



Supragingival mikrobiota hos hundar med och utan parodontit

Louise Lundmark

Självständigt arbete • 30 hp
Sveriges lantbruksuniversitet, SLU
Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Veterinärprogrammet
Uppsala 2025



Supragingival mikrobiota hos hundar med och utan parodontit

Supragingival microbiota in dogs with and without periodontitis

Louise Lundmark

Handledare:	Peter Halvarsson, Sveriges lantbruksuniversitet, Institutionen för husdjurens biovetenskaper
Bitr. handledare:	Karolina Brunius Enlund, Sveriges lantbruksuniversitet, Institutionen för kliniska vetenskaper
Examinator:	Ingrid Hansson, Sveriges lantbruksuniversitet, Institutionen för husdjurens biovetenskaper
Omfattning:	30 hp
Nivå och fördjupning:	Avancerad nivå, A2E
Kurstitel:	Självständigt arbete i veterinärmedicin
Kurskod:	EX1003
Program/utbildning:	Veterinärprogrammet
Kursansvarig inst.:	Institutionen för kliniska vetenskaper
Utgivningsort:	Uppsala
Utgivningsår:	2025
Upphovsrätt:	Alla bilder används med upphovspersonens tillstånd.
Nyckelord:	parodontit, mikrobiota, hund, bakterier, supragingivalt plack

Sveriges lantbruksuniversitet

Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap

Veterinärprogrammet

Sammanfattning

Parodontit som är en av de vanligaste sjukdomarna på hundar, är en inflammatorisk sjukdom i tandens stödjevävnad. Stödjevävnaden består av parodontalligament, cement, alveolärt ben och gingiva. Inflammationen som uppstår är en reaktion på bakterier som finns i plack. Många tidigare studier som undersökt mikrobiotan i plack hos hundar med och utan parodontit har kommit fram till att det finns skillnader beroende på sjukdomsstadie. Bakterier som har visats vara relevanta för parodontit enligt tidigare studier och som analyseras i denna studie är bland annat *Porphyromonas* sp., *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola*, *Eikenella corrodens*, *Pasteurella canis*, *Campylobacter* sp., *Neisseria animaloris*, *Neisseria weaveri* och *Neisseria zoodegmatis* medan *Moraxella* sp. och *Capnocytophaga* sp. varit vanligare hos hundar utan parodontit. I den här studien provtogs supragingivalt plack från 69 hundar i Uppsala. Från dessa prov extraherades DNA och 16s PCR metabarcoding användes för att kunna analysera mikroberna. Sekvenseringen gjordes med illumina, next generation sequencing. Resultatet visade en högre andel av *Porphyromonas gulae* och *Treponema porcinum* hos hundar med parodontit. Medan hundar utan parodontit hade en högre andel av *Capnocytophaga canimorsus*, *Moraxella cuniculi*, *N. weaveri* och *N. zoodegmatis*. Totalt påvisades 414 bakteriearter. Antalet arter skiljde sig inte mellan de olika grupperna och inte heller diversiteten av arter inom varje prov. *Pseudomonadota*, *Bacillota* och *Bacteriota* var de tre vanligaste fyla och hos hundarna med grav parodontit påvisades en lägre andel *Pseudomonadota* och en högre andel *Bacillota* jämfört med hundarna utan parodontit. Denna studie ger viktig insikt i den orala mikrobiotans förändring hos hundar med parodontit och med hjälp av denna studies resultat kan förhoppningsvis diagnostisering och förebyggande av parodontit hos hund förenklas i framtiden.

Nyckelord: parodontit, mikrobiota, hund, bakterier, supragingivalt plack

Abstract

Periodontitis, which is one of the most common diseases in dogs, is an inflammatory disease of the supporting tissue of the tooth. This supporting tissue consists of periodontal ligament, cementum, alveolar bone and gingiva. The inflammation that occurs is a reaction to bacteria found in plaque. Many previous studies that have examined the oral microbiota in dogs with and without periodontitis have shown that there are differences depending on the stage of the disease. Bacteria that have been shown to be relevant to periodontitis according to previous studies and that are analyzed in this study include *Porphyromonas* sp, *Tannerella forsythia*, *Treponema* sp, *Eikenella corrodens*, *Pasteurella canis*, *Campylobacter* sp and *Neisseria* sp, while *Moraxella* sp and *Capnocytophaga* sp were more common in dogs without periodontitis. In this study, supragingival plaque was sampled from 69 dogs in Uppsala. DNA was extracted from these samples and 16s PCR metabarcoding was used before analyzing the microbes. The sequencing was done with illumina, next generation sequencing. The result showed a higher proportion of *Porphyromonas gulae* and *Treponema porcinum* in dogs with periodontitis. While dogs without periodontitis had a higher proportion of *Capnocytophaga canimorsus*, *Moraxella cuniculi*, *Neisseria weaveri* and *Neisseria zoodegmatidis*. A total of 414 bacterial species were detected. The number of species did not differ between the different groups, nor did the diversity of species within each sample. *Pseudomonadota*, *Bacillota* and *Bacteriota* were the three most common phyla and in dogs with severe periodontitis a lower proportion of *Pseudomonadota* and a higher proportion of *Bacillota* were detected compared to dogs without periodontitis. This study provides important insight into the changes in the oral microbiota on species level in dogs with periodontitis and with the help of this study's results, the diagnosis and prevention of periodontitis in dogs can hopefully be simplified in the future.

Keywords: periodontitis, microbiota, canine, bacteria, supragingival plaque

Innehållsförteckning

1. Inledning	9
2. Litteraturöversikt.....	10
2.1 Patogenes	10
2.2 Riskfaktorer	11
2.3 Oral mikrobiota.....	11
2.3.1 Bakterier hos hundar med parodontit	12
2.3.2 Bakterier hos hundar utan parodontit	14
3. Material och metoder	16
3.1 Provinsamling.....	16
3.2 DNA-extraktion	16
3.3 PCR metabarcoding 16s	17
3.3.1 Spädning av primers	17
3.3.2 Tvåstegs-PCR	17
3.3.3 Rening och poolning av PCR-produkter	18
3.4 Illuminasekvensering	18
3.5 Bioinformatik	18
3.6 Statistik.....	19
4. Resultat	20
4.1 Studiepopulation	20
4.2 Sekvenseringsresultat.....	20
4.3 Munhålets mikrobiota	22
5. Diskussion	38
5.1 Mikrobiomet.....	38
5.2 Styrkor och svagheter med denna studie	41
5.3 Framtida forskning	42
5.4 Konklusion.....	43
Särskilt tack	44
Referenser.....	45
Populärvetenskaplig sammanfattning	50
Bilaga 1 – Blankett vid provtagning	52

1. Inledning

Hundens tänder hålls på plats av parodontiet, stödjevävnad som består av gingiva, cement, alveolärt ben och parodontalligament (Niemiec *et al.* 2020). Parodontit är en inflammatorisk sjukdom i parodontiet, initierat av plack, och en av de vanligaste sjukdomarna hos hund som man ser på veterinärkliniken (Robinson *et al.* 2016). Prevalensen av parodontal sjukdom, som innefattar både gingivit och parodontit, var 86,3 % en studie från USA gjord på hundar från kennlar (Stella *et al.* 2018). Siffrorna varierar dock mycket och andra studier gjorda i bland annat Kroatien och Tyskland, påvisade prevalens från 44 till 100 % (Wallis & Holcome 2020).

På veterinärkliniken sker diagnosticering och behandling av parodontit. Ett tidigt sjukdomstecken är halitosis (dålig andedräkt) och gingivit (inflammation i tandköttet) men sjukdomen kräver generell anestesi (narkos) för korrekt diagnos och behandling. Vid undersökning i generell anestesi hos hundar med parodontit ses ökat fickdjup, gingival retraktion eller hyperplasi, furkationslesioner, mobila tänder och radiologiskt ses klinisk fästeförlust runt tandroten (Harvey 2005; Niemiec *et al.* 2020). Behandling består av tandrengöring med noggrann rengöring över och under tandköttsskanten (supra- och subgingivalt). Därefter rekommenderas daglig tandborstning för att stoppa utveckling av sjukdomen. I en japansk studie beräknades antalet bakterier i munnen efter olika rengöringsmetoder för hundtänder. I de grupper där tandborstning fanns med som rengöringsmetod påvisades signifikant färre bakterier än i de grupper där endast ultraljudsscaler eller polering användes (Watanabe *et al.* 2015).

Parodontit är en mycket smärtsam sjukdom hos hund och har associationer till lever-, njur- och hjärtsjukdom, bland annat på grund av bakteriemi (Pereira dos Santos *et al.* 2019; Niemiec *et al.* 2020). Parodontit har förslagits som en av de tre viktigaste sjukdomarna hos hund ur ett välfärdhetsperspektiv (Summers *et al.* 2019) därför är det viktigt att förstå mer om sjukdomen. Syftet med den här studien var att få en ökad förståelse för sjukdomens etiologi genom att undersöka eventuella skillnader i supragingival mikrobiota hos hundar med respektive utan parodontit. Studien syftade även till att jämföra olika potentiella riskfaktorer genom att analysera samband mellan utvalda bakteriearter och ålder, vikt och tandborstning.

2. Litteraturoversikt

2.1 Patogenes

Munnen är rik på olika bakterier som tillsammans bildar en oral mikrobiota bestående av över 700 olika bakteriearter (Niemi *et al.* 2022) som i en frisk mun befinner sig i symbios med värdjuret (Meyle & Chapple 2015). Denna symbios kan påverkas av plack. Plack är en biofilm som bildas när glykoprotein från Saliven fäster till tandytan och bildar ett proteinnät som bakterier lätt fastnar i. Ifall plack inte tas bort regelbundet mineraliserar biofilmen med hjälp av kalcium från saliven och bildar tandsten. Tandstenen består av en porös yta som nya glykoprotein och bakterier fäster till och på så sätt bildas större och fler biofilmer (Wallis & Holcombe 2020). I takt med att biofilmen på tandytan växer sker en förändring i biofilmens mikrobiota vilket kan leda till att en dysbios i mikrobiotan uppstår. Varför en dysbios uppstår är inte helt klarlagt men olika teorier finns som beskriver att dysbios uppstår när så kallade ”nyckelpatogener” fäster till biofilmen (Hajishengallis & Lamont 2012; Lamont & Hajishengallis 2015). En dysbios kan också uppstå när anaeroba patogener selekteras fram då plackformation minskar tillgången på syre underst i biofilmen (Meyle & Chapple 2015).

I saliven finns antibakteriella ämnen som kan förhindra bakteriell överväxt och ämnena är en del av immunförsvaret. Saliv innehåller bland annat lysosym (ett bakteriolytiskt enzym), lactoferrin (ett protein med baktericid effekt) och IgA specifika antikroppar som tillsammans har en antimikrobiell effekt (Harvey 2005). Hos individer med en dysbios kan en överdriven reaktion hos immunförsvaret framkallas och en dåligt reglerad och oproportionerlig inflammation uppstår i parodontiet som utvecklas till en reversibel gingivit (Niemi *et al.* 2020) eller vidare till en irreversibel parodontit (Wallis & Holcome 2020; Santibáñez *et al.* 2021). Graden av dysbios och mängden biofilm som behövs för aktivering av immunförsvaret är individuellt och kan påverkas av flera faktorer som exempelvis ålder, genetik och immunologisk funktion. Därför kan faktorer som påverkar immunförsvaret även påverka utvecklingen av parodontit vilket gör sjukdomen i högsta grad komplex. Det är alltså inte biofilmen i sig som orsakar parodontit utan världens immunologiska svar (Meyle & Chapple 2015).

När inflammation uppstår frisätts toxiner och enzym, exempelvis proteaser, samtidigt som inflammatoriska processer som osteoklastaktivering inleds (Lamont & Hajishengallis 2015). Detta orsakar vävnadsdestruktion av parodontiet och fästeförlust vilket kan leda till komplikationer som fistelbildning upp till näshålan, rotpetsabscesser och patologiska frakturer framför allt i mandibula (Niemi *et al.* 2020).

