

Artigo Original de Pesquisa
Original Research Article

Descontaminação de escovas dentais utilizadas por crianças portadoras de necessidades especiais: análise microbiológica

Decontamination of toothbrushes used by children with special needs: microbiological analysis

Ana Cláudia Rodrigues Chibinski¹
Kamila Grando²
Patrícia Trochman Fanchin²
Eduardo Campagnoli¹
Fábio André dos Santos¹
Denise Stadler Wambier¹

Endereço para correspondência:
Corresponding author:

Ana Cláudia Rodrigues Chibinski
Avenida Anita Garibaldi, n.º 1.661 – casa 38 B – Vila Órfãs
CEP 84015-903 – Ponta Grossa – PR
E-mail: anachibinski@hotmail.com

¹ Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual de Ponta Grossa – Ponta Grossa – PR – Brasil.

² Faculdade de Odontologia, Centro de Ensino Superior dos Campos Gerais – Ponta Grossa – PR – Brasil.

Recebido em 17/11/2010. Aceito em 7/12/2010.

Received for publication: November 17, 2010. Accepted for publication: December 7, 2010.

Palavras-chave: escova dental; contaminação; descontaminação.

Resumo

Introdução: Crianças portadoras de necessidades especiais apresentam higiene bucal deficiente. Portanto, suas escovas dentais tornam-se altamente contaminadas e constituem fontes de disseminação de diferentes patógenos. **Objetivo:** Avaliar a contaminação e a descontaminação de escovas dentais usadas por crianças com necessidades especiais. **Material e métodos:** Escovas dentais de 30 indivíduos, após 30 dias de uso, foram armazenadas em ágar nutriente estéril e incubadas (37°C, por 24 horas). A seguir,

100 μ l das diluições (1:10 e 1:100) foram semeados em ágar MacConkey (bactérias gram-negativas), ágar Mitis Salivarius (*Streptococcus* spp.) e ágar Sabouraud (*Candida* spp.) e incubados (37°C, por 48 horas). Dividiram-se de modo aleatório as amostras em três grupos para descontaminação com três soluções, aplicadas com *spray* (seis borrifadas por escova) antes da análise microbiológica: clorexidina (GC – digluconato de clorexidina a 0,12%), hipoclorito (GH – hipoclorito de sódio a 1%) e água destilada (GA – controle). Para a análise estatística dos dados, recorreu-se aos testes não paramétricos exato de Fisher e Wilcoxon ($\alpha = 0,05$). **Resultados:** A primeira avaliação microbiológica evidenciou crescimento bacteriano nas 30 escovas. Detectaram-se níveis superiores a $\geq 300 \times 10^3$ UFC/ml em 80% das amostras para estreptococos, 60% para gram-negativos e 47% para cândida. Após a desinfecção, apenas o GC apresentou redução significativa na turvação do meio ($p = 0,04$) e nos níveis de gram-negativos ($p = 0,04$) e cândida ($p = 0,005$). Quanto aos outros grupos, o processo de descontaminação não foi estatisticamente expressivo na diminuição dos níveis dos microrganismos pesquisados. **Conclusão:** Entre os agentes testados, somente a clorexidina demonstrou eficiência na redução dos bacilos gram-negativos e das leveduras do gênero *Candida* spp., e nenhuma das soluções se mostrou eficaz contra *Streptococcus* spp.

Keywords: toothbrush; contamination; decontamination.

