



FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

Tema:

PCR de punto final para la detección de *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium* aislados en cepillos dentales de estudiantes en la facultad de odontología de la Universidad Hemisferios en el periodo académico 2021 – 2022.

Trabajo de titulación para la obtención del Título de odontólogo

Presentado por:

Est. Deneb Sarahí Alvarez Rosero

Tutor:

Dra. Maria Cristina Rockenbach Binz Ordóñez

Cotutor:

Dra. Andrea Morales Huachi

Colaborador:

Ing. Estefany Jarrín

Quito, Diciembre 12 del 2023

Resumen

Introducción: El cepillado dental es uno de los factores más importantes para mantener una buena higiene oral. Muchos estudios han demostrado que este objeto se contamina con múltiples bacterias, pero no se ha mencionado a microorganismos de contaminación fecal. Es común que los cepillos dentales permanezcan en el sanitario, por ende, el objetivo de este estudio es comprobar la presencia de *E. faecalis* y *E. faecium*, en cepillos dentales.

Materiales y métodos: Se recolectaron 150 cepillos dentales de estudiantes de la Universidad Hemisferios. Cada muestra fue sembrada en un caldo de cultivo para Enterococos, de las muestras que mostraron crecimiento se realizó un asilamiento de colonias bacterianas en agar nutritivo. Posterior a ello, se realizó PCR para identificar con certeza la especie de Enterococos presentes en los cepillos dentales.

Resultados: Se encontró que el 40,66% de las muestras presentaron bacterias del género *Enterococcus*. De las cuales el 54,01% de muestras correspondían a cepillos contaminados con *E. faecalis*, y el 11,48% a cepillos con *E. faecium*.

Conclusión: Se concluyó que *E. faecalis* y *E. faecium* están presentes en cepillos dentales indicando contaminación fecal en los mismos.

Palabras clave: Contaminación fecal, cepillo dental, *E. faecalis*, *E. faecium*, reacción en cadena de polimerasa.

DECLARACIÓN DE ACEPTACIÓN DE NORMA ÉTICA Y DERECHOS

El presente documento se ciñe a las normas éticas y reglamentarias de la Universidad de Los Hemisferios. Así, declaro que lo contenido en este ha sido redactado con entera sujeción al respeto de los derechos de autor, citando adecuadamente las fuentes. Por tal motivo, autorizo a la Biblioteca a que haga pública su disponibilidad para lectura dentro de la institución, a la vez que autorizo el uso comercial de mi obra a la Universidad de Los Hemisferios, siempre y cuando se me reconozca el cuarenta por ciento (40%) de los beneficios económicos resultantes de esta explotación. Además, me comprometo a hacer constar, por todos los medios de publicación, difusión y distribución, que mi obra fue producida en el ámbito académico de la Universidad de Los Hemisferios.

De comprobarse que no cumplí con las estipulaciones éticas, incurriendo en caso de plagio, me someto a las determinaciones que la propia Universidad plantee.

Nombre: Deneb Sarahí Álvarez Rosero

C.I: 1719801928

Firma del postulante:



Firmado electrónicamente por:
DENEB SARAHI
ALVAREZ ROSERO

Dedicatoria

Agradezco primeramente a Dios por permitirme culminar esta etapa de mi vida profesional, que sin duda alguna ha sido una grata experiencia.

Este trabajo de titulación se lo dedico a mi padre, él me ha visto crecer y formarme como la profesional que aspiro ser, además de brindarme su apoyo incondicional en cada paso. Así también se lo dedico a mi madre que me ha dado la fuerza y valentía para seguir adelante y no rendirme bajo ninguna circunstancia. Y finalmente este objetivo alcanzado también se los dedicó a mis hermanas que han acompañado en ese arduo camino y han sido un ejemplo para culminar esta carrera universitaria.

Agradezco a la Dra. Andrea Morales por darme la iniciativa para poder realizar esta investigación. Agradezco a la Ing. Estefany Jarrín por guiarme y asesorarme para manejar una investigación in vitro. De igual manera agradezco a la Dra. Cristina Rockenbach por todo su apoyo en el desarrollo de la presente investigación.

