

Utrechtseweg 48
Postbus 360
3700 AJ Zeist

www.tno.nl

T +31 30 694 41 44
F +31 30 694 47 77
wegwijzer@tno.nl

TNO-rapport

V 8935-01

Tandenborstel hygiëne bij langdurig gebruik:

Resultaten onderzoek oraal pathogenen op tandenborstels

Datum	12 april 2010
Auteur(s)	Dr. Athina Esveld-Amanatidou Dr. Rob Leer Dr. Jos van der Vossen Dr. Bart Keijser
Opdrachtgever	Glaxo Smith Kline
Projectnummer	031.20516/01.04

Aantal pagina's	11
Aantal bijlagen	-

Alle rechten voorbehouden. Niets uit dit rapport mag worden vermenigvuldigd en/of openbaar gemaakt door middel van druk, fotokopie, microfilm of op welke andere wijze dan ook, zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van TNO.

Indien dit rapport in opdracht werd uitgebracht, wordt voor de rechten en verplichtingen van opdrachtgever en opdrachtnemer verwezen naar de Algemene Voorwaarden voor onderzoeksopdrachten aan TNO, dan wel de betreffende terzake tussen de partijen gesloten overeenkomst.

Het ter inzage geven van het TNO-rapport aan direct belanghebbenden is toegestaan.

Inhoudsopgave

1	Inleiding.....	3
2	Materiaal & Methoden.....	5
3	Resultaten & Discussie.....	7
4	Conclusies.....	9
5	Referenties.....	10
6	Ondertekening.....	11

1 Inleiding

In opdracht van Glaxo Smith Kline heeft TNO een gefaseerd onderzoek uitgevoerd om de microbiologische kwaliteit te bepalen van de tandenborstels bij langdurig gebruik. Gedurende de eerste fase van dit onderzoek zijn de algemene bacteriële besmettingsniveaus op de tandenborstels na een en drie maanden bepaald. Daarnaast is middels kwantitatieve PCR de aanwezigheid bepaald van een fecaal indicator organisme – *Escherichia coli* – en een indicator van de orale microbiele flora – *Streptococcus mitis*. Gedurende de tweede fase van het onderzoek is een bepaling gedaan op het voorkomen vijf belangrijke orale pathogenen. Dit zijn:

- *Streptococcus mutans*
- *Tannerella forsythensis*
- *Porphyromonas gingivalis*
- *Fusobacterium nucleatum*
- *Candida albicans*

De keuze op deze vijf pathogenen is gemaakt, enerzijds vanuit het gegeven dat bovengenoemde orale pathogenen een belangrijke rol spelen bij infectieziektes van de mond-keelholte, waaronder parodontitis en cariës. Anderzijds verschillen bovengenoemde pathogenen in taxonomische oorsprong (Gram-negatieve bacterie, Gram-positieve bacterie en een Eukaryote gist). Deze verschillen in taxonomisch oorsprong, en daarmee celbouw hebben mogelijk ook gevolgen voor de mate van overleving op de tandenborstel. Aanwezigheid van geselecteerde pathogenen is uitgevoerd met behulp van real-time PCR, een gevoelige kweek-onafhankelijke methode, gebaseerd op detectie van DNA. De aanwezigheid van het DNA van de oraal pathogenen kan een aanwijzing zijn dat tandenborstels mogelijk infectiebron kunnen zijn bij verspreiding van orale infecties in de mondholte van een individu, maar is vanzelfsprekend geen bewijs hiervan.

De analyse is beperkt tot tien hoog besmette tandenborstels die bij aanvang van de studie “Microbiologische gesteldheid van tandenborstels bij langdurig gebruik” zijn ingeleverd.

Streptococcus mutans

S. mutans speelt een belangrijke rol in het ontstaan van cariës [5]. Verschillende studies, vooral bij kinderen, hebben sterke associaties aangetoond tussen het voorkomen van *S. mutans* in plaque en cariës [6]. Transmissie van *S. mutans* van ouders naar kinderen lijkt de belangrijkste bron te zijn van orale kolonisatie bij kinderen referentie [7]. Cariës ontstaat door bacteriële omzetting van suikers in zuren. *S. mutans* is in staat snel suikers in zuren om te zetten en kan bij lage pH nog actief zijn [4]. Daarnaast is *S. mutans* actief betrokken bij de vorming van tandplaque op tanden en kiezen.