Abstract

Introduction: Children with special needs generally present poor oral hygiene, consequently, their toothbrushes become highly infected, acting as a reservoir for dissemination of different pathogens. **Objective:** To evaluate the contamination and decontamination of toothbrushes used by children with special needs. **Material and methods:** Toothbrushes were retrieved from 30 children after 30 days of use, stored in tubes containing nutrient agar and incubated for 24 h (37°C). After, 100 μ l of the dilutions (1:10 and 1:100) were plated on MacConkey agar (Gram negative bacteria), Mitis Salivarius agar (*Streptococcus* spp.), and Saboroud agar (*Candida* spp.) and incubated (37°C, 48 h). The toothbrushes were randomly divided into 3 groups for decontamination procedures using 0.12% chlorhexidine (GC); 1% sodium hypochlorite (GH) and distilled water (GA - control). The solutions were sprayed 6 times onto the bristles and the toothbrushes were submitted to microbiological analysis. Statistical analysis used non-parametric tests (Fisher's exact and Wilcoxon) ($\alpha = 0.05$). **Results:** The initial microbiological analysis showed a bacterial growth in all samples. Microorganisms levels higher than $\geq 300 \times 10^3$ CFU/mL were detected in 80% of the samples for *Streptococcus* spp.; 60% for Gram negative bacteria e 47% for *Candida* spp. After decontamination, there was significant reduction for GC when considering turbidity ($p = 0.04$) and at the levels of Gram negative bacteria ($p = 0.04$) and *Candida* spp. ($p = 0.005$). For GH e GA, the decontamination procedures were not significant. **Conclusion:** Chlorhexidine solution was the only agent effective against Gram negative bacteria and *Candida* spp. None of the solutions tested was effective against *Streptococcus* spp.

Introdução

A escovação dental é o método mais comum e universalmente aceito para controle do biofilme dental e, por consequência, das principais patologias bucais placa-dependentes (cárie e doença periodontal). Todavia, durante essa ação, há uma transferência inevitável dos microrganismos da microbiota bucal (que pode abrigar mais de 700 diferentes espécies) para as cerdas das escovas dentais [5].

Portanto, as escovas tornam-se abrigos de diversos microrganismos, desde bactérias cariogênicas e periodontopatogênicas, passando por leveduras e fungos [4] e até mesmo aqueles causadores de doenças infecciosas, como hepatite C [10]. Além disso, há os microrganismos vindos do ambiente em que a escova está guardada. Ao mantê-la no banheiro, ela ficará contaminada por coliformes fecais e pseudomonas [2]. Uma vez que as cerdas das escovas dentais são ambientes propícios para a multiplicação de tais agentes patogênicos, as condições de armazenagem, como recipientes abertos ou fechados, definirão se ela ocorrerá em maior ou menor grau.

Em escolas ou creches existe ainda outra variável. Sabendo-se que é muito difícil controlar o contato salivar entre indivíduos decorrente da troca e/ou do compartilhamento de escovas [4], tais objetos se tornam um reservatório para inoculação e reinoculação de microrganismos, aumentando a sua contaminação e a disseminação destes [16].

No caso de instituições que cuidam de pacientes portadores de necessidades especiais, o problema agrava-se. Essas pessoas muitas vezes têm higiene bucal precária, se comparadas à população em geral, com tendência a manifestar índices aumentados de lesões de cárie não tratadas e doença periodontal [1, 17]. Também podem exibir condições sistêmicas associadas, como doenças cardíacas congênitas, comuns nos portadores de síndrome de Down [22], ou comprometimento imunológico, como em doentes renais crônicos ou transplantados, o que faz com que a possibilidade de bacteremia associada à escovação dentária fique mais grave.

Os microrganismos presentes em uma escova dental infectada são capazes de originar afecções comuns e de simples tratamento, como herpes simples ou dor de garganta [2], até complicações sérias e potencialmente fatais, como endocardite

infecciosa [11]. A associação entre os microrganismos patogênicos e oportunistas pode ocasionar problemas respiratórios, gastrointestinais, cardiovasculares e renais [9].

Para controle da contaminação, as escovas devem ser trocadas com regularidade e sobretudo após qualquer tipo de infecção [4, 18]. No dia a dia recomenda-se que depois do uso as escovas sejam lavadas, secas e mantidas em ambientes ventilados. Todavia, nessa situação, a viabilidade de certos grupos bacterianos é mantida. *Streptococcus mutans*, por exemplo, consegue se manter viável por períodos de até 8 horas após utilização da escova [19], *Pseudomonas aeruginosa* permanece viável por quatro dias e *Staphylococcus epidermidis*, por 8 dias [8]. Portanto, é possível a reinoculação dessas bactérias na próxima escovação ou a contaminação de escovas mantidas juntas [5], o que significa que o ato de deixá-las secar se mostra insuficiente para eliminar os microrganismos.

A literatura indica desinfetá-las com agentes descontaminantes [4, 5, 9, 15]. Para tal há soluções descontaminantes eficazes, acessíveis, de baixo custo e que podem ser empregadas de forma individual (domiciliar) ou coletiva (institucional).