Índice

Temas	Páginas
Resumen	6
Introducción.....	8
Materiales y métodos.....	10
Resultados.....	13
Discusión.....	17
Conclusión.....	19
Referencias.....	20

“PCR de punto final para la detección de *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium* aislados en cepillos dentales de estudiantes en la facultad de odontología de la Universidad Hemisferios en el periodo académico 2021 – 2022”

Nombres y apellidos: Deneb Sarahí Alvarez Rosero

Filiación académica: Universidad Hemisferios

Correo electrónico: dsalvarezr@estudiantes.uhemisferios.edu.ec

Resumen

Introducción: El cepillado dental es uno de los factores más importantes para mantener una buena higiene oral. Muchos estudios han demostrado que este objeto se contamina con múltiples bacterias, pero no se ha mencionado a microorganismos de contaminación fecal. Es común que los cepillos dentales permanezcan en el sanitario, por ende, el objetivo de este estudio es comprobar la presencia de *E. faecalis* y *E. faecium*, en cepillos dentales. **Materiales y métodos:** Se recolectaron 150 cepillos dentales de estudiantes de la Universidad Hemisferios. Cada muestra fue sembrada en un caldo de cultivo para Enterococos, de las muestras que mostraron crecimiento se realizó un asilamiento de colonias bacterianas en agar nutritivo. Posterior a ello, se realizó PCR para identificar con certeza la especie de Enterococos presentes en los cepillos dentales. **Resultados:** Se encontró que el 40,66% de las muestras presentaron bacterias del género *Enterococcus*. De las cuales el 54,01% de muestras correspondían a cepillos contaminados con *E. faecalis*, y el 11,48% a cepillos con *E. faecium*. **Conclusión:** Se concluyó que *E. faecalis* y *E. faecium* están presentes en cepillos dentales indicando contaminación fecal en los mismos.

Palabras clave: Contaminación fecal, cepillo dental, *E. faecalis*, *E. faecium*, reacción en cadena de polimerasa.

Abstract

Introduction: Toothbrushing is a crucial factor in maintaining good oral hygiene. Numerous studies have demonstrated that toothbrushes harbor various bacteria, yet little attention has been given to fecal contamination microorganisms. Given that toothbrushes are often stored in bathrooms, this study aims to investigate the presence of *E. faecalis* and *E. faecium* in toothbrushes. **Materials and Methods:** We collected 150 toothbrushes from students at the Hemisferios University. Each sample was cultured in an Enterococcus broth, and from the samples showing growth, bacterial colonies were isolated on nutrient agar. Subsequently, PCR was performed to accurately identify the Enterococcus species present in the toothbrushes. **Results:** It was found that 40.66% of the samples exhibited bacteria of the Enterococcus genus. Among these, 54.01% of the samples were contaminated with *E. faecalis*, and 11.48% with *E. faecium*. **Conclusion:** The study concludes that *E. faecalis* and *E. faecium* are present in toothbrushes, indicating fecal contamination.

Keywords: Fecal contamination, toothbrush, *E. faecalis*, *E. faecium*, polymerase chain reaction.

Introducción

La salud oral es un factor importante para mantener y contribuir el bienestar general y calidad de vida de un individuo. Existen más de 700 especies de microorganismos colonizadores en boca, siendo así, el microbioma bucal uno de los más importantes y complejos en el cuerpo humano (Peng et al., 2022). Dentro de esta microflora oral, tenemos microorganismos comensales, los cuales ayudan a mantener un equilibrio homeostático en dicho medio, también existen bacterias patógenas que hacen posible el desarrollo de infecciones oportunistas en condiciones vulnerables. Por lo tanto, es esencial mantener una adecuada higiene oral (Ganesh et al., 2022). Además, la odontología integral desempeña un papel clave para diagnosticar patologías sistémicas, por tal motivo la cavidad oral debe mantener una buena higiene (Bui et al., 2019).

El cepillado dental es el método más efectivo para controlar la microflora, deshacer el biofilm bacteriano y mantener la higiene oral. Debido a su función de removedor de placa bacteriana, el cepillo puede convertirse en un reservorio de bacterias propias de cavidad oral y también del ambiente en el que se encuentran (Naik et al., 2015), de manera que un cepillo dental con bacterias patógenas en vez de favorecer a la buena salud puede llegar a ser un foco de infección.

El cepillo dental se puede contaminar mediante aerosoles, debido a esto y dado que muchas personas guardan su cepillo dental en el sanitario, bacterias de contaminación fecal pueden llegar a colonizarlo (Suzuki et al., 2012). A pesar de que existen diferentes técnicas de cepillado dental que se han descrito en la literatura odontológica, ninguna de ellas especifica el adecuado uso y almacenamiento del cepillo para evitar contaminación fecal (Acosta-Andrade et al., 2021; Asquino & Villarnobo, 2019).

