# Identifikacija i klasifikacija mikroorganizama s korištenih četkica za zube

**Duplančić, Roko**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2016**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Split, School of Medicine / Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:171:799179

*Rights / Prava:* In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-03-28**

SVEUČILIŠTE U SPLITU
MEDICINSKI FAKULTET
UNIVERSITAS STUDIORUM SPALATENSIS
FACULTAS MEDICA

*Repository / Repozitorij:*

MEFST Repository

zir.nsk.hr

UNIVERSITY OF SPLIT

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

**SVEUČILIŠTE U SPLITU**

**MEDICINSKI FAKULTET**

**Roko Duplančić**

# IDENTIFIKACIJA I KLASIFIKACIJA MIKROORGANIZAMA S KORIŠTENIH ČETKICA ZA ZUBE

**Diplomski rad**

**Akademska godina:**

**2015./2016.**

**Mentorica:**

**Doc. prim. dr. sc. Ivana Goić Barišić, dr. med.**

**Split, srpanj 2016.**

# SADRŽAJ


1. UVOD ..... 1
   1.1. Usna šupljina čovjeka i oralna mikrobiota ..... 2
   1.2. Oralno zdravlje i oralna higijena ..... 6
   1.3. Instrumenti i sredstva za oralnu higijenu ..... 8
2. CILJ ISTRAŽIVANJA ..... 10
3. MATERIJALI I METODE ..... 12
   3.1. Ispitanici, ispunjavanje upitnika i potpisivanje suglasnosti ..... 13
   3.2. Prikupljanje, obrada i analiza uzoraka ..... 14
   3.3. Statistička obrada podataka ..... 15
4. REZULTATI ..... 16
   4.1. Identificirane vrste bakterija i njihova zastupljenost ..... 17
   4.2. Podaci iz ispunjenih upitnika i rezultati statističke obrade ..... 19
5. RASPRAVA ..... 20
6. ZAKLJUČCI ..... 23
7. POPIS CITIRANE LITERATURE ..... 25
8. SAŽETAK ..... 34
9. SUMMARY ..... 36
10. ŽIVOTOPIS ..... 38

# ZAHVALA

*Zahvaljujem svim profesorima, asistentima i ostalim kolegama koji su uz pomoć svojih znanja, stručnosti i vještina oblikovali brojne sate nastave, prenosili svoje znanje i time postali zaslužni za dobrobit mog obrazovanja za vrijeme (i van) studija; zahvaljujući njima shvatio sam što želim i što ne želim raditi u budućoj karijeri.*

*Također zahvaljujem svojim prijateljima i poznanicima, pogotovo pojedincima koji su se odvažili družiti sa mnom u profesionalnom odnosu i tako postali jednim od mojih prvih pacijenata. Prijatelji su oni koji su također činili ugodno društvo koje mi je obilježilo (studentski) život van nastavnih sati; zahvaljujući njima shvatio sam kakva osoba želim biti u budućim godinama života.*

*Još želim zahvaliti i svojoj užoj i široj obitelji na podršci – bila ona emotivna ili materijalna, igrala je svoju ulogu u tome da se nađem gdje sam danas; zahvaljujući njima sam shvatio da čovjek doživotno ostavlja mjesta napretku te koliko je zapravo važno težiti iskorištenju tog mjesta.*

*Posebne zahvale želim uputiti prof. dr. sc. Vlatku Panduriću koji me uputio te prof. dr. sc. Marku Jakovcu koji me primio na stručnu praksu koja mi je omogućila kompletiranje mojih znanja po završetku studija. U posebne zahvale želim ubrojiti i svoju mentoricu, doc. prim. dr. sc. Ivanu Goić Barišić i time joj zahvaliti na stručnom vođenju i pomoći pri izradi ovog diplomskog rada.*

*Na kraju, zahvalan sam i poreznim obveznicima Republike Hrvatske što su platili većinu mog obrazovanja i time mi omogućili da postanem kritičan prema dogmatskim učenjima koja su prijetnja zdravom razumu te da se okrenem dokazima tj. znanosti.*

*Roko Duplančić*

# 1. UVOD

## 1.1. Usna šupljina čovjeka i oralni mikrobiota

Usna šupljina čovjeka početni je dio njegovog probavnog sustava. Specifična je po tome što ima izravan kontakt s vanjskim svijetom, tj. okolišem zbog svog anatomskog položaja, oblika i funkcije; sudjeluje u hranjenju, pijenju, žvakanju, gutanju, disanju i govoru. U vrijeme rađanja usna šupljina novorođenčeta sterilna je, no tijekom poroda mikroorganizmi iz majčinog porođajnog kanala koloniziraju sluznicu usne šupljine novorođenčeta[1]. Daljnja mikrobiološka kolonizacija usne šupljine nastavlja se nakon poroda. Ljudi se rađaju s refleksom sisanja[2, 3] koji omogućuje pojedincu hranjenje u toj dobi; pri kontaktu mikroorganizmi s majčine kože ili usta započinju naseljavanje usne šupljine njenog potomka[1]. Sastav oralne flore, odnosno oralne mikrobiote dalje se mijenja tijekom života ovisno o godinama starosti te o postojanju tj. statusu zubala. Oralna mikrobiota najviše se mijenja u vrijeme nicanja zuba kao neljuštećeg tvrdog tkiva sa svojim gingivnim sulkusom (prethodno nepostojećih anatomskih struktura) u kojem prevladavaju anaerobni uvjeti pogodni za razvoj istoimenih bakterija[4]. U bezubih osoba sastav oralne mikrobiote nalikuje onom koji je bio prisutan prije nicanja zuba[1].

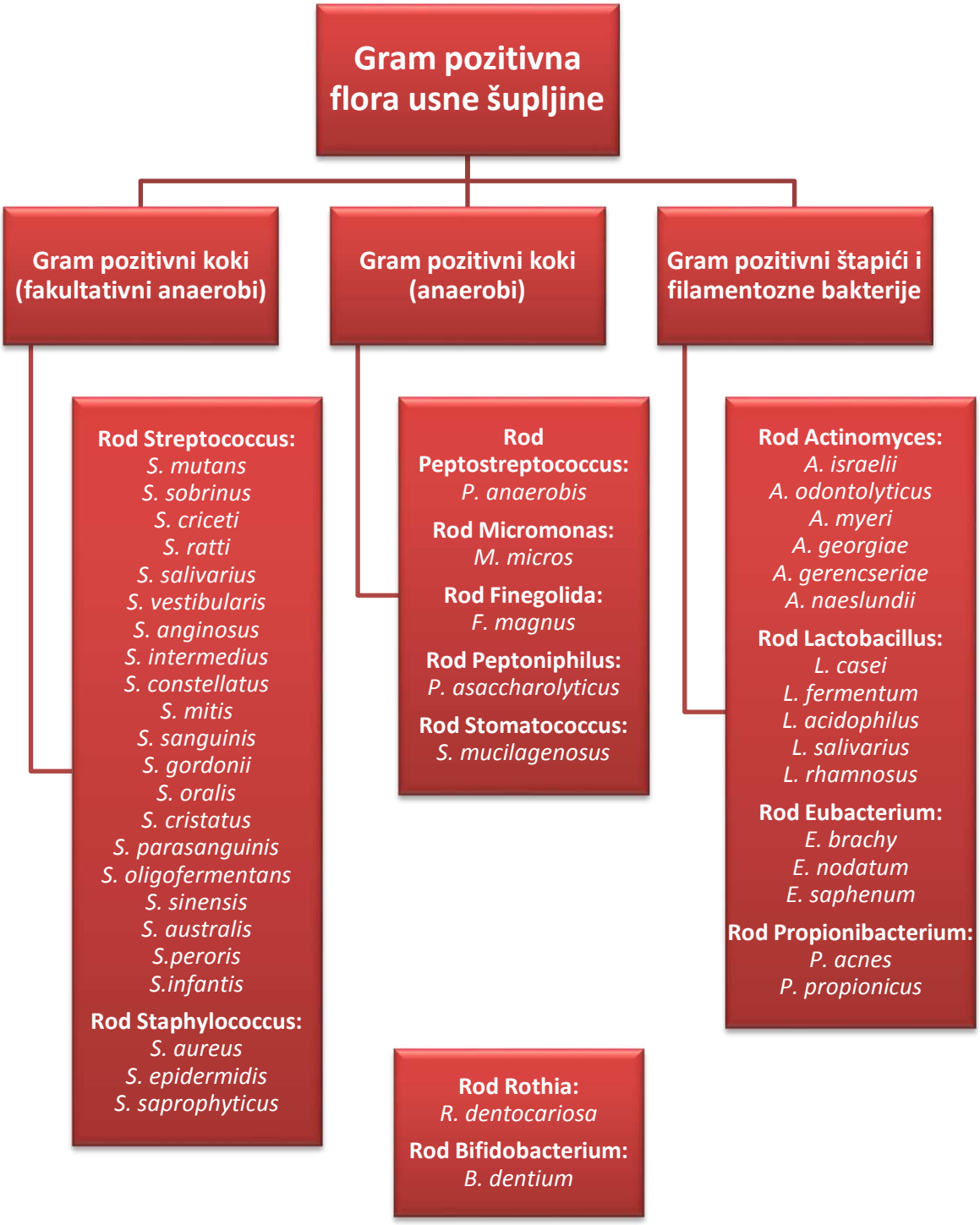
Literatura još uvijek nije složna u preciznom definiranju ukupnog broja jedinki te broja vrsta mikroorganizama koji naseljavaju našu usnu šupljinu. Jedan od razloga je što se oralna mikrobiota sastoji od više domena mikroorganizama: prokariotskih (*bacteria*, *archaea*), eukariotskih (*fungi*, *protozoa*) te mogućih virusnih čestica koje mogu biti prisutne s vremena na vrijeme[5]. Navedeni organizmi (i virusi) mogu živjeti na raznim površinama anatomskih struktura usne šupljine uključujući usne, sluznicu obraza, zube, gingivalne sulkuse, jezik, tvrdo i meko nepce te tonzile[5, 6]. S obzirom na to da od svih navedenih mikroorganizama prisutnih u usnoj šupljini čovjeka po broju jedinki i vrsta dominiraju upravo bakterije, drugi razlog otežanog definiranja humane oralne mikrobiote može biti komplicirano specificiranje tj. identifikacija svih tih vrsta. Naime, samo 50 % do 60 % vrsta bakterija nativno prisutnih u usnoj šupljini čovjeka moguće je uzgojiti u laboratorijskim uvjetima[5 - 7]. Ostatak se odnosi na vrste koje je (zasad) nemoguće uzgojiti izvan živih stanica te se moderna istraživanja okreću identifikaciji koristeći molekularne metode, ponajviše sekvenciranju bakterijskih gena – metagenomici (sekvenciranje 16S rRNA – *Human Microbiome Project*) [6 - 9]. Uz već spomenute višestruke površine koje koloniziraju različite bakterije unutar iste usne šupljine samo jednog pojedinca te uz prikazane prepreke u identifikaciji i

klasifikaciji oralne mikrobiote mogu se ubrojiti i individualne razlike pojedinaca (vrsta prehrane, geografska lokacija itd.) te tako se dolazi do zaključka kako je egzaktno definiranje oralne mikrobiote čovjeka dug, vremenski, financijski i materijalno zahtjevan te složen posao[5 - 9]. Usprkos enormnoj raznolikosti i složenosti oralne mikrobiote, zanimljivo je spomenuti kako mnogi mikroorganizmi često izolirani iz susjednih ekosustava (poput kože ili ostatka probavnog sustava) ne moraju biti prisutni i u usnoj šupljini. To dalje upućuje na jedinstvenu i selektivnu osobinu usne šupjine u vezi s kolonizacijom mikroorganizmima[1, 5].