A solução mais comum é a clorexidina [4, 9, 13, 15, 21]. Entretanto o produto tem um custo elevado [9] se comparado com outros, como o hipoclorito de sódio. Além disso, comumente as pessoas têm em sua casa o hipoclorito, facilitando a adesão aos protocolos de desinfecção de escovas dentárias.

O objetivo desta pesquisa foi avaliar a ação antimicrobiana do hipoclorito de sódio a 1% na descontaminação de escovas dentais utilizadas por crianças portadoras de necessidades especiais institucionalizadas.

Material e métodos

Compuseram a amostragem do presente estudo 30 escovas dentais infantis de cerdas macias (Colgate, Colgate-Palmolive Ind. e Com. Ltda., São Bernardo do Campo, SP, Brasil) de crianças com necessidades especiais (grau moderado de retardo mental, pertencentes à categoria treináveis, portadoras de paralisia cerebral, síndrome de Down e atraso no desenvolvimento cognitivo), com idade entre 4 e 7 anos. Por 30 dias cuidadores realizaram, em cada um dos pacientes, uma escovação diária com dentífrico fluoretado (Colgate,

Colgate-Palmolive Ind. e Com. Ltda., São Bernardo do Campo, SP, Brasil). O padrão usual de escovação não foi modificado. Terminada a tarefa, lavavam-se as escovas em água corrente e o excesso de água era removido com papel absorvente antes de serem armazenadas em recipientes plásticos coletivos. As escovas apresentavam cabeça em torno de 2,5 x 1,3 cm e cerdas macias com comprimento de 9 mm, dispostas em quatro fileiras e 28 tufo, cada uma com aproximadamente 60 cerdas. Escovas dentais de pacientes em terapia com antibiótico atual ou no último mês, com lesões de cárie extensa, comprometimento endodôntico ou em tratamento odontológico durante o período da investigação foram excluídas.

Ao término dos 30 dias, as escovas foram recolhidas, imediatamente imersas em tubos de ensaio codificados, contendo 20 ml de caldo nutriente estéril, e incubadas em estufa bacteriológica a 37°C por 24 horas. A seguir, agitaram-se os tubos (1 minuto), obtiveram-se diluições nas frações de 1:10 e 1:100 e, em triplicata, semearam-se 100 µL de cada diluição em diferentes meios de cultura: ágar MacConkey (bacilos gram-negativos), ágar Mitis Salivarius (*Streptococcus* spp.) e ágar Sabouraud (leveduras do gênero *Candida*).

Incubaram-se as placas a 37°C por 48 horas em aerobiose, e procedeu-se à contagem das unidades formadoras de colônias dos microrganismos avaliados (UFC/ml). Expressaram-se os resultados em escores de 1 a 4 (tabela I) para o total de bactérias gram-negativas e estreptococos. Para as leveduras de *Candida* spp., notou-se presença ou ausência de colônias no meio de cultura.

Efetou-se a confirmação das espécies bacterianas por meio da confecção de lâminas e coloração de gram para observação em microscopia ótica da morfologia das colônias. Essa primeira etapa foi desenvolvida para análise da contaminação das escovas dentais.

Tabela I - Escores para expressar o número de unidades formadoras de colônias (UFC) das bactérias pesquisadas

Escore	Total de microrganismos
1	Ausência
2	1 a 100 x 10 ³ UFC/ml
3	101 a 299 x 10 ³ UFC/ml
4	≥ 300 x 10 ³ UFC/ml

Em seguida, as escovas foram lavadas em água corrente e mantidas em uma sala à temperatura ambiente por 2 horas para secagem, sem que houvesse contato entre elas.

Dividiram-se de modo aleatório as escovas em três grupos: água destilada (GA – controle), clorexidina (GC – controle positivo, digluconato de clorexidina a 0,12%, Periogard, Colgate-Palmolive Ind. Com. e Ltda., São Bernardo do Campo, SP, Brasil) e hipoclorito (GH – hipoclorito de sódio a 1%, Asfer Indústria Química Ltda., São Caetano do Sul, SP, Brasil). Armazenaram-se as soluções em frascos plásticos codificados e com borrifadores em *spray*.