Enterococcus faecalis y *Enterococcus faecium* son las bacterias más representativas del género *Enterococcus* que pueden llegar a causar infecciones, siendo las responsables del 8% al 9% de las infecciones que ocurren en el torrente sanguíneo (López-Luis et al., 2021). Además, las bacterias del género *Enterococcus* son la tercera causa más común de la enfermedad infecciosa letal conocida como endocarditis bacteriana. Cuando ocurre una endocarditis bacteriana debido a este género de bacterias, el 90-97% tiene como agente infeccioso a *E. faecalis* (Herrera-Hidalgo et al., 2020), la cual es una bacteria que se puede transmitir de individuo a individuo o mediante fómites, de manera que puede estar presente en cavidad oral, e incluso viajar al torrente sanguíneo (Shobo et al., 2022; Suzuki et al., 2012).

La formación de aerosoles durante el uso del inodoro y un almacenamiento incorrecto del cepillo, aumentan la posibilidad de contaminación de *E. faecalis* y *E. faecium*, representando un riesgo para la salud del individuo. Por tal motivo, el objetivo del presente estudio es identificar la presencia de *E. faecalis* y *E. faecium* mediante una reacción en cadena de polimerasa de punto final en cepillos dentales de estudiantes en la facultad de odontología de la Universidad Hemisferios en el periodo académico 2021 – 2022. Todo esto con la finalidad de poder registrar la presencia de bacterias patógenas en el cepillo dental, que pueden llegar a causar infecciones graves como lo es la endocarditis infecciosa.

Materiales y métodos

Se presenta un estudio descriptivo-experimental donde se recolectaron 150 cepillos dentales de estudiantes de la facultad de Odontología de la Universidad Hemisferios durante el periodo académico 2021 – 2022. Cada participante llenó un consentimiento informado para formar parte de este estudio, además se realizó una encuesta para obtener datos de los participantes, todo esto con la aprobación del comité de ética de la Universidad Hemisferios.

Se incluyeron participantes de ambos géneros, entre 18 a 40 años de edad, sin enfermedades sistémicas, sin uso de aparatología removible y con un uso mínimo de 2 meses de su cepillo dental. Se recolectaron las muestras en fundas de esterilización y fueron almacenadas a una temperatura de 4 °C, para su posterior uso.

Las cabezas de los cepillos fueron cortadas con una hoja de bisturí y sembradas bajo condiciones estériles en un caldo de cultivo para enterococos Chromocult® 1.10294 Merck Millipore. Los frascos con caldo fueron incubados durante 24 horas a 37 °C.

Las muestras positivas que presentaron una coloración azul verdosa en el caldo de cultivo fueron separados para transferir 100 µL a cajas con agar nutritivo, usando puntas para micropipeta estériles. Las cajas fueron incubadas por 24 horas a 37 °C. Los cultivos con crecimiento masivo fueron resembrados para el aislamiento de colonias en agar nutritivo e incubadas durante 24 h a 37 °C para obtener cultivos puros.

Las muestras aisladas fueron procesadas mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de punto final para la identificación de *E. faecalis* y *E. faecium* (Harwood et al., 2004). La PCR de la célula completa fue realizada a partir de colonias aisladas 24 horas antes en un termociclador de gradiente SimpliAmp (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Una colonia

de cada muestra fue transferida con una aguja de siembra estéril a la mezcla de PCR para *E. faecalis*, la que contenía los siguientes componentes en agua ultrapura: GoTaq® Green Master Mix (1X), coadyuvante Dimetil Sulfoxido (4%) y cada primer (0.1 µM). Los primers específicos para *E. faecalis* y *E. faecium* fueron sintetizados por Macrogen (Seúl, Corea del Sur). Los primers para *E. faecalis* (E1, 5'-ATC AAG TAC AGT TAG TCT-3' y E2, 5'-ACG ATT CAA AGC TAA CTG-3') están dirigidos al gen *ddl* que codifica para la proteína D-Ala ligasa y que produce un fragmento de ADN de 941 pares de bases (Dutka-Malen et al., 1995). Para la PCR de *E. faecium* se transfirió una colonia de cada muestra a la mezcla que contenía los siguientes componentes en agua ultrapura: GoTaq® Green Master Mix (1X) y cada primer (0.1 µM). Los primers para *E. faecium* (EM1A, 5'-TTG AGG CAG ACC AGA TTG ACG-3' y EM1B, 5'-TAT GAC AGC GAC TCC GAT TCC-3') producen un fragmento de ADN de 658 pares de bases, fue diseñado por sustracción hibridación, y se desconoce el gen/ADN diana (Cheng et al., 1997). La especie *E. faecalis* ATCC 29212 fue empleada para la optimización de la PCR y como control positivo.