Tannerella forsythensis

T. forsythensis is een Gram negatief, strikt anaëroob microorganisme. De bacterie groeit langzaam. *T. forsythensis* wordt gezien als paropathogen. Het organisme wordt veelal in grote aantallen aangetroffen in actieve parodontale pockets, en bij patiënten met refractaire parodontitis. Bij genezing van parodontitis neemt het voorkomen van *T. forsythensis* af. Kenmerken van parodontitis zijn botverlies rond de geïnfecteerde tand/kies, toename van de sondeerdiepte (pockets), bloeding na sonderen, roodheid en

zwellend het tandvlees. In een laat stadium kan de ziekte zelfs leiden tot verlies van tanden. Voor zover bekend komt *T. forsythensis* alleen in de mond voor [1][8].

Porphyromonas gingivalis

P. gingivalis is bekend als belangrijke pathogeen in de subgingivale plaque. Het is een Gram negatief microorganisme. Het organisme fermenteert geen koolhydraten en is sterk proteolytisch. Het organisme vormt een donker gekleurd pigment bij groei op bloedplaten; een indicatie van haemolytische activiteit. *P. gingivalis* bezit een groot arsenaal aan virulentie factoren, waaronder collagenase, een trypsineachtig enzym, en produceert diverse cytotoxische stoffen. De sterke proteolytische activiteit lijkt de belangrijkste virulentie factor te zijn. Diverse eiwitten die een belangrijke rol spelen bij de afweer bij parodontale infecties, kunnen door *P. gingivalis* worden afgebroken. Het micro-organisme wordt geassocieerd voor de voortgang van parodontitis, het verlies van (bot)weefsel, en verlies van aanhechting van tanden en kiezen referentie [3]. *P. gingivalis* wordt in 40-50% van de volwassen patiënten met ernstige parodontitis aangetroffen in concentraties tot 50% van de subgingivale microflora. De bacterie kan worden overgedragen van een parodontitis patiënt naar andere, niet-geïnfecteerde volwassenen [1][2][8].

F. nucleatum

F. nucleatum is een strict anaeroob groeiend microorganisme. *F. nucleatum* behoort tot de normale microflora van de mondholte. Het organisme wordt in grote aantallen aangetroffen in subgingivale plaque van parodontitis patiënten en maakt 5 tot 10% uit van de totale microflora [1]. Het organisme wordt veelvuldig aangetroffen in patiënten met chronische en acute necrotiserende gingivitis, pulpitis, parodontitis apicalis en odontogene abscessen. *F. nucleatum* breekt eiwitten af (proteolytisch) en produceert diverse toxische stoffen. Een percentage van >5% van deze bacterie kan een indicatie zijn voor slechte mondhygiënereferentie [8].

C. albicans

C. albicans is een schimmel die in de mondholte van 20-5% van de mensen wordt aangetroffen. Het organisme kan onder bepaalde omstandigheden orale candidiasis veroorzaakt. Symptomen van orale candidiasis zijn branderige pijn en zachte, witte pseudomembranen op een erythemateuze ondergrond (acute vorm) of erytheem en oedeem van de mucosa en kloofjes in de mondhoeken (voornamelijk bij dragers van een gebitsprothese). Orale candidiasis komt vooral voor bij jonge kinderen in de leeftijd van 0 tot 4 jaar of bij verminderde afweer [9][10].

