

## TNO-rapport

T  
F

V8935-02

## Microbiologische gesteldheid van tandenborstels bij langdurig gebruik

### Datum

Auteurs	B.J.F. Keijser
Opdrachtgever	Glaxo Smith Kline
Projectnummer TNO	031.20516

Status	definitief
Vorige versies	

Aantal pagina's	12
Aantal tabellen	
Aantal figuren	
Aantal bijlagen	
Aantal appendices	

Alle rechten voorbehouden.

Niets uit deze uitgave mag worden vermenigvuldigd en/of openbaar gemaakt door middel van druk, foto-kopie, microfilm of op welke andere wijze dan ook, zonder voorafgaande 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 onderzoekopdrachten aan TNO, dan wel de betreffende terzake tussen de partijen gesloten overeenkomst.

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

## Inhoudsopgave

<b>1</b>	<b>Inleiding</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Materiaal en methoden</b> .....	<b>2</b>
2.1	Monster verzameling .....	2
2.2	Microbiologische methoden .....	2
2.3	Moleculaire analyse van microorganismen .....	3
<b>3</b>	<b>Resultaten</b> .....	<b>4</b>
3.1	Kweek resultaten.....	4
3.2	Moleculaire analyses.....	5
<b>4</b>	<b>Conclusies</b> .....	<b>8</b>
<b>5</b>	<b>Ondertekening</b> .....	<b>9</b>
<b>6</b>	<b>Referenties</b> .....	<b>10</b>
<b>7</b>	<b>Bijlage 1 – Resultaten plaattellingen</b> .....	<b>11</b>
<b>8</b>	<b>Bijlage 2 – resultaten kwantitatieve PCR</b> .....	<b>12</b>

# 1 Inleiding

Frequent poetsen van tanden en kiezen is essentieel in de preventie van orale infecties. Intensief gebruik van tandenborstels zorgt voor slijtage van de borstelkop. Deze slijtage kan de efficiëntie van plaqueverwijdering sterk verminderen [4][5][6]. Tandartsen raden hun patiënten aan om tandenborstels waarmee gedurende drie maanden of langer is gepoetst niet meer te gebruiken [8][9]. Echter, in de praktijk worden de tandenborstels veelal gedurende een langere periode gebruikt (soms een jaar of langer). Naast slijtage van de borstelkop heeft langdurig gebruik van de tandenborstels ook mogelijke gevolgen voor de microbiologische kwaliteit. Uit eerdere onderzoeken is gebleken tandenborstels bij gebruik kunnen worden gekoloniseerd door verschillende soorten Gram-positieve en Gram-negatieve bacteriën. Deze konden worden geïdentificeerd als vertegenwoordigers van de Enterobacteriaceae, Pseudomonaden, Streptococce en Staphylococce [1][2][3].

Gedurende dit onderzoek is microbiële kolonisatie van tandenborstels geanalyseerd gedurende drie maanden regulier gebruik. Aan het onderzoek hebben 37 vrijwilligers deelgenomen. Bij aanvang van de studie werden vrijwilligers gevraagd de oude tandenborstel in te ruilen voor een nieuwe borstel van een willekeurig merk. Na een maand van gebruik werden vrijwilligers wederom gevraagd de tandenborstel in te ruilen voor een nieuw exemplaar. Tot slot werd ook na drie maanden van gebruik de tandenborstel in geleverd. De ingeleverde tandenborstels zijn direct bij binnenkomst in het laboratorium onderzocht op aanwezigheid van microorganismen. Het microbiologische onderzoek heeft zich enerzijds gericht op het bepalen van aantal aërobe en anaërobe kweekbare organismen. Daarnaast is door toepassing van kwantitatieve PCR onderzocht of de aanwezige microorganismen afkomstig waren uit de mond van de gebruiker, of dat ook fecale indicator organismen een rol spelen bij kolonisatie / biofilm vorming op tandenborstels.

## 2 Materiaal en methoden

### 2.1 Monster verzameling

Van een groep van 37 vrijwilligers is op 19 januari 2010 tandenborstels verzameld. Bij de inzameling is door de vrijwilligers ook vastgelegd wat het merk en de gebruiksduur was. De groep vrijwilligers bestond uit een groep van gezonde willekeurig geselecteerde mannen en vrouwen in de leeftijd tussen 20 en 60 jaar. Tandeborstels werden anoniem aangeleverd in een hersluitbare plastic zak. Bij inlevering van de oude tandenborstel werd een nieuwe tandenborstel verstrekt, van een willekeurig gekozen merk, overeenkomstig met het huidige assortiment verkrijgbaar bij Nederlandse supermarkten en drogisten. Na een maand van gebruik (op 16 februari 2010) werden vrijwilligers wederom gevraagd de tandenborstels in te leveren. Hierbij kregen vrijwilligers opnieuw een nieuwe tandenborstel uitgereikt. Ten slotte werd vrijwilligers op 18 mei 2010, na 13 weken gebruik, gevraagd de tandenborstels opnieuw in te leveren voor microbiologisch onderzoek. De studie is anoniem uitgevoerd.