El programa de PCR para *E. faecalis* fue una modificación del programa usado por Harwood et al. (2004): desnaturalización inicial y lisis celular a 94°C por 10 min durante 1 ciclo, seguido de 40 ciclos de desnaturalización a 94°C por 1 min, hibridación a 51°C por 1min, extensión a 72°C por 1 min, y extensión final a 72°C por 10 min durante 1 ciclo. El programa de PCR para *E. faecium* fue realizado según lo descrito por Harwood et al. (2004): desnaturalización inicial y lisis celular a 95°C por 10 min durante 1 ciclo, seguido de 40 ciclos de desnaturalización a 94°C por 1 min, hibridación a 55 °C por 1min, extensión a 72°C por 1 min, y extensión final a 72°C por 8 min durante 1 ciclo. Los productos de PCR fueron revelados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% (Promega, Madison, WI, USA) y visualizados en

un transiluminador de luz azul (Invitrogen, Waltham, MA, USA). Los resultados obtenidos fueron recolectados en tablas específicamente diseñadas para ello y posteriormente analizados mediante estadística descriptiva en el programa SPSS.

Resultados

De los 150 participantes, 59 fueron del sexo masculino, mientras que 91 participantes fueron del sexo femenino. La edad de los participantes en promedio fue de 22 años. Se confirmó la contaminación fecal en cepillos dentales debido a la presencia de bacterias del género *Enterococcus* en el 40,66% (61/150) de muestras analizadas mediante el caldo de cultivo, es decir, un total de 61 cepillos dentales presentaron cambio de coloración en el caldo de cultivo para enterococos Chromocult® 1.10294 Merck Millipore, y crecimiento en agar nutritivo, como lo muestra la **Figura 1** y Figura 2.



Figura 1. Resultados en caldo de cultivo Chromocult. Se muestran varias muestras después de su incubación A: muestras positivas con coloración azul verdosa. B: muestras negativas con coloración amarilla.

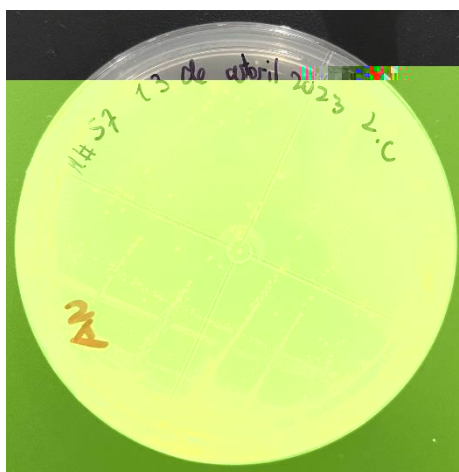


Figura 2. Crecimiento de bacteria en agar Nutritivo. Muestra N° 57 sembrada en agar nutritivo.

De las 61 muestras que mostraron crecimiento de *Enterococos* spp, se realizaron dos PCR de punto final con los respectivos primers de *E. faecalis* y *E. faecium* para identificar la especie de cada muestra. Se encontró que el 54,09% (33/61) de muestras presentó un fragmento de 941 pb correspondientes al gen *ddl* presente en *E. faecalis* (Figura 3). En el caso de *E. faecium*, únicamente el 11,48% (7/61) de las muestras presentaron un fragmento de 658 pb correspondientes al fragmento de primers específicos para esta especie (Figura 4). La tabla 1 especifica los resultados de la PCR.

