

치과대학 임상 시뮬레이션 실습실 치과용 유니트 수계의 세균 오염도 조사

윤혜영 · 이시영[†]

강릉원주대학교 치과대학 구강미생물학교실 및 구강과학연구소

Bacterial Contamination of Dental Unit Water Systems in a Student Clinical Simulation Laboratory of College of Dentistry

Hye Young Yoon and Si Young Lee[†]

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

The water supplied from dental unit water systems (DUWS) in dentistry may be heavily contaminated with bacteria and thus may be a potential source of infection for both practice staff and patients. The aim of this study was to evaluate the level of heterotrophic bacteria and to confirm the presence of opportunistic pathogens from DUWS in student clinical simulation laboratory of college of dentistry. Water samples were collected from 36 ultrasonic scalers in student clinical simulation laboratory. The levels of heterotrophic bacteria in water samples were quantified by counting colony forming units (CFUs) on R2A agar media. In addition, opportunistic pathogens were detected by using the polymerase chain reaction (PCR) method. The mean CFUs were 16,095 CFU/ml for water samples and all of water samples exceeded current American Dental Association recommendations of 200 CFU/ml. *Pseudomonas* species and non-tuberculous *Mycobacterium* species were detected in the one sample and two samples, respectively, among the 36 water samples by the PCR with specific primers for these bacteria. Our study indicated that DUWS in student clinical simulation laboratory can cause potential infection in students and participants. This study suggested the dental unit water line management and wearing personal protective equipment in student clinical simulation laboratory will be needed to reduce bacterial contamination.

Key Words: Biofilms, Dental infection control, Polymerase chain reaction, Water microbiology, Water quality

서론

치과용 유니트 수계(dental unit water system, DUWS)에서는 수관(waterline)을 통하여 치과용 유니트(dental chair unit, DCU)와 연결된 고속 핸드피스, 초음파 치석제거기, air-water syringe 등에 물을 분배한다. DUWS의 물은 구강 소독 후 세척, 치석제거, 그리고 치아 절삭 등 치과치료 중 다양한 용도로 사용된다. 치과치료 과정에서 DUWS 물은 환자의 구강에 접촉되기 때문에 음용수와 같은 수준으로 깨끗

하여야만 한다. 미국질병관리본부(Center for Disease Control)에서는 치과치료에 사용하는 물의 종속영양세균(heterotrophic bacteria)수를 음용수와 같은 기준인 500 colony forming unit (세균 집락 형성 단위, CFU)/ml 이하로 유지해야 함을 강조하고 있으며¹⁾, 미국치과의사협회(American Dental Association, ADA)는 200 CFU/ml 이하로 가능한 낮춰야 한다고 권고하고 있다²⁾. 국내에서는 치과치료를 위해 사용하는 물을 대상으로 종속영양세균 수의 기준을 정하지는 않았지만, 환경부에서 음용수의 일반 세균 수가 100

Received: March 6, 2015, Revised: March 31, 2015, Accepted: March 31, 2015

ISSN 1598-4478 (Print) / ISSN 2233-7679 (Online)

[†]Correspondence to: Si Young Lee

Department of Oral Microbiology, College of Dentistry, Research Institute of Oral Science, Gangneung-Wonju National University, 7 Jukheon-gil, Gangneung 210-702, Korea
Tel: +82-33-640-2455, Fax: +82-33-642-6410, E-mail: siyoung@gwnu.ac.kr

Copyright © 2015 by the Korean Society of Dental Hygiene Science

© 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.