2.2 Riskfaktorer

Två välstuderade faktorer som ökar risken för att drabbas av parodontit är ålder och hundens storlek. Flera studier visar att en stigande ålder korrelerar positivt med utvecklandet av parodontit samt allvarlighetsgraden av symptom (Stella *et al.* 2018; Wallis & Holcome 2020). Storlek på hund ses också som en riskfaktor då det finns studier som tyder på att hundar av mindre raser oftare drabbas av parodontit (Hamp *et al.* 1984; Carreira *et al.* 2015). Detta förklaras bland annat av att små raser har förhållandevis större tänder jämfört med stora raser vilket kan orsaka malokklusion som skapar trånga utrymme där plack lättare ansamlas. Mindre raser har även tunnare gingiva och tunnare käkben vilket ger sämre stöd åt tanden och ökad risk för tandlossning (Wallis & Holcome 2020). Hos mindre raser finns en större andel av bakterier ofta förknippade med parodontit så som olika arter från *Firmicutes/Bacillota* och mindre andel bakterier som oftare hittas hos hundar utan parodontit så som bakterier från fylat *Proteobacteria/Pseudomonadota* (Wallis *et al.* 2021).

Även om många studier håller med om att det framför allt är rasstorlek som är en riskfaktor där små raser lider av större risk att drabbas av parodontit finns det tecken på att genetik även är av betydelse och att vissa större raser är predisponerade. Mindre hundraser som har en ökad risk att utveckla parodontit är framför allt chihuahua, dvärgschnauzer, jack russell terrier, shetland sheepdog, toy pudel och yorkshireterrier medan större predisponerade hundraser är bland annat cocker spaniel och greyhound (Wallis & Holcombe 2020).

Foder är också en parameter som kan behöva tas i beräkning angående riskfaktorer för parodontitutveckling. I en studie jämförde man torrfoder med burkmat/konserverad mat och mätte olika symptom. Hundar som åt burkmat/konserverad mat hade större andel *Firmicutes*, *Tannerella forsythia* och *Peptostreptococaceae* bland annat, som man i många studier kopplat till parodontit medan de hade lägre andel *Capnocytophaga cynodegmi*, *Capnocytophaga canimorsus* och *Porphyromonas cangingivalis* bland annat, som ofta är förenade med hälsosamt parodontium. Hundarna som åt burkmat/konserverad mat hade också mer plackproduktion, mer halitosis och lägre pH i saliven där lägre pH skulle kunna ses som en fördel eller försvarsmekanism (Oba *et al.* 2022).

2.3 Oral mikrobiota

Bakterier i hundars mun kan vara kommensaler, opportunister, zoonotiska och patogena bakterier. Kombinationen av de olika bakterierna i munnen, eller med andra ord mikrobiotan påverkas som tidigare nämnts av många olika faktorer och

kan förändras över tid. Följande litteraturöversikt är framför allt inriktad på specifika bakterier i den orala mikrobiota som ofta diskuteras i samband med parodontit.

Aeroba bakterier har visat sig vara vanligare i den supragingivala mikrobiota hos hundar utan parodontit medan hos hundar med parodontit stiger andelen anaeroba samt fakultativa anaeroba bakterier ju svårare parodontit (Davis *et al.* 2013; Niemiec *et al.* 2022). Det har också setts en skillnad i förekomst av gramnegativa och grampositiva bakterier. Hos hundar med parodontit är det enligt en nyare studie vanligare med gramnegativa anaerober (Santibáñez *et al.* 2021). Gramnegativa bakteriers cellvägg har ett yttermembran som består av lipopolysackarider (LPS). LPS kan påverka immunförsvarsceller som finns i parodontiet, framför allt i gingiva och orsaka inflammationsreaktioner vilket kan vara en förklaring till varför gramnegativa bakterier i större utsträckning associeras med parodontit (Aziz *et al.* 2021).

2.3.1 Bakterier hos hundar med parodontit

Hos hundar med parodontit har en skillnad jämfört med friska hundar mellan fördelningen av olika bakteriefyla påvisats. Det fylym som ökar hos hundar med parodontit är framför allt *Bacteroidota* (Santibáñez *et al.* 2021).

Treponema

En ofta diskuterad bakterie i dessa sammanhang är den gramnegativa spiroketen *Treponema*. *Treponema denticola* är en av de vanligaste bakterierna i hundars orala mikroflora (Gołyńska *et al.* 2017). I en studie av Nises *et al.* (2018) kunde spiroketer påvisas hos 10 av 11 hundar oberoende av parodontitstatus vilket talar emot att *Treponema* skulle vara en parodontitörsakande bakterie. I en annan studie påvisades att specifika grupper inom släktet var associerade med parodontit hos hund nämligen I, II och IV och även *T. socranskii* medan *T. denticola* och liknande arter inte var lika frekventa vid parodontit (Nordhoff *et al.* 2008). *Treponema* är ett anaerobt släkte och trivs därför i syrefattiga miljöer, exempelvis tandfickor, vilket förklarar varför fler *Treponema* spp. påvisas subgingivalt än supragingivalt. Det kan ta flera veckor upp till fem månader att odla fram spiroketskulturer vilket gör släktet svåradiagnostiserat (Nises *et al.* 2018).

Som tidigare nämnt har studier kommit fram till olika resultat angående *Treponema denticola*. Vissa studier har i kontrast till tidigare nämnda resultat, påvisat att bakterien är vanligare hos hundar med parodontit (Wallis *et al.* 2021a; Kwon *et al.* 2022; Polkowska *et al.* 2023) och vissa har inte kunnat påvisa *T. denticola* alls hos hundar utan parodontit (Kačírová *et al.* 2022). En studie gjord på 30 beaglar där man provtog supragingivalt plack före och efter professionell tandrengöring

kunde visa att *T. denticola* och hela fylat *Spirochaetes* signifikant minskade efter rengöring vilket skulle kunna tala för att arten lättare koloniserar i en mun med plack och tandsten (Flancman *et al.* 2018).

Porphyromonas

Porphyromonas är ett släkte av gramnegativa anaeroba bakterier. *Porphyromonas gulae* är en relativt vanlig bakterie i hundens orala mikroflora men vanligare hos hundar med parodontit (Santibáñez *et al.* 2021; Niemiec *et al.* 2022). Kačírová *et al.* (2022) isolerade bakterien från 100 % av hundarna med parodontit och från drygt 70 % av hundar utan parodontit. Bakterien har även visats vara vanligare hos äldre hundar (Yasuda *et al.* 2024). En annan bakterie i släktet är *Porphyromonas cangingivalis* som är en av de vanligaste bakterierna i den orala mikrobiotan hos hund oberoende av parodontitstatus (Wallis *et al.* 2021; Niemiec *et al.* 2022). I en tredje studie var dock *P. cangingivalis* vanligare hos friska hundar (Davis *et al.* 2013). *Porphyromonas gingivalis* har många effektiva virulensfaktorer och är en ofta förekommande bakterie vid parodontit hos människor (Di Bello *et al.* 2014; de Andrade *et al.* 2019) men hos hund är bakterien inte lika ofta associerad med parodontit. I en fallkontroll-studie på 176 hundar var andelen *P. gingivalis* istället lägre hos hundar med parodontit jämfört med hundar utan parodontit (Kwon *et al.* 2022). Men det finns andra teorier att *P. gingivalis* i kombination med andra bakterier kan orsaka dysbios som initierar en inflammation (Di Bello *et al.* 2014) och därför anses bakterien vara en relevant faktor i samband med parodontit.

Tannerella forsythia

Tannerella forsythia är en gramnegativ anaerob tillhörande fylum *Bacteroidota* med en stor virulenspotential framför allt när den samexisterar med bakterier såsom *P. gingivalis* (Sharma 2010). Blandinfektion med *T. forsythia* och *P. gingivalis* har även påvisats i andra studier, där en koppling mellan bakterierna och hundar med gingivit eller parodontit kunde ses (Di Bello *et al.* 2014; Kwon *et al.* 2022). Mer specifikt har *T. forsythia* visats kunna orsaka destruktion av alveolärt ben i en studie gjord på möss, vilket förklaras genom att ett protein (BspA) i cellväggen aktiverar cytokinfrisättningen (Sharma *et al.* 2005). Det är dock inte alla studier som stödjer att *T. forsythia* orsakar parodontit då bakterien i en studie kunde detekteras hos alla hundar som undersöktes oberoende av parodontitstatus (Kačírová *et al.* 2022a) och i en annan studie endast hade en prevalens på 4 % hos hundar med parodontit (Özavci *et al.* 2019).

Eikenella corrodens

Eikenella corrodens är en gramnegativ fakultativ anaerob tillhörande *Pseudomonadota*. Dess prevalens i en studie med 176 hundar var 86,9 % och signifikant

associerad med parodontit, framför allt hos hundar med lindrig parodontit men även måttlig parodontit (Kwon *et al.* 2022). En annan studie som endast undersökte förekomsten av *E. corrodens* hos hundar med konstaterad parodontit fann en förekomst på 20–25 % (Yamasaki *et al.* 2012). I en tredje studie var prevalensen av *E. corrodens* endast 4 % i plack från hundar med parodontit (Özavci *et al.* 2019).

Övriga bakterier

Ett annat ofta påvisat bakteriesläkte är *Neisseria* där *N. weaveri*, *N. zoodegmatis* och *N. animaloris* enligt en fallkontroll-studie gjord på 30 hundar är vanligare hos hundar med parodontit (Tavares *et al.* 2023). Här skiljer sig data åt angående *N. animaloris* som enligt en annan studie är vanligare hos hundar utan parodontit (Niemiec *et al.* 2022). Andra bakterier som är vanligare hos parodontitdrabbade hundar är *Corynebacterium canis* (Davis *et al.* 2013; Tavares *et al.* 2023), *Pasteurella canis* (Niemiec *et al.* 2022; Tavares *et al.* 2023), *Prevotella intermedia* (Kwon *et al.* 2022; Polkowska *et al.* 2023), *Campylobacter rectus* (Kwon *et al.* 2022) och bakterier tillhörande familjen *Peptostreptococcaceae* (Davis *et al.* 2013; Wallis *et al.* 2021; Niemiec *et al.* 2022). *Prevotella nigrescens* och *Eubacterium nodatum* har också i en studie visat sig vara vanligare hos hundar med parodontit (Kwon *et al.* 2022).

2.3.2 Bakterier hos hundar utan parodontit

Vissa bakterier är i större utsträckning associerade med den orala mikrofloran hos hundar som har ett friskt parodontium.

Capnocytophaga canimorsus

Det släkte av bakterier som många studier oftare har påvisat hos hundar utan parodontit är *Capnocytophaga* (Davis *et al.* 2013; Sturgeon *et al.* 2013; Wallis *et al.* 2021). *Capnocytophaga canimorsus* är en långsamväxande gramnegativ kapnofil fakultativ anaerob i hundars orala mikrobiota som har zoonotisk potential (Gaasterra & Lipman 2010). Uppgifter om förekomsten i hundars orala mikrobiota varierar från 22 % (Dilegge *et al.* 2011) till 74 % (Suzuki *et al.* 2010). En studie har visat en signifikant skillnad mellan hundar med och utan parodontit där *C. canimorsus* var vanligare hos hundar utan parodontit (Niemiec *et al.* 2022).

Övriga bakterier

Neisseria shayeganii skiljer sig från andra arter inom släktet *Neisseria* och är vanligare hos hundar utan parodontit (Davis *et al.* 2013; Wallis *et al.* 2021; Niemiec *et al.* 2022). *Moraxella* sp. är ett annat bakteriesläkte som också har identifierats i större utsträckning hos hundar utan parodontit (Davis *et al.* 2013; Sturgeon *et al.* 2013; Wallis *et al.* 2021; Niemiec *et al.* 2022). Även släktet *Ber-*

geylla (bland annat *B. zoohelcum*) är också vanligare hos hundar utan parodontit (Davis *et al.* 2013; Sturgeon *et al.* 2013; Wallis *et al.* 2021) och likadant familjen *Pasteurellaceae* (Davis *et al.* 2013) och *Porphyromonadaceae* (Wallis *et al.* 2021).

3. Material och metoder

3.1 Provinsamling

Provtagning utfördes av veterinärer på tre kliniker i Uppsala samt av veterinärstudenter på Sveriges lantbruksuniversitet, SLU, och totalt samlades 69 prover in under perioden april till september 2024. Provtagningen innebar att en e-svabb (eSwab 480CE, Copan Italia, Brescia, Italy) ströks längs den supragingivala, buccala gingivakanten på över- och underkäke enligt instruktioner (bilaga 1). E-svabbarna förvarades sedan i -20 °C under maximalt fyra månader vilket var lägre än instruktionsmanualens maximala sex månader.