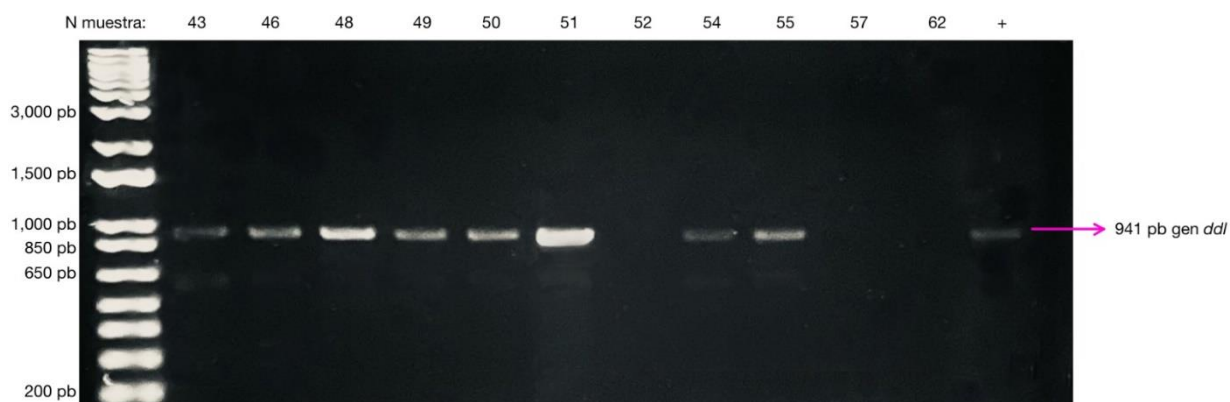


Figura 3. Gel de agarosa. Electroforesis de PCR *E. faecalis* de Muestras N°: 43, 46, 48, 49, 50, 51, 52, 54, 55, 57, 62. Control positivo (+) de *E. faecalis*.

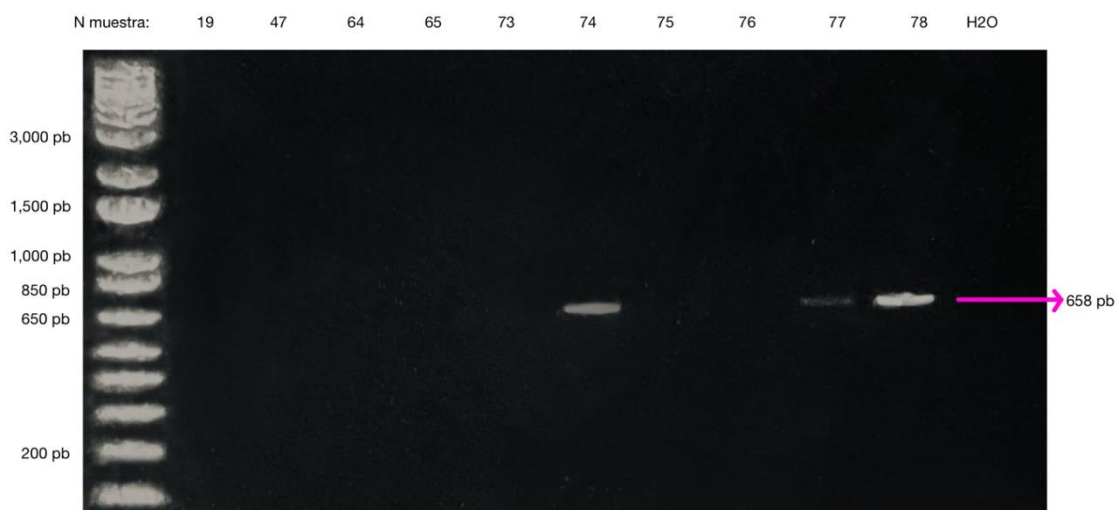


Figura 4. Gel de agarosa. Electroforesis de PCR *E. faecium* de Muestras N°: 19, 47, 64, 65, 73, 74, 75, 76, 77, 78. Control negativo (H2O): agua ultrapura.

Tabla 1. Resultado de PCR para *E. faecalis* y *E. faecium* de las muestras que presentaron crecimiento en caldo de cultivo para *Enterococos spp.*

Por otro lado, el 6,56% (4/61) de las muestras presentaron resultados inconsistentes debido al resultado positivo para ambas bacterias, debido probablemente a la presencia de dos especies de *Enterococcus* en un solo cultivo o al diseño de los primers utilizados para *E. faecalis*. Además, el 27,87% (17/61) de las muestras analizadas resultaron ser otras especies de bacterias ya que no presentaron el fragmento de ADN esperado correspondiente a *E. faecalis* ni a *E. faecium*, a pesar de haber presentado un resultado positivo para el caldo de cultivo de enterococos. La Tabla 1 especifica las 61 muestras positivas para el caldo de cultivo de Enterococos y su resultado en cada una de las PCR para identificar su especie. De las encuestas realizadas a los participantes se encontró que las 40 muestras contaminadas con *E. faecalis* o *E. faecium* se almacenaron en el sa25 Tf000051122(e)ur(pondiearua o.r(e)cen

Resultado encuesta gingivitis y/o periodontitis		
	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecium</i>
Solo gingivitis	11	3
Solo periodontitis	0	0
Ambas	2	3
Ninguna	20	1
TOTAL	33	7

Tabla 2. Resultado de la encuesta en cuanto a presencia de gingivitis o periodontitis de las muestras contaminadas con *E. faecalis* y *E. faecium*.