CFU/ml를 넘지 않을 것을 제시하고 있다. 하지만 이전의 많은 연구 결과를 보면 대부분의 치과에서 사용하는 DUWS 물이 권장하는 기준에 도달하지 못하는 것으로 밝혀졌다³⁻⁵⁾. Williams 등³⁾의 연구에서는 DUWS 물의 세균 오염도가 최대 1.2×10^6 CFU/ml, Walker 등⁶⁾의 연구에서는 최대 6.4×10^4 CFU/ml, 그리고 Epstein 등⁷⁾의 연구에서는 최대 4.6×10^5 CFU/ml까지 다양하게 나타났다. 국내에서 치과대학 병원의 DCU를 대상으로 진행된 Lee 등⁸⁾의 연구에서는 최대 3.7×10^4 CFU/ml의 세균 오염도를 보여주었고, 이 오염도 또한 국내 환경부에서 권장하는 음용수 기준에는 적합하지 않은 것을 확인할 수 있다.

오염된 DUWS의 물에는 주로 병원성이 낮은 종속영양세균이 포함되어 있지만, *Pseudomonas species*, *Legionella species*, 비결핵성 *Mycobacterium species*와 같은 기회감염성 병원균도 또한 분리된다고 보고되고 있다^{1,3,5,9-12)}. 기회감염성 병원균은 치과치료 중 오염된 물의 접촉이나 혹은 발생하는 에어로졸 흡입으로 감염될 수 있으며, 면역력이 저하된 환자와 노인에게는 특히 위험할 수 있다^{1,13,14)}. Martin¹⁴⁾의 연구에서 오염된 DUWS의 물을 통해 두 명의 암환자가 *Pseudomonas aeruginosa*에 감염된 사례가 보고된 바가 있고, Oppenheim 등¹⁵⁾과 Fotos 등¹⁶⁾의 연구에서는 비치과종사군 보다 치과종사군에서 *Legionella* 항체가 높고, 임상에서 노출된 시간이 증가할수록 *Legionella* 감염의 위험이 증가한다는 것을 보여주었다. 이러한 이유로 DUWS에서 공급되는 물은 치과종사자와 환자 모두에게 잠재적인 감염의 원인이 될 수 있다⁶⁾. DUWS의 미생물 오염은 학생들의 임상실습을 위해 사용되는 DCU에서도 일어날 수 있으며, 실습과정 중 물이나 에어로졸을 통해 학생들과 대상자들이 기회감염성 병원균에 노출될 가능성이 있다. 하지만 현재 임상실습을 위해 사용되는 DCU를 대상으로 세균 오염도를 조사한 연구를 국내나 국외에서 찾아볼 수 없다.

본 연구의 목적은 치과대학 학생들의 임상실습을 위해 사용되고 있는 시뮬레이션실의 DCU를 대상으로 DCU의 초음파치석제거기(ultrasonic scaler)에서 배출되는 물 속 종속영양세균의 수준을 평가하고 기회 감염성 병원균인 *Pseudomonas species*, *Legionella species*, 비결핵성 *Mycobacterium species*의 존재를 분자생물학적 방법을 사용하여 확인하는 것이다.

연구대상 및 방법

1. 시료채취

강릉원주대학교 치과대학 임상실습에 사용되는 시뮬레

이션실의 DCU 중 36개를 대상으로 하였다. 36개 DCU에서 초음파치석제거기의 한 달 사용빈도를 조사하여, 1) 한 달 동안 1번도 사용하지 않은 DCU, 2) 1번 이상 3번 미만으로 사용한 DCU, 3) 3번 이상 사용한 DCU로 분류하였다. 각 DCU의 초음파치석제거기에서 물 시료를 1 L씩 멸균된 유리병에 수집하였다¹⁷⁾. 수집 전 다른 세균오염요인을 차단하기 위해 물이 나오는 입구와 손잡이 부분을 70% 에탄올로 표면소독 해주었다¹⁸⁾. 잔류염소를 중화시키기 위해 채취한 각 시료에 10% sodium thiosulphate (Yakuri Pure Chemicals Co., Ltd, Kyoto, Japan) 용액을 1 ml씩 넣어주었다¹⁹⁾. 이렇게 채취한 시료는 바로 실험실로 옮겨졌다.

