

Molecular Identification of Bacterial Species Present on Toothbrushes

Ye Won Kwon and Si Young Lee*

Department of Microbiology and Immunology, College of Dentistry, Research Institute of Oral Science, Gangneung-Wonju National University, Gangneung, 210-702, Korea

(received November 19, 2014; revised December 8, 2014; accepted December 9, 2014)

Toothbrushes play an essential role in oral hygiene. However, they can be significant in microbial transmission and can increase the risk of infection, since they can serve as a reservoir for microorganisms in healthy, oral-diseased and medically ill adults. This study was conducted to evaluate toothbrush contamination in six toothbrushes donated from four people. Two participants each supplied two toothbrushes – one used in the bathroom and one used in the workplace. The other two people each donated two toothbrushes used in the workplace. Polymerase chain reaction was used to construct a 16S rRNA clone library. Sequences of cloned DNA were compared with those from the reference organisms provided by GenBank. A total 120 clones, representing 20 clones for each toothbrush, were analyzed. They are composed of six phylum, 46 genera and 79 species. The most dominant species were *Streptococcus oralis*, *Streptococcus parasanguinis* and *Haemophilus parainfluenzae*. *Enterobacter* and *Escherichia* were recovered from toothbrushes used domestically. Toothbrushes used in the workplace did not contain *Enterobacteria*.

Key words: toothbrush, bacteria, contamination

*Correspondence to: Si Young Lee, Department of Oral Microbiology, College of Dentistry, Research Institute of Oral Science, Gangneung-Wonju National University, Gangneung, 210-702, Korea.
Tel.: +82-33-640-2455, Fax: +82-33-642-6410,
E-mail: siyoung@gwnu.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

서론

칫솔은 구강위생에서 중요한 역할을 담당한다. 적절한 칫솔질이나 가글, 치실을 사용하는 것은 치태가 형성하는 것을 방해하고 제거한다. 몇 가지의 연구에서는 칫솔질로 구강치태를 제거한 후에 전체 세균의 양이 상당량 감소했다는 것을 증명하였다[1-3]. 건강한 성인의 칫솔은 사용 초기부터 오염이 발생하며 사용을 반복할수록 증가하는데 [4], 칫솔은 치아나, 환경, 손, 공기, 그리고 보관용기로부터 오염될 수 있다[5]. 오염된 미생물들이 칫솔에 반복적으로 부착되고, 축적되어 생존하게 되면 구강 내로 다시 전파될 가능성이 있다. 칫솔에 군집되어 있는 세균에 대한 연구가 다양하게 이루어졌으며 많은 연구가 칫솔에 존재하는 미생물의 종류와 수에 대해 보고하였다[5-10].

Malmberg 등은 4군데의 보육원에서 수집한 44개의 칫솔에 존재하는 미생물을 조사하였다[7]. 이들의 연구에서 *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus mitis*와 같은 *Streptococci*가 우점종으로 나타났고, *Haemophilus* 종들은 샘플의 82%에서 확인되었다. 혐기성 세균들은 평균 미생물군집의 1/3을 구성하고 있는 것으로 보고하였으며, 곰팡이도 샘플의 50%에서 발견되었다고 보고하였다[7]. Caudry 등은 건강한 사람의 칫솔 20개를 사용하여 미생물의 존재를 확인했으며, 칫솔을 vortex하여 준비한 현탁액에서 각 칫솔당 평균 4×10^3 CFU의 미생물을 발견하였다[5].

그러나 이러한 연구들은 대부분 전통적인 세균 배양방법을 이용한 연구들이었으며, 발견된 미생물들은 그람염색 양상, 배양, 생화학적 특성 등을 이용하여 동정되었다. 이런 미생물 동정법은 주요한 두 가지 문제점을 가진다.

첫 번째로, 이런 방법은 배양되지 않는 미생물 종의 연구에는 사용할 수 없기 때문에 칫솔에서 발견할 수 있는 세균의 종류에 한계가 있으며, 두 번째로, 미생물의 생화학적 특성은 때때로 지금까지 알려진 어떤 종이나 속의 특성과 맞지 않는 경우가 생길 수 있는 문제점이 있다.

본 연구에서는 이러한 한계를 극복하기 위해서 칫솔에 존재하는 세균의 16S ribosomal DNA를 cloning하여 library를 구축하고 염기서열을 분석해 칫솔에 존재하는 세균을 동정하고 서로 비교하였다.