De acordo com o grupo de estudo, cada amostra recebeu seis borrifadas de solução de forma a atingir todas as cerdas: lado direito, lado esquerdo, porção superior, porção inferior e parte de trás da cabeça da escova, conforme metodologia proposta por Nelson-Filho *et al.* (2006) [15]. Estipulou-se uma distância de 5 cm entre o bico do borrifador e as cerdas. O excesso de solução foi removido agitando as escovas. Estas foram armazenadas novamente em temperatura ambiente por 2 horas, antes de nova análise microbiológica, já descrita.

Um único examinador, treinado e cego em relação à solução descontaminante usada, executou a contagem das colônias formadas nos diferentes meios de cultura. Considerou-se excelente (índice kappa = 0,92) a concordância intraexaminador.

O *software* estatístico GraphPad InStat, versão 3.06 para Windows (GraphPad InStat Software Inc., San Diego, EUA), serviu para a análise estatística dos dados ($\alpha = 0,05$), por intermédio dos testes não paramétricos exato de Fisher e Wilcoxon.

Resultados

As escovas dentais apresentaram contaminação em 100% dos casos, evidenciada pela turvação do caldo nutriente, no tempo de 24 horas. Houve crescimento de bacilos gram-negativos e estreptococos (figura 1), bem como presença de leveduras do gênero *Candida* em 47% (n = 14) das amostras.

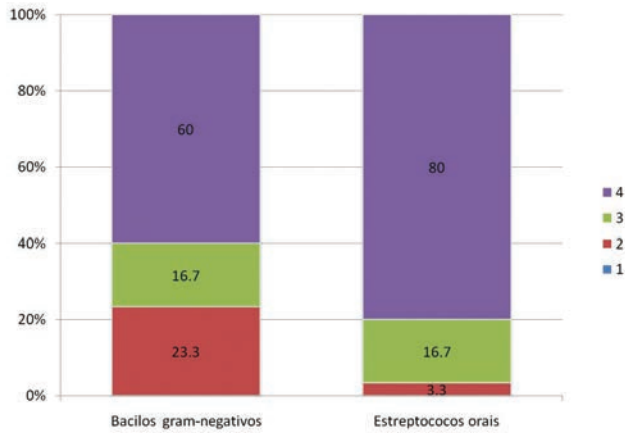


Figura 1 - Distribuição das frequências relativas dos escores de crescimento de bacilos gram-negativos e estreptococos pré-descontaminação

Feita a aplicação dos agentes descontaminantes, GA e GH continuaram tendo 100% de turvação; no GC, 40% das escovas não exibiram turvação do meio, o que é estatisticamente significativo ($p = 0,043$ - teste exato de Fisher).

Ao se considerar o crescimento de bacilos gram-negativos, observaram-se aumento expressivo em GA e redução em GC; GH não evidenciou diferença estatística significativa (figura 2). Em relação aos estreptococos orais, nenhum grupo demonstrou alterações relevantes (figura 3). O crescimento de *Candida* spp. foi muito pequeno no grupo GC ($p = 0,005$); não houve alterações nos grupos GA e GH (figura 4).

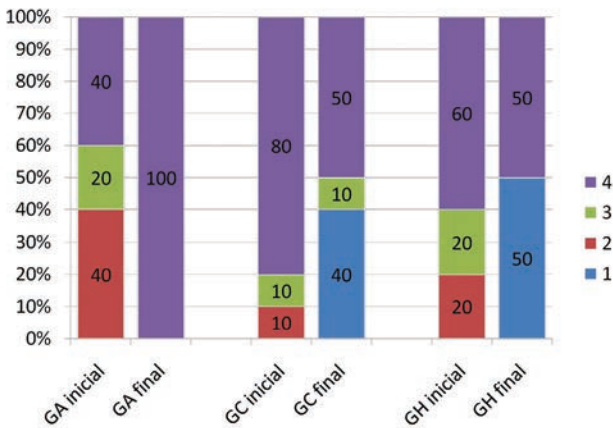


Figura 2 - Distribuição das frequências relativas dos escores de crescimento de bacilos gram-negativos. Teste de Wilcoxon: GA ($p = 0,0272$) e GC ($p = 0,0431$) - diferença expressiva; GH ($p = 0,1282$) - diferença não significativa