2. 세균배양

CFU/ml를 조사하기 위해 시료를 1:1, 1:100으로 희석하여 R2A agar 배지(Becton; Dickinson and Company, Sparks, MD, USA)에 각각 2장씩 spiral plater (IUL, S.A., Barcelona, Spain)를 사용하여 도말하였다. 도말한 R2A agar 배지를 24°C에서 7일 동안 배양 후 세균의 집락은 colony counter로 계수하였다²⁰⁾.

3. DNA 추출

기회병원성 세균의 존재 유무를 polymerase chain reaction (PCR) 방법을 이용하여 탐색하기 위하여 수집 시료에서 다음과 같은 방법으로 전체 세균을 수집하고 세균의 genomic DNA를 얻었다. 수집한 시료를 0.2 µm 여과지 (Millipore, Billerica, MA, USA)에 통과시켜 세균을 모은 후, 여과지를 0.15 mm 유리비드 7개와 1% phosphate-buffered saline 용액 10 ml가 담긴 멸균된 플라스틱튜브에 넣어서 강하게 와류시켰다¹⁷⁾. G-spin Genomic DNA Extraction Kit (Intron Biotechnology Inc., Seongnam, Korea)를 사용하여 제조사의 방법대로 시료에서 얻은 세균으로부터 genomic DNA를 추출하였다.

4. Polymerase chain reaction

PCR 반응은 HotStart PCR Premix (Bioneer, Daejeon, Korea)에 추출한 genomic DNA와 각 세균에 대한 forward/reverse primer를 각각 넣어 최종 20 µl를 만들어 준 후, 유전자 증폭기(GeneAMP PCR System 9700; Perkin Elmer, Waltham, MA, USA)를 사용하여 증폭시켰다. 모든 세균에 항상 존재하는 universal primer를 사용하여 추출한 genomic DNA 시료에서 세균이 제대로 분리되고 genomic DNA를 얻었는지를 확인하였고, 기회감염성 병원균인 *Pseudomonas species*, *P. aeruginosa*, *Legionella species*,

Legionella pneumophila, 및 비결핵성 *Mycobacterium* species의 검출을 위해 각 세균의 특이적 primer를 사용하였다(Table 1)²¹⁻²⁴. Table 1에 기록된 방법으로 DNA를 증폭한 후, PCR 산물을 1.5% agarose gel에 1시간 동안 전기영동하고 ethidium bromide로 염색 후 ultraviolet transilluminator (Corebio, Seoul, Korea)로 유전자 증폭유무를 확인하였다.

5. 통계처리

연구에 사용된 DCU에서 초음파치석제거기의 사용빈도

와 CFU/ml 사이를 통계적으로 분석하기 위해 통계프로그램인 IBM SPSS Statistics ver. 21.0 (IBM SPSS Inc., Armonk, NY, USA)를 사용하여 일원배치 분산분석(one-way ANOVA)으로 유의성을 확인한 후, 각 군별 간의 차이를 확인하기 위해 Scheffe의 사후검정을 실시하였다.