Monstername	T0	T1	T2
Datum bemonstering	19/01/2010	16/02/2010	18/05/2010
Sample	Oude tandenborstel	Tandenborstel 1	Tandenborstel 2
<b>Data</b>			
Merk en type	X		
Gebruiksduur	X		
Aëroob koloniegetal	X	X	X
Anaëroob koloniegetal	X		X
<i>E coli lacZ</i> (qPCR)	X	X	X
<i>S. mitis groEL</i> (qPCR)	X	X	X

*Schema van studie, met daarin aangegeven de analyses die zijn uitgevoerd.*

### 2.2 Microbiologische methoden

Tandenborstels zijn na inleveren geplaatst in een buis met 30 ml trypton soya bouillon (TSB, Oxoid). Vervolgens zijn de buizen geplaatst in een ultrasoon bad (Decon F5) en mild gesonificeerd (2 x 1 minuut). De helft (15 ml) van het vrijgemaakte materiaal is direct daarna gebruikt voor microbiologische analyses. Hiertoe werd een seriële verdunning gemaakt in Pfz (8,5 g Natrium Chloride en 1 g bacteriologisch pepton per liter water). Het materiaal werd vervolgens uitgeplaat op trypton soya agar (TSA, Oxoid) en geïncubeerd bij 37°C gedurende 3 dagen (Aëroob koloniegetal). Het anaerobe koloniegetal is bepaald door het uitplaten van een seriële verdunning op Schaedler anaerobe agar (SAA). De platen werden geïncubeerd bij 37°C gedurende 3 dagen onder anaërobe condities (80% N<sub>2</sub> / 10%CO<sub>2</sub> / 10%H<sub>2</sub>).

### 2.3 Moleculaire analyse van microorganismen

Voor moleculaire analyse van aanwezige microorganismen, is het resterende deel van het losgetrilde materiaal gebruikt voor DNA isolatie. Daartoe werd 15 ml van het eluaat gecentrifugeerd om de aanwezige microorganismen te verzamelen. Vervolgens werd het microbiële DNA vrij gemaakt door grondig te schudden met zirkonium beads (bead beating) in een fenolische oplossing. Het DNA werd vervolgens gezuiverd met behulp van de AGOWA mag Mini DNA Isolation Kit. Het gezuiverde DNA werd vervolgens gebruikt voor de kwantitatieve moleculaire analyse van aanwezigheid *E. coli* en *S. mitis*. Voor de kwantitatieve bepaling van *Escherichia coli* werd gebruik gemaakt van *lacZ* gen als target; voor de bepaling van *S. mitis* werd gebruik gemaakt van het *groEL* gen als target. Sequenties van de gebruikte primers en probes staan vermeld in tabel 1. De kwantitatieve PCR werd uitgevoerd met de 7500 Fast Real Time PCR cycler (AB Applied Biosystems) en PCR master mix (Diagnode). Het volume monster is 1/5 deel van het reactie mengsel dat 1x Diagnode PCR mix, 0.4µM forward en reverse primer en 0.2 µM probe bevatte. Voor beide soorten is een specifieke ijkreeks meegenomen (5ft – 5ng) bij de analyse. Vervolgens is een omrekening naar aantal bacteriële cellen gemaakt door de aanname te doen dat een bacteriële cel ongeveer 3 femtogram DNA bevat. 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.

Tabel 1

Naam primer	Target	Sequentie
StmitGRO F	<i>groEL</i> – <i>S. mitis</i>	5' – GGTGGTGG AACAGCCCTTGTA –3'
StmitGRO Rv	<i>groEL</i> – <i>S. mitis</i>	5' – TGTGGGCGATTTGACGAACA –3'
Stmit Probe	<i>groEL</i> – <i>S. mitis</i>	FAM-CTGCCGTAGCTGATTTGGAATTAACAGGAGACGAA – TAMRA
EclacFOR	<i>LacZ</i> – <i>E.coli</i>	5' – GGATCTGCCATTGTCAGACATG –3'
EclacRev	<i>LacZ</i> – <i>E.coli</i>	5' – TGGTGTGGGCCATAATTCAATT –3'
Eclac Probe	<i>LacZ</i> – <i>E.coli</i>	FAM-TACCCCGTACGTCTTCCCGAGCG – TAMRA