Discusión

Se evidenció la contaminación fecal mediante la presencia de *E. faecalis* y *E. faecium* en cepillos dentales, coincidiendo con varios autores en que debido al uso y manipulación en boca, el cepillo dental está expuesto a contaminación bacteriana, siendo un riesgo para la salud oral (Frazelle & Munro, 2012; Glass & Lare, 1986). Se ha comprobado que los aerosoles fecales son capaces de contaminar las superficies y objetos cercanos al inodoro (Luo et al., 2023), e incluso, se ha demostrado que las cerdas de los cepillos retienen microorganismos y los mantienen vivos (Bunetel et al., 2000). Esto quiere decir que los cepillos dentales almacenados en el sanitario pueden ser colonizados por bacterias fecales, tal como se evidenció en los resultados de este estudio. En la contaminación de cepillos dentales se han aislado diversas especies microbianas, sin embargo, no se nombra, ni se les toma en cuenta a las especies indicadoras de contaminación fecal (Ankola et al., 2009; Blaustein et al., 2021; Karibasappa et al., 2011).

En el presente estudio, se tomó en cuenta la presencia de *E. faecalis* y *E. faecium*, debido a que son bacterias indicadoras de contaminación fecal y no se ha especificado su influencia en la salud oral. Weiner y colaboradores (2016) afirman que los *Enterococcus* son patógenos que pueden causar infecciones nosocomiales, y son la tercera causa más común de endocarditis infecciosa (EI). En una EI causada por *Enterococcus*, el 90-97% se debe a *E. faecalis* (López-Luis et al., 2021). Por lo que, si existen bacterias de dicho género en el cepillo dental existe el riesgo de contraer una infección. Por otro lado, Martins y colaboradores (2023) mencionan que, existe 28% de incidencia de bacteriemia causada por una profilaxis, 16% ocasionada luego del uso del hilo dental y de 8% a 26% después del cepillado dental. Con la presencia de estas bacterias en el torrente sanguíneo, el riesgo de contraer una endocarditis bacteriana aumenta.

Sin embargo, Zhang et al. (2013) no encontró correlación para ningún parámetro y magnitud de bacteriemia total después de usar el hilo dental o raspado y alisado radicular, así mismo, indicó que, al reducir los factores de riesgo como mala higiene oral, enfermedades sistémicas y, edad avanzada, se disminuye significativamente el riesgo de producir una bacteriemia por procedimientos dentales. Entendiendo que el riesgo de contraer una bacteriemia y posteriormente una EI debido a la presencia de *E. faecalis* en el cepillo dental es bajo, no se puede decir que es nulo. El uso de un cepillo de dientes con contaminación fecal bajo ningún motivo es recomendable para mantener una buena salud oral.

Para identificar con certeza la presencia de una especie microbiológica, el método más utilizado es la reacción en cadena de polimerasa (PCR) ya que permite identificar de manera específica un fragmento de ADN propio o diferenciador de un microorganismo (Apte & Daniel, 2009). En el presente estudio se confirmó la presencia de dos especies de *Enterococcus*, sin embargo, también se obtuvo un fragmento de ADN adicional inespecífico, en la PCR de *E. faecalis*. Probablemente esto sucedió debido al diseño de primers, un primer mal sintetizado da como resultado muy poca o nula cantidad de producto, o puede llevar a una amplificación inespecífica o formación de dímeros (Apte & Daniel, 2009). Por lo que, para procedimientos futuros, se recomienda utilizar primers con un diseño óptimo y específicos para el segmento de ADN diana. Por otro lado, también se recomienda ampliar el número de muestra para poder realizar análisis estadísticos con más relevancia para la población, ya que en el presente estudio el número de muestra no fue muy significativo para afirmar que gran parte de la población tiene su cepillo dental con *E. faecalis*. De igual manera, para investigaciones futuras se recomienda analizar la virulencia de *E. faecalis* aislado de cepillos dentales para evaluar el riesgo de contraer una EI o alguna otra infección debido al cepillo dental con contaminación fecal.