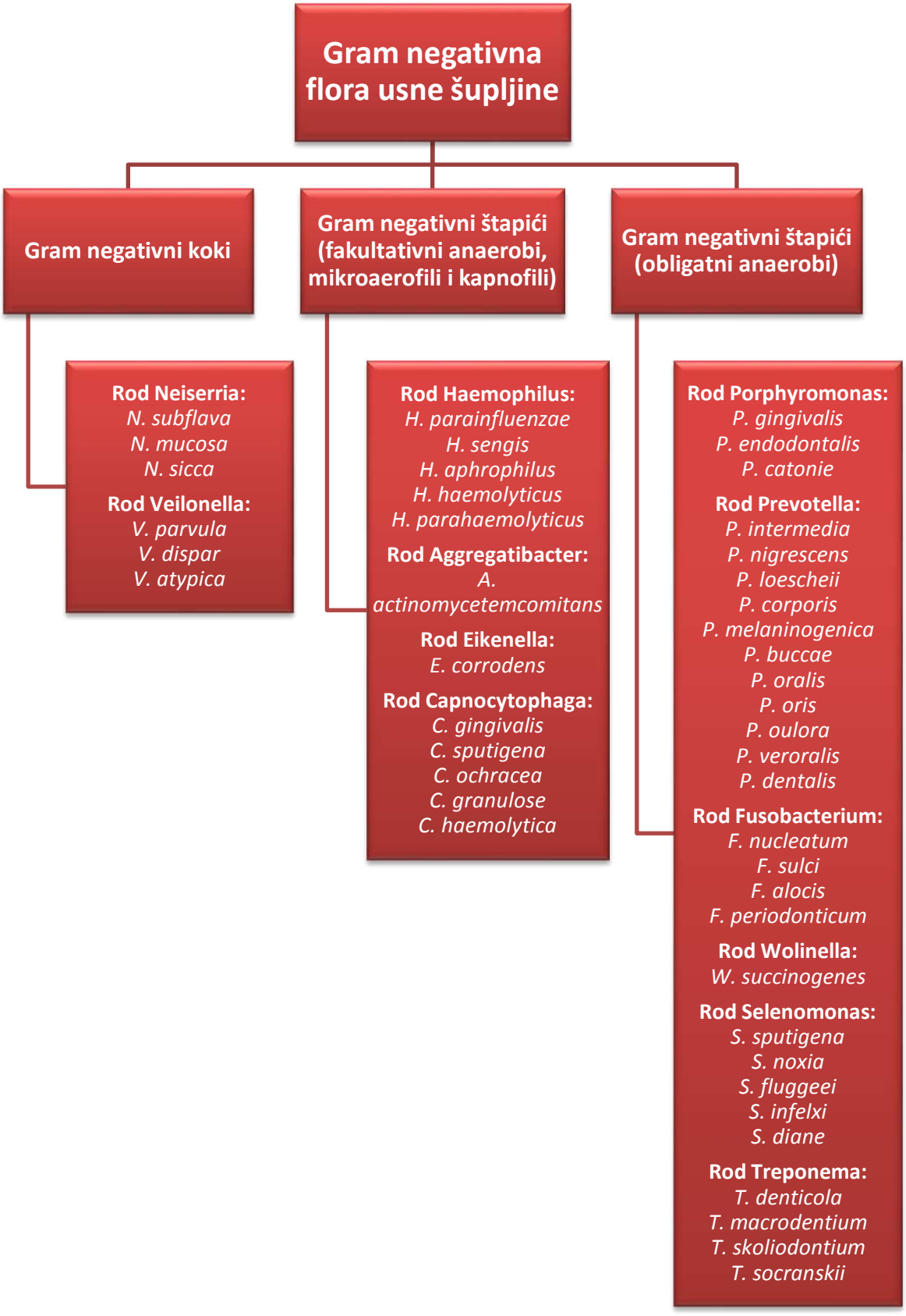
Unatoč svemu napredak je evidentan. Leeuwenhoek u 17. stoljeću pod svoj mikroskop izlaže plak s vlastitih zubi – „malu bijelu tvar“ i opisuje da „u spomenutoj bijeloj tvari ima mnogo jako malih živih životinjica“[10]. Njegovo je otkriće zapravo bilo prvo viđenje oralnih bakterija koje je poznato[10 - 12]. Danas moderna literatura navodi podatke koji govore o brojci između 500 i 700 vrsta, odnosno podtipova bakterija koje su u stanju naseliti ljudska usta[5 - 7], dok ukupan broj bakterijskih jedinki u ustima jednog pojedinca može premašiti i 20 milijardi. To i nije teško zamisliti kada se uzme u obzir činjenica da čovjek u okoliš emitira milijun bioloških čestica po satu[13], dok bakterijske stanice prisutne u cijelom čovjekovom tijelu nadmašuju broj njegovih vlastitih stanica: nekada se mislilo da je to čak 10 : 1 u korist bakterija[14, 15], dok novija istraživanja upućuju na manji omjer[16, 17].

Iako je broj bakterija u čovjekovom tijelu, tj. usnoj šupljini zaista impresivan, većina njih spada u ono što se naziva fiziološkom florom, odnosno fiziološkom mikrobiotom. To znači da je ista razvila komenzalni odnos s čovjekom kao domaćinom[5]; taj balansirani bakterijski biofilm pomaže očuvati zdravlje domaćina[18, 19]. Isti komenzalni odnos moguće je primjetiti i u udaljenim dijelovima probavnog sustava[20]. Poremećaj komenzalnog odnosa tj. disbioza usne šupljine dovodi do lokalno prisutnih oboljenja, poput parodontitisa[21, 22], a broj dokaza o utjecaju i povezanosti iste s nekim sustavnim bolestima, poput reumatoidnog artritisa, stanovit je i u porastu[23 - 25]. Također se, u nekim slučajevima, zasluge pojedinačne vrste bakterije mogu pripisati udaljenim infekcijama[26, 27] i krvarenjima u organizmu[28, 29]. Komenzalni odnos pojedinac može narušiti štetnim navikama poput pušenja i neodržavanja adekvatne oralne higijene; pušenje stvara disbiozu mikrobiote usne šupljine[30] dok neadekvatna oralna higijena omogućuje akumuliranje plaka i kamenca pa se tim povećava ukupan broj bakterija u usnoj šupljini[21].

***Tablica 1.*** *Fiziološka (gram pozitivna) flora usne šupljine. Izrađeno po* [1, 5].



***Tablica 2.*** *Fiziološka (gram negativna) flora usne šupljine. Izrađeno po* [1, 5].



## 1.2. Oralno zdravlje i oralna higijena

Oralno je zdravlje stanje pojedinca u kojem je slobodan od kronične boli usta i lica, raka usne šupljine i grla, oralnih vrijedova, urođenih defekata poput rascjepa usne i nepca, parodontnih bolesti, karijesa, gubitka zuba te svih ostalih bolesti i poremećaja koji zahvaćaju ljudsku usnu šupljinu[31]. Samo zdrava usna šupljina omogućuje čovjeku prehranu, govor i socijalni kontakt bez ikakvih poteškoća. Faktori rizika za oralne bolesti uključuju nezdravu prehranu, uživanje duhana, prekomjerno uživanje alkohola, neodgovorno spolno ponašanje i lošu oralnu higijenu[31].

Oralna je higijena radnja, odnosno praksa pojedinca u održavanju čistoće zuba i usta u svrhu prevencije bolesti zuba i usne šupljine. Postoji određena skupina ljudi na svijetu koja često čuje pitanje „Zašto moram prati zube?“, najčešće u večernjim satima i najčešće upitano od strane svojih potomaka. To je isto pitanje koje i kolege kliničari, kao zdravstveni profesionalci, čuju od svojih (mlađih) pacijenata. Zašto se mora održavati adekvatna oralna higijena? Iako svi naši predci nisu održavali oralnu higijenu to ne znači da nisu imali problema s karijesom[32]. Evolucijski razlog potrebe za adekvatnom oralnom higijenom leži u dugotrajnosti ljudskog zubala. Naš najbliži genetski srodnik – čimpanza – u divljini živi oko 30, dok u zatočeništvu može poživjeti i do 60 godina[33]. To je već dovoljno za razvoj karijesa i parodontnih bolesti, zbog čega se podvrgavaju redovitim oralnim pregledima i higijeni.



***Slika 1.*** *Intraoralni pregled čimpanze u zatočeništvu. Preuzeto iz* [34].

Ljudski životni vijek danas je procijenjen na oko 68 (svjetski prosjek) do 78 godina (razvijene zemlje)[35], što znači da danas ljudi žive dvostruko duže od svojih najbližih genetskih srodnika, a i znatno duže od svojih pravih predaka[32, 35]. To je i više nego dovoljno vremena da ih sustignu bolesti zuba i okolnih potpornih te mekih tkiva. Uz razliku u životnom vijeku u odnosu na pretke postoji i znatna razlika u prehrani; u modernoj ljudskoj prehrani dominiraju škrob i jednostavni šećeri[36, 37] – supstrat koji uz uzročnika (bakterije), domaćina (čovjeka, tj. njegovu usnu šupljinu) i vrijeme uzrokuje karijes[38, 39]. Osim evolucijskih razloga valja spomenuti i one praktične tj. anatomske. Specifičnost usne šupljine jest što ona sadrži zube – tvrdo tkivo bez mogućnosti ljuštenja stanica epitela u svrhu sprječavanja adhezije bakterija – te gingivne sulkuse i međuzubne prostore kao mjesta koja nisu uvijek dostupna fiziološkom čišćenju (ispiranje i otplavljivanje slinom).