2 Materiaal & Methoden

Dit project is een uitbreiding van een onderzoek voor GSK naar de microbiologische besmetting op tandenborstels bij langdurig gebruik. Details over studie opzet en verzameling van de tandenborstels wordt beschreven in rapport nummer V8935-2. Voor de analyse werden de aangehechte micro-organismen vrijgemaakt van de tandenborstels door de tandenborstelkoppen in 30 ml trypton soya bouillon (TSB, Oxoid) mild te sonificeren (2 x 1 minuut). 15 ml van het eluaat werd gecentrifugeerd om de aanwezige micro-organismen te verzamelen. Vervolgens werd het microbiële DNA vrij gemaakt door grondig te schudden met zirkonium beads (bead beating) in een fenolische oplossing. Daarna werd het DNA gezuiverd met behulp van de AGOWA mag Mini DNA Isolation Kit. Het gezuiverde DNA werd vervolgens gebruikt voor de kwantitatieve analyse van de mondpathogenen. Hiertoe werd een kwantitatieve PCR uitgevoerd waarbij specifieke primer/probe combinaties zijn gebruikt voor de detectie van voor *P. gingivalis*, *T. forsythensis*, *F. nucleatum*, *S. mutans* en *C. albicans*. Kwantitatieve PCR werd uitgevoerd met de 7500 Fast Real Time PCR cycler (AB Applied Biosystems) en PCR master mix (Diagnode). Het volume monster bedroeg 1/5 deel van het reactie mengsel dat 1x Diagnode PCR mix, 0,4µM forward en reverse primer en 0,2 µM probe bevatte. De sequenties van de gebruikte primers en probes staan vermeld in tabel 1. Met uitzondering van *T. forsythensis* is voor elke soort een specifieke ijkreeks meegenomen (5ft – 5ng) bij de analyse. Voor *T. forsythensis* is gebruikt gemaakt de ijkreeks van *P. gingivalis*. Vervolgens is een omrekening naar aantal cellen gemaakt door de aanname te doen dat een bacteriële cel ongeveer 3 femtogram DNA bevat. Voor *Candida* is de hoeveelheid DNA per cel geschat op 15fg. De PCR werd uitgevoerd bij de volgende condities: 10 min 95°C DNA denaturatie en enzym activatie gevolgd door 40 cycli van denaturatie 15 sec. bij 95°C en annealing, elongatie 1min 60°C. Data werden verzameld na iedere 60°C stap.

Met betrekking tot de detectie van *S. mutans* dient te worden opgemerkt dat duidelijk remming optrad bij vermeerdering en detectie van het PCR product. Veelal wordt dit ondervonden bij aanwezigheid van hoge aantallen micro-organismen die nauw verwant zijn aan het te detecteren organisme. Dit kan worden verklaard door aanwezigheid van grote aantallen *Streptococcus* op de tandenborstel, die het algemene voorkomen van deze groep micro-organismen in de mondholte reflecteert.

Tabel 1: Overzicht van primer-probe combinaties die zijn gebruikt voor kwantatieve PCR

naam primer	Target	sequentie
P.gin-F	16S Porphyromonas gingivalis	3'-GCGCTCAACGTTCA GCC-5'
P.gin-R	16S Porphyromonas gingivalis	3'-CACGAATTCGCCTGC-5'
P.gin-P	16S Porphyromonas gingivalis	FAM-CACTGAACTCAAGCCCGGCAGTTTCAA-MGB'
T.for-F	16S Tannerella forsythensis	3'-GACTGTCAGTTGCTAACAGGTAAAGCT-5'
T.for-R	16S Tannerella forsythensis	3'-CCAACCTTCTCACAGCTTACG-5'
T.for-P	16S Tannerella forsythensis	FAM-ACTCTGGCGGGACTG-MGB'
F.nuc-F	16S Fusobacterium nucleatum	3'-TCCGGATTTATTGGGCGTAA-5'
F.nuc-R	16S Fusobacterium nucleatum	3'-TTGAGCCCTGCATTTTACA-5'
F.nuc-P	16S Fusobacterium nucleatum	FAM-TAGGTGGTTATGTAAGTCTG-MGB'
S.mut-F	16S Streptococcus mutans	3'-CCAGGTCTT GACATCCCGAT-5'
S.mut-R	16S Streptococcus mutans	3'-CACCTGTCTCCGATGTACCGA-5'
S.mut-P	16S Streptococcus mutans	FAM-ATTCTTAGAGATAGGAAGTTAC-MGB'
C. alb-F	18S Candida albicans	3'-GGG TTT GCT TGA AAG ACG GTA-5'
C. alb-R	18S Candida albicans	3'-TTG AAG ATA TAC GTG GTG GAC GTT A -5'
C. alb-P	18S Candida albicans	FAM-ACCTAAGCCATTGTCAAAGCGATCCCG-TAMRA'