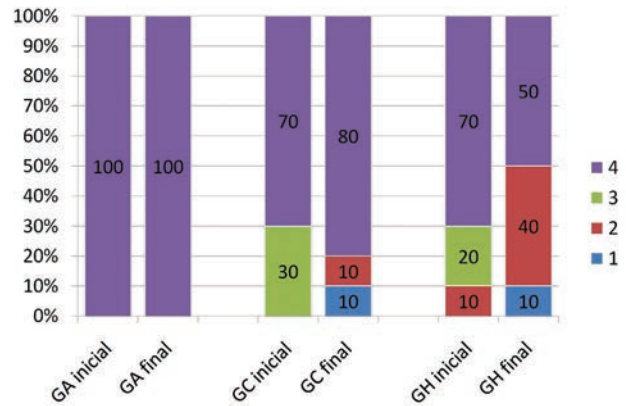


Figura 3 - Distribuição das frequências relativas dos escores de crescimento de estreptococos. Teste de Wilcoxon: GA ($p = 1,0$), GC ($p = 0,6858$) e GH ($p = 0,1508$) - diferença não relevante

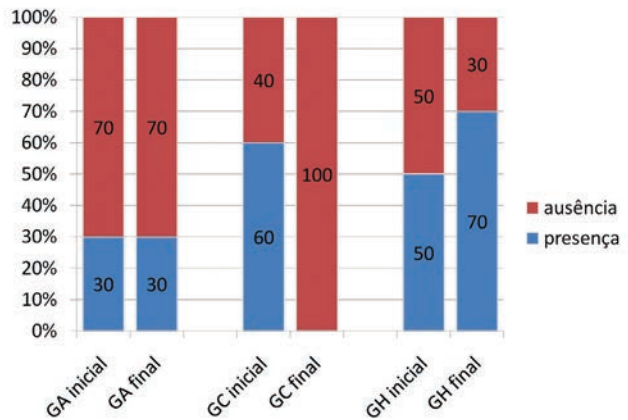


Figura 4 - Distribuição das frequências relativas da presença ou ausência de crescimento de leveduras do gênero *Candida* spp. Teste exato de Fisher: GA ($p = 1,0$) e GH ($p = 0,325$) - diferença não expressiva; GC ($p = 0,005$) - diferença significativa

Discussão

Na metodologia adotada não se preconizou método específico de armazenagem ou técnica diferenciada de escovação. Existe uma tendência na literatura em seguir protocolos específicos, como utilização da escova por cinco dias e armazenamento em recipientes plásticos individuais [3, 4], ou um único uso seguido pelos procedimentos microbiológicos [13, 15]. Tais recomendações não correspondem à realidade encontrada nas creches ou escolas para crianças portadoras de necessidades especiais. Portanto, a amostra da presente pesquisa pretendeu reproduzir

as condições encontradas no dia a dia desses indivíduos.

Todas as escovas dentais apresentaram contaminação pelos microrganismos averiguados. Detectou-se contaminação superior a 300×10^3 UFC/ml (escore 4) em 80% das amostras para estreptococos orais, 60% para bacilos gram-negativos e 47% para *Candida*.

Não foram encontrados estudos para comparação cuja amostra fosse composta por escovas dentais de pessoas com necessidades especiais. No tocante a crianças não portadoras, alguns autores relatam índices inferiores de colonização por estreptococos orais em escovas dentais [4, 23]. Nelson-Filho *et al.* (2006) [15] acharam uma porcentagem de 91% de contaminação por estreptococos nas escovas. No entanto os autores incluíram em tal valor todas as escovas nas quais se verificou presença ≥ 100 UFC/ml desses microrganismos.

A literatura também descreve índices inferiores aos encontrados aqui para *Candida* spp., porém em amostragem composta por estudantes universitários (37%) [13] e para microrganismos gram-negativos (47%) [20]. Portanto, os dados indicam maior colonização microbiana em escovas dentais de crianças portadoras de necessidades especiais, o que torna ainda mais importante os cuidados de descontaminação.