Iako sam naziv ne ukazuje na širu sliku, oralno zdravlje neodvojiv je i sastavni dio općeg zdravlja te važan čimbenik ukupne kvalitete života. Već u uvodnom dijelu o oralnoj mikrobioti spomenuta je važnost uravnoteženosti fiziološke flore usne šupljine zbog njenog utjecaja na sustavno zdravlje[23 - 25]. Redovita i kvalitetna oralna higijena sprječava parodontna oboljenja koja su također povezana s nekim metaboličkim[40 - 42] ili kardiovaskularnim[43 - 45] bolestima. Trenutno postoji mnoštvo nedvojbenih dokaza o mnogostrukoj povezanosti oralnog i sustavnog zdravlja, a njihov je broj i dalje u porastu[46].

Konstantni napredak dentalne medicine, kao grane opće medicine, omogućio je dostupnost novih tehnologija i postupaka koji u kliničkoj praksi olakšavaju dijagnostiku i terapiju najčešćih oralnih bolesti – prednost koja je dobrodošla i terapeutima i pacijentima. Unatoč spomenutom napretku struke, činjenici o povezanosti oralnog i sustavnog zdravlja te mogućnosti prevencije bolesti adekvatnom oralnom higijenom, svjedoci smo kako mnogi od nas oralno zdravlje uzimaju „zdravo za gotovo“, održavaju nedostatnu oralnu higijenu te ignoriraju potrebu za redovitim stomatološkim pregledima. Karijes je danas, u 21. stoljeću, još uvijek velik javnozdravstveni problem[39]. Pokazatelj loše oralne higijene i posljedično lošeg oralnog zdravlja na lokalnoj razini jesu i poražavajući podaci o oralnom zdravlju za Republiku Hrvatsku koji govore o vrlo visokim KEP indeksima kako u populaciji mladih, odnosno školske djece[47], tako i u općoj populaciji[48]. Isti podaci pokazuju kako Hrvatska zaostaje u odnosu na razvijenije države Europske unije[47]. Vlada Republike Hrvatske prepoznala je važnost oralnog zdravlja te u svom strateškom planu promicanja i zaštite

oralnog zdravlja na prvo mjesto stavlja edukaciju i prevenciju[48]. Edukacija bi trebala započeti od „najmanjih nogu“[49] kako bi se djeci kroz igru, tj. na njima prihvatljiv način, pobliže prikazala dentalna medicina i time smanjio strah od stomatološke ambulante i osoblja. Isto vrijedi i za prevenciju koja je manje traumatična za pacijente svih dobi, a najbolja je prevencija upravo oralna higijena.



***Slika 2.*** *Studentska organizacija „Zubolina“ za edukaciju djece o oralnom zdravlju i higijeni. Autorska fotografija.*

## 1.3. Instrumenti i sredstva za oralnu higijenu

Oralna higijena sastoji se od osnovnog mehaničkog dijela – četkanja, odnosno uklanjanja plaka s površine zubi – te od potpornog kemijskog dijela gdje aktivni sastojci pastī za zube i tekućinā za ispiranje usta vrše svoj remineralizacijski[50 - 52], antiseptički[53 - 55] i antizadahni[56] učinak. Četkica za zube najpopularnije je, odnosno najkorištenije pomagalo u oralnoj higijeni. Postala je toliko prisutna u ljudskim životima da su je Amerikanci 2003. godine proglasili ljudskim izumom broj 1 bez kojeg ne bi mogli živjeti[57, 58]. Danas je teško zamisliti stanovnika razvijene zemlje koji ne posjeduje barem jednu četkicu za zube kao glavni instrument u svakodnevnom održavanju oralne higijene.

Najstariji preteče modernih četkica za zube bila su babilonska drvca za žvakanje koja su se koristila još 3500. godine p. n. e.[59]. Tijekom godina drvca za žvakanje evoluiraju preko četkica za zube od bioloških materijala (drvo, kost i bijelokost za dršku te čekinje vepra i kasnije kravlja te konjska dlaka za vlakna)[59] do prvih modernijih četkica za zube od najlona, koje su se prvi put pojavile na tržištu kasnih 1930-ih, kada je najlon izumljen[59, 60].

Današnje, suvremene četkice za zube također imaju niti od najlonskih vlakana. Sastoje se od drške, vrata te glave u kojoj su inkorporirana spomenuta vlakna. Mogu se razlikovati po broju tj. gustoći vlakana koja sadrže te po raznim dodacima poput fleksibilne glave, gumenih dodataka za masažu gingive, strugača za jezik i sl. S obzirom na vrstu razlikuju se po tome jesu li ručne s fiksnom glavom ili električne s rotirajućom glavom. Ono što je svima zajedničko jest upravo glava s najlonskim vlaknima koja služe za mehaničko čišćenje površine zuba, tj. za uklanjanje plaka koji sadrži ostatke hrane, izljuštene stanice epitela sluznice te mikroorganizme[21]. Ovisno o krutosti vlakana četkice se klasificiraju kao tvrde, srednje ili meke. Današnja saznanja zagovaraju upotrebu mekih četkica sa što većom gustoćom vlakana; meka vlakna pogodnija su zbog smanjenog negativnog učinka na gingivu i ostala meka tkiva te zbog manjeg promjera pojedinačnog vlakna, što im omogućuje veću fleksibilnost i time povećava dodirnu površinu sa zubom. Istraživanja pokazuju da tvrdoća četkice igra daleko manju ulogu u abraziji cakline u odnosu na vrstu paste za zube koja se koristi u kombinaciji s četkicom[61, 62]. Neovisno o vrsti četkice u upotrebi, ona je instrument koji se koristi više puta dnevno te je neizbježno zaostajanje dijelova plaka i veće količine bakterija između tj. na površini vlakana.



***Slika 3. & 4.*** *Korištene četkice za zube i površina vlakana. Autorske fotografije.*

# 2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Svijest o nužnosti adekvatne oralne higijene širi se i pojačava svake godine. Četkica za zube postala je osnovno, tj. nezamjenjivo pomagalo u oralnoj higijeni modernog čovjeka. U kombinaciji s dodatnim sredstvima (zubnim koncem, interdentalnim četkicama, pastama za zube, tekućinama za usta itd.), koristimo se njom više puta dnevno; ljudi svoj dnevni ritual oralne higijene najčešće vrše u vlastitim toaletima, gdje i čuvaju svoje četkice do sljedeće upotrebe. Tako ostavljene, podložne su naseljavanju mikroorganizama iz okoline. Upravo ta činjenica potakla je neke istraživače da započnu s istraživanjem mikroorganizama koji se mogu naći na korištenim četkicama za zube.

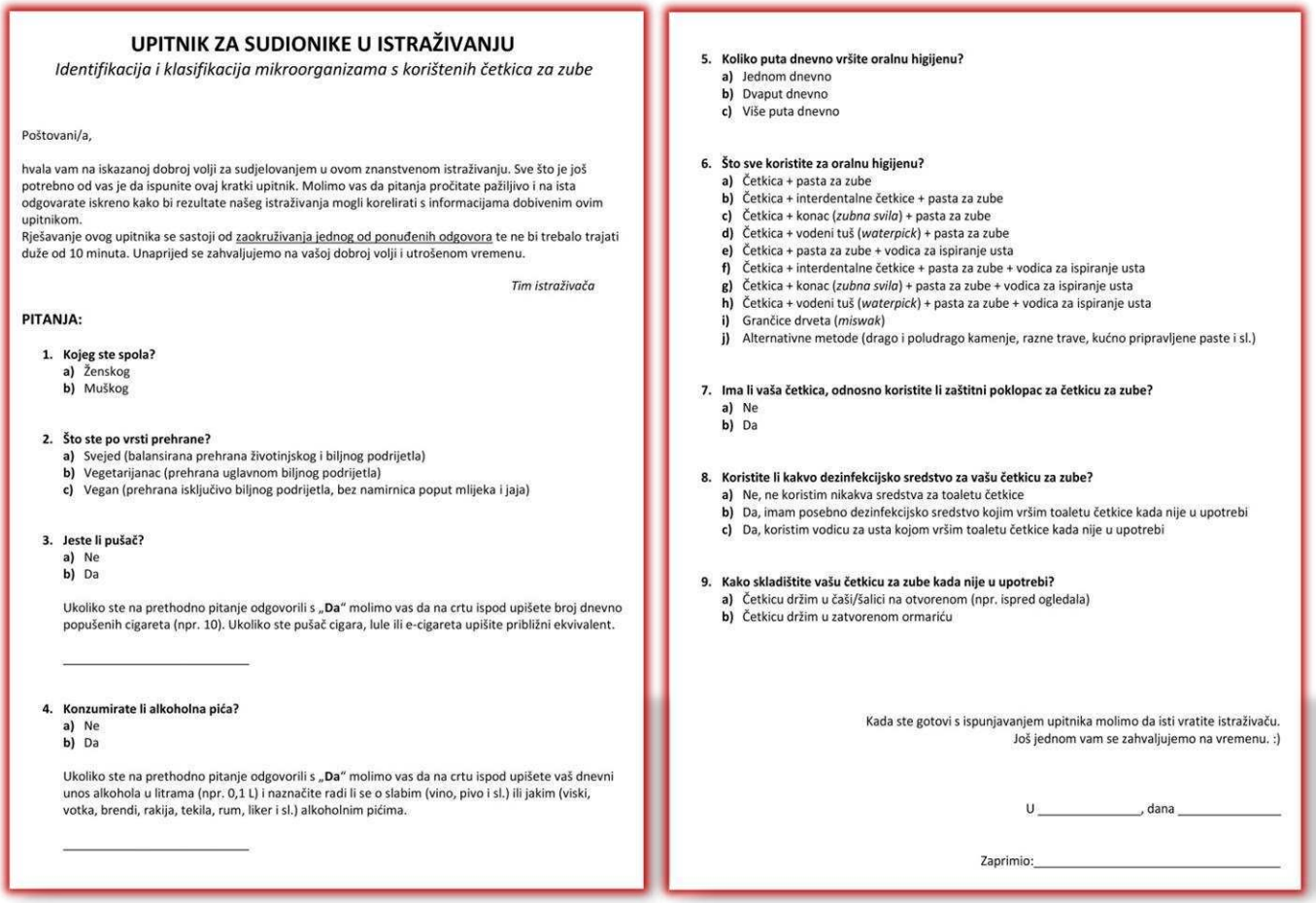
Hipoteza ovog istraživanja pretpostavlja kako bakterije uzgojene s prikupljenih korištenih četkica za zube neće u potpunosti biti podrijetlom iz fiziološke mikrobiote ljudske usne šupljine.