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

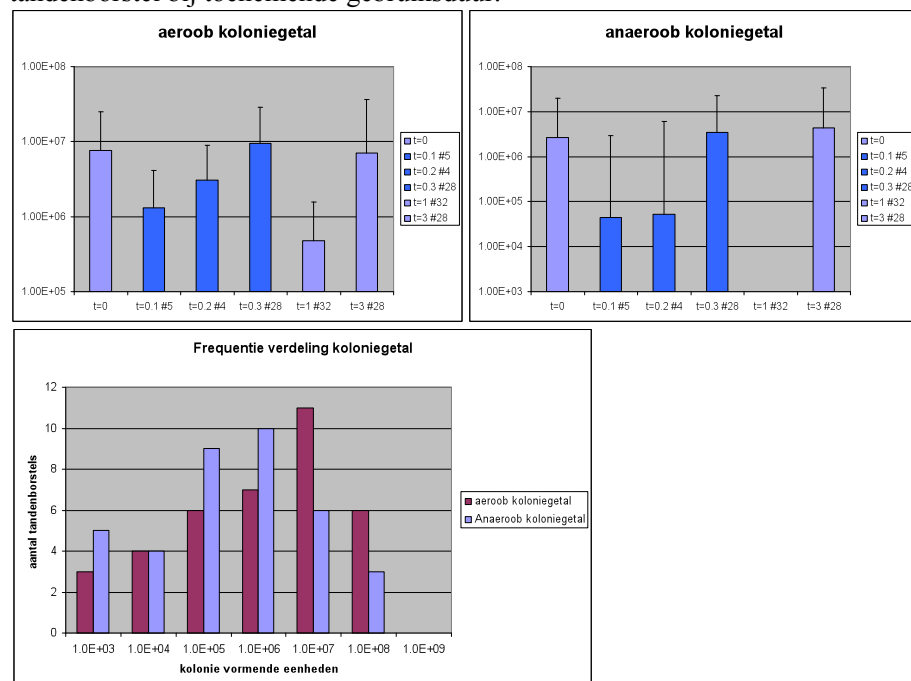
### 3 Resultaten

Gedurende deze studie is de ontwikkeling van de microbiële biofilm op tandenborstels gedurende de tijd onderzocht. Er zijn geen pogingen ondernomen om ook het type of merk tandenborstel in verband te brengen met microbiële niveaus. Alhoewel te verwachten is dat het ontwerp en uitvoering (type materiaal) een sterke invloed heeft op de microbiële besmetting, is dit verder niet in de studie meegenomen. Ook is het poetsgedrag van de gebruiker van de tandenborstel, zoals routine in gebruik, reinigen na afloop, bewaarcondities etc. niet meegenomen bij deze studie.

Alle ruwe onderzoeksgegevens staan weergegeven in de tabellen: bijlagen 1 en 2. Bij presentatie van de resultaten is een overzicht gemaakt van gemiddelde waarden.

#### 3.1 Kweek resultaten

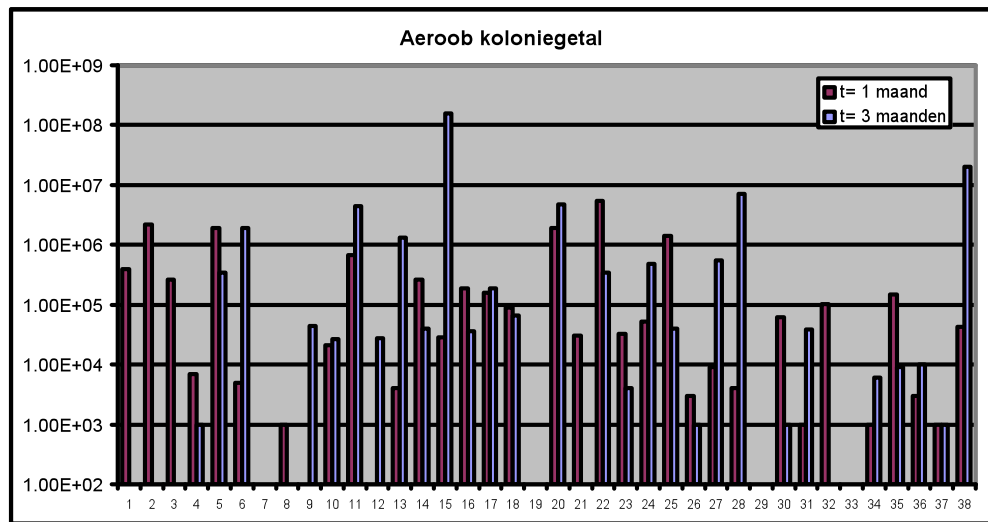
Bij aanvang van de studie was het gemiddelde aëroob koloniegetal dat werd aangetroffen op de ingeleverde tandenborstels  $7,7 \cdot 10^6$ . Dit getal liep per tandenborstel sterk uiteen, en leek mede beïnvloed door verschillen in gebruiksduur. Alhoewel het aantal tandenborstels met een korte gebruiksduur relatief klein was, kon toch een duidelijke trend worden waargenomen met een toenemend koloniegetal bij langere gebruiksduur. Het anaerobe koloniegetal dat werd gevonden op de tandenborstels bij aanvang van de studie was iets lager dan het aërobe koloniegetal: gemiddeld  $2,6 \cdot 10^6$  per tandenborstel. Ook hierbij werden sterke verschillen gevonden in aantal KVE's per tandenborstel. Er leek een trend te zijn van een toenemend aantal KVE's per tandenborstel bij toenemende gebruiksduur.