재료 및 방법

연구재료

실험에 사용된 총 6개의 칫솔은 4명의 지원자로부터 수집되었다. 이 중 두 명의 남성에게서는 화장실에서 사용되는 칫솔을 각각 1개씩 수집하여 분석에 사용하였고 (Toothbrush A, B), 다른 두 명의 여성에게서는 화장실에서 사용되는 칫솔과(Toothbrush C, D), 사무실에서 사용되는 칫솔(Toothbrush E, F)을 수집하여 본 연구를 수행하였다.

세균의 수집

칫솔에 존재하는 세균의 수집을 위하여 10 ml의 멸균 증류수가 들어있는 멸균 시험관에 실험에 사용할 칫솔을 넣고 5분간 vortex하여 세균을 수집하였다.

세균 genomic DNA의 추출, 16S rRNA의 증폭 및 클로닝

세균을 채취한 현탁액 중 1 ml을 사용하여 13,000 xg로 1 분 동안 원심분리하고, 200 μ L의 멸균증류수로 현탁하여, 이를 AccuPrep Genomic DNA Extraction Kit(BIONEER, Deajeon, Korea)를 이용하여 제조회사의 지시에 따라 genomic DNA를 추출하였다. 16S rRNA 유전자를 증폭할 수 있는 universal PCR primer(27F; 5'-AGAGTT TGA TCM TGG CTC AG-3', 1492R; 5'-GGY TAC CTT GTT ACG ACT T-3')와 Accupower HotStart PCR Premix(BIONEER)를 이용하여 GeneAmp PCR System 9700(PerkinElmer; Waltham, MA, USA)에서 16S rRNA 유전자를 증폭하였다. 이때 PCR 조건은 다음과 같이 시행하였다. 0.1 μ M forward 및 reverse primer와 100 pg의 세균 genomic DNA를 넣고 증류수를 첨가하여 최종 용량 20 μ L이 되도록 한 후, 94°C에서 2분간 처리한 다음 94°C에서 30초간 denaturation, 55°C에서 30초간 annealing, 72°C에서 1분간 extension(34 cycle)하였다. 최종 반응물을

1% agarose gel에 전기영동 하였고, AccuPrep Gel Purification Kit(BIONEER)를 이용하여 제조회사의 지시대로 정제하였다. 젤에서 정제된 16S rDNA를 TOPO TA Cloning Kit(Invitrogen, USA)를 사용하여 제조회사의 지시에 따라 클로닝하고, One Shot TOP10 Chemically Competent Cells(Invitrogen, Carlsbad, USA)를 이용하여 형질전환 시켰다. 클로닝한 재조합 plasmid를 지닌 *Escherichia coli*(TOP10)는 ampicillin이 들어있는 LB agar plate(Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD, USA)에서 배양하고 칫솔 샘플 한 개 당 20개의 콜로니를 무작위로 선택하였다.

염기서열의 결정 및 세균동정

선택한 콜로니를 3 ml LB broth에서 배양 한 다음 AccuPrep Plasmid Nano-Plus Plasmid Mini Extracion Kit(BIONEER)를 이용하여 제조회사의 지시대로 plasmid를 추출하였다. 추출한 plasmid DNA는 제한효소인 EcoR1(BIONEER)을 처리한 후 전기영동으로 insert DNA를 확인한 뒤에 마크로젠(Seoul, Korea)에 의뢰하여 최소 350 bp 이상의 염기서열을 얻었다. 분석한 16S rDNA 핵산염기서열을 GenBank(<http://www.ezbiocloud.net>)의 데이터 베이스를 통하여 상동성 검색을 하고, 98% 이상 상동성을 보이는 세균 종들 중에서 검색된 비율이 가장 높은 종을 해당 세균 종으로 결정하였다.