*F-forward primer**R-reverse primer**P-probe*

3 Resultaten & Discussie

Gedurende dit project zijn tien tandenborstelkoppen getest op de aanwezigheid van vijf relevante oraal pathogenen. De gebruikte tandenborstels zijn afkomstig uit een lopend onderzoek naar de microbiologische kwaliteit van tandenborstels. De gebruikte tandenborstels zijn afkomstig uit de zogenaamde ‘nulmeting’, en betreffen de eigen tandenborstels van deelnemers aan het kwaliteitsonderzoek die zijn ingeleverd bij aanvang. Op basis van indicaties van gebruikers is vastgesteld dat met merendeel van de tandenborstels minimaal vier maanden in gebruik is. Verder heeft eerder onderzoek een zeer hoge microbiologische ‘besmetting’ (>1.000.000 kve/tandenborstel) vastgesteld op deze set van tandenborstels. De resultaten van dit onderzoek staan vermeld in Tabel 2. Deze vastgestelde bacteriële niveaus geven een indicatie van de totale bacteriële ‘besmetting’, maar geven geen beeld van het voorkomen van specifieke micro-organismen.

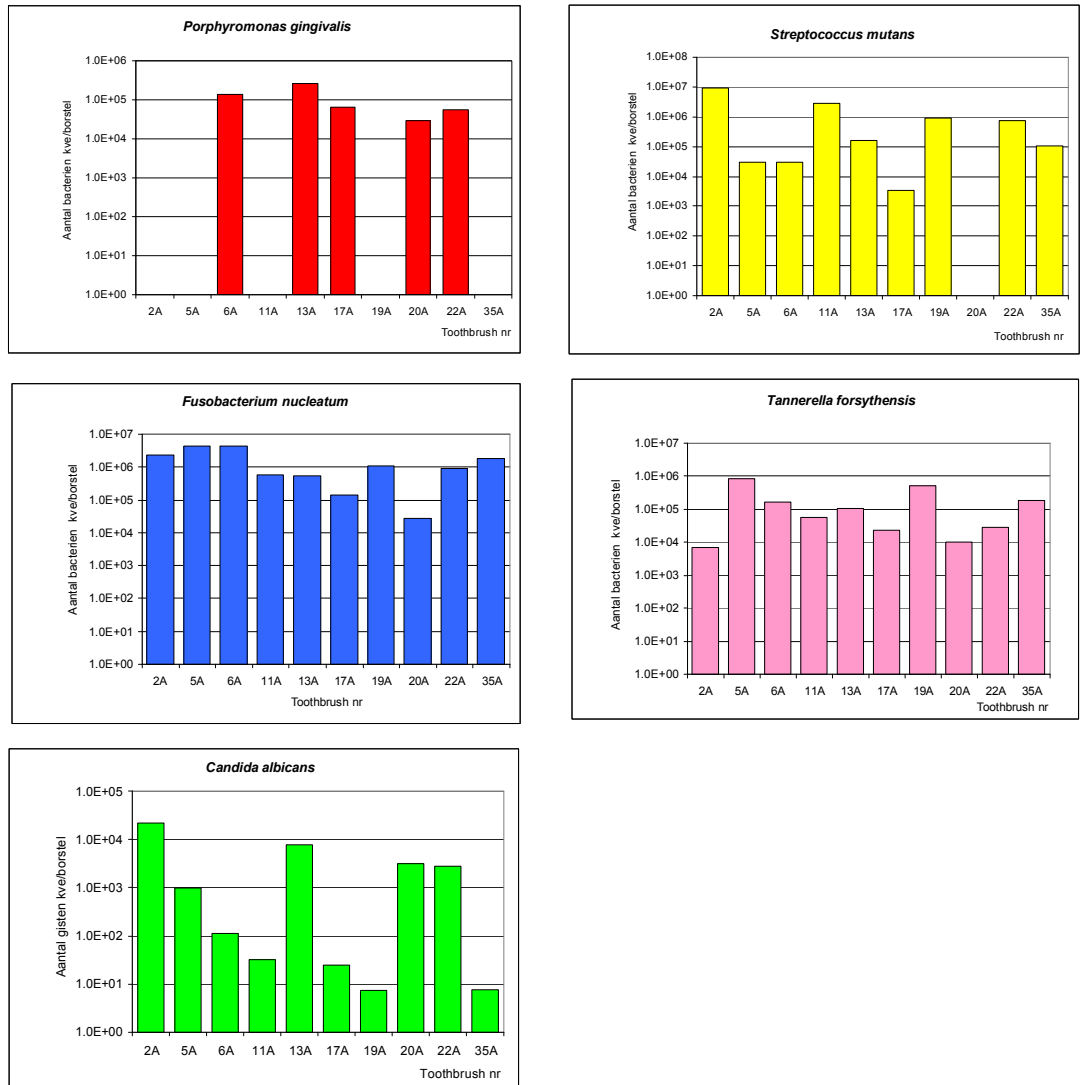
Tabel 2. Totaal aantal micro-organismen per tandenborstelkop