Figuur 1 - Overzicht van aëroob (links) en anaëroob (rechts) koloniegetal aanwezig op de tandenborstel. Kolommen in donderblauw geven het overzicht van de tandenborstels verzameld bij aanvang, opgesplitst naar gebruiksduur (1 maand, 2 maanden of 3 en langer). Het getal achter het symbool # geeft een indicatie van het aantal tandenborstels. Figuur onder geeft de frequentie verdeling aan van gevonden koloniegetallen van de tandenborstels bij aanvang van de studie.

Na een maand van gebruik werd een gemiddeld aëroob koloniegetal gevonden van  $4,8 * 10^5$ , maar varieerde per tandenborstel tussen  $10^3$  en  $10^6$  KVE's. Het anaërobe koloniegetal is op dit tijdstip (1 maand) niet bepaald.

Na drie maanden van gebruik werd op de tandenborstels een gemiddeld aëroob koloniegetal gevonden van  $7,0 * 10^6$ . Het gemiddeld anaërobe koloniegetal werd bepaald op  $4,3 * 10^6$ . Er werd een sterke overeenkomst gevonden tussen het aërobe en anaërobe koloniegetal. Dit kan enerzijds worden veroorzaakt door aanwezigheid van facultatief anaërobe microorganismen die onder zowel anaërobe als aërobe condities kunnen groeien. Anderzijds is het ook mogelijk dat anaërobe microorganismen zich pas kunnen handhaven op de tandenborstel biofilm zodra deze zich voldoende heeft ontwikkeld en er zuurstofarme niches zijn ontstaan. Vergelijkbaar met eerdere waarnemingen werd een sterke variatie gevonden in koloniegetal tussen de verschillende tandenborstels.

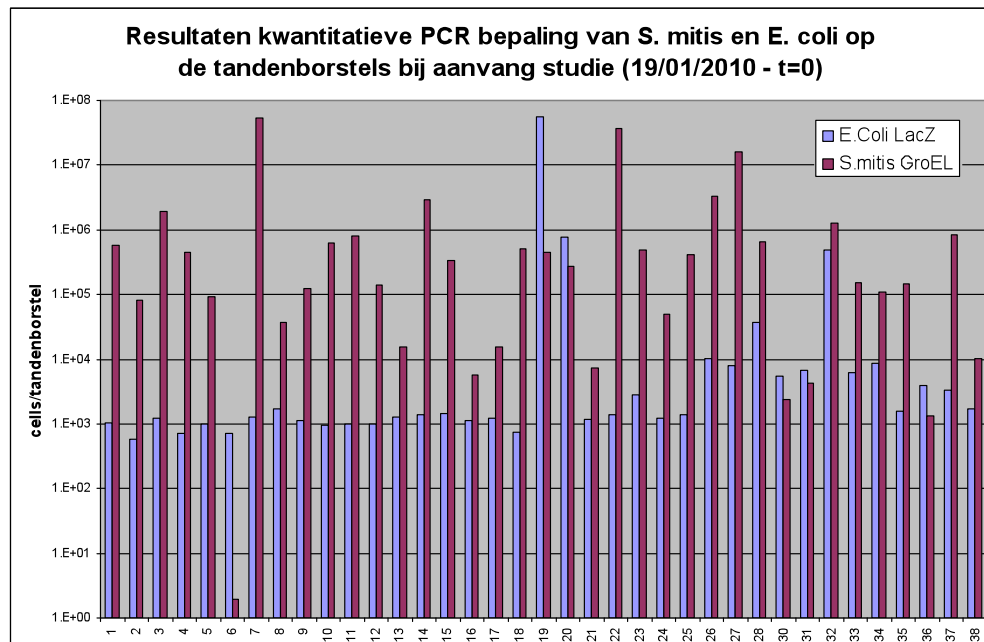


Figuur 2 – Overzicht van het aëroob koloniegetal gevonden op de tandenborstels na 1 maand en 3 maanden gebruik.

### 3.2 Moleculaire analyses

Voor het bepalen van een mogelijke herkomst van de biofilm die op tandenborstels werd aangetroffen is gebruik gemaakt van kwantatieve PCR. De meest waarschijnlijke herkomst van microorganismen in de biofilm op de tandenborstel is de mondholte. Speeksel bevat ongeveer 500 miljoen bacteriële cellen per milliliter ( $5 * 10^8$ ). De dagelijkse poetsbeurt zal daarbij een flink aantal bacteriën achterlaten op de tandenborstel, die deels na het afspoelen van de borstel achterblijven en een biofilm kunnen vormen. *Streptococcus mitis* is een van de meest voorkomende soorten in de mondholte, en is daarom in deze studie gebruikt als indicatororganisme voor orale microorganismen.