결 과

1. CFU/ml

연구에 사용된 DCU의 물 시료를 도말한 모든 R2A agar

Table 1. Primers and Polymerase Chain Reaction (PCR) Conditions

References	Target organism	Product size (bp)	Sequence (5'-3')	PCR condition
de Lillo et al. ²¹⁾	Universal	1,465	5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3' 5'-GGYTACCTTGTTACGACTT-3'	95°C 2 min, 34 cycle (94°C 30 sec, 55°C 30 sec, 72°C 1 min), 72°C 10 min
Spilker et al. ²²⁾	<i>Pseudomonas</i> species	618	5'-GACGGGTGAGTAATGCCTA-3' 5'-CACTGGTGTTCCTTCCTATA-3'	95°C 2 min, 25 cycle (94°C 20 sec, 54°C 20 sec, 72°C 40 sec), 72°C 10 min
Spilker et al. ²²⁾	<i>P. aeruginosa</i>	956	5'-GGGGGATCTTCGGACCTCA-3' 5'-TCCTTAGAGTGCCACCCG-3'	95°C 2 min, 25 cycle (94°C 20 sec, 58°C 20 sec, 72°C 40 sec), 72°C 10 min
Joly et al. ²³⁾	<i>Legionella</i> species	386	5'-AGGGTTGATAGGTTAAGAGC-3' 5'-CCAACAGCTAGTTGACATCG-3'	95°C 8 min, 45 cycle (95°C 10 sec, 57°C 10 sec, 72°C 15 sec), 72°C 10 min
Joly et al. ²³⁾	<i>L. pneumophila</i>	186	5'-GCATTGGTGCCGATTTGG-3' 5'-G[CT]TTTGCCATCAAATCTTTCTGAA-3'	95°C 8 min, 45 cycle (95°C 10 sec, 57°C 10 sec, 72°C 15 sec), 72°C 10 min
Briancesco et al. ²⁴⁾	Non-tuberculous <i>Mycobacterium</i> species	439	5'-ACCAACGATGGTGTGTCCAT-3' 5'-CTTGTCGAACCGCATACCCT-3'	95°C 2 min, 45 cycle (94°C 1 min, 64°C 1 min, 72°C 1 min), 72°C 10 min

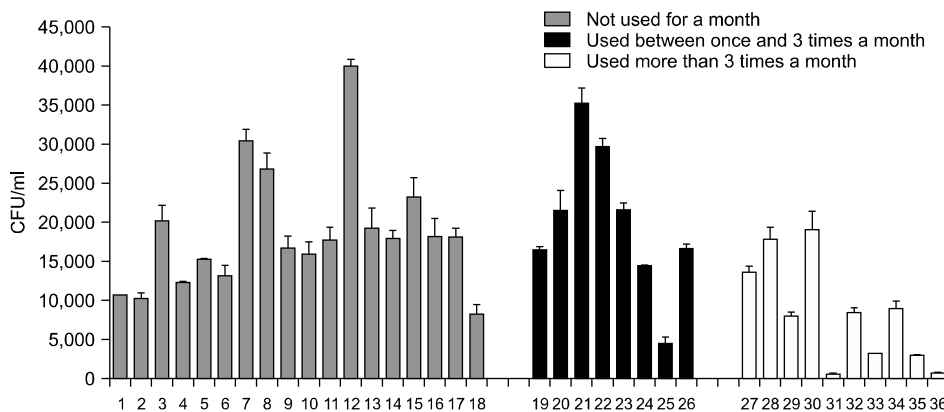


Fig. 1. Heterotrophic bacterial counts (counting colony forming unit, CFU/ml) in water samples of dental unit water system in student clinical simulation laboratory. The values are the means of measurements of CFUs and the error bars indicate standard deviations of the mean.

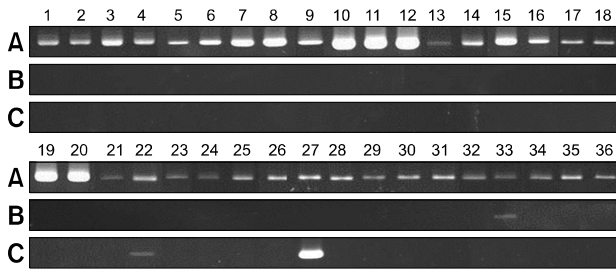


Fig. 2. Universal primers (A) were used to confirm the presence of bacteria in samples genomic DNA extracted. Detection of *Pseudomonas* species (spp.) (B) and non-tuberculous *Mycobacterium* spp. (C) with specific primers. Polymerase chain reaction products were electrophoresed on 1.5% agarose gel and stained with ethidium bromide.

배지에서 세균군집을 확인하였다. CFU/ml를 측정된 결과는 Fig. 1에 정리하였다. 평균 CFU/ml는 16,095 CFU/ml (standard deviation [SD]=8,921)로 최대 39,920 CFU/ml, 최소 720 CFU/ml로 나타났다.