Glavni je cilj ovog istraživanja identificirati i klasificirati mikroorganizme s korištenih četkica za zube, odrediti spadaju li oni u fiziološku mikrobiotu ljudske usne šupljine ili su pak naneseni na četkice iz drugih izvora te rezultate usporediti s postojećim podacima iz literature.

# 3. MATERIJALI I METODE

## 3.1. Ispitanici, ispunjavanje upitnika i potpisivanje suglasnosti

U istraživanje su uključene korištene četkice za zube osoba koje su ispunile kriterije uključenja te dobrovoljno pristale sudjelovati u istraživanju. Prikupljeno je ukupno 14 korištenih četkica za zube: 9 od osoba ženskog te 5 od osoba muškog spola. Kriterij uključenja bio je uvjet da osoba priloži vlastitu četkicu za zube koju je koristila jednako ili duže od 30 dana. Svaki je ispitanik ispunio upitnik u kojem je izrazio demografske podatke (godine i spol), podatke o stilu života (vrsta prehrane, pušenje, konzumacija alkohola) te podatke o oralnoj higijeni (koliko puta dnevno vrši oralnu higijenu, kojim se sredstvima za oralnu higijenu koristi, koristi li se zaštitnim poklopcem ili dezinfekcijskim sredstvom za četkicu i gdje ju skladišti kada nije u upotrebi). Svaki je ispitanik, također, pročitao suglasnost za sudjelovanje, u kojoj se uređuju pravni odnosi između istraživača i ispitanika te svojim vlastoručnim potpisom prihvatio donaciju svoje korištene četkice u zamjenu za novu četkicu za zube marke *Curaprox*, model *5460* u nasumično odabranoj boji.



**UPITNIK ZA SUDIONIKE U ISTRAŽIVANJU**

*Identifikacija i klasifikacija mikroorganizama s korištenih četkica za zube*

Poštovani/a,

hvala vam na iskazanoj dobroj volji za sudjelovanjem u ovom znanstvenom istraživanju. Sve što je još potrebno od vas je da ispunite ovaj kratki upitnik. Molimo vas da pitanja pročitate pažljivo i na ista odgovarate iskreno kako bi rezultate našeg istraživanja mogli korelirati s informacijama dobivenim ovim upitnikom.
Rješavanje ovog upitnika se sastoji od zaokruživanja jednog od ponuđenih odgovora te ne bi trebalo trajati duže od 10 minuta. Unaprijed se zahvaljujemo na vašoj dobroj volji i utrošenom vremenu.

*Tim istraživača*

**PITANJA:**

1. **Kojeg ste spola?**
   a) Ženskog
   b) Muškog

2. **Što ste po vrsti prehrane?**
   a) Svejed (balansirana prehrana životinjskog i biljnog podrijetla)
   b) Vegetarijanac (prehrana uglavnom biljnog podrijetla)
   c) Vegan (prehrana isključivo biljnog podrijetla, bez namirnica poput mlijeka i jaja)

3. **Jeste li pušač?**
   a) Ne
   b) Da

   Ukoliko ste na prethodno pitanje odgovorili s **„Da"** molimo vas da na crtu ispod upišete broj dnevno popušenih cigareta (npr. 10). Ukoliko ste pušač cigara, lule ili e-cigareta upišite približni ekvivalent.

   _____

4. **Konzumirate li alkoholna pića?**
   a) Ne
   b) Da

   Ukoliko ste na prethodno pitanje odgovorili s **„Da"** molimo vas da na crtu ispod upišete vaš dnevni unos alkohola u litrama (npr. 0,1 L) i naznačite radi li se o slabim (vino, pivo i sl.) ili jakim (viski, votka, brendi, rakija, tekila, rum, liker i sl.) alkoholnim pićima.

   _____

5. **Koliko puta dnevno vršite oralnu higijenu?**
   a) Jednom dnevno
   b) Dvaput dnevno
   c) Više puta dnevno

6. **Što sve koristite za oralnu higijenu?**
   a) Četkica + pasta za zube
   b) Četkica + interdentalne četkice + pasta za zube
   c) Četkica + konac (*zubna svila*) + pasta za zube
   d) Četkica + vodeni tuš (*waterpick*) + pasta za zube
   e) Četkica + pasta za zube + vodica za ispiranje usta
   f) Četkica + interdentalne četkice + pasta za zube + vodica za ispiranje usta
   g) Četkica + konac (*zubna svila*) + pasta za zube + vodica za ispiranje usta
   h) Četkica + vodeni tuš (*waterpick*) + pasta za zube + vodica za ispiranje usta
   i) Grančice drveta (*miswak*)
   j) Alternativne metode (drago i poludrago kamenje, razne trave, kućno pripravljene paste i sl.)

7. **Ima li vaša četkica, odnosno koristite li zaštitni poklopac za četkicu za zube?**
   a) Ne
   b) Da

8. **Koristite li kakvo dezinfekcijsko sredstvo za vašu četkicu za zube?**
   a) Ne, ne koristim nikakva sredstva za toaletu četkice
   b) Da, imam posebno dezinfekcijsko sredstvo kojim vršim toaletu četkice kada nije u upotrebi
   c) Da, koristim vodicu za usta kojom vršim toaletu četkice kada nije u upotrebi

9. **Kako skladištite vašu četkicu za zube kada nije u upotrebi?**
   a) Četkicu držim u čaši/šalici na otvorenom (npr. ispred ogledala)
   b) Četkicu držim u zatvorenom ormariću

Kada ste gotovi s ispunjavanjem upitnika molimo da isti vratite istraživaču.
Još jednom vam se zahvaljujemo na vremenu. :)

U _____, dana _____

Zaprimio:_____

***Slika 5. & 6.*** *Upitnik za sudionice i sudionike u istraživanju.*

## 3.2. Prikupljanje, obrada i analiza uzoraka

Četkice za zube nakon jutarnjeg korištenja prikupljene su od ispitanika, glave četkica otpiljene su i u potpunosti uronjene u tekući hranjivi medij te su dostavljene u Klinički zavod za mikrobiologiju i parazitologiju Kliničkog bolničkog centra Split. Tekući hranjivi medij nasađen je na podloge za aerobnu kultivaciju. Podloge kojima se koristilo jesu krvni agar, kao univerzalna podloga za kultivaciju, te kromogeni agar, kao diferencijalna podloga za većinu Gram negativnih bakterija. Aerobne podloge inkubirane su u $CO_2$ inkubatoru na 36 ºC tijekom 24 – 48 sati. Nakon odgovarajuće inkubacije od 24 – 48 sati porasli mikroorganizmi namnoženi su u čistoj kulturi, u dovoljnoj količini za identifikaciju. Identifikacija je provedena temeljem utvrđivanja značajki poraslih kolinija (veličina, oblik, izgled površine i rubova), određivanjem morfologije mikroskopiranjem obojenih pripravaka (Gram preparat) te utvrđivanjem uvjeta rasta (aerobni/anaerobni rast, rast na selektivnim/obogaćenim podlogama) prisutnih bakterija. Za određivanje biokemijskih obilježja poraslih bakterija testirala se sposobnost fermentacije (šećera i aminokiselina) ili asimilacije te enzimski potencijal (testovi katalaze, oksidaze i koagulaze). Cjelokupna identifikacija napravljena je u Kliničkom zavodu za mikrobiologiju i parazitologiju Kliničkog bolničkog centra Split u skladu s navedenim standardnim postupcima kojima se koristi u mikrobiologiji.




***Slika 7. & 8.*** *Tekući hranjivi mediji i uronjene glave četkica. Autorske fotografije.*

## 3.3. Statistička obrada podataka

Za statističku obradu podataka korišten je programski paket *GraphPad Software*® (San Diego, Kalifornija, SAD) te program *Microsoft Excel*®, dio programskog paketa *Microsoft Office*® (Redmond, Washington, SAD). Postotni izračun korišten je za određivanje osnovnih statističkih parametara, dok je Hi kvadrat testom bez Yatesove korekcije s prikazom dvostranih p-vrijednosti utvrđeno postojanje/nepostojanje statistički značajne razlike između mjerenih parametara iz analiziranih upitnika te parametara dobijenih analizom, odnosno identifikacijom uzgojenih mikroorganizama. U svim testovima u obzir uzeta je statistička značajnost ukoliko je p-vrijednost bila manja od 0,05 ($p < 0,05$).