I samband med provtagning fick djurägare och veterinär fylla i en blankett (bilaga 1) som innehöll djurägarmedgivande samt information om hundens kön, ålder, vikt, ras, tandborstningsrutiner och övriga sjukdomar. För att beskriva tandborstningsrutiner av sin hund fick djurägare välja mellan alternativen “dagligen”, “4–6 gånger i veckan”, “1-3 gånger i veckan”, “mer sällan”, “aldrig” och “vet ej” (Enlund *et al.* 2020). Hundarna i studien hade bokat tid för professionell tandrengöring eller annan åtgärd som krävde narkos exempelvis lagning av tandfraktur eller korrigering av bettfel. Hundarna sövdes alltså aldrig enbart i provtagnings-syfte. För att öka andelen hundar utan parodontit, då dessa var få, provtogs fyra vakna hundar som tidigare genomgått munkoll hos veterinär och munkoll vid provtagningsstillfälle. Parodontal status bedömdes av veterinär efter noggrann dental undersökning inklusive fickdjupsmätning och dentalröntgen. Parodontal status graderades utifrån AVDC graderingsschema; normal, gingivit, lindrig (från engelskans “early”), måttlig eller grav parodontit (bilaga 1). Normal benämns som “utan parodontit” men innebär “utan parodontal sjukdom” i denna studie.

Denna studie riktade in sig på bakterier som enligt tidigare studier har visat sig kunna vara relevanta för parodontit såsom *Porphyromonas cangingivalis*, *Porphyromonas gulae*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola*, *Treponema porcinum*, *Eikenella corrodens*, *Pasteurella canis*, *Campylobacter rectus*, *Campylobacter mucosalis*, *Neisseria animaloris*, *Neisseria weaveri*, *Neisseria zoodegmatis*, *Moraxella cuniculi* och *Capnocytophaga canimorsus* (Davis *et al.* 2013; Kačirová *et al.* 2022; Niemiec *et al.* 2022).

3.2 DNA-extraktion

För DNA-extraktion användes DNeasy PowerLyzer Powersoil (100) (Qiagen AB). DNeasy är ursprungligen utvecklad för att extrahera DNA från jordmaterial,

men används ofta för metabarcoding av bakterier från olika provmaterial, och för munsvabbar har protokollet optimerats genom att slå samman några steg i tillverkarens protokoll (Mattei *et al.* 2019), se nedan.

E-svabbarna tinades i 15 minuter innan proverna centrifugerades i 4500 RPM i 10 min för att separera pellets och supernatant. Därefter togs 750 µl av supernatanten bort och resterande material på upp till 250 mikroliter inklusive uppslammad pellet tillsattes till DNeasy-kitets powerbead solution. I samma powerbead solution tillsattes c1, c2 och c3 för att sedan vortexa blandningen i 10 minuter på max hastighet (Mattei *et al.* 2019). Extraktionen fortsatte genom att glaskulorna centrifugerades ner och 700 mikroliter supernatant flyttades över till ett nytt provrör tillsammans med 1200 mikroliter c4. Denna nya blandning filtrerades genom ett MB filtrationsrör (micropurification spin column) så att allt DNA bands till filtret. Sedan tillsattes 500 mikroliter c5 till filtret för att rena filtret. Filtrationsröret (MB) sattes i nya provrör och 100 mikroliter c6 tillsattes som sköljde ned DNA-molekylerna i provröret. Provröret med 100 µl DNA förvarades i -20 °C.

3.3 PCR metabarcoding 16s

3.3.1 Spädning av primers

Inför metabarcoding PCR-laborationen förbereddes de lösningar som behövdes. Varje primer späddes enligt protokoll som skickades med, märktes upp och förvarades i -20 °C till dag 2.

3.3.2 Tvåstegs-PCR

Båda PCR-reaktionerna gjordes i duplikat för att minska risken för att vissa DNA-fragment skulle bli överrepresenterade i PCR-reaktionen. Den första mastermixen (PCR1) gjordes i 20 µl reaktioner bestående av 0,4 µl 10mM dNTPs, 4 µl buffert, 0,6 µl BSA, 0,25 µl primer 515F, 0,25 µl primer 806R, 0,2 µl Phusion™ Hot Start II DNA Polymerase (2 U/µL) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) och 26,6 µl ddH₂O. Till 19 µl mastermix tillsattes 1 µl DNA. PCR-reaktionen kördes med följande termocykel: 1 cykel om 30s 98 ° / 24 cykler om 10s 98 °, 20' 56 °, 15s 72 ° / 1 cykel om 8' 72 °, ∞ 4 °.

I den andra PCR-reaktionen tillsattes primers som gav en unik barcode för varje prov som används för att bioinformatiskt separera proverna efter sekvenseringen. Den andra mastermixen gjordes i 30 µl reaktioner bestående av 0,6 µl dNTPs, 3 µl buffert, 0,3 µl Phusion™ Hot Start II DNA Polymerase och 72,3 µl ddH₂O. Till 29,5 µl mastermix tillsattes 0,5 µl PCR-produkt från PCR1 samt unika primerkombinationer till varje enskild brunn. Protokoll förs över vilka primers och prov-

nummer som kombinerats. PCR-reaktionen utfördes med följande termoscykel: 1 cykel om 30s 98 ° / 24 cykler om 10s 98 °, 20' 56 °, 15s 72 ° / 1 cykel om 8' 72 °, ∞ 4 °.

3.3.3 Rening och pooling av PCR-produkter

Poolingen av PCR-produkter inför illuminasekvenseringen gjordes i två steg. I det första steget slogs de duplicerade reaktionerna i PCR 2 samman och sedan togs 25 µl från varje brunn och polades om åtta i eppendorfrör så att det totalt blev nio eppendorfrör med 200 µl PCR-produkt i varje. För att rena PCR-produkten från primers och annat som ej är rent dna tillsattes rumstempererad och vortexad Agencourt AMPure XP (Beckman-Coulter) som innehöll magnetiska partiklar, 180 µl tillsattes till de 200 µl PCR-produkt som gav ett förhållande på 1:0.9 PCR-produkt/partiklar för att spara DNA längre än 250 baspar. Blandningen blandades väl och inkuberades i rumstemperatur i 5 min för att sedan ställas i magnetställ för att separera magnetpartiklar bundet med DNA från lösningen. Vidare tvättades magnetpartiklarna med 400 µl 70 % etanol i två omgångar. När magnetpartiklarna med DNA var tvättade och helt torkade togs rören bort från magnetställningen och 100 µl lösningsbuffer tillsattes för att separera DNA-molekylerna från magnetpartiklarna. Efter 5 minuter ställdes eppendorfrören tillbaka i magnetställningarna och efter ytterligare 5 minuter överfördes de renade PCR-produkterna till sterila 1,5 ml provrör.

För att göra den slutliga poolen, mättes först DNA-koncentrationen för de nio poolade proverna. Utifrån koncentrationen pipetterades en lika stor mängd DNA från varje pool (variabel volym) till ett nytt eppendorfrör. Slutligen mättes koncentrationen och medellängden på PCR-produkterna på en TapeStation.

3.4 Illuminasekvensering

DNA-sekvensering utfördes av National Genomics Infrastructure i Stockholm finansierad av Science for Life Laboratory med illumina, next generation sequencing, NGS. För sekvenseringen användes flowcell P1xLeap (2x300 baspar) på en Illumina NextSeq 2000.

3.5 Bioinformatik

SciLifeLab levererade sekvenserna demultiplexade, så att sekvenserna för varje prov och sekvenseringsriktning fanns i egna filer. För att analysera vilka bakteriearter varje prov innehöll, användes den bioinformatiska pipleinen dada2

version 1.20 (Callahan *et al.* 2016) vilket utfördes i R v4.4.2 (R Core Team 2024). Först användes funktionen `dada2::removePrimers` för att ta bort primersekvenserna som används under PCR-stegen vid framställningen av sekvenseringspoolen. Därefter beräknades antal sekvensvarianter för varje prov och sekvenserna i båda sekvenseringsriktningarna (forward och reverse) slogs ihop. För att minska risken för felaktiga artbestämningar beräknades först felfrekvensen vid sekvenseringen och därefter kontrollerades varje sekvens så att de inte är en hybrid av olika PCR-produkter.

Slutligen gjordes en artbestämning av vilka bakterier som finns i provet med funktionen `assignTaxonomy` i `dada2`. En referensdatabas, Silva v 138, med sekvenser hämtades från <https://www.arb-silva.de/documentation/release-138/> (Quast *et al.* 2013; Yilmaz *et al.* 2014). Koden för `dada2` som användes följer https://benjjneb.github.io/dada2/tutorial_1_8.html.

3.6 Statistik

De relativa förekomsterna av varje bakterieart per prov beräknades med hjälp av paketet `Phyloseq` v1.50.0 (McMurdie & Holmes 2013). Statistiska beräkningar är gjorda i R 4.4.2 (R Core Team 2024) och datat är visualiserat med paketet `ggplot2` v3.5.1 (Wickham 2016). Statistiken i figurerna är gjord med paketet `ggpubr` v0.6.0 (Kassambara 2023), för jämförelsen av kategoriska data (boxplot) har Kruskal-Wallis t-test använts och för korrelationerna har korrelationskoefficient beräknats. Signifikansnivån för p-värdet, för att acceptera skillnader mellan grupper och korrelationer mellan faktorer, sattes till $p < 0.05$.

4. Resultat

4.1 Studiepopulation

Totalt provtogs 69 hundar i Uppsala och av dessa fanns det sex prover utan tillhörande blankett och dessa uteslöts därför vilket gav studien en population på 63 hundar. I gruppen utan parodontit var det tre hundar som var under 1 år och dessa har inte tagits med vid uträkning av medelvikt och medelålder. Medelvikten hos hundarna utan parodontit var 9,9 kg mer än medelvikten hos hundarna med grav parodontit medan medelåldern hos hundarna utan parodontit var 4,4 år yngre än hundarna med grav parodontit (tabell 1).

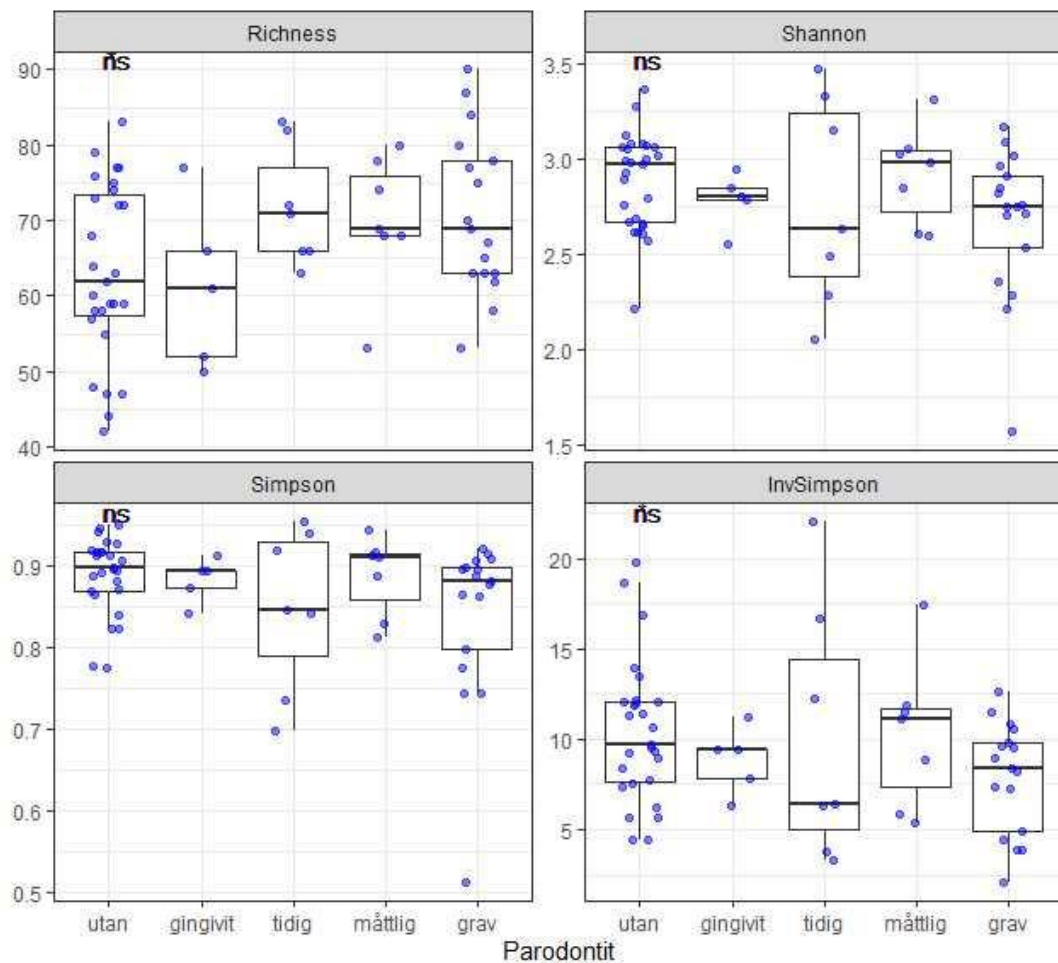
Tabell 1: Översiktsdata över studiepopulationen grupperad efter parodontitstadie. Medelvikt och medelålder är uträknad för respektive parodontitstadie och angett i kilogram och år.