Tomando en cuenta todo lo analizado anteriormente, los profesionales de la salud en el ámbito oral deberían capacitar a sus pacientes para poder llevar un adecuado uso y almacenamiento del cepillo dental. Una de las mejores opciones estudiada por varios autores es la desinfección del cepillo dental, se ha demostrado que el peróxido de hidrógeno e hipoclorito de sodio al 0.5% reducen significativamente la adherencia de microorganismos, como *E. faecalis* en el cepillo dental (D'Ercole et al., 2020), dando como resultado poca carga bacteriana. Se recomienda cambiar el cepillo dental cada tres meses y/o después de contraer una infección viral, debido a que bajo estos dos factores la presencia de microorganismos aumenta considerablemente. Se debe dar la importancia a estos temas para evitar problemas de salud. (Twumwaa Hannah et al., 2021).

Conclusión

Se concluyó que *E. faecalis* y *E. faecium* están presentes en cepillos dentales indicando contaminación fecal en los mismos.

Referencias

- Acosta-Andrade, A., David-Solórzano, J., Pico-Sornoza, A., Sinchiguano-Quinto, K., & Zambrano-Torres, J. (2021). Correcto cepillado dental en niños. *Revista Científica Arbitrada En Investigaciones de La Salud GESTAR*, 4(7), 2–22.
<https://doi.org/10.46296/gt.v4i7.0018>
- Ankola, A., Hebbal, M., & Eshwar, S. (2009). How clean is the toothbrush that cleans your tooth? *International Journal of Dental Hygiene*, 7(4), 237–240.
<https://doi.org/10.1111/j.1601-5037.2009.00384.x>
- Apte, A., & Daniel, S. (2009). PCR Primer Design. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2009(3), pdb.ip65. <https://doi.org/10.1101/pdb.ip65>
- Asquino, N., & Villamobo, F. (2019). Cepillos interdentes, de la teoría a la práctica. Revisión de literatura e indicaciones clínicas. *Odontoestomatología*, 21(33), 46–53.
<https://doi.org/10.22592/ode2019n33a6>
- Blaustein, R. A., Michelitsch, L.-M., Glawe, A. J., Lee, H., Huttelmaier, S., Hellgeth, N., Ben Maamar, S., & Hartmann, E. M. (2021). Toothbrush microbiomes feature a meeting ground for human oral and environmental microbiota. *Microbiome*, 9(1), 32.
<https://doi.org/10.1186/s40168-020-00983-x>
- Bui, F. Q., Almeida-da-Silva, C. L. C., Huynh, B., Trinh, A., Liu, J., Woodward, J., Asadi, H., & Ojcius, D. M. (2019). Association between periodontal pathogens and systemic disease. *Biomedical Journal*, 42(1), 27–35. <https://doi.org/10.1016/j.bj.2018.12.001>

- Bunetel, L., Tricot-Doleux, S., Agnani, G., & Bonnaure-Mallet, M. (2000). *In vitro* evaluation of the retention of three species of pathogenic microorganisms by three different types of toothbrush. *Oral Microbiology and Immunology*, *15*(5), 313–316.
<https://doi.org/10.1034/j.1399-302x.2000.150508.x>
- Cheng, S., McCleskey, F. K., Gress, M. J., Petroziello, J. M., Liu, R., Namdari, H., Beninga, K., Salmen, A., & DelVecchio, V. G. (1997). A PCR assay for identification of *Enterococcus faecium*. *Journal of Clinical Microbiology*, *35*(5), 1248–1250.
<https://doi.org/10.1128/jcm.35.5.1248-1250.1997>
- D’Ercole, S., Tieri, M., Martinelli, D., Ciaravino, C., Fulco, D., & Tripodi, D. (2020). Microbial Contamination and Disinfection of Sport Mouthguard: In Vitro Study. *Current Microbiology*, *77*(2), 246–253. <https://doi.org/10.1007/s00284-019-01834-1>
- Dutka-Malen, S., Evers, S., & Courvalin, P. (1995). Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant enterococci by PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, *33*(1), 24–27. <https://doi.org/10.1128/jcm.33.1.24-27.1995>
- Frazelle, M. R., & Munro, C. L. (2012). Toothbrush Contamination: A Review of the Literature. *Nursing Research and Practice*, *2012*, 1–6. <https://doi.org/10.1155/2012/420630>
- Ganesh, A., Manohar, R., Venkatesan, K., Raja, S., & Kanakasabapathy, B. S. (2022). Assessment of Microbial Contamination of a Toothbrush Head with and without a Protective Cover: An Ex Vivo Study. *International Journal of Clinical Pediatric Dentistry*, *15*(4), 455–457. <https://doi.org/10.5005/jp-journals-10005-2403>

Glass, R. T., & Lare, M. M. (1986). Toothbrush contamination: a potential health risk?

Quintessence International (Berlin, Germany: 1985), 17(1), 39–42.