Tandenborstel nummer	Gebruiksperiode tandenborstel	Microbiologische niveau per tandenborstel kve/borstel in 30 ml TSB
2	ca. 3-4 maanden	1.5E+09
5	ca. 4 maanden	5.4E+07
6	1,5 maand	3.6E+08
11	3 weken	1.9E+08
13	3 maanden	1.7E+09
17	> 4 maanden	6.7E+08
19	> 3 maanden	4.9E+08
20	> 3 maanden	2.3E+09
22	onbekend	1.1E+08
35	> 3 maanden	2.5E+08

Om een meer gedetailleerd beeld te verkrijgen van de aanwezige micro-organismen is gedurende dit onderzoek een kwantitatieve bepaling gedaan van het voorkomen van vijf orale indicator pathogenen: *P. gingivalis*, *T. forsythensis*, *F. nucleatum*, *St. mutans* en *C. albicans*. De bepaling is gedaan met behulp van kwantitatieve PCR. Deze methode is gebaseerd op het detecteren van specifieke genetische kenmerken van de pathogenen. De kwantitatieve PCR analyse is uitgevoerd op DNA geïsoleerd uit micro-organismen die konden worden losgetrild uit de geselecteerde tandenborstels (Tabel 2). De resultaten van de analyse zijn weergegeven in Figuur 1. In algemene zin kan worden geconcludeerd dat alle geteste oraal pathogenen kunnen worden aangetroffen op de tandenborstels, zij het soms op relatief lage niveaus. *T. forsythensis* en *F. nucleatum* DNA is aangetroffen op alle tandenborstels in aantallen overeenkomend met 10^4 tot 5×10^6 cellen per borstel. *P. gingivalis* is aangetoond in vijf van de tien tandenborstels (10^4 - 10^5 cellen /borstel). *St. mutans* is aantoonbaar in negen van de tien borstels. Aantallen *St. mutans* per borstel liggen tussen 10^3 – 10^7 cellen. *C. albicans* is aangetoond in een range van 10^2 – 10^4 cellen per borstel.

De directe klinische relevantie kan niet onmiddellijk worden afgeleid uit deze getallen. Duidelijk is wel dat relevante oraal pathogenen kunnen worden aangetroffen op de tandenborstels, en dat dit in potentie ook een infectierisico met zich mee brengt. De

relatieve niveaus zijn laag; de geteste pathogenen vertegenwoordigen ~0.1 – 0.01% van de totale microbiële biofilm.



Figuur 1. Aantallen micro-organismen per tandenborstel bepaald met kwantitatieve PCR.