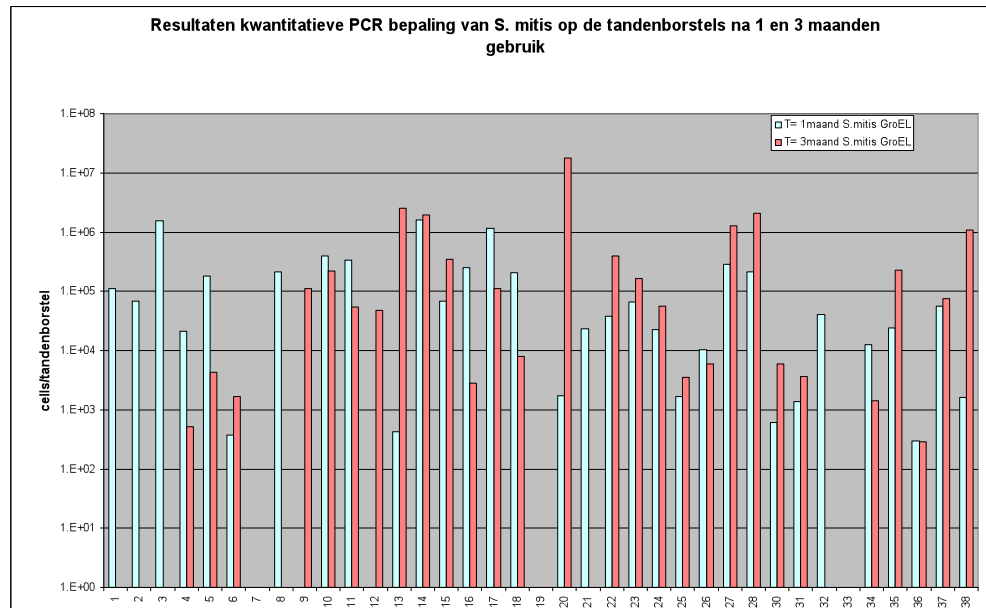
*Escherichia coli* is gedurende dit project ingezet als indicator voor besmetting vanuit de omgeving. In de mondholte wordt *E. coli* slechts incidenteel aangetroffen, en doorgaans op lage niveaus ( $10^2$ - $10^3$  per ml). *E. coli* wordt in grote aantallen ( $>10^4$ - $10^8$ ) aangetroffen in de darmen van zoogdieren, waaronder ook de mens. Het organisme wordt verder ook aangetroffen in het milieu, op ongewassen groenten en op rauw vlees.



Figuur 3 - Kwantitatieve bepaling van het voorkomen van *E. coli* en *S. mitis* op tandenborstels bij aanvang studie.

Aanwezigheid van *S. mitis* en *E. coli* werd bepaald met behulp kwantitatieve PCR, een methode die berust op de detectie van specifieke DNA kenmerken. Belangrijk daarbij is dat de methode zowel kweekbare als niet-kweekbare microorganismen kan detecteren. *S. mitis* werd bij het merendeel van de onderzochte oude tandenborstels aangetroffen. De bacteriële niveaus waren relatief laag in vergelijking met de gevonden koloniegetallen. Opgemerkt dient te worden dat in de bepaling van *S. mitis* niveaus remming werd ondervonden van de PCR reactie. Een waarschijnlijke verklaring hiervoor is het optreden van kruis-hybridisatie met nauw verwante *Streptococcus* soorten tijdens de PCR reactie. Naast *Streptococcus mitis* zijn er veel *Streptococcus* soorten abundant aanwezig in de mondholte. Opvallend was dat *E. coli* werd in drie gevallen abundant op de ingeleverde tandenborstels werd aangetroffen. In de overige gevallen was het aandeel verwaarloosbaar klein.

Gedurende de studie werd *E. coli* niet in significante aantallen aangetroffen op de nieuwe tandenborstels. *Streptococcus mitis* werd op het merendeel van de tandenborstels aangetroffen. De niveaus waren relatief laag in vergelijking met de aërobe koloniegetallen, en namen slechts in geringe mate toe bij langduriger gebruik. Na 1 maand was het gemiddelde niveau  $2.2 \cdot 10^5$  cellen per tandenborstel; na 3 maanden gebruik lag dit niveau op  $1.0 \cdot 10^6$ .



Figuur 4 – Kwantitatieve PCR bepaling van aanwezigheid van *Streptococcus mitis* op de tandenborstels na 1 resp. 3 maanden gebruik.

## 4 Conclusies

Dit onderzoek heeft laten zien dat bij gebruik van tandenborstels gedurende 3 maanden er zich een de bacteriële populatie ontwikkeld van gemiddeld 7 miljoen bacteriën per tandenborstelkop. Deze resultaten zijn in lijn met bevindingen uit eerdere studies[1][2]. Opvallend daarbij was dat op tandenborstels die bij aanvang van de studie waren ingeleverd, en langdurig waren gebruikt (>3 maanden) veelal een hoger besmettingsniveau werd gevonden dan bij tandenborstels die minder lang waren gebruikt. Een vergelijkbare trend – een toename in bacteriële besmettingsniveaus bij langduriger gebruik - werd ook gevonden na 1 en 3 maanden gebruik van de nieuwe tandenborstels. Wel dient te worden opgemerkt dat de bacteriële besmettingsniveaus een sterke variatie lieten zien per individu. Deze variatie heeft mogelijk een relatie met het type en kwaliteit van de tandenborstel, en de wijze van tandenborstel gebruik (mate van slijtage, reinigen, condities van bewaren etc). Deze variabelen zijn niet in dit onderzoek meegenomen. De aanhechting van bacteriën en mogelijke vorming van een biofilm op tandenborstel weerspiegelt deels ook mogelijke veroudering van de tandenborstel. Het is bekend dat gebruik van tandenborstels een slijtage geeft aan tandenborstel haren, die daarbij korter kunnen worden, kunnen splijten, wijder kunnen gaan staan. Door deze verouderingsprocessen van de tandenborstel kunnen deeltjes zich gemakkelijker ophopen tussen de borstel haren, en kan de tandenborstel mogelijk ook langer vochtig blijven. Hierdoor ontstaat een uitstekende omgeving voor bacteriën om in een warme badkamer omgeving te groeien en een biofilm te vormen.