	Utan parodontit	Gingivitis	Lindrig parodontit	Måttlig parodontit	Grav parodontit
Antal n=63	27	5	7	7	17
Medelvikt (kg)	18,8	15,4	16	8,9	8,9
Medelålder (år)	4,2	5,6	8,3	9	8,6

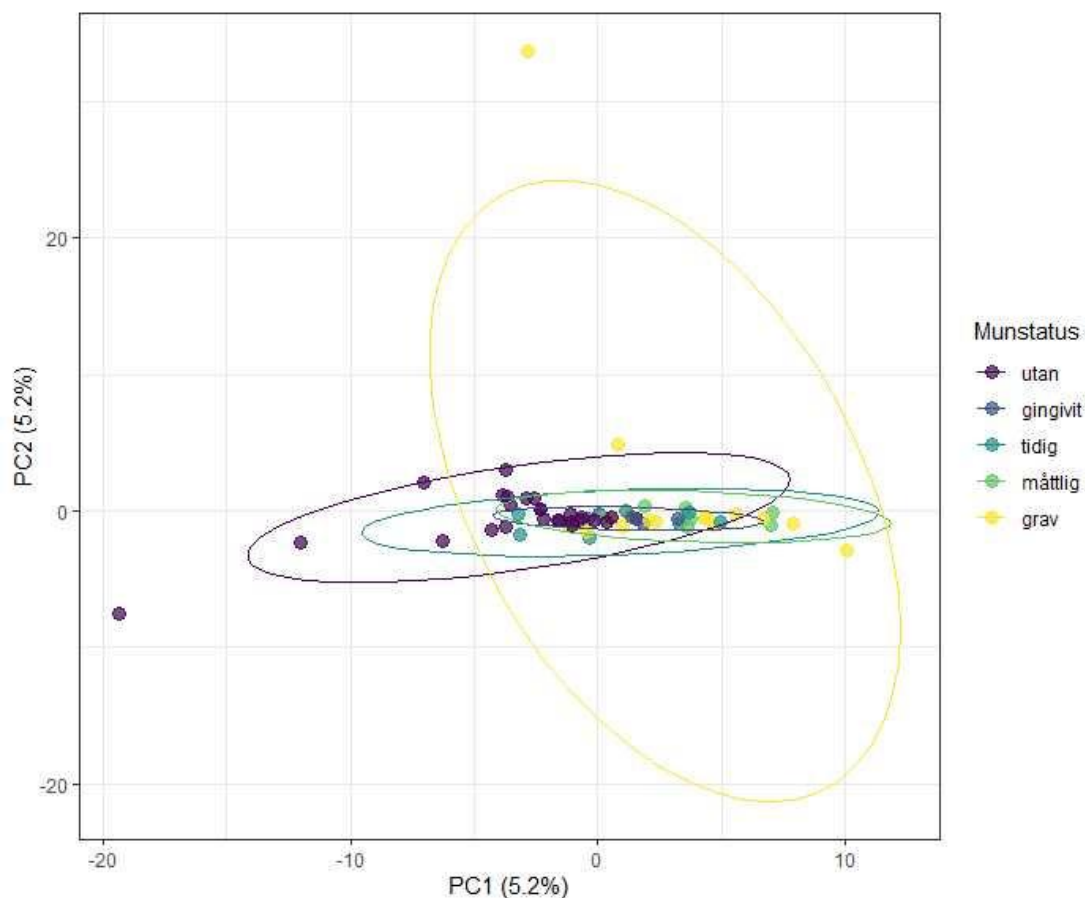
4.2 Sekvenseringsresultat

Efter filtrering och kvalitetskontroll i den bioinformatiska pipelinen återstod 3 589 543 sekvenser. Medelantalet sekvenser per prov var 52 022 och minsta och största antalet sekvenser var 23 919 respektive 97 577. Totalt påvisades 88 811 unika sekvenser som klustrade till 414 bakteriearter. Antalet arter (Richness) skiljde sig inte mellan de olika grupperna och inte heller fördelningen av arter inom varje prov (Shannon, Simpson och invSimpson diversitetsindex) (Figur 1). Artsammansättningen (PCA) skiljde sig inte heller mellan grupperna men

förklaringsgraden för variablerna stod för en liten andel (10,4 %) (Fig 2).



Figur 1. Boxplot över för de olika parodontitkategorierna, med avseende på antal arter i varje kategori (Richness över till vänster, ÖV) samt tre alfadiversitetsindex, Shannon (ÖH), Simpson (NV), Inverterad Simpson (NH). Artrikedom och index skiljde sig inte åt mellan de olika parodontitkategorierna (not significant, NS). Provstorlek: utan parodontit $n=27$, gingivit $n=5$, lindrig parodontit $n=7$, måttlig parodontit $n=7$ och grav parodontit $n=17$.



Figur 2. Principalkomponentanalys (PCA) av bakteriersammansättningen för de 63 hundarna i de olika parodontitkategorier (utan parodontit $n=27$, gingivit $n=5$, lindrig parodontit $n=7$, måttlig parodontit $n=7$ och grav parodontit $n=17$). Analysen förklarar 10,4 % av variationen (5,2 % för både principalkomponent 1 (PC1) och PC2). Alla prover ligger samlade i ett kluster, förutom två outliers.

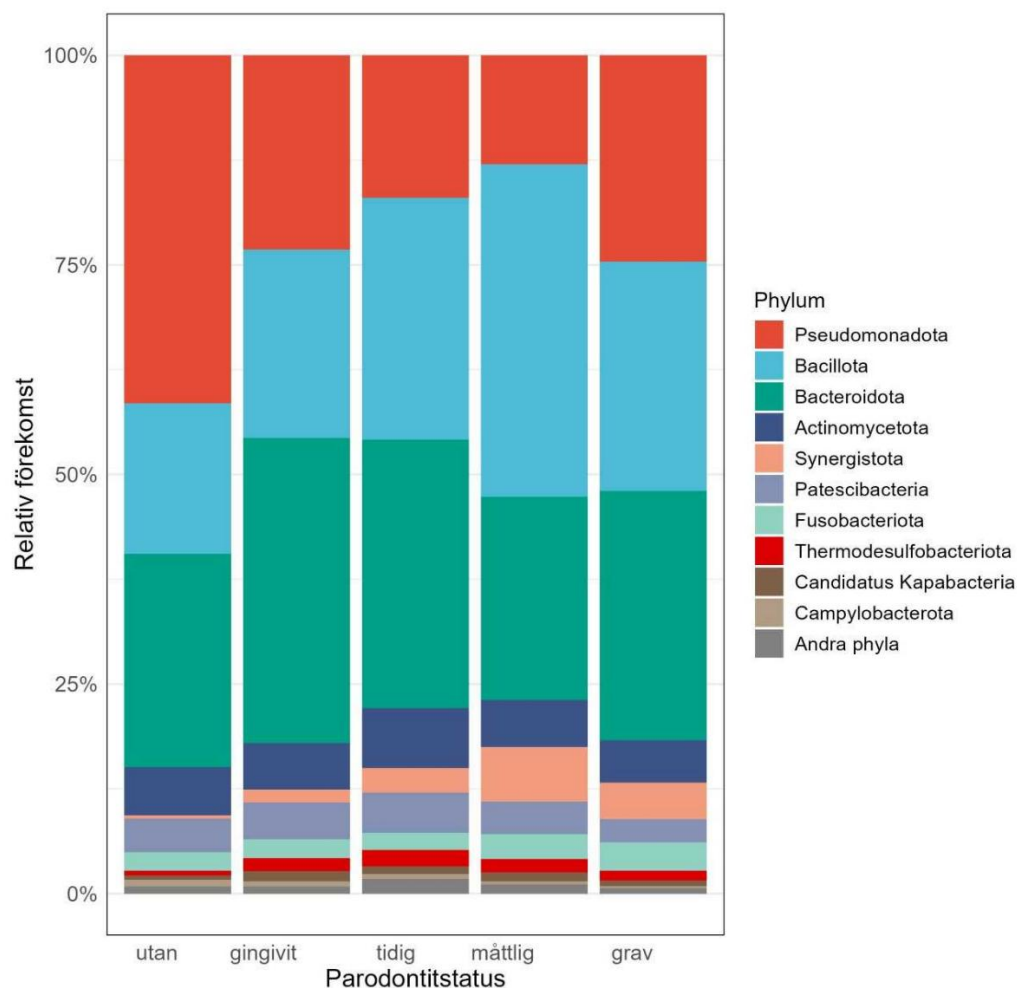
4.3 Munhålan mikrobiota

Fyla

Den supragingivala mikrobiotan bestod framförallt av bakterier från *Pseudomonadota*, *Bacillota* och *Bacteridota* och dessa tre fyla representerade tillsammans minst 75 % av mikrobiotan i alla parodontitkategorier (figur 3). De tydligaste skillnaderna avläses för *Pseudomonadota* som minskar, och *Bacillota* som ökade i relativ frekvens hos hundarna med grav parodontit jämfört med hundarna utan parodontit. Den relativa frekvensen av *Bacteridota* är ungefär den samma oberoende av parodontitstadie och likaså för *Actinomycetota* och *Patescibacterie*. Synergistota ökade något i relativ frekvens hos hundar med grav parodontit jämfört med hundar utan parodontit men är fortfarande mycket mindre förekomman-

de än de tidigare nämna fyla. *Actinomycetota*, *Bacillota*, *Bacteroidota*, *Fusobacteriota*, *Patescibacteria* och *Pseudomonadota* kunde påvisas i samtliga prover (tabell 2) men med varierande relativ frekvens.

Vid analys av absoluta frekvenser av respektive bakterieart kunde det påvisas att de vanligaste bakterierna hos hundar utan parodontit var *C. canimorsus*, *P. cangingivalis*, *P. canis* och *N. zoodegmatis* medan hos hundar med grav parodontit var *P. cangingivalis*, *P. gulae*, *T. forsythia* och *N. zoodegmatis* vanligare (tabell 3). *T. porcinum* kunde inte alls påvisas hos hundarna utan parodontit men fanns i sju prov (ca 41 %) hos hundarna med grav parodontit. Det fanns ingen bakterie som kunde påvisas hos alla proven.



Figur 3: Stapeldiagram visar relativ förekomst av de vanligaste fylum i procent (%) i de olika parodontitstadierna. Provstorlek: utan parodontit n=27, gingivit n=5, lindrig parodontit n=7, måttlig parodontit n=7 och grav parodontit n=17.

Tabell 2: Antal prover inklusive förekommande bakteriefylum i de olika parodontit-grupperna. De fyla som är fetmarkerade är de som visas i figur 3 och är de som har påvisats i högst relativ frekvens. De fyla som inte är fetmarkerade representeras av "övrigt" i figur 3 och är de som har funnits i lägst relativ frekvens.