Harwood, V. J., Delahoya, N. C., Ulrich, R. M., Kramer, M. F., Whitlock, J. E., Garey, J. R., &

Lim, D. V. (2004). Molecular confirmation of *Enterococcus faecalis* and *E. faecium* from clinical, faecal and environmental sources. *Letters in Applied Microbiology*, 38(6), 476–482. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2004.01518.x>

Herrera-Hidalgo, L., de Alarcón, A., López-Cortes, L., Luque-Márquez, R., López-Cortes, L.,

Gutiérrez-Valencia, A., & Gil-Navarro, M. (2020). *Enterococcus faecalis* Endocarditis and Outpatient Treatment: A Systematic Review of Current Alternatives. *Antibiotics*, 9(10), 657. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9100657>

Karibasappa, G., Nagesh, L., & Sujatha, B. (2011). Assessment of microbial contamination of toothbrush head: An in vitro study. *Indian Journal of Dental Research*, 22(1), 2.

<https://doi.org/10.4103/0970-9290.79965>

López-Luis, B. A., Sifuentes-Osornio, J., Lambraño-Castillo, D., Ortiz-Brizuela, E., Ramírez-Fontes, A., Tovar-Calderón, Y. E., Leal-Vega, F. J., Bobadilla-del-Valle, M., & Ponce-de-León, A. (2021). Risk factors and outcomes associated with vancomycin-resistant

Enterococcus faecium and ampicillin-resistant *Enterococcus faecalis* bacteraemia: A 10-year study in a tertiary-care centre in Mexico City. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 24, 198–204. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2020.12.005>

Luo, D., Huang, J., Zheng, X., Liu, F., Li, Y., Wang, Y., & Qian, H. (2023). Spread of flushing-generated fecal aerosols in a squat toilet cubicle: Implication for infection risk. *Science of The Total Environment*, 859, 160212. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.160212>

- Martins, C. C., Lockhart, P. B., Firmino, R. T., Kilmartin, C., Cahill, T. J., Dayer, M., Occhi-Alexandre, I. G. P., Lai, H., Ge, L., & Thornhill, M. H. (2023). Bacteremia following different oral procedures: Systematic review and meta-analysis. *Oral Diseases*.
<https://doi.org/10.1111/odi.14531>
- Naik, R., Ahmed Mujib, B., Telagi, N., Anil, B., & Spoorthi, B. (2015). Contaminated tooth brushes-potential threat to oral and general health. *Journal of Family Medicine and Primary Care*, 4(3), 444. <https://doi.org/10.4103/2249-4863.161350>
- Peng, X., Cheng, L., You, Y., Tang, C., Ren, B., Li, Y., Xu, X., & Zhou, X. (2022). Oral microbiota in human systematic diseases. *International Journal of Oral Science*, 14(1), 14. <https://doi.org/10.1038/s41368-022-00163-7>
- Shobo, C. O., Essack, S. Y., & Bester, L. A. (2022). Enterococcal contamination of hospital environments in KwaZulu-Natal, South Africa. *Journal of Applied Microbiology*, 132(1), 654–664. <https://doi.org/10.1111/jam.15224>
- Suzuki, Y., Kanda, N., & Furukawa, T. (2012). Abundance of *Enterococcus* species, *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* , essential indicators of fecal pollution, in river water. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, 47(11), 1500–1505. <https://doi.org/10.1080/10934529.2012.680315>
- Twumwaa Hannah, Asumang Betty, Imoro Zarouk, & Kpordze Stephen. (2021). TOOTHBRUSH AND TOWEL HANDLING AND THEIR MICROBIAL QUALITY: THECASEOFSTUDENTS OF UNIVERSITY FOR DEVELOPMENT STUDIES, NYANKPALA CAMPUS, GHANA. *African Journal of Infectious Diseases*, 15(1), 41–46.

- Weiner, L. M., Webb, A. K., Limbago, B., Dudeck, M. A., Patel, J., Kallen, A. J., Edwards, J. R., & Sievert, D. M. (2016). Antimicrobial-Resistant Pathogens Associated With Healthcare-Associated Infections: Summary of Data Reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2011–2014. *Infection Control & Hospital Epidemiology*, 37(11), 1288–1301. <https://doi.org/10.1017/ice.2016.174>
- Zhang, W., Daly, C. G., Mitchell, D., & Curtis, B. (2013). Incidence and magnitude of bacteraemia caused by flossing and by scaling and root planing. *Journal of Clinical Periodontology*, 40(1), 41–52. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12029>