4 Conclusies

De volgende conclusies kunnen worden getrokken uit dit deelonderzoek:

- Alle geteste oraal pathogenen konden worden aangetroffen op (een gedeelte van) de geteste tandenborstels in aantallen tussen 10^2 – 10^7 cellen per borstel.
- De aanwezigheid van deze pathogene micro-organismen op de tandenborstels kan niet rechtstreeks worden gekoppeld aan mogelijke gezondheidsrisico's of mogelijke orale infecties. De gebruikte onderzoeksmethode geeft wel een sterke indicatie van de aanwezigheid van deze bacteriële cellen, maar doet geen uitspraak over risico op infecties.
- De resultaten suggereren dat bij langdurig gebruik een microbiologische flora (biofilm) op de tandenborstels ontstaat die overeenkomsten heeft met tand plaque. Deze biofilm kan mogelijk ook een omgeving voor oraal pathogene micro-organismen bevatten.
- Om de bevindingen van het onderzoek te bekrachtigen is verdere onderzoek nodig op:
 - ✓ De levensvatbaarheid van de oraal pathogene in de tandenborstel biofilm, en inventarisatie van het mogelijke infectie risico.
 - ✓ Veranderingen in het voorkomen van oraal pathogene op de tandenborstels gedurende de tijd.
 - ✓ Koppeling van het voorkomen van pathogene en opbouw biofilm aan gebruik van de tandenborstel (bewaarcondities/reinigen etc)
 - ✓ Koppeling van de tandenborstel biofilm aan de aanwezige microbiële flora in de mondholte.
 - ✓ Microscopische analyse van de biofilm op tandenborstels.

Deze rapportage betreft een tussenrapportage van het complete onderzoek, Dit betekent dat niets uit dit rapport vermenigvuldigd en/of openbaar gemaakt kan worden. Dit zal wel mogelijk zijn met de eindrapportage van het complete onderzoek zoals overeengekomen in het projectvoorstel tussen TNO en GSK met referentie FBI_10_0010_v2_ATM.

5 Referenties

- [1] Parodontologie W. Beertsen, M. Quirynen, D. van Steenberghe, U. van der Velden (Studie)boek 1e druk 01-07-2009 9789031368860
- [2] Mombelli A, Schmid B, Rutar A, Lang NP (2002). Local antibiotic therapy guided by microbiological diagnosis. Treatment of Porphyromonas gingivalis and Actinobacillus actinomycetemomitans persisting after mechanical therapy. *J Clin Periodontol* 2000; 29: 743-749
- [3] Steenbergen TJ van, Winkelhoff AJ van, Velden U van der, Graaff J de. Taxonomy, virulence and epidemiology of black-pigmented Bacteroides species in relation to oral infections. *Infection* 1989; 17: 194-196.
- [4] Loesche WJ. (1986) Role of Streptococcus mutans in human dental decay. *Microbiol Rev* 1986; 50: 353-380.
- [5] Thenisch NL, Bachmann LM, Imfeld T, Leisebach Minder T, Steurer (2006) Are mutans streptococci detected in preschool children a reliable predictive factor for dental caries risk? A systematic review *J. Caries Res.*;40(5):366-74. 1 .
- [6] Parisotto TM, Steiner-Oliveira C, Silva CM, Rodrigues LK, Nobre-dos-Santos M. (2010) Early childhood caries and mutans streptococci: a systematic review. *Oral Health Prev Dent.*;8(1):59-70.
- [7] Douglass JM, Li Y, Tinanoff N. (2008) Association of mutans streptococci between caregivers and their children. *Pediatr Dent.* 30(5):375-87.
- [8] Lamont, R. J. , Burne, R. A., Lantz, M. S., LeBlanc, D. J. (2006) Oral microbiology and immunology. Amer Society for Microbiology ISBN-13: 9781555812621
- [9] Van de Lisdonk EH, Van den Bosch WJHM, Huygen FJA, et al. (1999) Ziekten in de huisartspraktijk. 3de druk. Maarssen: Elsevier/Bunge.
- [10.] Epstein JB, Polsky B (1998) Oropharyngeal candidiasis: a review of its clinical spectrum and current therapies. *Clin Ther.* 20:40-57.

6 Ondertekening

Zeist, 12 april 2010

TNO Kwaliteit van Leven

Roy Montijn
Teamleider

Bart Keijser
Auteur

Jos van Der Vossen
Projectleider