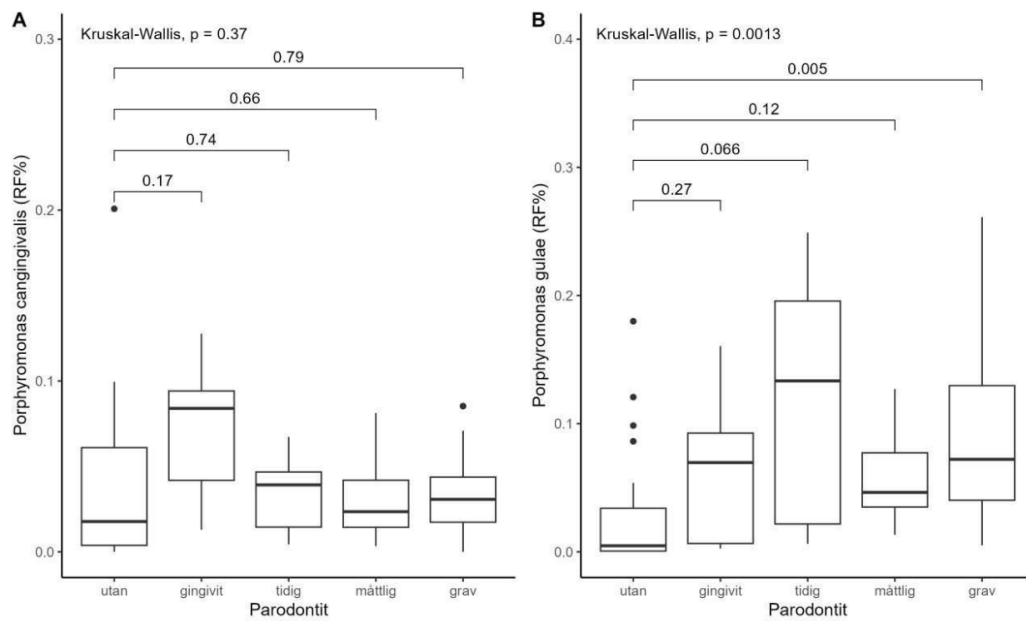
Fylum	utan	gingivit	tidig	måttlig	grav
Totalt antal prov	27	5	7	7	17
<i>Abditibacteriota</i>	0	0	1	0	0
<i>Acidobacteriota</i>	7	1	2	5	4
<i>Actinomyces</i>	27	5	7	7	17
<i>Armatimonadota</i>	3	0	0	2	1
<i>Bacillota</i>	27	5	7	7	17
<i>Bacteroidota</i>	27	5	7	7	17
<i>Bdellovibrionota</i>	1	0	3	1	2
<i>Campylobacterota</i>	27	5	7	7	15
<i>Candidatus Eremiobacterota</i>	2	1	1	4	3
<i>Candidatus Kapabacteria</i>	24	5	7	7	16
<i>Chloroflexota</i>	16	4	7	7	16
<i>Cyanobacteriota</i>	4	0	2	3	4
<i>Deferribacterota</i>	0	0	1	0	1
<i>Deinococcota</i>	2	0	0	0	1
<i>Elusimicrobiota</i>	3	0	2	5	8
<i>Fusobacteriota</i>	27	5	7	7	17
<i>Gemmatimonadota</i>	4	0	1	3	3
<i>Halobacteriota</i>	0	1	2	0	3
<i>Margulisbacteria</i>	1	0	0	0	1
<i>Methanobacteriota</i>	2	0	3	2	8
<i>Myxococcota</i>	8	3	2	3	4
<i>Patescibacteria</i>	27	5	7	7	17
<i>Planctomycetota</i>	6	2	4	3	3
<i>Pseudomonadota</i>	27	5	7	7	17
<i>Spirochaetota</i>	24	5	7	7	16
<i>Synergistota</i>	21	5	7	7	17
<i>Thermodesulfobacteriota</i>	25	5	7	7	17
<i>Thermoplasmatota</i>	1	0	0	0	0
<i>Thermoproteota</i>	0	0	0	1	0
<i>Verrucomicrobiota</i>	6	0	2	4	2

Tabell 3: Antal prover i de olika parodontitstadierna som respektive bakterie kunnat påvisas i. Tabellen beskriver de absoluta frekvenserna.

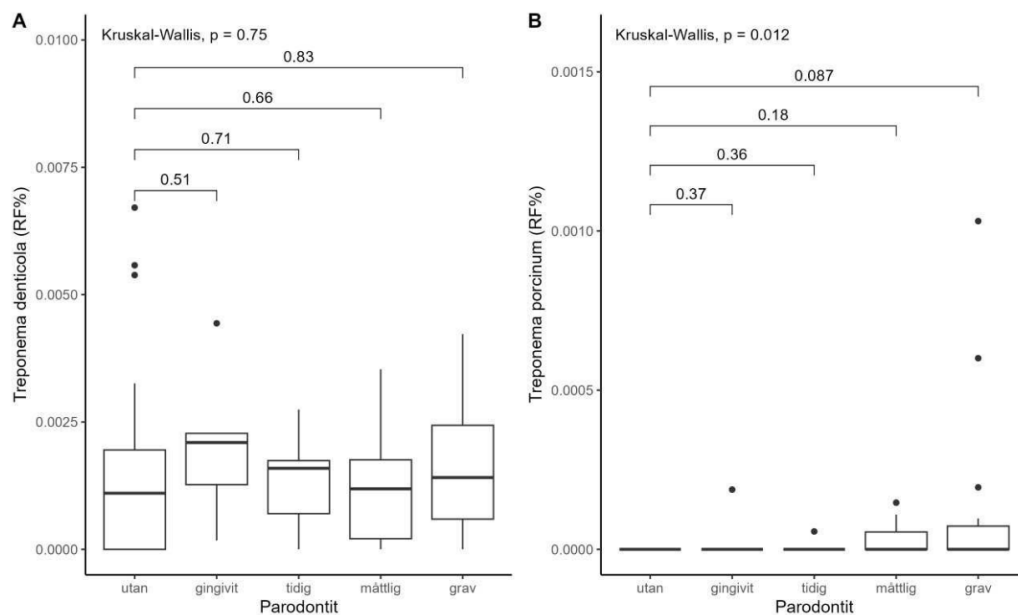
Species	utan	gingivit	tidig	måttlig	grav
Total Samples	27	5	7	7	17
<i>C. canimorsus</i>	26	5	6	6	15
<i>P. cangingivalis</i>	26	5	7	7	16
<i>P. gulae</i>	24	5	7	7	17
<i>T. forsythia</i>	22	5	7	7	17
<i>T. denticola</i>	19	5	6	5	13
<i>T. porcinum</i>	0	1	1	2	7
<i>P. canis</i>	26	5	5	6	15
<i>M. cuniculi</i>	25	3	6	5	11
<i>C. rectus</i>	12	4	2	3	4
<i>C. mucosalis</i>	15	1	3	1	6
<i>N. zoodegmatis</i>	26	4	5	6	17
<i>N. weaveri</i>	23	5	3	3	5
<i>N. animaloris</i>	8	2	2	1	10

Parodontal status och relativ förekomst

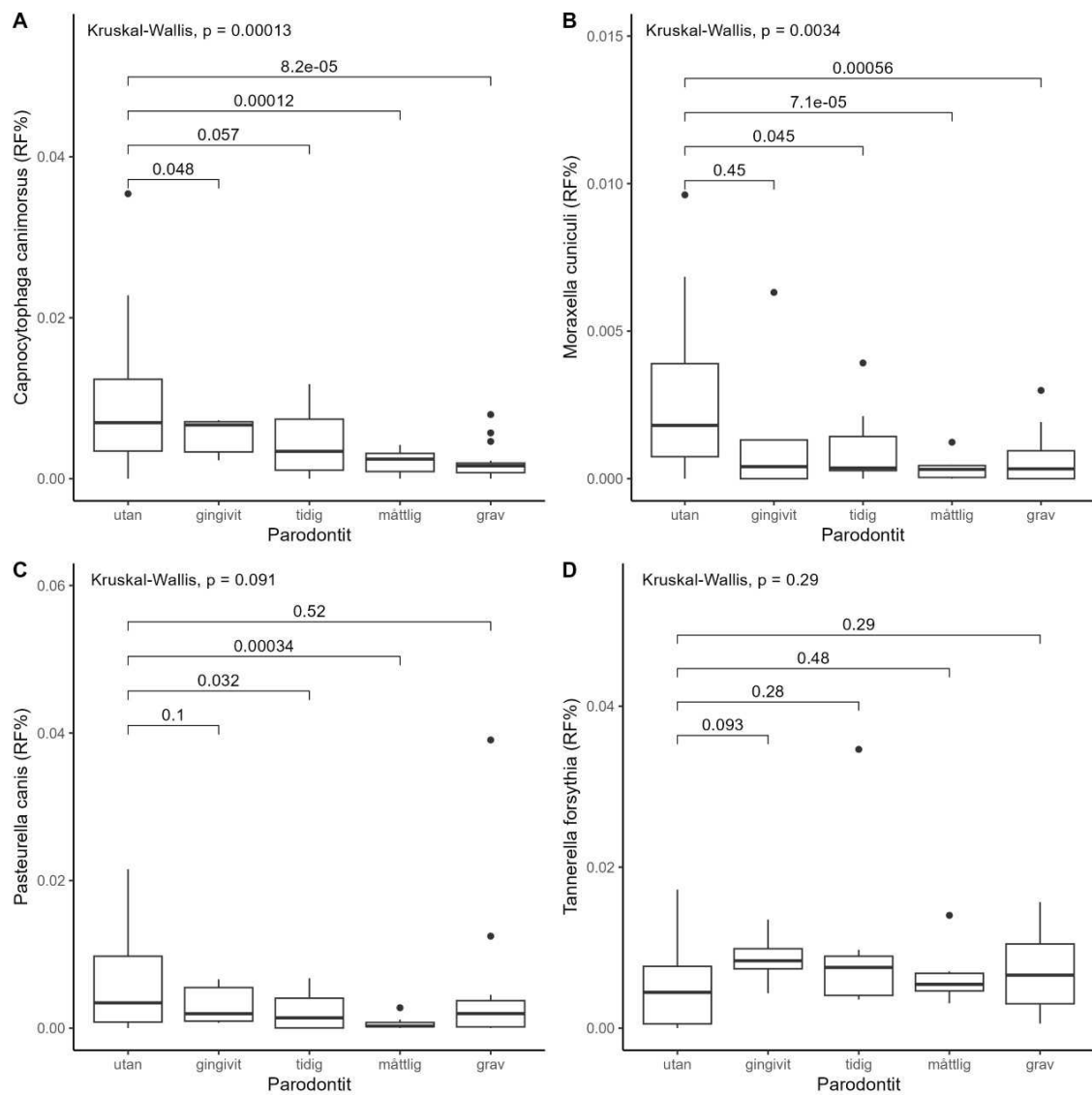
Den relativa förekomsten av *Porphyromonas gulae* var signifikant högre hos hundarna med grav parodontit jämfört med hundarna utan parodontit (figur 4). Det fanns ingen signifikant skillnad mellan den relativa förekomsten av *Porphyromonas cangingivalis* och de olika stadierna av parodontit. Någon statistisk skillnad av relativ förekomst av *Porphyromonas gingivalis* mellan grupperna kunde heller inte påvisas då det endast var i ett prov som *P. gingivalis* påvisades. För *Treponema denticola* kunde ingen signifikant skillnad i den relativa förekomsten mellan de olika stadierna av parodontit identifieras däremot fanns en signifikant skillnad för *Treponema porcinum* i relativ förekomst där förekomsten var högre i gruppen ”grav parodontit” (figur 5). Den relativa förekomsten av *Capnocytophaga canimorsus* var signifikant högre hos hundarna utan parodontit jämfört med grupperna ”måttlig parodontit” och ”grav parodontit” (figur 6). Även den relativa förekomsten av *Moraxella cuniculi* var signifikant högre hos hundarna utan parodontit jämfört med grupperna med parodontit (figur 6). Däremot var det ingen signifikant skillnad i den relativa förekomsten mellan de utan parodontit och de olika parodontitstadierna för *Pasteurella canis* eller *Tannerella forsythia* (figur 6). För *Neisseria animaloris*, *Neisseria weaveri* och *Neisseria zoodegmatis* fanns en signifikant skillnad för de två sistnämnda där den relativa förekomsten var högre hos hundarna utan parodontit medan ingen skillnad kunde ses för *N. animaloris* (figur 7). För *Campylobacter mucosalis* och *Campylobacter rectus* kunde ingen skillnad i relativ förekomst mellan parodontitstadierna påvisas (figur 8).