결과

칫솔 샘플 6개에서 각 칫솔 당 20개의 클론을 얻어 총 120개의 클론을 분석하였다(Table 1). 각 클론의 핵산 염기서열을 결정된 뒤 세균을 동정한 결과 총 6개의 문(phylum), 46개의 속(genus), 79개의 종(species)이 검출되었다. 그 중 *Streptococcus* (28%)가 가장 많이 검출되었으며, *Pseudomonas* (13%), *Enterobacter* (7%)가 그 뒤를 이었다(Fig. 1). 종으로 봤을 때는 *Streptococcus oralis* (4.2%), *Streptococcus parasanguinis* (4.2%), *Haemophilus parainfluenzae* (4.2%)로 세 가지 미생물이 같은 비율로 가장 많이 발견되었다. 이 세가지 종 중 *S. oralis*와 *S. parasanguinis*는 구강세균이며, *H. parainfluenzae*는 토양에서 발견되는 환경상재균이다. 화장실에서 사용된 칫솔에서는 *Citrobacter sedlakii*, *Citrobacter youngae*, *Enterobacter gergoviae*, *Enterobacter kobei*, *Perluclidibaca piscinae*, *Serratia quinivorans*, *Shigella flexneri*와 같은 장내세균이 발견되었으나, 사무실에서 사용된 칫솔에서는 이러한 장내세균이 발견되지 않았다. 각각의 칫솔 오염

Table 1. Summary of isolated clones derived from toothbrushes

Phylum Genus	Species	Toothbrushes						Total	%
		Bathroom				Office			
		A	B	C	D	E	F		
Actinobacteria									
<i>Arthrobacter</i>	<i>Arthrobacter aureus</i>		1					1	0.8
<i>Cellulomonas</i>	<i>Cellulomonas massiliensis</i>	1						1	0.8
<i>Rhodococcus</i>	<i>Rhodococcus pyridimivorans</i>						1	1	0.8
	<i>Rothia aerea</i>		1					1	0.8
<i>Rothia</i>	<i>Rothia dentocariosa</i>	1						1	0.8
	<i>Rothia mucilaginoso</i>					1		1	0.8
Bacteroidetes									
<i>Capnocytophaga</i>	<i>Capnocytophaga sputigena</i>						1	1	0.8
<i>Prevotella</i>	<i>Prevotella dentalis</i>				1			1	0.8
	<i>Prevotella melaninogenica</i>		1		1			2	1.7
Cyanobacteria									
<i>Raphidiopsis</i>	<i>Raphidiopsis brookii</i>						1	1	0.8
Firmicutes									
<i>Anaerovibrio</i>	<i>Anaerovibrio lipolyticus</i>		1					1	0.8
<i>Catonella</i>	<i>Catonella morbi</i>					1		1	0.8
<i>Granulicatella</i>	<i>Granulicatella adiacens</i>		1				1	2	1.7
<i>Lachnobacterium</i>	<i>Lachnobacterium bovis</i>		1					1	0.8
<i>Lactobacillus</i>	<i>Lactobacillus nantensis</i>			1				1	0.8
<i>Sporomusa</i>	<i>Sporomusa ovata</i>		1					1	0.8
<i>Moryella</i>	<i>Stomatobaculum longum</i>					1		1	0.8
<i>Streptococcus</i>	<i>Streptococcus australis</i>	1	1					2	1.7
	<i>Streptococcus fryi</i>	1				1	1	3	2.5
	<i>Streptococcus gallolyticus subsp.</i>	2						2	1.7
	<i>Streptococcus hyovaginalis</i>	1						1	0.8
	<i>Streptococcus infantis</i>	1			1	1		3	2.5
	<i>Streptococcus minor</i>					1		1	0.8
	<i>Streptococcus mitis</i>						2	2	1.7
	<i>Streptococcus mutans</i>		1					1	0.8
	<i>Streptococcus oralis</i>	4				1		5	4.2
	<i>Streptococcus parasanguinis</i>				1	2	2	5	4.2
	<i>Streptococcus porcinus</i>					1		1	0.8
	<i>Streptococcus pseudopneumoniae</i>		2					2	1.7
	<i>Streptococcus salivarius subsp. salivarius</i>			1			1	2	1.7
	<i>Streptococcus sanguinis</i>	1	1					2	1.7
	<i>Streptococcus vestibularis</i>						1	1	0.8
	<i>Streptococcus vestibularis</i>						1	1	0.8
<i>Veillonella</i>	<i>Veillonella dispar</i>		1					1	0.8
	<i>Veillonella rogosae</i>					1		1	0.8
<i>Vibrio</i>	<i>vibrio maritimus</i>				1			1	0.8
<i>Xenorhabdus</i>	<i>Xenorhabdus poinarii</i>						1	1	0.8
Fusobacteria									
<i>Sebaldella</i>	<i>Sebaldella termitidis</i>	1						1	0.8

균의 종류를 조사한 결과(Fig. 2) 칫솔의 미생물구성은 대부분 비슷하지만 장내세균의 대부분이 화장실에서 사용한 여성의 칫솔에 존재하는 것을 보여주었다.