A opção de borrifar os agentes descontaminantes [3, 4, 12, 14, 15, 20] oferece vantagens em relação à imersão nas soluções: aplicação fácil e rápida, o produto sempre estará limpo, a quantidade de solução utilizada é reduzida [14] e um único frasco de agente em *spray* serve para toda a família, diminuindo assim o custo. Deve-se também salientar que a aplicação via *spray* é tão efetiva na descontaminação da escova quanto sua imersão em produto descontaminante [3]. Nesta pesquisa não foi possível eliminar todos os microrganismos com nenhuma das soluções testadas. O melhor resultado foi obtido com digluconato de clorexidina a 0,12%, que reduziu em 40% o crescimento microbiano nas escovas, mostrando diminuição significativa no número de colônias de bacilos gram-negativos e *Candida* spp., sem modificação para os estreptococos orais.

Levando em conta a ação da clorexidina sobre microrganismos gram-positivos, esperava-se uma redução expressiva no crescimento dos estreptococos, como verificado em diversos

trabalhos realizados *in vitro* [9] e *in vivo* [3, 4, 6, 9, 12, 15, 20]. Todavia há diferenças nas metodologias que podem ter influenciado os resultados, como descontaminação depois de uma única escovação [12, 15], associação da clorexidina 0,12% com benzidamina 0,15% em duas aplicações [3] e imersão das amostras em solução de clorexidina a 0,2% por 12 horas [4], 24 horas [6] e 10 minutos [9].

No que diz respeito aos outros patógenos testados, o protocolo de descontaminação com clorexidina preconizado pelo presente trabalho mostrou-se eficaz, com ausência de crescimento de *Candida* spp. em 100% das amostras, o que já havia sido divulgado por autores que recorreram ao mesmo método [9, 13]. Também houve redução relevante no total de bacilos gram-negativos, achado compartilhado por outras pesquisas [15, 21].

A solução de hipoclorito de sódio a 1% não revelou resultados significativos para nenhum dos microrganismos examinados. Contudo, na literatura, os dados são diferentes, com ausência de crescimento de estreptococos orais [6], redução de 90% [7] ou de 61% [4]. É necessário, mais uma vez, avaliar tais resultados com cautela, já que existem variações importantes na metodologia, como uso de escovas novas por apenas cinco dias [4, 7] e imersas na solução por 12 [4] ou 24 horas [6].

Ao analisar os achados, alguns pontos precisam ser levantados. Independentemente da solução descontaminante testada, os níveis de microrganismos detectados na amostragem da presente investigação ficaram superiores aos expostos por estudos com crianças ou adultos jovens não portadores de necessidades especiais, seja para estreptococos orais [4, 15, 23], bacilos gram-negativos [20] ou *Candida* spp. [13]. O protocolo baseado no cotidiano de crianças com necessidades especiais determina que a mesma escova seja utilizada diariamente por pelo menos 30 dias. No processo, a cada uso poderá ocorrer reinoculação de microrganismos, tanto do próprio sujeito quanto dos que frequentam a instituição e cumprem a mesma rotina.

O tempo de uso da escova, estabelecido em 30 dias para reproduzir os hábitos das crianças, também pode ter influenciado os resultados. Um estudo mostrou a perpetuação da infecção no biofilme dental de voluntários que compartilharam a mesma escova por um mês. Por outro lado, observou-se diminuição expressiva no nível de estreptococos

orais e *Candida* spp. quando esses indivíduos trocaram diariamente a escova dental [18].

Portanto, protocolos diferenciados devem ser avaliados em portadores de necessidades especiais. Ademais, eles têm de possibilitar boa adesão de crianças e pais, além de serem de baixo custo, rápidos e efetivos.

Conclusão

Dos agentes testados, apenas a clorexidina foi eficiente na diminuição dos bacilos gram-negativos e leveduras do gênero *Candida* spp., e nenhuma das soluções se mostrou eficaz contra estreptococos orais.