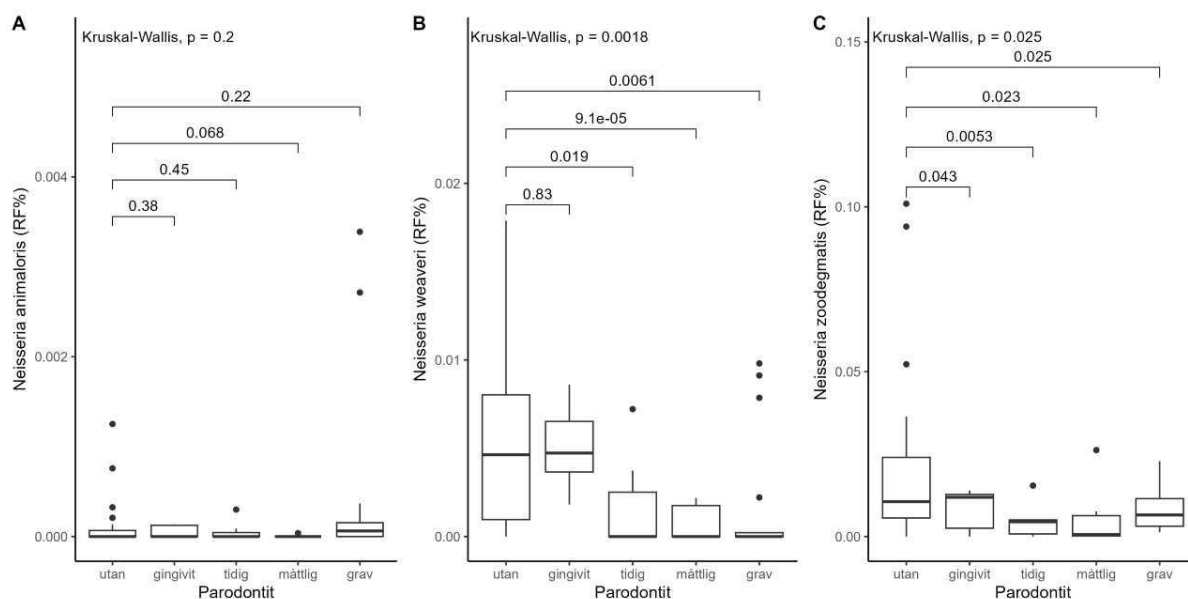
Figur 4: Boxplot för hundarnas parodontitstadie och relativ förekomst i procent (RF%) av (A) *Porphyromonas cangingivalis* samt (B) *Porphyromonas gulae*. Boxploten visar medianvärdet för den relativa förekomsten och övre och under kvartil, vertikala streck visar minimum respektive maxvärden och punkter visar outliers. Signifikansnivån är satt till <0.05 . Provstorlek i varje grupp: utan parodontit $n=27$, gingivit $n=5$, lindrig parodontit $n=7$, måttlig parodontit $n=7$ och grav parodontit $n=17$.



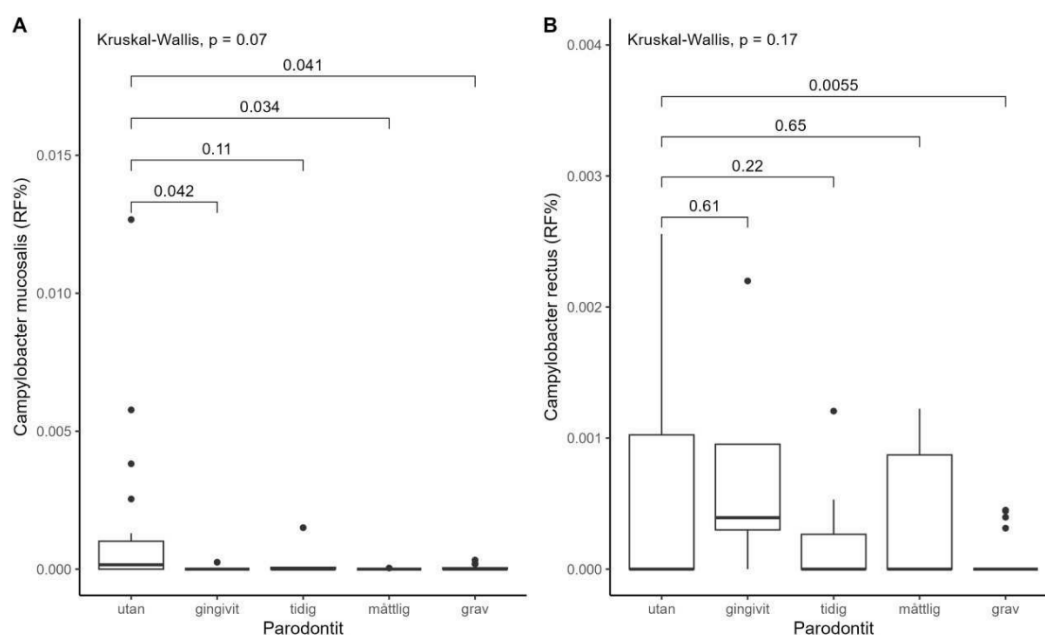
Figur 5: Boxplot för hundarnas parodontitstadie och relativ förekomst i procent (RF%) av (A) *Treponema denticola* samt (B) *Treponema porcinum*. Boxploten visar medianvärdet för den relativa förekomsten och övre och under kvartil, vertikala streck visar minimum respektive maxvärden och punkter visar outliers. Signifikansnivån är satt till <0.05 . Provstorlek i varje grupp: utan parodontit $n=27$, gingivit $n=5$, lindrig parodontit $n=7$, måttlig parodontit $n=7$ och grav parodontit $n=17$.



Figur 6: Boxplot för hundarnas parodontitstadie och relativ förekomst i procent (RF%) av (A) *Capnocytophaga canimorsus*, (B) *Moraxella cuniculi*, (C) *Pasteurella canis* samt (D) *Tannerella forsythia*. Boxploten visar medianvärdet för den relativa förekomsten och övre och under kvartil, vertikala streck visar minimum respektive maxvärden och punkter visar outliers. Signifikansnivån är satt till <0.05 . Provstorlek i varje grupp: utan parodontit $n=27$, gingivit $n=5$, lindrig parodontit $n=7$, måttlig parodontit $n=7$ och grav parodontit $n=17$.



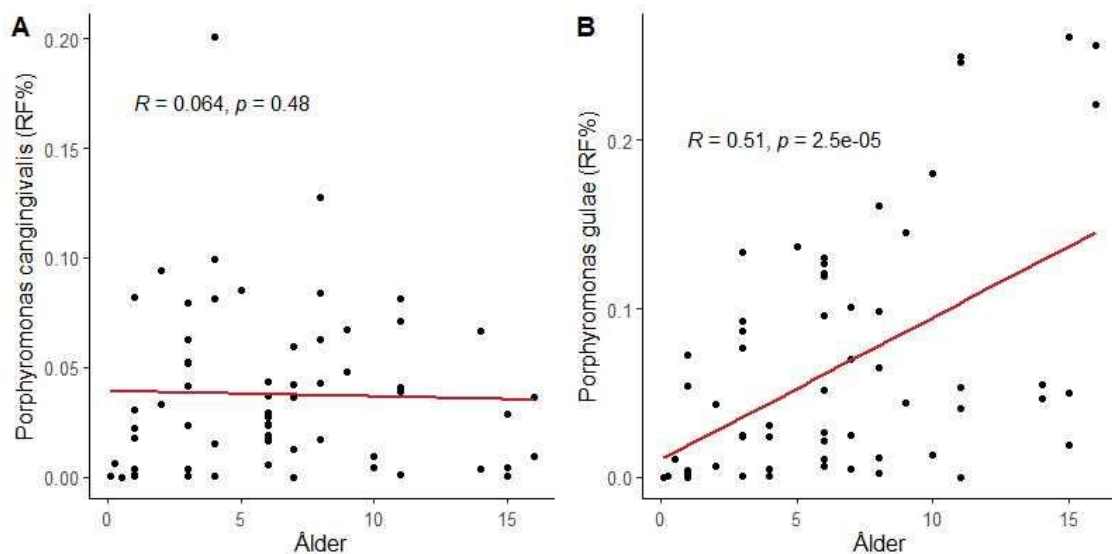
Figur 7: Boxplot för hundarnas parodontitstadie och relativ förekomst i procent (RF%) av (A) *Neisseria animaloris*, (B) *Neisseria weaveri* samt (C) *Neisseria zoodegmatis*. Boxploten visar medianvärdet för den relativa förekomsten och övre och under kvartil, vertikala streck visar minimum respektive maxvärden och punkter visar outliers. Signifikansnivån är satt till <0.05 . Provstorlek i varje grupp: utan parodontit $n=27$, gingivit $n=5$, lindrig parodontit $n=7$, måttlig parodontit $n=7$ och grav parodontit $n=17$.



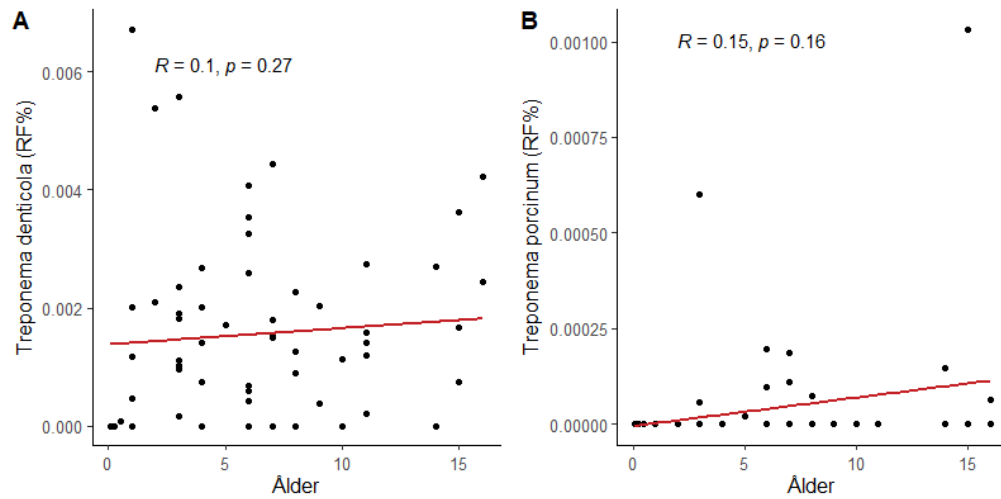
Figur 8: Boxplot för hundarnas parodontitstadie och relativ förekomst i procent (RF%) av (A) *Campylobacter mucosalis* samt (B) *Campylobacter rectus*. Boxploten visar medianvärdet för den relativa förekomsten och övre och under kvartil, vertikala streck visar minimum respektive maxvärden och punkter visar outliers. Signifikansnivån är satt till <0.05 . Provstorlek i varje grupp: utan parodontit $n=27$, gingivit $n=5$, lindrig parodontit $n=7$, måttlig parodontit $n=7$ och grav parodontit $n=17$.

Ålder och relativ förekomst

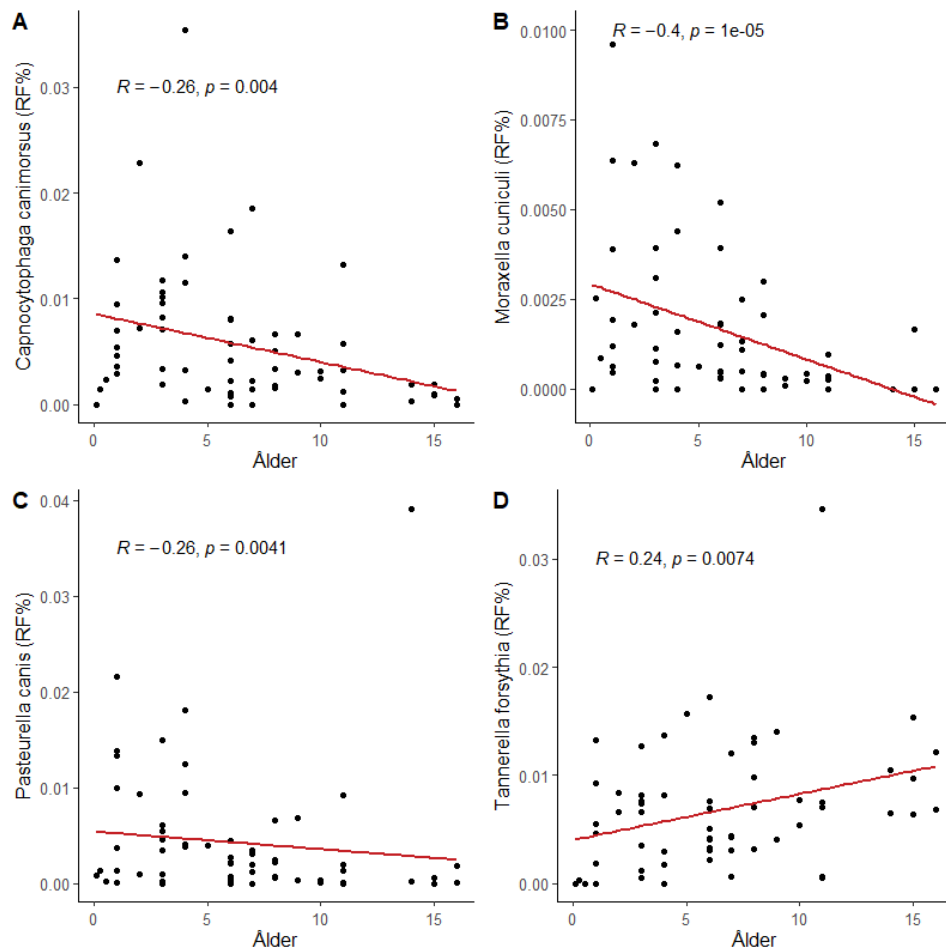
Porphyromonas gulae och *T. forsythia* var oftare förekommande hos äldre hundar (figur 9 och 11) medan *C. canimorsus*, *M. cuniculi*, *P. canis*, *N. zoodegmatis*, *C. mucosalis* samt *C. rectus* var oftare förekommande hos yngre hundar (figur 11, 12 och 13). Inget samband kunde påvisas mellan hundarnas ålder och relativ frekvens av bakterierna *P. cangingivalis*, *T. denticola*, *T. porcinum*, *N. animalorus* och *N. weaveri*.