또한, 구강 세균 중 치주질환과 관련된 세균인 *Capnocytophaga sputigena*, *Prevotella melaninogenica*, *Catonella morbi*가 발

견되었으며, 구강세균의 일종인 *Rothia dentocariosa*, *Lactobacillus nantensis*도 발견되었다. 칫솔에서 발견된 병원성 미생물의 종류를 살펴보면, 일반적으로 건강한 사람에게서 병독성을 나타내지 않지만 면역력이 떨어지는 사람에게 병을 일으키는 기회병원균인 *Pseudomonas aeruginosa*

Table 1. (Continued)

Phylum	Genus	Species	Toothbrushes						Total	%
			Bathroom				Office			
			A	B	C	D	E	F		
Proteobacteria										
	<i>Alkalimonas</i>	<i>Alkalimonas amylolytica</i>					1		1	0.8
	<i>Alkanindiges</i>	<i>Alkanindiges ilinoisensis</i>					1		1	0.8
	<i>Azomonas</i>	<i>Azomonas insignis</i>					1		1	0.8
	<i>Citrobacter</i>	<i>Citrobacter sedlakii</i>					2		2	1.7
		<i>Citrobacter youngae</i>			1				1	0.8
		<i>Enterobacter cloacae</i>					2		2	1.7
	<i>Enterobacter</i>	<i>Enterobacter gergoviae</i>			1	1			2	1.7
		<i>Enterobacter kobei</i>				1			1	0.8
		<i>Enterobacter mori</i>				3			3	2.5
	<i>Escherichia</i>	<i>Shigella flexneri</i>			1				1	0.8
	<i>Haemophilus</i>	<i>Haemophilus parainfluenzae</i>				1	2	2	5	4.2
	<i>Janthinobacterium</i>	<i>Janthinobacterium svalbardensis</i>					1		1	0.8
	<i>Klebsiella</i>	<i>Klebsiella michiganensis</i>				1			1	0.8
	<i>Kluyvera</i>	<i>Kluyvera georgiana</i>	1	1					2	1.7
	<i>Lysobacter</i>	<i>Lysobacter xinjiangensis</i>			1				1	0.8
		<i>Neisseria oralis</i>			1				1	0.8
	<i>Neisseria</i>	<i>Neisseria perflava</i>						2	2	1.7
		<i>Neisseria subflava</i>			1			2	3	2.5
	<i>Pandoraea</i>	<i>Pandoraea thiooxydans</i>	1						1	0.8
	<i>Pantoea</i>	<i>Pantoea ananatis</i>			1	1			2	1.7
		<i>Pantoea anthophila</i>				1			1	0.8
	<i>Perluclidibaca</i>	<i>Perluclidibaca piscinae</i>				1			1	0.8
		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>			1				1	0.8
		<i>Pseudomonas asturiensis</i>					2		2	1.7
		<i>Pseudomonas batumici</i>					2		2	1.7
		<i>Pseudomonas beteli</i>			2				2	1.7
	<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas cichorii</i>			1				1	0.8
		<i>Pseudomonas fluorescens</i>	1					1	2	1.7
		<i>Pseudomonas oleovorans subsp.</i>	1						1	0.8
		<i>Pseudomonas pachasterllae</i>			1				1	0.8
		<i>Pseudomonas psychrotolerans</i>	1						1	0.8
		<i>Pseudomonas taiwanensis</i>				3			3	2.5
	<i>Raoultella</i>	<i>Raoultella ornithinolytica</i>			1				1	0.8
	<i>Salinivibrio</i>	<i>Salinivibrio proteolyticus</i>				1			1	0.8
	<i>Salmonella enterica</i>	<i>Salmonella enterica subsp.</i>	1						1	0.8
		<i>Serratia entomophila</i>					1		1	0.8
	<i>Serratia</i>	<i>Serratia marcescens subsp.</i>			1				1	0.8
		<i>Serratia nematodiphila</i>			1				1	0.8
		<i>Serratia quinivorans</i>			1				1	0.8
	<i>Shimwellia</i>	<i>Shimwellia blattea</i>				1			1	0.8
	<i>Tatumella</i>	<i>Tatumella punctata</i>			2				2	1.7
Total			20	20	20	20	20	20	120	100

와 *Tatumella punctata*가 발견되었으며, 폐렴의 원인균인 *Streptococcus pseudopneumoniae*와, 호흡기나 비노기에서 질병을 일으킬 수 있는 *Serratia nematodiphila*, 수막염의 원인이 되어 폐혈증을 일으킬 수 있는 *Neisseria perflava* 등도 분리되었다.