초음파치석제거기를 한 달 동안 사용하지 않은 DCU, 1번 이상 3번 미만 사용한 DCU, 3번 이상 사용한 DCU로 나누었을 때, 각 군의 평균 CFU/ml가 각각 18,590 CFU/ml (SD=7,720/n=18), 20,070 CFU/ml (SD=9,400/n=8), 8,420 CFU/ml (SD=6,710/n=10)로 나타났다. 3개 군의 평균 CFU/ml는 통계학적으로 유의한 차이를 보였고(one-way ANOVA, $p < 0.05$), 3번 이상 사용한 DCU의 평균 CFU/ml가 다른 두 군의 평균 CFU/ml보다 유의하게 낮음을 확인하였다($p < 0.05$).

2. Polymerase chain reaction 분석

36개의 DCU에서 얻은 물 시료 중 1개의 시료에서 *Pseudomonas* species가 검출되었고, 2개의 시료에서 비결핵성 *Mycobacterium* species가 검출되었다(Fig. 2). *Legionella* species, *L. pneumophila*, *P. aeruginosa*는 검출되지 않았다 (results not shown).

고 찰

연구에 사용된 DCU에서 수집한 모든 물 시료의 세균오염수준은 국내 환경부, ADA와 미국질병관리본부에서 권고하는 수준을 초과하였다. 우리의 연구에서 평균 세균오염수준은 16,095 CFU/ml로, 49,700 CFU/ml의 평균 세균오염수준을 나타낸 Williams 등³⁾의 연구와 평균 62,900 CFU/ml의 세균오염수준을 보여준 Epstein 등⁷⁾의 연구 결과보다는 낮으며, 평균 2,900 CFU/ml의 세균오염수준을 보여준 Walker

등⁶⁾의 연구 결과보다는 높았다. 연구에 사용된 DCU를 초음파치석제거기의 사용빈도에 따라 3개의 군으로 분류하였을 때, 3개 군의 평균 CFU/ml는 유의한 차이를 보였고, 사용빈도가 가장 높은 군에서의 평균 CFU/ml가 유의하게 낮았으며 사용빈도가 세균오염수준에 영향을 주는 것을 확인하였다. 다른 학교 실습실의 DCU도 거의 비슷한 빈도로 사용하므로, 세균오염수준 또한 본 실험에서 보여준 결과와 유사할 것으로 추정된다.

DUWS에 공급되는 물의 세균오염수준이 낮은 것에 비해 DUWS에서 배출되는 물의 세균오염수준이 높은 현상에 대한 원인으로 연구자들은 치과용 유니트 수관(dental unit waterline, DUWL) 내면에 형성된 바이오필름을 강조하고 있다^{3,4,25)}. DUWL과 같은 수생 환경에서 흔하게 볼 수 있는 바이오필름은 수관 내부 표면에 부착하여 성장하는 세균, 곰팡이, 바이러스 등 여러 종류로 이루어진 복잡한 미생물 덩어리이다²⁶⁾. 좁은 구경의 DUWL과 진료시간 외 물의 긴 정체시간은 바이오필름이 형성되기 좋은 환경을 만들어 준다^{27,28)}. 이렇게 형성된 바이오필름은 DUWL 속에서 미생물의 성장이 계속되도록 도와준다^{1,27,29,30)}. 이 때문에 바이오필름의 형성을 억제시키는 것이 물의 미생물 오염 수준을 감소시킬 수 있는 것으로 알려졌다. 사용빈도가 높은 군의 세균 오염도가 낮았던 이유는 물의 잦은 사용이 DUWL에 형성된 바이오필름의 성장을 억제하는 역할을 했기 때문으로 추정된다.