Nadere analyse van de microorganismen aanwezig op de tandenborstel suggereert dat de aanwezige microorganismen voor een groot deel afkomstig zijn uit de mondholte van de gebruiker. Incidenteel werd *E. coli* gevonden, hetgeen mogelijk duidt op besmetting vanuit de omgeving. Dit wordt bevestigd door eerder gepubliceerd werk waarbij ook *Listeria species* aangetoond op tandenborstels [10]. *Listeria monocytogenes* is een bekende voedselpathogeen. De gevonden niveaus van *S. mitis* en *E. coli* waren relatief laag in vergelijking met de totale bacteriële niveaus die via kweek werd bepaald.

Al met al moet worden geconcludeerd dat de tandborstel een goede omgeving vormt voor het ontstaan van een bacteriële biofilm, grotendeels gevormd door lichaamseigen bacteriën, maar die ook mogelijkheden biedt voor omgevingsbacteriën voor groei / overleving.

De vraag blijft staan op welke wijze bacteriële besmetting een gezondheidsrisico vormt voor de gebruiker. Huidige data voorhanden is onvoldoende om de mogelijke effecten van aanwezigheid van microorganismen op tandenborstels in te schatten. Tijdens het poetsen van tanden ontstaat een intensief contact van de tandenborstel met tanden en tandvlees. Het is daarbij niet uit te sluiten dat microorganismen aanwezig op de tandenborstel daarmee van de tandenborstel op de gebruiker overgedragen kunnen worden. Uitgaande van het gegeven dat het merendeel van de tandenborstels door slechts één gebruiker zal worden gebruikt, zal de kans op infectie van persoon op persoon laag zijn. Echter, met het oog op de incidentele aanwezigheid een organisme uit de omgeving – *E. coli* – op de tandenborstel, kan niet worden uitgesloten dat microorganismen uit de omgeving, die dus niet van nature in de mondholte voorkomen, via de tandenborstel worden overgedragen op de gebruiker. Hierdoor ontstaat mogelijk een risico op infectie. Het exacte risico op infectie via deze route is niet goed in te schatten op basis van de verzamelde gegevens.

## 5 Ondertekening

Zeist, 7 juli 2010

TNO Kwaliteit van Leven

Roy Montijn  
Team manager

Bart Keijser  
Auteur

Jos van der Vossen  
Projectleider

## 6 Referenties

- [1] R. L. Sammons, D. Kaur and P. Neal (2004). Bacterial survival and biofilm formation on conventional and antibacterial toothbrushes. *Biofilms*, 1 , pp 123-130.
- [2] M. Quirynen, M. de Soete, M. Pauwels, K. Goossens, W. Teughels, J. van Eldere, D. van Steenberghe (2001) Bacterial survival rate on tooth- and interdental brushes in relation to the use of toothpaste. *Journal Of Clinical Periodontology*, 28; 12 pp 1106-1114.
- [3] Glass RT, Lare MM. Toothbrush contamination: a potential health risk? *Quintessence Int.* 1986 Jan;17(1):39-42.
- [4] Kreifeldt JG, Hill PH, Calisti LJ. A systematic study of the plaque removal efficiency of worn toothbrushes. *J Dent Res.* 1980 Dec;59(12):2047-55.
- [5] Conforti NJ, Cordero RE, Liebman J, Bowman JP, Putt MS, Kuebler DS, Davidson KR, Cugini M, Warren PR. An investigation into the effect of three months' clinical wear on toothbrush efficacy: results from two independent studies. *J Clin Dent.* 2003;14(2):29-33.
- [6] Warren PR, Jacobs D, Low MA, Chater BV, King DW. A clinical investigation into the effect of toothbrush wear on efficacy. *J Clin Dent.* 2002;13(3):119-24.
- [7] E. Yourassowsky, M. P. Van der Linden, Y. Pardaens, F. Crokaert, Y. Glupczynski Selection and Counting of Aerobic Gram-Negative Bacilli in Saliva by the Spiral System *Eur. J. Clin. Microbiol.*, December. 1987, p. 634-636.
- [8] Statement on Toothbrush Care: Cleaning, Storage and Replacement American Dental Association - Council on Scientific Affairs, November 2005 (<http://www.ada.org/1887.aspx>)
- [9] <http://www.ivorenkruis.nl/index.cfm?t=keyword.cfm&folder=15>
- [10] R.R. Beumer, M. C. te Giffel, E. Spoorenberg, F. M. Rombouts *Listeria* species in domestic environments *Epidemiol. Infect.* (1996), 117, 437-442