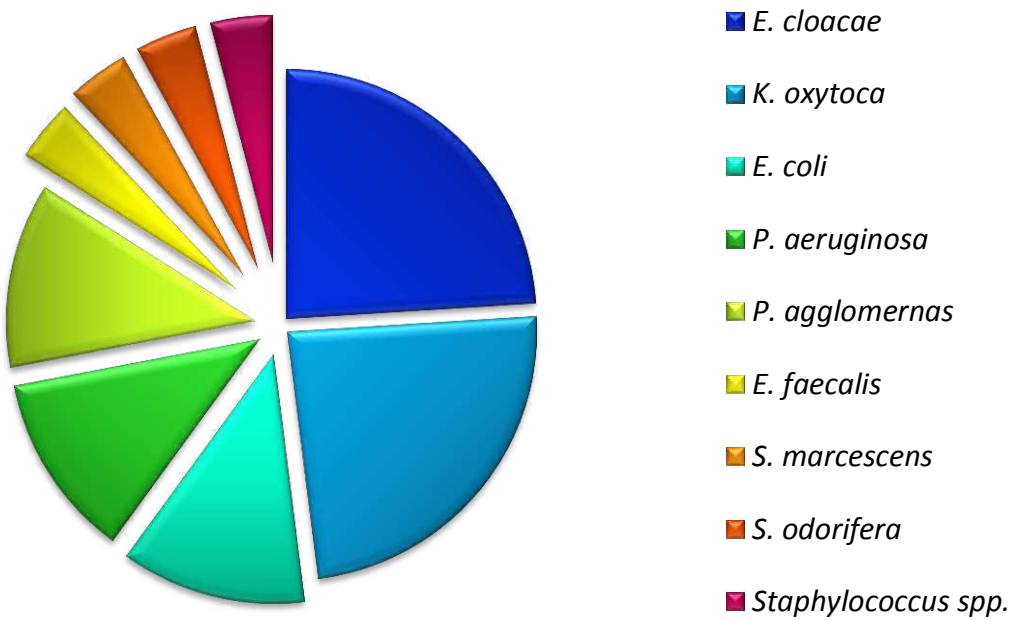
# 4. REZULTATI

## 4.1. Identificirane vrste bakterija i njihova zastupljenost

Rezultati istraživanja pokazali su rast od ukupno 9 vrsta bakterija, s opaskom da je s jednog uzorka moglo biti identificirano više vrsta. Identificirane su sljedeće vrste:

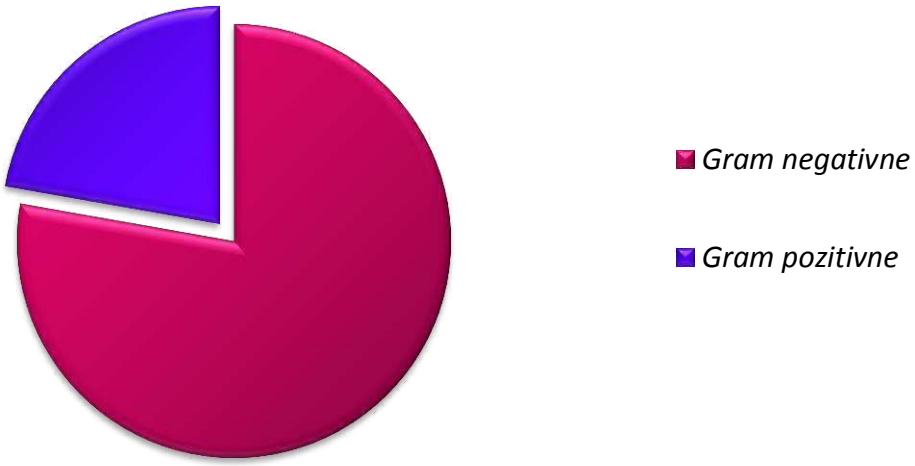
- *Klebsiella oxytoca*
- *Enterobacter cloacae*
- *Pantoea agglomerans*
- *Pseudomonas aeruginosa*
- *Escherichia coli*
- *Serratia odorifera*
- *Serratia marcescens*
- *Enterococcus faecalis*
- *Staphylococcus spp.* (koagulaza negativni).

*E. cloacae* i *K. oxytoca* pronađene su na 42,8 % (6) četkica, *E. coli* , *P. aeruginosa* i *P. agglomerans* na 21,4 % (3) četkica dok su *E. faecalis*, *S. marcescens*, *S. odorifera* te *Staphylococcus spp*. pronađeni na 7,1 % (1) četkica za zube. Grafikon 1. slikovno prikazuje ovaj odnos, tj. raspodjelu navedenih bakterijskih vrsta u njihovom ukupnom broju.



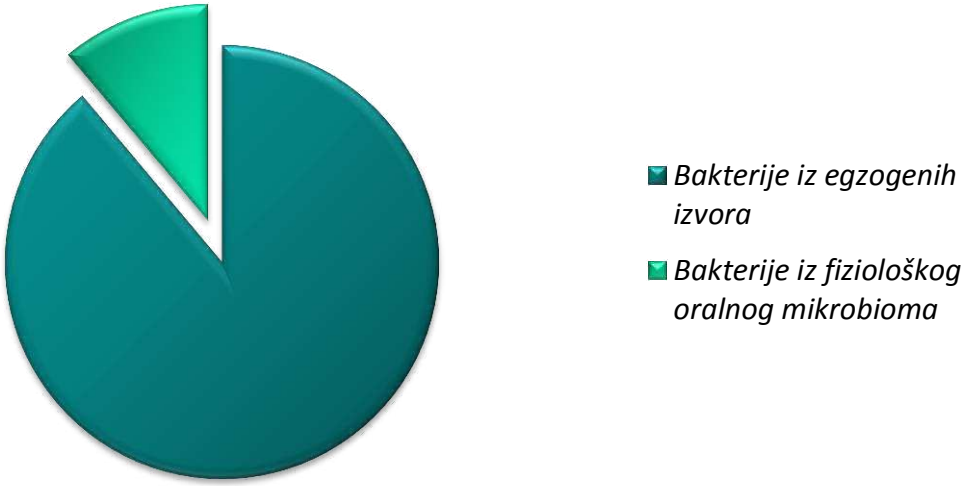

***Grafikon 1.*** *Zastupljenost pojedine vrste bakterija u ukupnom broju bakterijskih vrsta.*

S obzirom na bojanje po Gramu dominirale su Gram negativne bakterije; od ukupno 9 izoliranih vrsta 77,78 % je bilo Gram negativnih (*K. oxytoca, E. cloacae, P. agglomerans, P. aeruginosa, E. coli, S. odorifera* te *S. marcescens*), dok je ostalih 22,22 % bilo Gram pozitivnih (*E. faecalis* i *Staphylococcus spp.*). Grafikon 2. slikovno prikazuje ovaj odnos, tj. raspodjelu Gram negativnih u odnosu na Gram pozitivne bakterije u ukupnom broju vrsta.




***Grafikon 2.*** *Zastupljenost bakterija po bojanju po Gramu.*

Važno je napomenuti kako je od ukupno 9 izoliranih vrsta čak 88,89 % bakterija *(K. oxytoca, E. cloacae, P. agglomerans, P. aeruginosa, E. coli, S. odorifera, S. marcescens, E. faecalis*) iz egzogenih izvora, dok je samo 11,11 % (*Staphylococcus spp.*) potencijalnih stanovnika usne šupljine, tj. članova fiziološke oralne mikrobiote. Grafikon 3. slikovno prikazuje ovaj odnos, tj. raspodjelu bakterija po podrijetlu u ukupnom broju vrsta.




***Grafikon 3.*** *Zastupljenost bakterija po podrijetlu.*

## 4.2. Podaci iz ispunjenih upitnika i rezultati statističke obrade

64,29 % (9 od ukupno 14) ispitanika klasificira se pušačima, dok je ostalih 35,71 % (5 od ukupno 14) nepušača. Kod pušača, tj. njihovih četkica, nije pronađena statistički značajna razlika ($p > 0,05$) u nalazu, tj. zastupljenosti Gram pozitivnih odnosno Gram negativnih bakterija ($X^2 = 1,938$, $df = 1$, $p = 0,1638$) u odnosu na četkice nepušača.

50 % (7 od ukupno 14) ispitanika izjavilo je da koristi poklopac, tj. zaštitnu kapicu na svojoj četkici za zube kada ona nije u upotrebi, dok ostalih 50 % (7 od ukupno 14) nema tu naviku. Unatoč savršenoj raspodjeli nije pronađena statistički značajna razlika ($p > 0,05$) u nalazu, tj. zastupljenosti bakterijskih vrsta iz egzogenih izvora kod četkica koje su bile prekrivene zaštitnom kapicom ($X^2 = 1,077$, $df = 1$, $p = 0,2994$) u odnosu na one koje nisu.

Rezultati analize upitnika pokazali su da se 100 % ispitanika klasificira osobama koje jedu svu vrstu hrane (uživaju balansiranu prehranu životinjskog i biljnog podrijetla), 100 % ispitanika vrši oralnu higijenu dva ili više puta dnevno, 100 % ispitanika skladišti svoje četkice u toaletu na otvorenom (npr. na polici, ispred ogledala i sl.) te se 100% njih ne koristi nikakvim dezinfekcijskim sredstvom za svoju četkicu za zube. Zbog takve raspodjele nije bilo moguće statistički usporediti postojeće nalaze s, primjerice, onima koji pripadaju vegetarijancima, osobama koje vrše oralnu higijenu jednom dnevno, osobama koje skladište svoju četkicu u zatvorenom (npr. u ormariću) ili onima osoba koje se koriste nekakvim dezinfekcijskim sredstvom za četkicu za zube.

# 5. RASPRAVA

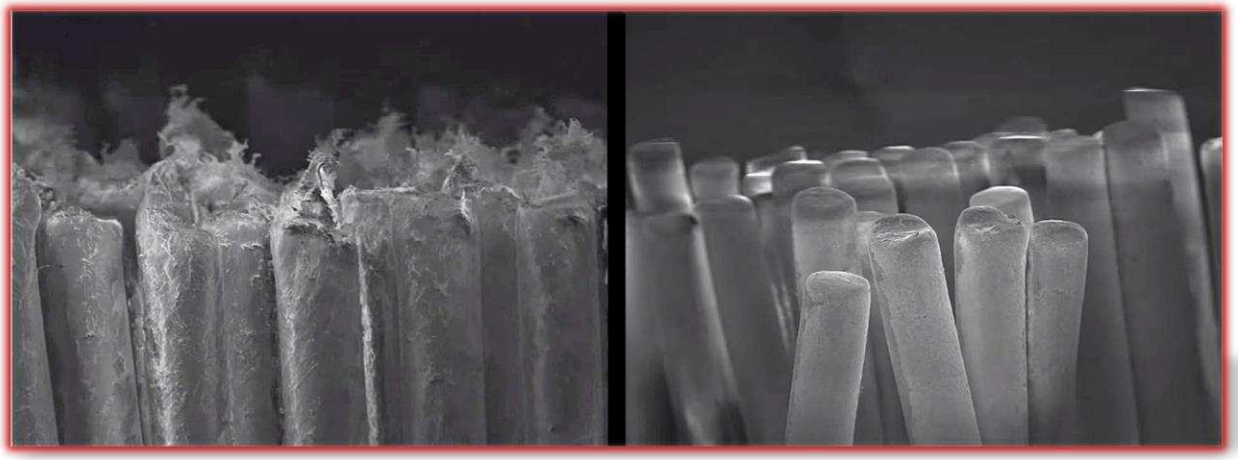
Rezultati ovog istraživanja pokazali su da identificirane bakterije većinom potječu iz egzogenih izvora neovisno o navikama ispitanika. Izuzev *Staphylococus spp.* – koji može biti dio fiziološke mikrobiote kože, gornjeg dijela respiratornog trakta i usne šupljine[63] – te *Pseudomonas aeruginosa,* koja može biti dio fiziološke mikrobiote kože[63], sve ostale vrste bakterija potječu iz egzogenih izvora. Identificirane vrste bakterija koje potječu iz egzogenih izvora dio su obitelji *Enterobacteriaceae* (*K. oxytoca, E. cloacae, P. agglomerans, E. coli, S. odorifera, S. marcescens*) te *Enterococcaceae* (*E. faecalis)*, što zapravo upućuje na njihovu povezanost s fiziološkom mikrobiotom crijeva čovjeka[63].