기회감염성 병원균 중에는 *Pseudomonas* species, 비결핵성 *Mycobacterium* species가 36개의 DCU 중 각각 1개(1%)와 2개(5%)의 검출률을 보였다. 요르단에서 DCU에서 배출되는 물을 수집하여 기회감염성 병원균의 존재를 확인한 결과, *L. pneumophila*와 *P. aeruginosa*의 검출률이 86.7%로 높은 기회감염성 병원균 오염수준을 보였다^{11,12)}. 또 유럽국가들의 치과의원 DCU를 대상으로 조사한 연구에서 *P. aeruginosa*는 스페인에서 최대 10%, *Legionella* species와 *L. pneumophila*는 덴마크에서 각각 11%, 6%, 그리고 *Mycobacterium* species는 53%의 검출률을 나타냈다⁵⁾. 기존 연구들과 우리 연구가 세균오염수준이나 기회감염성 병원균의 검출률에서 차이를 보였다. 기존 연구는 치과의원에서 사용되는 DCU를 대상으로 하였으나, 우리의 연구에서는 학생실습에 사용되는 DCU를 대상으로 한 것이 검출률 차이의 한 가지 원인으로 추정된다. 또한 본 실험에 사용된 DCU는 대형 탱크 하나에 저장된 상수도를 전체 유니트에 공급하는 시스템이고, 기존 연구의 대상 치과의원에서는 DCU의 개별적으로 장치된 독립적인 저수통에 물을 저장하여 사용하는 시스템으로 물을 공급하는 체계에서도 차이를

보였다. 하지만, DCU에 물이 공급되는 체계별로 세균오염 수준을 비교한 Walker 등⁶⁾의 연구 결과에 의하면 공급체계에 따른 세균오염수준은 통계적으로 유의하지 않는 것으로 나타났다. 기존 연구들과 우리 연구가 보여준 차이 중, 결과에 큰 영향을 미쳤을 원인은 국가별로 상수도를 처리하는 과정이 다르고 상수도에 포함된 염소나 다른 화학물질들의 농도 차이로 인해 공급되는 물 자체가 다르기 때문으로 추측된다. 그리고 각 치과 별로 다른 DUWL의 소독 주기와 방법 또한 세균오염수준에 큰 영향을 미쳤을 것으로 추측된다.

국내나 국외에서 발표된 연구 중 학생 실습을 위해 사용되는 DCU를 대상으로 세균오염실태를 조사한 연구가 없고 국내에는 치과의원에서 사용되는 DCU의 오염도를 조사한 논문이 드물기 때문에 적절한 비교대상이 되는 논문을 찾아볼 수 없어, 본 연구와 기존 연구의 오염 수준이 차이를 보이는 정확한 원인을 파악하기 힘들다. 본 연구에서 실습을 위해 사용되는 DCU를 대상으로 연구를 진행하였지만, 앞으로 치과의원이나 치과병원의 DCU를 대상으로 한 여러 연구가 많이 진행되어 우리나라의 자체적인 기준과 지침을 제정하여야 할 것으로 생각된다. 이러한 기준을 충족시키기 위한 근거기반의 효율적인 소독처리 과정에 관한 폭넓은 연구 또한 필요하며 교육과정에서부터 DCU 수관관리를 포함한 치과 감염관리에 대한 지도가 비중 있게 이루어져야 할 것으로 생각된다.

우리의 연구는 학생실습에 사용되는 DCU도 일반 치과의원에서 사용되는 DCU의 오염수준 이상의 높은 수준으로 미생물에 오염이 되어 있고, 그 중에는 기회성 병원균도 존재함을 보여주었다. 본 연구의 결과는 오염된 물로 인해 일어날 수 있는 잠재적 감염의 방지를 위한 실습 전 학생들의 보호장비 착용과 실습 후 수관관리의 필요성을 알려준다.

