* 1996;12:262-271.
 - 75. Miller CH. Microbes in dental unit water. *CDA J* 1996;24: 47-52.
 - 76. Barbeau J, Gauthier C, Payment P. Biofilms, infectious agents, and dental unit waterlines: A review. *Can J Microbiol* 1998;44:1019-1028.
 - 77. Flemmig TF. Periodontitis. *Ann Periodontol* 1999;4: 32-37.
 - 78. Hirschfeld L, Wasserman B. A long-term survey of tooth loss in 600 treated periodontal patients. *J Periodontol* 1978;49:225-237.
 - 79. Goldman MJ, Ross IF, Goteiner D. Effect of periodontal therapy on patients maintained for 15 years or longer.

- A retrospective study. *J Periodontol* 1986;57:347-353.
80. McFall WT. Tooth loss in 100 treated patients with periodontal disease. *J Periodontol* 1982;53:539-549.
81. Columbo AP, Haffajee AD, Dewhirst FE, et al. Clinical and microbiological features of refractory periodontitis subjects. *J Clin Periodontol* 1998;25:169-180.
82. Slots J, Rams TE, Listgarten MA. Yeasts, enteric rods and pseudomonads in the subgingival flora of severe adult periodontitis. *Oral Microbiol Immunol* 1988;3:47-52.
83. Slots J, Feik D, Rams TE. Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonadaceae* and *Acinetobacter* in human periodontitis. *Oral Microbiol Immunol* 1990;5:149-154.
84. Rams TE, Feik D, Young V, Hammond BF, Slots J. Enterococci in human periodontitis. *Oral Microbiol Immunol* 1992;7:249-252.
85. Rams TE, Babalola OO, Slots J. Subgingival occurrence of enteric rods, yeasts, and staphylococci after systemic doxycycline therapy. *Oral Microbiol Immunol* 1990;5:166-168.
86. Helovuo H, Hakkarainen K, Paunio K. Changes in the prevalence of subgingival enteric rods, staphylococci and yeasts after treatment with penicillin and erythromycin. *Oral Microbiol Immunol* 1993;8:75-79.
87. Listgarten MA, Lai C-H, Young V. Microbial composition and pattern of antibiotic resistance in subgingival microbial samples from patients with refractory periodontitis. *J Periodontol* 1993;64:155-161.
88. Puttaiah R, Cederberg RA. Assessment of endotoxin levels in dental effluent water. *J Dent Res* 1998;77(Spec. Issue):263(Abstr. 1257).
89. Putins EE, DiGiovanni D, Bhular AS. Dental unit water-line contamination and its possible implications during periodontal surgery. *J Periodontol* 2001;72:393-400.
90. Gristina AG, Costerton JW. Bacterial adherence and the glycocalyx and their role in musculoskeletal infection. *Orthop Clin North Am* 1984;15(3):517-535.
91. Marrie TJ, Costerton JW. Mode of growth of bacterial pathogens in chronic polymicrobial human osteomyelitis. *J Clin Microbiol* 1985;22:924-933.
92. 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):3363-3367.
93. Rosenzweig AL. Hydrogen peroxide in prevention of water contamination (letter to editor). *Lancet* 1978;1:944.

Correspondence: Dr. M. Robert Wirthlin, Department of Stomatology, University of California, Box 0762, San Francisco, CA 94143-0762.

Accepted for publication April 18, 2003.