## 7 Bijlage 1 – Resultaten plaattellingen

Datum	19/01/10	16/02/10		18/05/10		
Nummer	Gebruiks duur	Aeroob koloniegetal	Anaeroob koloniegetal	Aeroob koloniegetal	Aeroob koloniegetal	Anaeroob koloniegetal
		TSA (KVE)	SAA (KVE)	TSA (KVE)	TSA (KVE)	SAA (KVE)
1	ca. 3-4 maanden	2.70E+05	1.04E+05	3.90E+05	N.A.	N.A.
2	ca. 3-4 maanden	5.04E+07	2.00E+07	2.20E+06	N.A.	N.A.
3	>3 maanden	6.10E+05	4.10E+05	2.60E+05	N.A.	N.A.
4	ca. 3-4 maanden	3.50E+06	4.60E+06	7.00E+03	<1E+03	<1E+03
5	ca. 4 maanden	1.80E+06	2.80E+06	1.90E+06	3.4E+05	1.20E+05
6	1,5 maand	1.20E+07	6.00E+03	5.00E+03	1.90E+06	5.20E+04
7	2 maanden	1.90E+05	2.90E+04	N.A.	N.A.	N.A.
8	>3 maanden	3.20E+06	5.10E+06	<1E+03	N.A.	N.A.
9	>3 maanden	6.00E+03	<1E+03	N.A.	4.40E+04	3.01E+05
10	1 maand	2.30E+04	1.60E+04	2.10E+04	2.70E+04	2.70E+06
11	3 weken	6.40E+06	1.21E+05	6.80E+05	4.40E+06	<1E+03
12	>3 maanden	<1E+03	<1E+03	N.A.	2.80E+04	2.00E+05
13	3 maanden	5.76E+07	2.30E+06	4.00E+03	1.30E+06	6.30E+05
14	1 maand	9.00E+03	7.00E+04	2.60E+05	4.00E+04	6.50E+04
15	3 weken	9.00E+04	1.40E+04	2.90E+04	1.56E+08	<1E+03
16	3-6 maanden	<1E+03	<1E+03	1.90E+05	3.60E+04	4.00E+03
17	>4 maanden	2.24E+07	4.30E+04	1.60E+05	1.90E+05	5.10E+04
18	>4 maanden	2.30E+06	2.20E+05	8.90E+04	6.60E+04	9.10E+07
19	>3 maanden	1.63E+07	2.16E+07	N.A.	N.A.	N.A.
20	>3 maanden	7.60E+07	3.28E+07	1.90E+06	4.80E+06	2.80E+06
21	>6 maanden	9.10E+06	2.70E+06	3.10E+04	N.A.	N.A.
22	?	3.70E+06	2.20E+05	5.40E+06	3.40E+05	1.29E+06
23	ca. 4 maanden	2.80E+05	1.70E+04	3.30E+04	4.00E+03	2.00E+05
24	>3 maanden	1.70E+06	6.60E+05	5.30E+04	4.80E+05	1.70E+05
25	3-6 maanden	5.40E+05	9.20E+05	1.40E+06	4.00E+04	1.60E+04
26	>3 maanden	7.10E+04	2.90E+04	3.00E+03	<1E+03	<1E+03
27	1 maand	<1E+03	3.00E+03	9.00E+03	5.60E+05	5.60E+05
28	ca. 3 maanden	4.90E+04	2.16E+05	4.00E+03	7.10E+06	1.70E+06
29	?	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
30	ca. 2-3 maanden	7.00E+03	3.00E+03	6.20E+04	<1E+03	<1E+03
31	<3 maanden	7.20E+04	1.70E+05	<1E+03	3.80E+04	4.00E+04
32	>3 maanden	6.40E+05	2.10E+06	1.02E+05	N.A.	N.A.
33	3 maanden	3.70E+06	4.40E+04	N.A.	N.A.	N.A.
34	ca. 3 maanden	1.00E+05	6.50E+04	<1E+03	6.00E+03	1.60E+04
35	>3 maanden	8.40E+06	<1E+03	1.50E+05	9.00E+03	3.20E+04
36	3 maanden	1.10E+05	2.00E+03	3.00E+03	1.00E+04	1.20E+04
37	3 maanden	8.00E+03	<1E+03	<1E+03	<1E+03	<1E+03
38	>3 maanden	3.30E+06	3.30E+05	4.20E+04	2.00E+07	1.90E+07

Tabel – Resultaten anaërobe en aërobe telling van microorganismen aanwezig op de tandenborstels.