요 약

이 연구는 강릉원주대학교 치과대학 학생들의 임상실습을 위해 사용되고 있는 DCU에서 배출되는 물 속 종속영양세균의 수준을 평가하면서 사용빈도에 따른 세균 오염수준의 차이를 확인하고 기회 감염성 병원균의 존재를 분자생물학적 방법을 사용하여 확인하였다. 임상 실습실에서 사용되는 DCU 36개를 대상으로 초음파치석제거기에서 물 시료를 수집하여 평균 CFU/ml를 조사하고 초음파치석제거기의 한 달 사용빈도에 따라 DCU를 세 집단으로 분류하여 세균오염수준을 비교하였다. 또한 수집한 물 시료에서 세균의 genomic DNA를 추출한 후 PCR 분석을 통해 기회감염성 병원균의 존재를 확인한 결과는 다음과 같다. 학생 실습에

사용한 DCU에서 수집한 물 시료의 평균 종속영양세균수준은 16,095 CFU/ml로 ADA에서 권장하는 200 CFU/ml 이하의 수준에 적합하지 않은 것을 확인하였다. 초음파 치석제거기의 한 달 사용빈도에 따라 3집단으로 나누어 CFU/ml를 조사하였을 때, 초음파치석제거기를 한 달에 1번 이상 3번 미만 사용한 DCU에서 평균 CFU/ml가 20,070 CFU/ml로 가장 높게 나타났으며, 3번 이상 사용한 유닛은 CFU/ml 평균이 8,420 CFU/ml로 가장 적게 나타났다. 3개군의 CFU/ml 차이는 통계학적으로 유의성이 있는 것을 보여주었고($p < 0.05$), 그 중 사용빈도가 가장 높은 군에서 유의하게 낮은 CFU/ml를 보여주었다. 치과에서 사용하는 DCU에 존재하는 기회감염성 병원균이 학생실습에 사용하는 DCU에서도 분리되었다. 36개의 genomic DNA 시료 중 1개의 시료에서 *Pseudomonas* species가 검출되었고, 2개의 시료에서 비결핵성 *Mycobacterium* species가 검출되었다. 따라서 학생실습용으로 사용되는 DCU는 학생들과 대상자에게 잠재적 감염의 원인이 될 수 있으며, 실습 전 학생들의 보호장비 착용과 실습 후 수관관리가 필요하다.

References

1. Kohn WG, Harte JA, Malvitz DM, et al.: Guidelines for infection control in dental health care settings-2003. J Am Dent Assoc 135: 33-47, 2004.
2. Shearer BG: Biofilm and the dental office. J Am Dent Assoc 127: 181-189, 1996.
3. Williams JF, Johnston AM, Johnson B, Huntington MK, Mackenzie CD: Microbial contamination of dental unit waterlines: Prevalence, intensity and microbiological characteristics. J Am Dent Assoc 124: 59-65, 1993.
4. Uzel A, Cogulu D, Oncag O: Microbiological evaluation and antibiotic susceptibility of dental unit water systems in general dental practice. Int J Dent Hyg 6: 43-47, 2008.
5. Walker JT, Bradshaw DJ, Finney M, et al.: Microbiological evaluation of dental unit water systems in general dental practice in europe. Eur J Oral Sci 112: 412-418, 2004.
6. 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 66: 3363-3367, 2000.
7. Epstein JB, Dawson JR, Buidvids IA, Wong B, Le ND: The effect of a disinfectant/coolant irrigant on microbes isolated from dental unit water lines. Spec Care Dentist 22: 137-141,