Referências

1. Anders PL, Davis EL. Oral health of patients with intellectual disabilities: a systematic review. *Spec Care Dentist*. 2010;30(3):110-7.
2. Ankola AV, Hebbal M, Eshwar S. How clean is the toothbrush that cleans your tooth? *Int J Dent Hyg*. 2009;7(4):237-40.
3. Aysegul O, Elgin IE, Gulcin A, Nedim S. The efficacy of chlorhexidine spray vs mouthwash in the microbial contamination of child toothbrushes. *J Dent Child*. 2007;74(3):177-81.
4. Balappanavar AY, Nagesh L, Ankola AV, Tangade PS, Kakodkar P, Varun S. Antimicrobial efficacy of various disinfecting solutions in reducing the contamination of the toothbrush – a comparative study. *Oral Health Prev Dent*. 2009;7(2):137-45.
5. Beneduce C, Baxter KA, Bowman J, Haines M, Andreana S. Germicidal activity of antimicrobials and violet personal travel toothbrush sanitizer: an in vitro study. *J Dent*. 2010;38(8):621-5.
6. Bhat S, Hedge K, George S. Microbial contamination of toothbrushes and their decontamination. *J Indian Soc Pedod Prev Dent*. 2003;21(3):108-72.
7. Chaves RAC, Ribeiro DML, Zaia JE, Alves EG, Souza MGM, Martins CHG et al. Avaliação de soluções antibacterianas na descontaminação de escovas dentais de pré-escolares. *Rev Odontol Unesp*. 2007;36(1):29-33.
8. Kaur D, Sammons RL. A comparison of bacterial survival on antibacterial and conventional toothbrushes. *J Dent Res*. 2003;82:542.
9. Komiyama EY, Back-Brito GN, Balducci I, Koga-Ito CY. Evaluation of alternative methods for the disinfection of toothbrushes. *Braz Oral Res*. 2010;24(1):28-33.
10. Lock G, Dirscherl M, Obermeier F, Gelbmann CM, Hellerbrand C, Knoll A. Hepatitis C – contamination of toothbrushes: myth or reality? *J Viral Hepat*. 2006;13(9):571-3.
11. Lockhart PB, Brennan MT, Sasser HC, Fox PC, Paster BJ, Bahrani-Mougeot FK. Bacteremia associated with toothbrushing and dental extraction. *Circulation*. 2008;117(24):3118-25.
12. Nascimento AP, Faria G, Watanabe E, Ito IY. Efficacy of mouthrinse spray in inhibiting cariogenic biofilm formation on toothbrush bristles. *Braz J Oral Sci*. 2008;7(24):1489-92.
13. Nascimento AP, Watanabe E, Ito IY. Toothbrush contamination by candida spp. and efficacy of mouthrinse spray for their disinfection. *Mycopathologia*. 2010;169(2):133-8.
14. Neal PR, Rippin JW. The efficacy of a toothbrush disinfectant spray – an in vitro study. *J Dent*. 2003;31(2):153-7.
15. Nelson-Filho P, Faria G, Silva RA, Rossi MA, Ito IY. Evaluation of the contamination and disinfection methods of toothbrushes used by 24- to 48-month-old children. *J Dent Child*. 2006;73(3):152-8.
16. Nelson-Filho P, Isper AR, Assed S, Faria G, Ito IY. Effect of triclosan dentifrice on toothbrush contamination. *Pediatr Dent*. 2004;26(1):11-6.
17. Oredugba FA, Akindayomi Y. Oral health status and treatment needs of children and young adults attending a day centre for individuals with special health care needs. *BMC Oral Health*. 2008;8(30):1-8.
18. Pai V. Effect of a single-use toothbrush on plaque microflora. *Indian J Dent Res*. 2009;20(4):404-6.
19. Saravia ME, Nelson-Filho P, Silva RA, Faria G, Rossi MA, Ito IY. Viability of streptococcus mutans toothbrush bristles. *J Dent Child*. 2008;75(1):29-32.

20. Sato S, Ito IY, Lara EHG, Panzeri H, Albuquerque Júnior RF, Pedrazzi V. Bacterial survival rate on toothbrushes and their decontamination with antimicrobial solutions. *J Appl Oral Sci.* 2004;12(2):99-103.
21. Sato S, Pedrazzi V, Lara EHG, Panzeri H, Albuquerque Júnior RF, Ito IY. Antimicrobial spray for toothbrush disinfection: an in vivo evaluation. *Quintessence Int.* 2005;36(10):812-6.
22. Vilas Boas LT, Albernaz EP, Costa RG. Prevalence of congenital heart defects in patients with down syndrome in the municipality of Pelotas, Brazil. *J Pediatr.* 2009;85(5):403-7.
23. Wetzel WE, Schaumburg C, Ansari F, Kroeger T, Sziegoleit A. Microbial contamination of toothbrushes with different principles of filament anchoring. *J Am Dent Assoc.* 2005;136(6):758-65; quiz 806.