Ljudi oralnu higijenu najčešće vrše u vlastitim toaletima, u kojima je najčešće prisutna i WC školjka. Istraživanja su pokazala da moderni toaletni sustavi pri svakom puštanju vode stvaraju znatan aerosol[64 - 67]. On se stvara ne samo zbog puštanja vode pod pritiskom već i zbog miješanja zraka i vode, čime se stvaraju zračni mjehurići koji svojim pucanjem mogu bakterije s površinskog mikrosloja vode izbaciti u atmosferu i tako stvarati bioaerosol[68]. Bioaerosol nije sastavljen samo od kapljica već i od kapljičnih jezgri, tj. sadržaja kapljice koji je zbog evaporacije vode u stanju ostati trajno suspendiran u zraku[64, 67]. Osim perzistiranja u zraku, bioaerosol može kontaminirati i okolne površine slijeganjem pod utjecajem graviatacije. Neke vrste bakterija koje su izolirane u ovom istraživanju – poput *E. coli, K. oxytoca., P. aeruginosa* te *S. marcescens* – mogu preživjeti na površinama mjesecima[69]. S obzirom na vrstu i broj bakterija te njihovu iznimnu mogućnost zadržavanja i opstanka u biofilmu na površini WC školjke[65, 66, 70] evidentno je da moderni toaletni sustavi sadrže sve elemente za generaciju bioaerosola koji se širi zrakom te okolnim površinama toaleta[64 - 67, 71]. Kako identificirane bakterije bakterije nisu dio fiziološke mikrobiote usne šupljine čovjeka, morale su poteći iz nekog egzogenog izvora. Upravo bioaerosol jest jedan od mogućih načina kontaminacije; višestruki dokazi o stvaranju bioaerosolā nepobitni su, međutim pretragom baza *Cochrane library*, *Google scholar*, *Medline* te *Web of science* nije pronađeno nijedno istraživanje koje bi (za sada) egzaktno dokazalo tj. potvrdilo transfer bakterija bioaerosolom toaletnog sustava.

Istraživanja koja su također analizirala mikroorganizme s korištenih četkica za zube raspolažu različitim rezultatima; dokazana je prisutnost oralne fiziološke mikrobiote (*Streptococcus spp., Staphylococcus spp.*)[72 - 79], kao i nekih bakterija iz egzogenih izvora (*Escherichia spp., Klebsiella spp.*)[72, 74, 76, 77, 79]. *S. mutans* može se naći i na otvoru paste za

zube[78]. Ono u čemu se slažu sva istraživanja jest činjenica da četkice za zube podliježu retenciji bakterija u manjoj ili većoj mjeri[80, 81]; prekrivanje četkice zaštitnom kapicom nakon upotrebe može pospješiti rast *P. aeruginosa*[81], dok *E. cloacae* može preživjeti na četkici za zube i do 16 dana[82]. S obzirom na to da zakon ne nalaže da četkice za zube moraju biti isporučene u sterilnim pakiranjima, one također mogu doći već kontaminirane bakterijama i u tvorničkom pakiranju[75].

Klinički značaj ove studije potvrđuje dosadašnje upute organizacija poput *CDC*-a i *ADA*-e o korištenju četkicama za zube i njihovu skladištenju. Četkice za zube ne bi trebalo dijeliti s drugim osobama, nakon korištenja bi ih trebalo dobro isprati tekućom vodom te ih ne bi trebalo prekrivati zaštitnim kapicama, već ostaviti da se osuše na zraku[83, 84]. Važno je i naglasiti da je potrebno mijenjati četkice za zube novima nakon 3 do 4 mjeseca[83, 84] zbog njihove istrošenosti.



***Slika 9.*** *Elektronmikroskopski prikaz vlakana nove četkice (lijevo) u odnosu na istrošena vlakna četkice korištene 3 mjeseca (desno). Preuzeto iz* [85].

# 6. ZAKLJUČCI

Ciljevi ovog istraživanja su postignuti te iz njegovih rezultata se može utvrditi potvrda početne hipoteze kako bakterije uzgojene s korištenih četkica za zube u potpunosti nisu podrijetlom iz fiziološke mikrobiote ljudske usne šupljine. Također se dolazi i do sljedećih zaključaka:

- Većina izoliranih bakterija ne pripada fiziološkoj mikrobioti usne šupljine, već fiziološkoj mikrobioti crijeva čovjeka. Četkice za zube kontaminirane su spomenutim bakterijama uz pomoć nekog vanjskog izvora. Istraživanja upućuju da je transfer bioaerosolom toaletnog sustava moguća opcija.
- Nije pronađena statistički značajna razlika u nalazu, tj. zastupljenosti bakterijskih vrsta iz vanjskih izvora kod četkica koje su bile prekrivene zaštitnom kapicom u odnosu na one koje nisu.
- Utvrđen je znatno veći porast, tj. nalaz Gram negativnih u odnosu na Gram pozitivne bakterije.
- Kod četkica za zube korištenih od strane pušača nije pronađena statistički značajna razlika u nalazu, tj. zastupljenosti Gram pozitivnih odnosno Gram negativnih bakterija u odnosu na četkice nepušača.
- Istraživanjā ovog i sličnih motiva još je uvijek premalo da bi se sa sigurnošću moglo govoriti o činjenicama; ovo istraživanje kao pilot-studija obuhvatilo je manji broj uzoraka te zbog toga može poslužiti kao osnova budućim istraživanjima koja bi trebala obuhvatiti znatno veći broj uzoraka s eventualno naprednijom metodologijom u svrhu dokaza podrijetla bakterija.
- Pravilnim održavanjem četkica za zube pridonosimo oralnom zdravlju, kako pojedinca tako i zajednice u cjelini te zaustavljamo kolonizaciju usne šupljine potencijalno štetnim mikroorganizmima.

# 7. POPIS CITIRANE LITERATURE

**1.** Presečki V. Stomatološka mikrobiologija. 1. izdanje. Zagreb: Medicinska Naklada; 2009.

**2.** Sohn M, Ahn Y, Lee S. Assessment of Primitive Reflexes in High-risk Newborns. J Clin Med Res. 2011;3(6):285-290.

**3.** Schott J, Rossor M. The grasp and other primitive reflexes. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 2003;74(5):558-560.

**4.** Sutter V. Anaerobes as Normal Oral Flora. Clin Infect Dis. 1984;6(Supplement 1):S62-S66.

**5.** Samaranayake L. Essential microbiology for dentistry. 4th ed. Edinburgh: Churchill Livingstone Elsevier; 2012.

**6.** Dewhirst F, Chen T, Izard J, Paster B, Tanner A, Yu W et al. The Human Oral Microbiome. J Bacteriol. 2010;192(19):5002-5017.

**7.** Aas J, Paster B, Stokes L, Olsen I, Dewhirst F. Defining the Normal Bacterial Flora of the Oral Cavity. J Clin Microbiol. 2005;43(11):5721-5732.

**8.** HMP. Human Microbiome Project DACC - Microbiome Analyses [Internet]. Hmpdacc.org. [citirano 5 srpnja 2016]. Dostupno s: http://hmpdacc.org/micro_analysis/microbiome_analyses.php

**9.** HMP. Human Microbiome Project DACC - View Dataset: Body Site - Oral [Internet]. Hmpdacc.org. [citirano 5 srpnja 2016]. Dostupno s: http://hmpdacc.org/catalog/grid.php?dataset=genomic&hmp_isolation_body_site=oral

**10.** Wikipedia - The Free Enciclopedia. Oral ecology: Discovery and history [Internet]. Wikipedia. [citirano 5 srpnja 2016]. Dostupno s: https://en.wikipedia.org/wiki/Oral_ecology#Discovery_and_history

**11.** Wikipedia - The Free Enciclopedia. Antonie van Leeuwenhoek: Techniques and discoveries [Internet]. Wikipedia. [citirano 5 srpnja 2016]. Dostupno s: https://en.wikipedia.org/wiki/Antonie_van_Leeuwenhoek#Techniques_and_discoveries

**12.** Pommerville J. Fundamentals of microbiology. 10th ed. Burlington, MA: Jones & Bartlett Learning; 2014.

**13.** Meadow J, Altrichter A, Bateman A, Stenson J, Brown G, Green J et al. Humans differ in their personal microbial cloud. PeerJ. 2015;3:e1258.

**14.** Luckey T. Introduction to intestinal microecology. Am J Clin Nutr. 1972;25(12):1292-1294.

**15.** Whitman WB, Doleman DC, Wiebe WJ. Prokaryotes: the unseen majority. Proc Natl Acad Sci. 1998;95(12):6578-6583.

**16.** Sender R, Fuchs S, Milo R. Revised estimates for the number of human and bacteria cells in the body. bioRxiv. 2016;Epub ahead of print.

**17.** Taub B. How Much Bacteria Does The Human Body Really Contain? [Internet]. IFLScience. 2016 [citirano 5 srpnja 2016]. Dostupno s: http://www.iflscience.com/plants-and-animals/how-much-bacteria-does-human-body-really-contain/

**18.** Pennisi E. A Mouthful of Microbes. Science. 2005;307(5717):1899-1901.

**19.** Avila M, Ojcius D, Yilmaz Ö. The Oral Microbiota: Living with a Permanent Guest. DNA Cell Biol. 2009;28(8):405-411.

**20.** Hooper L, Gordon J. Commensal Host-Bacterial Relationships in the Gut. Science. 2001;292(5519):1115-1118.

**21.** Lindhe J, Lang N, Karring T. Clinical periodontology and implant dentistry. 5th ed. Oxford: Blackwell Munksgaard; 2008.