고찰

칫솔은 사용초기부터 오염이 발생하며, 사용이 반복될수록 증가한다[11]. 심지어는 칫솔모의 80%가 사용 전

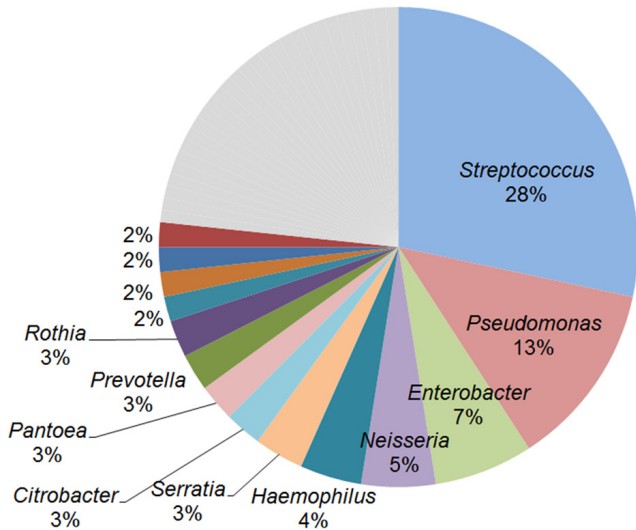


Fig. 1. Ratio of detected bacterial genus from toothbrushes.

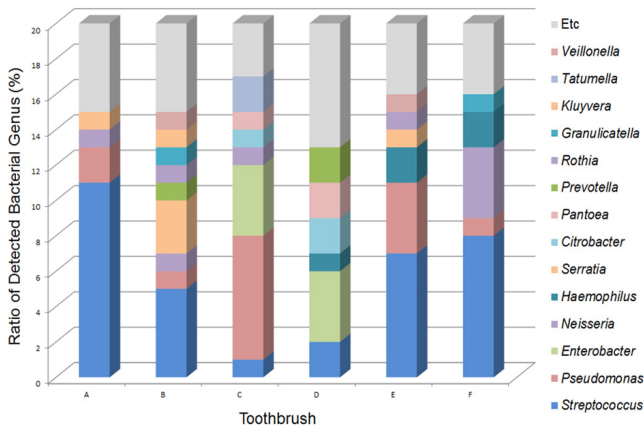


Fig. 2. Ratio of detected bacterial genus from each toothbrush.

부터 오염되어있는 것으로 알려져 있다[12]. 칫솔모에서 획득한 세균의 수는 칫솔마다 매우 다양하게 나타나는 것으로 보고되고 있으며, 이것은 *in vitro* 실험을 통해, 칫솔을 현탁액에 vortex하여 분석했을 때, 칫솔 하나 당 평균 10^4 에서 10^8 CFU/ml에 달하는 것으로 보고되고 있다[5,7,9,10].

칫솔의 오염에 관한 다른 연구들을 살펴보면, Glass와 Lare은 환자들이 사용한 칫솔을 분석하였고, 이 칫솔들이 서로 다른 구강 질병들과 연관된 다양한 미생물로 오염되어 있다는 사실을 밝혀냈다[11]. 또한 Malmberg는 아이들의 낫은 칫솔을 치약 없이 사용하게 한 뒤, 2시간 후에 조사한 결과, 칫솔에서는 호기성 미생물들이 주로 서식하였으나 staphylococci, fungi, pseudomonas와 같은 미생물들 또한 발견되었다[7]. 치주병원균 또한 칫솔에 오염되어있는 것이 발견되었다. Muller는 치주질환을 앓고 있는 청소년의 칫솔로부터 *A. actinomycetemcomitans*

를 발견하였는데 이것은 사용한 지 24시간이 지난 후에도 발견되었다[8].