- 2002.
8. Lee BM, Kim CW, Kim YS: A study on the microbial contamination of dental unit and ultrasonic scaler. *J Korean Acad Prosthodont* 36: 64-80, 1998.
 9. Schulze-Robbecke R, Feldmann C, Fischeder R, Janning B, Exner M, Wahl G: Dental units: an environmental study of sources of potentially pathogenic mycobacteria. *Tuber Lung Dis* 76: 318-323, 1995.
 10. Porteous NB, Redding SW, Jorgensen JH: Isolation of non-tuberculosis mycobacteria in treated dental unit waterlines. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 98: 40-44, 2004.
 11. Ma'ayeh SY, Al-Hiyasat AS, Hindiyeh MY, Khader YS: *Legionella pneumophila* contamination of a dental unit water line system in a dental teaching centre. *Int J Dent Hyg* 6: 48-55, 2008.
 12. Al-Hiyasat AS, Ma'ayeh SY, Hindiyeh MY, Khader YS: The presence of *Pseudomonas aeruginosa* in the dental unit waterline systems of teaching clinics. *Int J Dent Hyg* 5: 36-44, 2007.
 13. Dutil S, Veillette M, Meriaux A, Lazure L, Barbeau J, Duchaine C: Aerosolization of mycobacteria and legionellae during dental treatment: Low exposure despite dental unit contamination. *Environ Microbiol* 9: 2836-2843, 2007.
 14. Martin MV: The significance of the bacterial contamination of dental unit water systems. *Br Dent J* 163: 152-154, 1987.
 15. 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* 99: 159-166, 1987.
 16. Fotos PG, Westfall HN, Snyder IS, Miller RW, Mutchler BM: Prevalence of legionella-specific IgG and IgM antibody in a dental clinic population. *J Dent Res* 64: 1382-1385, 1985.
 17. Dallolio L, Scuderi A, Rini MS, et al.: Effect of different disinfection protocols on microbial and biofilm contamination of dental unit waterlines in community dental practices. *Int J Environ Res Public Health* 11: 2064-2076, 2014.
 18. Lin SM, Svoboda KK, Giletto A, Seibert J, Puttaiah R: Effects of hydrogen peroxide on dental unit biofilms and treatment water contamination. *Eur J Dent* 5: 47-59, 2011.
 19. Rice EW, Baird RB, Eaton AD, Clesceri LS: Standard methods for the examination of water and wastewater. 22ed. American Public Health Association, Washington DC, 2012.
 20. Karpay RI, Plamondon TJ, Mills SE: Comparison of methods to enumerate bacteria in dental unit water lines. *Curr Microbiol* 38: 132-134, 1999.
 21. de Lillo A, Ashley FP, Palmer RM, et al.: Novel subgingival bacterial phylotypes detected using multiple universal polymerase chain reaction primer sets. *Oral Microbiol Immunol* 21: 61-68, 2006.
 22. Spilker T, Coenye T, Vandamme P, LiPuma JJ: PCR-based assay for differentiation of *Pseudomonas aeruginosa* from other pseudomonas species recovered from cystic fibrosis patients. *J Clin Microbiol* 42: 2074-2079, 2004.
 23. Joly P, Falconnet PA, Andre J, et al.: Quantitative real-time legionella PCR for environmental water samples: Data interpretation. *Appl Environ Microbiol* 72: 2801-2808, 2006.
 24. Briancesco R, Semproni M, Della Libera S, Sdanganelli M, Bonadonna L: Non-tuberculous mycobacteria and microbial populations in drinking water distribution systems. *Ann Ist Super Sanita* 46: 254-258, 2010.
 25. Williams HN, Baer ML, Kelley JJ: Contribution of biofilm bacteria to the contamination of the dental unit water supply. *J Am Dent Assoc* 126: 1255-1260, 1995.
 26. American Dental Association Council on Scientific Affairs: Dental unit water lines: approaching the year 2000. *J Am Dent Assoc* 130: 1653-1664, 1999.
 27. Coleman DC, O'Donnell MJ, Shore AC, Russell RJ: Biofilm problems in dental unit water systems and its practical control. *J Appl Microbiol* 106: 1424-1437, 2009.
 28. O'Donnell MJ, Boyle MA, Russell RJ, Coleman DC: Management of dental unit waterline biofilms in the 21st century. *Future Microbiol* 6: 1209-1226, 2011.
 29. Walker JT, Marsh PD: Microbial biofilm formation in DUWS and their control using disinfectants. *J Dent* 35: 721-730, 2007.
 30. Cobb CM, Martel CR, McKnight SA 3rd, Pasley-Mowry C, Ferguson BL, Williams K: How does time-dependent dental unit waterline flushing affect planktonic bacteria levels? *J Dent Educ* 66: 549-555, 2002.