**22.** Yost S, Duran-Pinedo A, Teles R, Krishnan K, Frias-Lopez J. Functional signatures of oral dysbiosis during periodontitis progression revealed by microbial metatranscriptome analysis. Genome Med. 2015;7(1):27-45.

**23.** Ogrendik M. Rheumatoid arthritis is linked to oral bacteria: etiological association. Mod Rheumatol. 2009;19(5):453-456.

**24.** Sandhya P, Danda D, Sharma D, Scaria V. Does the buck stop with the bugs?: an overview of microbial dysbiosis in rheumatoid arthritis. Int J Rheum Dis. 2015;19(1):8-20.

**25.** Zhang X, Zhang D, Jia H, Feng Q, Wang D, Liang D et al. The oral and gut microbiomes are perturbed in rheumatoid arthritis and partly normalized after treatment. Nat Med. 2015;21(8):895-905.

**26.** Klein R, Dababneh A, Palraj B. Streptococcus gordonii prosthetic joint infection in the setting of vigorous dental flossing. BMJ Case Reports. 2015;bcr2015210695.

**27.** Yombi J, Belkhir L, Jonckheere S, Wilmes D, Cornu O, Vandercam B et al. Streptococcus gordonii septic arthritis : two cases and review of literature. BMC Infect Dis. 2012;12(1):215-219.

**28.** Nakano K, Hokamura K, Taniguchi N, Wada K, Kudo C, Nomura R et al. The collagen-binding protein of Streptococcus mutans is involved in haemorrhagic stroke. Nat Commun. 2011;2:Art. no. 485.

**29.** Tonomura S, Ihara M, Kawano T, Tanaka T, Okuno Y, Saito S et al. Intracerebral hemorrhage and deep microbleeds associated with cnm-positive Streptococcus mutans; a hospital cohort study. Sci Rep. 2016;6:Art. no. 20074.

**30.** Wu J, Peters B, Dominianni C, Zhang Y, Pei Z, Yang L et al. Cigarette smoking and the oral microbiome in a large study of American adults. ISME J. 2016;Epub ahead of print.

**31.** Health topics: Oral Health [Internet]. Who.int. 2016 [citirano 3 srpnja 2016]. Dostupno s: http://www.who.int/topics/oral_health

**32.** Oxilia G, Peresani M, Romandini M, Matteucci C, Spiteri C, Henry A et al. Earliest evidence of dental caries manipulation in the Late Upper Palaeolithic. Sci Rep. 2015;5:12150.

**33.** Wikipedia - The Free Enciclopedia. Chimpanzee: Anatomy and physiology [Internet]. Wikipedia. [citirano 6 srpnja 2016]. Dostupno s: https://en.wikipedia.org/wiki/Chimpanzee#Anatomy_and_physiology

**34.** Hank G. Why Do I Have to Brush My Teeth? [Internet] USA: SciShow; 2014. Dostupno s: https://www.youtube.com/watch?v=5HsTrg4OJPs

**35.** Wikipedia - The Free Enciclopedia. Life expectancy [Internet]. Wikipedia. [citirano 6 srpnja 2016]. Dostupno s: https://en.wikipedia.org/wiki/Life_expectancy

**36.** Ungar PS. Evolution of the human diet: The Known, the Unknown, and the Unknowable. 1st ed. Oxford: Oxford University Press; 2006.

**37.** Jew S, AbuMweis S, Jones P. Evolution of the Human Diet: Linking Our Ancestral Diet to Modern Functional Foods as a Means of Chronic Disease Prevention. J Med Food. 2009;12(5):925-934.

**38.** Šutalo J, Mervar M, Petolas D. Patologija i terapija tvrdih zubnih tkiva. 1. izdanje. Zagreb: Naklada Zadro; 1994.

**39.** Cummins D. Dental caries: a disease which remains a public health concern in the 21st century–the exploration of a breakthrough technology for caries prevention. J Clin Dent. 2013;24(Spec Iss A):1-14.

**40.** Casanova L, Hughes F, Preshaw P. Diabetes and periodontal disease: a two-way relationship. Br Dent J. 2014;217(8):433-437.

**41.** Mealey BL. Periodontal disease and diabetes. A two-way street. J Am Dent Assoc. 2008;137(Supplement):S26-S31.

**42.** Preshaw P, Alba A, Herrera D, Jepsen S, Konstantinidis A, Makrilakis K et al. Periodontitis and diabetes: a two-way relationship. Diabetologia. 2011;55(1):21-31.

**43.** Demmer RT, Desvarieux M. Periodontal infections and cardiovascular disease. The heart of the matter. J Am Dent Assoc. 2006;137(10):14-20.

**44.** Zoellner H. Dental Infection and Vascular Disease. Semin Thromb Hemost. 2011;37(03):181-192.

**45.** Nesse W, Dijkstra P, Abbas F, Spijkervet F, Stijger A, Tromp J et al. Increased Prevalence of Cardiovascular and Autoimmune Diseases in Periodontitis Patients: A Cross-Sectional Study. J Periodontol. 2010;81(11):1622-1628.

**46.** Vidović Juras D, Vučićević Boras V. Povezanost oralnog i općeg zdravlja. Medix. 2012;18(101/102):57-58.

**47.** Kursar S, Kolarec J, Kršek H, Dukić W. Prevalencija karijesa školske djece u Hrvatskoj u usporedbi s europskim zemljama – meta analiza. Sonda. 2014;15(28):58-61.

**48.** Ministarstvo Zdravlja Republike Hrvatske. Strateški plan promicanja i zaštite oralnog zdravlja 2015. - 2017. Zagreb: Vlada Republike Hrvatske; 2015 p. 4, 7-8.

**49.** Mishra G, Thakur S, Singhal P, Ghosh S, Chauhan D, Jayam C. Assessment of child behavior in dental operatory in relation to sociodemographic factors, general anxiety, body mass index and role of multi media distraction. J Indian Soc Pedod Prev Dent. 2016;34(2):159-164.

**50.** Tenuta L, Cury J. Fluoride: its role in dentistry. Braz oral res. 2010;24:9-17.

**51.** Cury J, Tenuta L. Enamel remineralization: controlling the caries disease or treating early caries lesions?. Braz oral res. 2009;23(Supplement 1):23-30.

**52.** Koenigs P, Faller R. Fundamentals of Dentifrice: Oral Health Benefits in a Tube [Internet]. Dentalcare.com. [citirano 3 srpnja 2016]. Dostupno s: http://www.dentalcare.com/en-US/dental-education/continuing-education/ce410/ce410.aspx?ModuleName=coursecontent&PartID=2&SectionID=1

**53.** Chlorhexidine Mechanism of Action [Internet]. Chlorhexidinefacts.com. [citirano 3 srpnja 2016]. Dostupno s: http://chlorhexidinefacts.com/mechanism-of-action.html

**54.** McBain A, Bartolo R, Catrenich C, Charbonneau D, Ledder R, Gilbert P. Effects of a Chlorhexidine Gluconate-Containing Mouthwash on the Vitality and Antimicrobial Susceptibility of In Vitro Oral Bacterial Ecosystems. Appl Environ Microbiol. 2003;69(8):4770-4776.

**55.** Ribeiro L, Hashizume L, Maltz M. The effect of different formulations of chlorhexidine in reducing levels of mutans streptococci in the oral cavity: A systematic review of the literature. J Dent. 2007;35(5):359-370.

**56.** Rosenberg M, Gelernter I, Barki M, Bar-Ness R. Day-Long Reduction of Oral Malodor by a Two-Phase Oil:Water Mouthrinse as Compared to Chlorhexidine and Placebo Rinses. J Periodontol. 1992;63(1):39-43.

**57.** Lemelson-MIT. Toothbrush beats out car and computer as the invention Americans can't live without, according to Lemelson-MIT Survey [Internet]. MIT News. 2003 [citirano 9 srpnja 2016]. Dostupno s: http://news.mit.edu/2003/lemelson

**58.** Legon J. CNN.com - Toothbrush trounces car as top invention - Jan. 22, 2003 [Internet]. Edition.cnn.com. 2003 [citirano 9 srpnja 2016]. Dostupno s: http://edition.cnn.com/2003/TECH/ptech/01/22/toothbrush.king

**59.** Zhou Z, Yu H, Zheng J, Qian L, Yan Y. Dental biotribology. 1st ed. New York: Springer; 2013.

**60.** Foundations of Polymer Science: Wallace Carothers and the Development of Nylon. [Internet]. American Chemical Society. [citirano 3 srpnja 2016]. Dostupno s: https://www.acs.org/content/acs/en/education/whatischemistry/landmarks/carotherspolymers.html

**61.** Voronets J, Jaeggi T, Buergin W, Lussi A. Controlled Toothbrush Abrasion of Softened Human Enamel. Caries Res. 2008;42(4):286-290.

**62.** Wiegand A, Schwerzmann M, Sener B, Carolina Magalhães A, Roos M, Ziebolz D et al. Impact of toothpaste slurry abrasivity and toothbrush filament stiffness on abrasion of eroded enamel – an in vitro study. Acta Odontol Scand. 2008;66(4):231-235.

**63.** Brooks G, Jawetz E, Melnick J, Adelberg E, Carroll K, Butel J et al. Jawetz, Melnick & Adelberg's medical microbiology. 26th ed. New York: McGraw-Hill; 2013.

**64.** Johnson D, Lynch R, Marshall C, Mead K, Hirst D. Aerosol Generation by Modern Flush Toilets. Aerosol Sci Technol. 2013;47(9):1047-1057.

**65.** Barker J, Jones MV. The potential spread of infection caused by aerosol contamination of surfaces after flushing a domestic toilet. J Appl Microbiol. 2005;99(2):339-347.

**66.** Gerba CP, Wallis C, Melnick JL. Microbiological hazards of household toilets: droplet production and the fate of residual organisms. Appl Microbiol. 1975;30(2):229-237.

**67.** Johnson DL, Mead KR, Lynch RA, Hirst DV. Lifting the lid on toilet plume aerosol: A literature review with suggestions for future research. Am J Infect Control. 2013;41(3):254-258.

**68.** Blanchard DC, Syzdek L. Mechanism for the water-to-air transfer and concentration of bacteria. Science. 1970;170(3958):626-628.

**69.** Kramer A, Schwebke I, Kampf G. How long do nosocomial pathogens persist on inanimate surfaces? A systematic review. BMC Infect Dis. 2006;6:130-137.