이렇게, 칫솔의 미생물 오염에 대한 연구는 이전에도 수행되었지만 이러한 연구 대부분이 일반배양법에 의존한 반 정량적인 방법이었기 때문에 오염된 칫솔의 위험성이 과소평가 될 수 있는 한계가 있었다. 본 연구는 고전적인 세균 배양 분리 방법이 가지는 한계를 극복하고자 분자생물학적인 실험기법을 이용하여 수행하였다.

본 연구에서는 칫솔에서 분리된 대부분의 세균이 병원성이 낮은 환경상재균과, 칫솔을 사용한 사람의 구강에서 유래한 구강미생물로 구성되어 있기 때문에 칫솔이 환자에게 직접적으로 감염을 일으키는 것으로 단정 짓기는 어려울 것으로 생각된다. 그러나 반복적으로 오염이 되어 있는 칫솔의 사용은 사용자에게 이들 오염 세균을 반복적으로 노출시킴으로써 감염의 가능성을 증가시킬 것이다. 또한, 건강한 일반인에게는 직접적으로 감염을 일으키지 않지만 면역력이 약한 노인이나 아이들, 환자들에게는 치명적일 수 있는 병원성 세균들도 발견되었다. 칫솔이 세균으로 오염되는 것은 틀림없는 사실이며, 세균이 구강의 한 장소에서 다른 장소로 전이가 가능할 수 있다. 그렇기 때문에 칫솔에 존재하는 미생물을 감소시키려는 노력이 계속되어야 할 것으로 생각된다.

우리의 연구에서는 대부분의 다른 연구결과와 마찬가지로 환경상재균인 *Pseudomonas*속과 *H. parainfluenzae*와 구강세균인 *S. oralis*, *S. parasanguinis*가 가장 많이 발견되었다. 이것은 칫솔을 오염시키는 세균의 대부분이 환경상재균과 구강세균으로 구성된다는 것을 증명한다. 그러나 다른 연구들은 미생물을 선택배지에 배양하여 분리하는 방법을 사용했기 때문에 특정 선택배지에서 자라지 않은 세균은 검출할 수 없었다. 그렇기 때문에 발견될 것이라고 예측 가능한 미생물만을 검출할 수 밖에 없었다. 그러나 우리는 세균의 16S rRNA를 이용한 분자생물학적인 실험기법을 이용하여 조사하였기 때문에 *C. sedlakii*, *C. youngae*, *E. gergoviae*, *E. kobei*, *P. piscinae*, *S. quinivorans*, *S. flexneri*와 같은 다양한 장내세균과 *P. aeruginosa*, *T. punctate*, *S. pseudopneumoniae*, *S. nematodiphila*, *N. perflava*와 같은 병원성 세균도 발견할 수 있었다.

칫솔의 오염에 영향을 미치는 요인들에 대해서는 칫솔의 형태, 치약, 칫솔의 보관 상태, 향미생 물질을 포함하고 있는 칫솔모의 사용이 영향을 미친다는 것이 이미 알려져 있으며, 이 외에도 칫솔질의 빈도, 칫솔의 사용 기간, 칫솔을 행구는 방법과 같은 여러 가지 요인들이 미생물총의 질과 양에 영향을 미칠 수 있을 것이기 때문에 이러한 요인을 조절하여 칫솔의 오염을 감소시킬 수 있을 것이라고 생각된다. 우리의 연구에서는 분자생

물리적인 실험기법으로는 실험된 적이 없었던, 칫솔의 보관장소에 따른 오염정도의 차이를 조사하였다. 두 보관장소에 있던 칫솔 모두 거의 병독성이 낮은 환경상재균과 구강세균으로 오염되어 있었지만 칫솔에서 분리된 모든 장내세균들은 화장실에서 사용한 칫솔에서만 분리되었다.

결론적으로, 본 연구에서는 사용하고 있는 칫솔이 높은 오염에 노출되어 있다는 것을 입증했을 뿐 아니라, 구강질환 및 여러 가지 다른 질병들과 연관되어 있는 감염성 병원균에 오염되어 있다는 것을 보여주고 있다. 또한 화장실에 보관되어 있던 칫솔에서만 장내세균이 분리된 것으로 보아, 칫솔의 보관장소가 칫솔을 오염시키는 세균의 종류에 영향을 미친다는 것을 보여준다. 이러한 장내세균은 변기나, 공기 중에 떠다니던 세균이 칫솔에 부착한 것으로 추측된다. 그러나 장내세균 대부분이 여성의 칫솔에서만 분리된 이유는 명확하지 않다.