## 8 Bijlage 2 – resultaten kwantitatieve PCR

		Cells/toothbrush					
#	gebruiksduur	T=0		T= 1 maand		T= 3 maand	
		<i>E.coli</i>	<i>S.mitis</i>	<i>E.coli</i>	<i>S.mitis</i>	<i>E.coli</i>	<i>S.mitis</i>
1	3-4 maanden	<3.9E+03	5.7E+05	<3.9E+03	1.1E+05		
2	3-4 maanden	<3.9E+03	8.3E+04	4.3E+03	6.9E+04		
3	>3 maanden	<3.9E+03	1.9E+06	4.9E+03	1.5E+06		
4	3-4 maanden	<3.9E+03	4.4E+05	<3.9E+03	2.1E+04	<3.9E+03	5.2E+02
5	ca. 4 maanden	<3.9E+03	9.3E+04	<3.9E+03	1.8E+05	<3.9E+03	4.3E+03
6	1,5 maand	<3.9E+03	2.0E+00	6.4E+03	3.8E+02	<3.9E+03	1.7E+03
7	2 maanden	<3.9E+03	5.3E+07				
8	3 maanden	<3.9E+03	3.7E+04	<3.9E+03	2.1E+05		
9	> 3 maanden	<3.9E+03	1.3E+05			<3.9E+03	1.1E+05
10	1 maand	<3.9E+03	6.3E+05	<3.9E+03	4.0E+05	<3.9E+03	2.2E+05
11	3 weken	<3.9E+03	8.2E+05	<3.9E+03	3.4E+05	<3.9E+03	5.4E+04
12	> 3 maanden	<3.9E+03	1.4E+05			<3.9E+03	4.7E+04
13	3 maanden	<3.9E+03	1.5E+04	<3.9E+03	4.3E+02	<3.9E+03	2.6E+06
14	1 maand	<3.9E+03	2.9E+06	<3.9E+03	1.6E+06	<3.9E+03	1.9E+06
15	3 weken	<3.9E+03	3.4E+05	<3.9E+03	6.7E+04	<3.9E+03	3.4E+05
16	3-6 maanden	<3.9E+03	5.7E+03	<3.9E+03	2.5E+05	6.2E+03	2.8E+03
17	> 4 maanden	<3.9E+03	1.6E+04	<3.9E+03	1.1E+06	<3.9E+03	1.1E+05
18	> 4 maanden	<3.9E+03	5.1E+05	<3.9E+03	2.1E+05	<3.9E+03	8.1E+03
19	> 3 maanden	5.6E+07	4.4E+05				
20	> 3 maanden	7.8E+05	2.8E+05	<3.9E+03	1.7E+03	<3.9E+03	1.8E+07
21	> 6 maanden	<3.9E+03	7.4E+03	<3.9E+03	2.4E+04		
22	?	<3.9E+03	3.7E+07	<3.9E+03	3.8E+04	<3.9E+03	3.9E+05
23	4 maanden	<3.9E+03	4.9E+05	<3.9E+03	6.7E+04	<3.9E+03	1.7E+05
24	> 3 maanden	<3.9E+03	4.9E+04	<3.9E+03	2.3E+04	<3.9E+03	5.5E+04
25	3-6 maanden	<3.9E+03	4.1E+05	<3.9E+03	1.7E+03	<3.9E+03	3.6E+03
26	> 3 maanden	1.0E+04	3.3E+06	<3.9E+03	1.0E+04	<3.9E+03	6.0E+03
27	1 maand	7.9E+03	1.6E+07	<3.9E+03	2.8E+05	<3.9E+03	1.3E+06
28	3 maanden	3.7E+04	6.5E+05	<3.9E+03	2.1E+05	4.9E+03	2.1E+06
30	ca 2-3 maanden	5.4E+03	2.4E+03	<3.9E+03	6.1E+02	<3.9E+03	6.0E+03
31	<3 maanden	6.8E+03	4.3E+03	<3.9E+03	1.4E+03	<3.9E+03	3.7E+03
32	>3 maanden	4.9E+05	1.3E+06	<3.9E+03	4.0E+04		
33	3 maanden	6.2E+03	1.5E+05				
34	3 maanden	8.8E+03	1.1E+05	<3.9E+03	1.3E+04	<3.9E+03	1.4E+03
35	> 3 maanden	<3.9E+03	1.5E+05	<3.9E+03	2.4E+04	<3.9E+03	2.3E+05
36	3 maanden	3.9E+03	1.3E+03	<3.9E+03	3.0E+02	<3.9E+03	2.9E+02
37	3 maanden	<3.9E+03	8.3E+05	4.8E+03	5.6E+04	<3.9E+03	7.4E+04
38	> 3 maanden	<3.9E+03	1.0E+04	<3.9E+03	1.6E+03	3.9E+03	1.1E+06

Tabel: Resultaten van kwantitatieve PCR bepaling van aanwezigheid van *Streptococcus mitis* en *Eschericia coli* op de tandenborstel. De ondergrens van *E. coli* bepaling werd vast gesteld op 3.900 cellen per tandenborstel. Bepalingen onder deze waarde kunnen niet kwantitatief worden bepaald en zijn aangegeven in oranje.