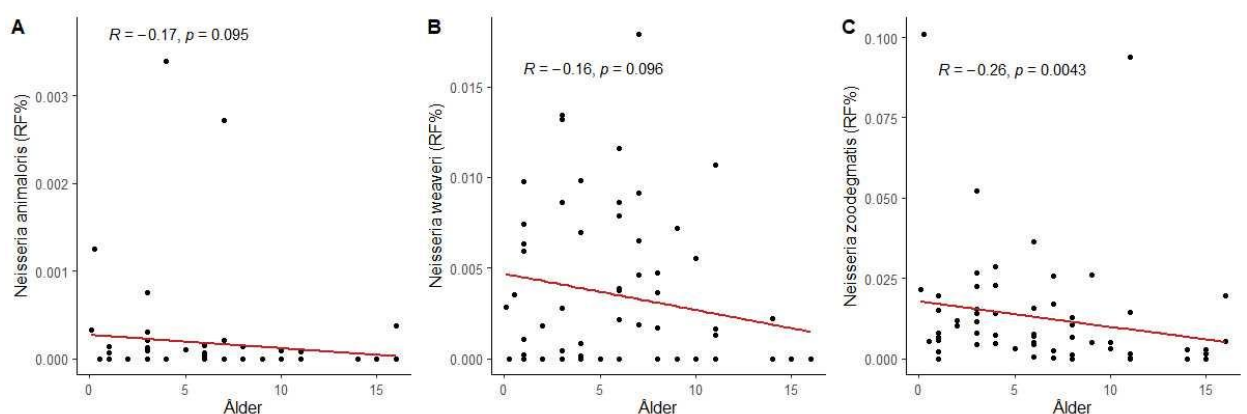
Figur 9: Punktdiagram över hundarnas ålder i år (x-axel) och relativ förekomst i procent (%) av *P. cangingivalis* (A) respektive *P. gulae* (B) (y-axel). Varje punkt representerar ett prov. Provstorlek, $n=63$. Linjen i punktdiagrammen visar trenden och signifikansnivån är satt till <0.05 .



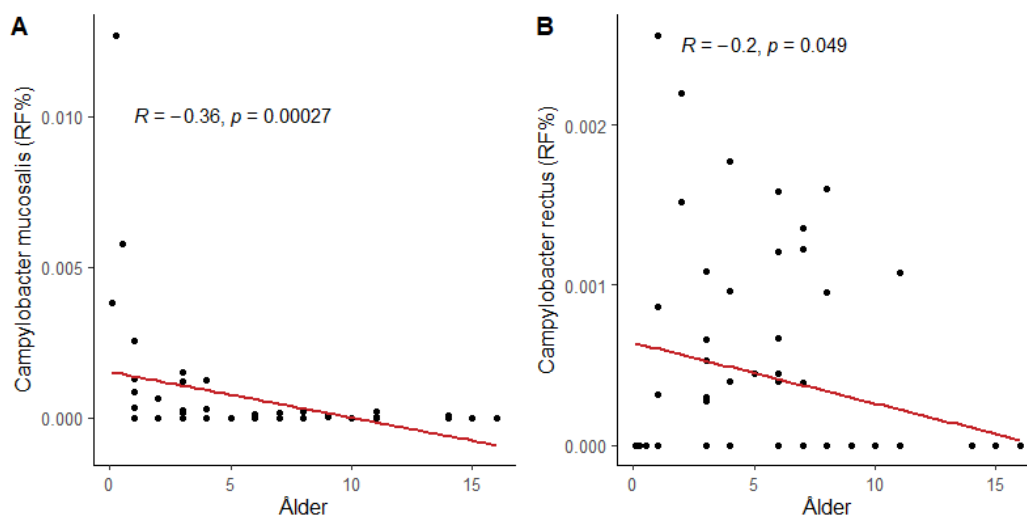
Figur 10: Punktdiagram över hundarnas ålder i år (x-axel) och relativ förekomst i procent (%) av *T. denticola* (A) respektive *T. porcinum* (B) (y-axel). Varje punkt representerar ett prov. Provstorlek, $n=63$. Linjen i punktdiagrammen visar trenden och signifikansnivån är satt till <0.05 .



Figur 11: Punktdiagram över hundarnas ålder i år (x-axel) och relativ förekomst i procent (%) av *C. canimorsus* (A), *M. cuniculi* (B), *P. canis* (C) och *T. forsythia* (D) (y-axel). Varje punkt representerar ett prov. Provstorlek, $n=63$. Linjen i punktdiagrammen visar trenden och signifikansnivån är satt till <0.05 .



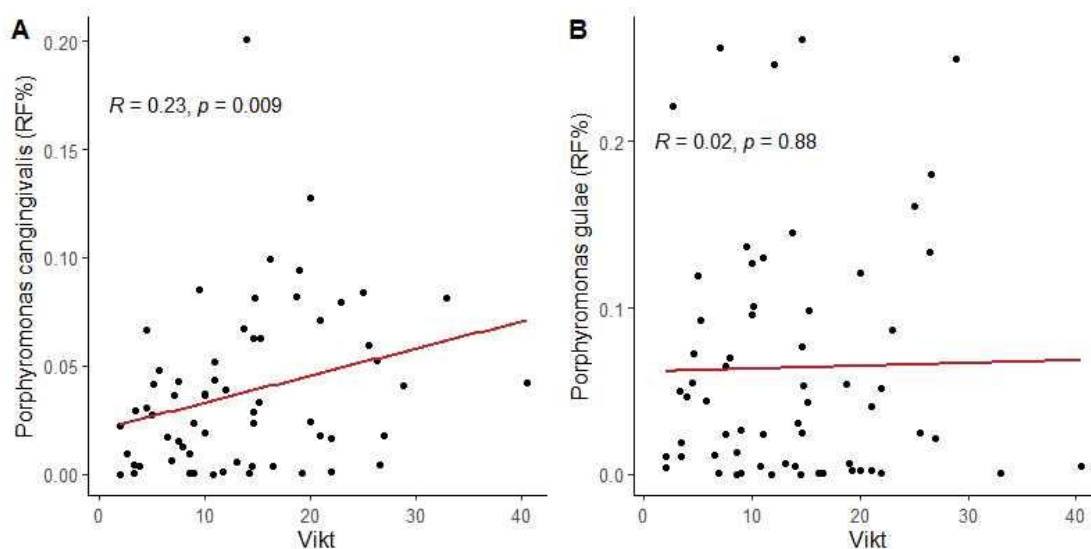
Figur 12: Punktdiagram över hundarnas ålder i år (x-axel) och relativ förekomst i procent (%) av *N. animaloris* (A), *N. weaveri* (B) och *N. zoodegmatis* (C) (y-axel). Varje punkt representerar ett prov. Provstorlek, $n=63$. Linjen i punktdiagrammen visar trenden och signifikansnivån är satt till <0.05 .



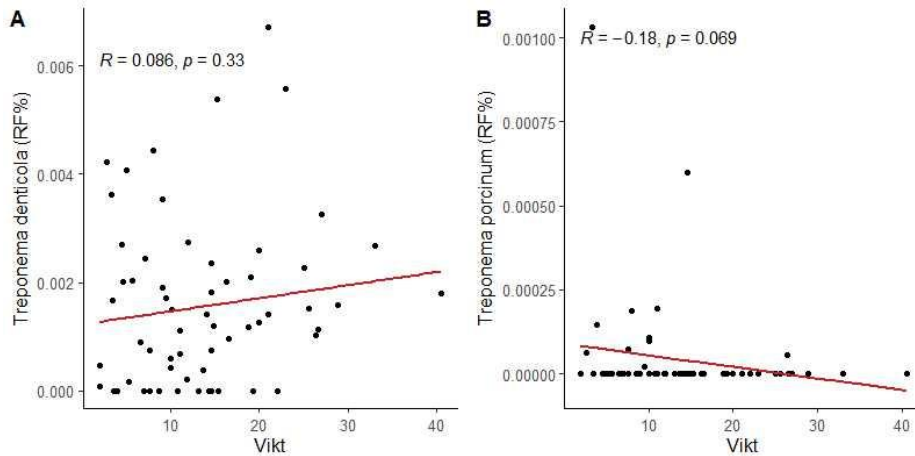
Figur 13: Punktdiagram över hundarnas ålder i år (x-axel) och relativ förekomst i procent (%) av *C. mucosalis* (A), och *C. rectus* (B) (y-axel). Varje punkt representerar ett prov. Provstorlek, $n=63$. Linjen i punktdiagrammen visar trenden och signifikansnivån är satt till <0.05 .

Vikt och relativ förekomst

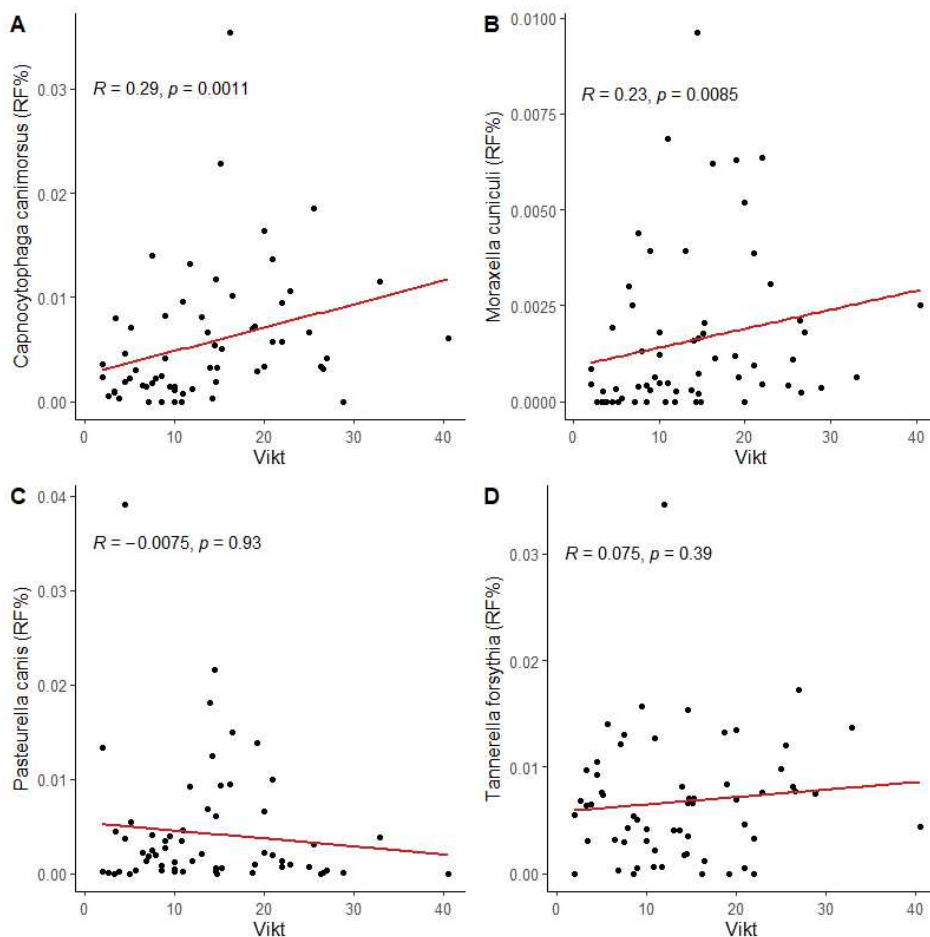
Det fanns ett samband mellan vikt och relativ förekomst av *P. cangingivalis*, *C. canimorsus*, *M. cuniculi* samt *N. weaveri* där bakterierna oftare förekom hos hundar av större vikt (figur 14, 16 och 17).