본 연구는 칫솔의 오염되어 있는 세균을 16S rRNA clone library를 구축하는 분자생물학적인 방법으로 분석한 첫 번째 연구이지만, 연구에 사용된 칫솔의 수가 적은 점, 염기서열 분석에 사용한 클론이 한 칫솔 샘플 당 20개로 제한되는 한계를 가지고 있다. 이러한 한계를 극복하기 위하여 차후에 차세대 sequencing 기법인 pyrosequencing법을 이용한 연구가 진행된다면 보다 더 광범위하고 정확한 결과를 얻을 수 있을 것으로 생각된다.

이 시점에서, 구강위생을 유지시키고 향상시키는 칫솔의 긍정적인 역할에 대해서는 반론의 여지가 없다. 이러한 사실은 여러 연구에서도 찾아볼 수 있다[13,14]. 이렇게 구강위생을 유지시키는 칫솔질에 중요성에 대해서는 잘 알고 있지만, 칫솔의 오염으로 인한 병원균 전이의 위험성이 존재하기 때문에 칫솔의 오염을 감소시킬 수 있는 방법과 일정수준의 위생기준을 마련하기 위해서는 아직도 많은 논의와 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

감사의 글

실험 데이터 분석에 도움을 준 안현영에게 감사합니다.

Conflict of interest

The authors declare that they have no competing interest.

References

1. Ho HP, Niederman R. Effectiveness of the sonicare sonic toothbrush on reduction of plaque, gingivitis, probing pocket depth and subgingival bacteria in adolescent orthodontic patients. *J Clin Dent.* 1997;8:15-19.
2. Rosema NA, Timmerman MF, Versteeg PA, van Palenstein Helderma WH, Van der Velden U, Van der Weijden GA. Comparison of the use of different modes of mechanical oral hygiene in prevention of plaque and gingivitis. *J Periodontol.* 2008;79:1386-1394.
3. Creeth JE, Gallagher A, Sowinski J, Bowman J, Barrett K, Lowe S, Patel K, Bosma ML. The effect of brushing time and dentifrice on dental plaque removal in vivo. *J Dent Hyg.* 2009;83:111-116.
4. Bonten MJ, Hayden MK, Nathan C, van Voorhis J, Matushek M, Slaughter S, Rice T, Weinstein RA. Epidemiology of colonisation of patients and environment with vancomycin-resistant enterococci. *Lancet.* 1996;348:1615-16159.
5. Caudry SD, Klitorinos A, Chan EC. Contaminated toothbrushes and their disinfection. *J Can Dent Assoc.* 1995;61:511-516.
6. Glass RT, Jensen HG. More on the contaminated toothbrush: The viral story. *Quintessence Int.* 1988;19:713-716.
7. Malmberg E, Birkhed D, Norvenius G, Noren JG, Dahlen G. Microorganisms on toothbrushes at day-care centers. *Acta Odontol Scand.* 1994;52:93-98.
8. Muller HP, Lange DE, Muller RF. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* contamination of toothbrushes from patients harbouring the organism. *J Clin Periodontol.* 1989;16:388-390.
9. Taji SS, Rogers AH. ADRF trebitsch scholarship. the microbial contamination of toothbrushes. A pilot study. *Aust Dent J.* 1998;43:128-130.
10. Verran J, Leahy-Gilmartin AA. Investigations into the microbial contamination of toothbrushes. *Microbios.* 1996;85:231-238.
11. Glass RT, Lare MM. Toothbrush contamination: A potential health risk? *Quintessence Int.* 1986;17:39-42.
12. Glass RT. The infected toothbrush, the infected denture, and transmission of disease: A review. *Compendium.* 1992;13:592, 594, 596-598.
13. Dahlen G, Lindhe J, Sato K, Hanamura H, Okamoto H. The effect of supragingival plaque control on the subgingival microbiota in subjects with periodontal disease. *J Clin Periodontol.* 1992;19:802-809.
14. Axelsson P, Lindhe J, Nystrom B. On the prevention of caries and periodontal disease. results of a 15-year longitudinal study in adults. *J Clin Periodontol.* 1991; 18:182-189.