**70.** Barker J, Bloomfield SF. Survival of Salmonella in bathrooms and toilets in domestic homes following salmonellosis. J Appl Microbiol. 2000;89(1):137-144.

**71.** Best EL, Sandoe JA, Wilcox MH. Potential for aerosolization of Clostridium difficile after flushing toilets: the role of toilet lids in reducing environmental contamination risk. J Hosp Infect. 2012;80(1):1-5.

**72.** Karibasappa GN, Nagesh L, Sujatha BK. Assessment of microbial contamination of toothbrush head: An in vitro study. Indian J Dent Res. 2011;22(1):2-5.

**73.** Malmberg E, Birkhed D, Norvenius G, Norén J, Dahlén G. Microorganisms on toothbrushes at day-care centers. Acta Odontol Scand. 1994;52(2):93-98.

**74.** Frazelle Munro C. Toothbrush Contamination: A Review of the Literature. Nurs Res Pract. 2012:1-6.

**75.** Glass RT, Lare MM. Toothbrush contamination: a potential health risk? Quintessence Int. 1986;17(1):39-42.

**76.** Verran J, Leahy-Gilmartin AA. Investigations into the microbial contamination of toothbrushes. Microbios. 1996;85(345):231-238.

**77.** Ferreira C, Savi G, Panatto A, Generoso J, Barichello T. Microbiological evaluation of bristles of frequently used toothbrushes. Dental Press J Orthod. 2012;17(4):72-76.

**78.** Svanberg M. Contamination of toothpaste and toothbrush by Streptococcus mutans. Eur J Oral Sci. 1978;86(5):412-414.

**79.** Taji SS, Rogers AH. ADRF Trebitsch Scholarship. The microbial contamination of toothbrushes. A pilot study. Aust Dent J. 1998;43(2):128-130.

**80.** Richards D. How clean is your toothbrush?. Evid Based Dent. 2012;13(4):111-111.

**81.** Mehta A, Sequeira PS, Bhat G. Bacterial contamination and decontamination of toothbrushes after use. N Y State Dent J. 2007;73(3):20-22.

**82.** Gaviria PA, Rosales HL, Contreras A. Contaminacion in vitro de cepillos dentales. Rev Estomatol. 2001;9(2):14-20.

**83.** Center for Diesease Control. CDC - Toothbrushes - Fact Sheets - Infection Control in Dental Settings - Oral Health [Internet]. Cdc.gov. [citirano 13 srpnja 2016]. Dostupno s: http://www.cdc.gov/OralHealth/infectioncontrol/factsheets/toothbrushes.htm

**84.** American Dental Association. Toothbrush Care: Cleaning, Storing and Replacement [Internet]. Ada.org. [citirano 13 srpnja 2016]. Dostupno s: http://www.ada.org/en/about-the-ada/ada-positions-policies-and-statements/statement-on-toothbrush-care-cleaning-storage-and

**85.** Krasnow B. Your toothbrush is worn.out! [Internet]. USA: Applied Science; 2015. Dostupno s: https://www.youtube.com/watch?v=cwN983PnJoA

# 8. SAŽETAK

**Naslov istraživanja:** Identifikacija i klasifikacija mikroorganizama s korištenih četkica za zube

**Uvod:** Oralna je higijena praksa pojedinca u održavanju zuba i usne šupljine čistima u svrhu prevencije oralnih bolesti. Četkica za zube najraširenija je, najprihvaćeniji i najkorišteniji instrument u održavanju oralne higijene. Svakodnevnom upotrebom na površini vlakana četkice mogu zaostati različiti mikroorganizmi.

**Cilj istraživanja:** Identifikacija i klasifikacija mikroorganizama s korištenih četkica za zube te određivanje spadaju li oni u fiziološku mikrobiotu ljudske usne šupljine ili su pak naneseni iz drugih izvora.

**Metode i meterijali:** Četkice za zube uzete su od osoba obaju spolova pod uvjetom da su korištene jednako ili više od 30 dana. Glave četkica otpiljene su te uronjene u tekući hranjivi medij. Iz medija su nasađene na univerzalni i kromogeni agar te su inkubirane na 24 – 48 sati. Naknadna identifikacija napravljena je u skladu sa standardnim postupcima koji se koriste u mikrobiologiji.

**Rezultati:** Identificirano je ukupno 9 različitih bakterijskih vrsta s 14 četkica: *Klebsiella oxytoca, Enterobacter cloacae, Pantoea agglomerans, Pseudomonas aeruginosa, Escherichia coli, Serratia odorifera, Serratia marcescens, Enterococcus faecalis, Staphylococcus sppecies* (koagulaza negativni). Kod četkica pušača nije pronađena statistički značajna razlika ($p > 0,05$) u nalazu, tj. zastupljenosti Gram pozitivnih odnosno Gram negativnih bakterija u odnosu na četkice nepušača ($X^2 = 1,938$, $df = 1$, $p = 0,1638$). Statistički značajna razlika nije pronađena ($p > 0,05$) ni u zastupljenosti bakterijskih vrsta iz egzogenih izvora kod četkica koje su bile prekrivene zaštitnom kapicom u odnosu na one koje nisu ($X^2 = 1,077$, $df = 1$, $p = 0,2994$). U životnom stilu i ostalim navikama ispitanici se nisu razlikovali.

**Zaključak:** Dominacija Gram negativnih bakterija koje pripadaju fiziološkoj mikrobioti crijeva čovjeka upućuje na kontaminaciju četkica iz vanjskih izvora. Jedna je od mogućnosti jest transfer bioaerosolom kojeg stvaraju suvremeni toaletni sustavi. Potrebna su naprednija istraživanja s većim brojem uzoraka kako bi se dokazalo podrijetlo pronađenih bakterija.

**Ključne riječi:** četkica za zube, kontaminacija, oralna flora, oralna mikrobiota, oralna higijena, bioaerosol

# 9. SUMMARY

**Research title:** Identification and classification of microorganisms from used toothbrushes

**Introduction:** Oral hygiene is one's practice of keeping his teeth and mouth cavity clean in order of prevention of oral diseases. Toothbrush is the world's most common, most accepted and most used instrument for oral hygiene. Its everyday usage results in leftover microorganisms on the surface of the bristles.

**Research objectives:** To identify and classify microorganisms from used toothbrushes and to define whether they are part of physiological oral microbiota or their origin is from another source.

**Methodes and materials:** Toothbrushes were taken from persons of both sexes with a condition that they used them for 30 days or more. Heads of the toothbrushes were sawn off and dipped in liquid nutrient-rich media. Microorganisms from the media were placed on an universal and cromogenic agar plates and incubated for 24 to 48 hours. Further identification has been made in accordance with standard procedures used in microbiology.

**Results:** 9 different bacterial species were identified from 14 toothbrushes: *Klebsiella oxytoca, Enterobacter cloacae, Pantoea agglomerans, Pseudomonas aeruginosa, Escherichia coli, Serratia odorifera, Serratia marcescens, Enterococcus faecalis, Staphylococcus sppecies* (coagulase negative). There was no significant statistical difference found ($p > 0,05$) in presence of Gram positive or Gram negative bacteria found on toothbrushes from smokers in relation to toothbursches from non-smokers ($X^2 = 1,938$, $df = 1$, $p = 0,1638$). Also, no significant statistical difference ($p > 0,05$) in presence of bacterial species from other sources was found on toothbrushes covered with a safety cap in relation to those that weren't ($X^2 = 1,077$, $df = 1$, $p = 0,2994$). There were no difference in other participant's habits or lifestyle.

**Conclusions:** Domination of Gram negative bacteria that belong to human physiological gut microbiota indicates that contamination of toothbrushes from other sources has taken place. One of the possibilities is the transfer via bioaerosol generated by toilet systems. Further and more advanced research with a greater number of samples is needed in order to establish firm evidence of origin of the mentioned bacteria.

**Keywords:** toothbrush, contamination, oral flora, oral micribiota, oral hygiene, bioaerosol

# 10. ŽIVOTOPIS

**Ime i prezime:** Roko Duplančić

**Datum i mjesto rođenja:** 14. travnja 1992., grad Split, Republika Hrvatska

**Državljanstvo:** Hrvatsko

**Adresa stanovanja:** Pazdigradska 15, 21000 Split, Republika Hrvatska

**E-mail adresa:** roko.duplancic@gmail.com

**Obrazovanje:**

1998. – 2006. Osnovna škola „Pujanki“

2006. – 2010. Srednja škola: opća gimnazija „Vladimir Nazor“

2010. – 2016. Sveučilište u Splitu, Medicinski Fakultet: integrirani preddiplomski i diplomski sveučilišni studij Dentalne medicine

**Ostala edukacija:**

2014. *3M ESPE & HKDM*: *Božić u Zagrebu* (osvojeno 2. mjesto za poster prezentaciju), Zagreb

2014. *IVOCLAR VIVADENT ICDE*: *New trends in aesthetic & restorative dentistry*, Schaan

2015. *IVOCLAR VIVADENT & NOBEL BIOCARE*: *Competence in esthetics,* Wien

2016. *DENTUM MEDICAL*: *Najčešće tehnike šivanja kod malih kirurških zahvata u dentalnoj medicini*, Split

**Radno iskustvo:**

2014. – 2016. *Sveučilište u Splitu, Medicinski Fakultet, Katedra za restaurativnu dentalnu medicinu i endodonciju*, Split: Demonstrator

2015. – 2016. *Sveučilište u Splitu, Medicinski Fakultet, studentska organizacija Zubolina*, Split: Suosnivač, član predsjedništva i aktivni član organizacije

2016. *Poliklinika Aesthetica,* Zagreb: Stomatološki asistent

**Posebne nagrade i priznanja:**

*Sveučilište u Splitu, Medicinski Fakultet*: Dekanova nagrada za izniman uspjeh u akademskoj godini 2012./2013.

*Sveučilište u Splitu*: Rektorova nagrada za izvrsnost u akademskoj godini 2015./2016.

*Sveučilište u Splitu, Medicinski Fakultet, studentska organizacija Zubolina*: Posebno priznanje za izniman doprinos u osnivanju, financiranju i potpori radu organizacije u akademskoj godini 2015./2016.

**Jezici:**

Hrvatski jezik (materinski),

Engleski jezik (C1 razina),

Španjolski jezik (A1 razina)

**Hobiji:** Teretana, automehanika, nautika, ronjenje, fotografija, rad na računalu, kino i kazalište