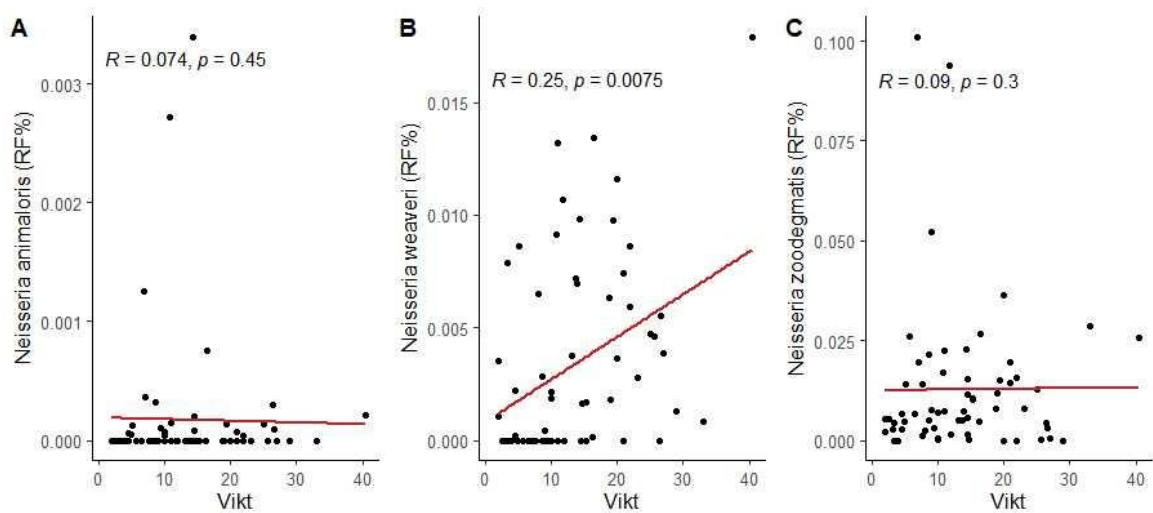
Figur 14: Punktdiagram över hundarnas vikt i kilogram (x-axel) och relativ förekomst i procent (%) av *P. cangingivalis* (A), och *P. gulae* (B) (y-axel). Varje punkt representerar ett prov. Provstorlek, $n=63$. Linjen i punktdiagrammen visar trenden och signifikansnivån är satt till <0.05 .



Figur 15: Punktdiagram över hundarnas vikt i kilogram (x-axel) och relativ förekomst i procent (%) av *T. denticola* (A), och *T. porcinum* (B) (y-axel). Varje punkt representerar ett prov. Provstorlek, $n=63$. Linjen i punktdiagrammen visar trenden och signifikansnivån är satt till <0.05 .



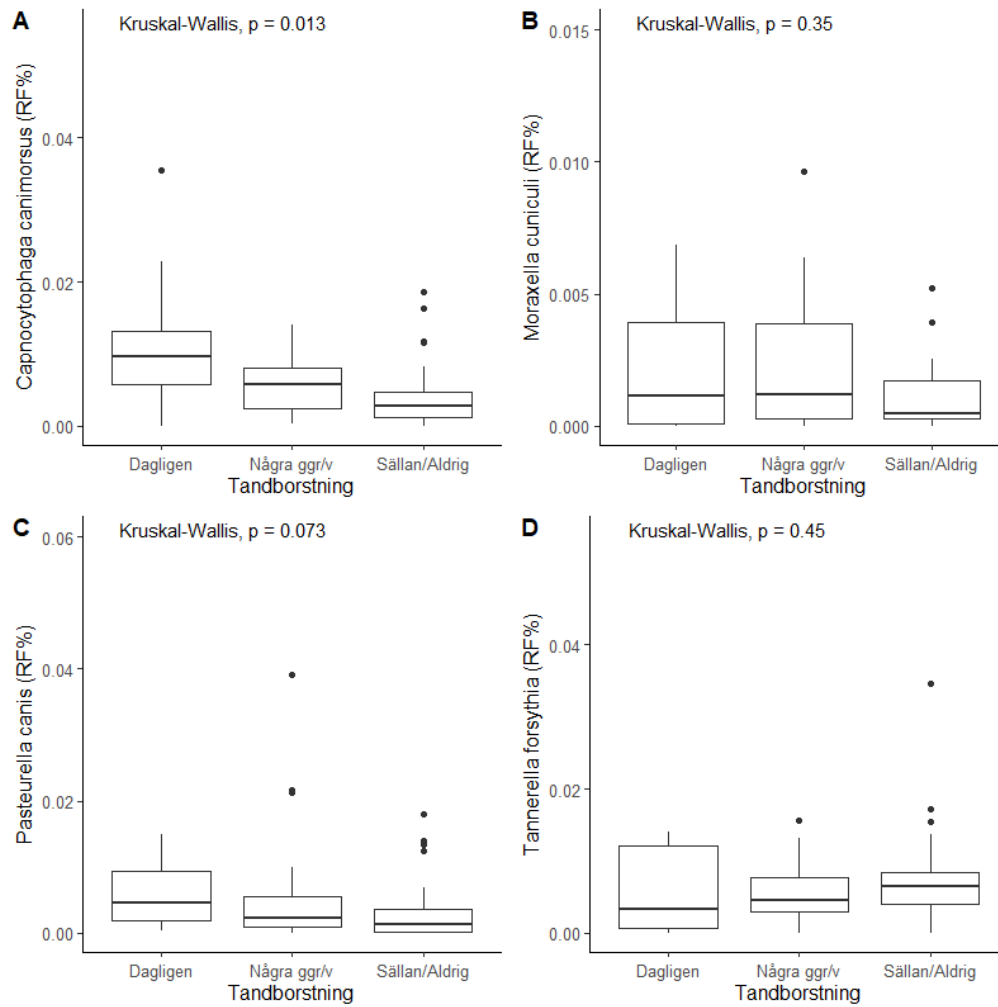
Figur 16: Punktdiagram över hundarnas vikt i kilogram (x-axel) och relativ förekomst i procent (%) av *C. canimorsus* (A), *M. cuniculi* (B), *P. canis* (C) och *T. forsythia* (D) i procent (y-axel). Varje punkt representerar ett prov. Provstorlek, $n=63$. Linjen i punktdiagrammen visar trenden och signifikansnivån är satt till <0.05 .



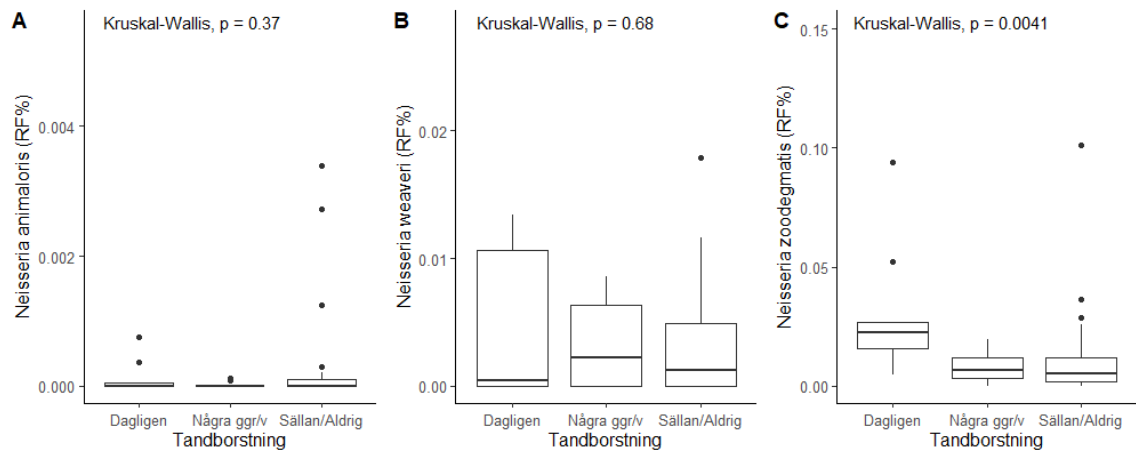
Figur 17: Punktdiagram över hundarnas vikt i kilogram (x-axel) och relativ förekomst i procent (%) av *N. animaloris* (A), *N. weaveri* (B) och *N. zoodegmatis* (C) i procent (y-axel). Varje punkt representerar ett prov. Provstorlek, $n=63$. Linjen i punktdiagrammen visar trenden och signifikansnivån är satt till <0.05 .

Tandborstning och relativ förekomst

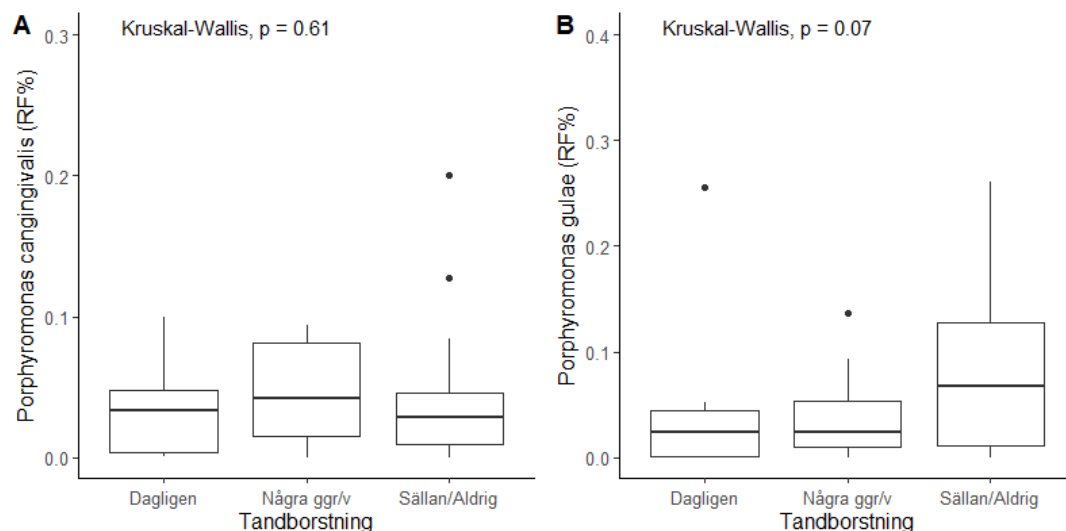
Vid undersökning av eventuellt samband mellan förekomst av bakterier och tandborstning påvisades att den relativa förekomsten av *C. canimorsus* och *N. zoodegmatis* var högre i gruppen som borstade tänderna dagligen (figur 18 och 19). Bland de resterande bakterier som undersöktes kunde inget samband påvisas (figur 18, 19, 20, 21 och 22).



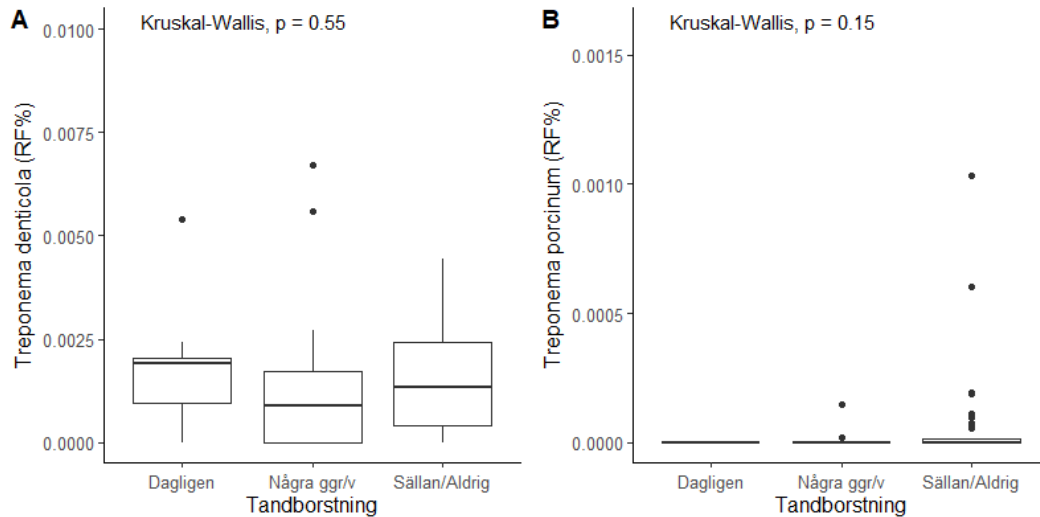
Figur 18: Boxplot för hundarnas tandborstningsrutiner och relativ förekomst i procent (RF%) av *C. canimorsus* (A), *M. cuniculi* (B), *P. canis* (C) och *T. forsythia*. Boxploten visar medianvärdet för den relativa förekomsten och övre och under kvartil, vertikala streck visar minimum respektive maxvärden och punkter visar outliers. Signifikansnivån är satt till <0.05 . Provstorlek i varje grupp: dagligen $n=9$, några ggr/v $n=17$, sällan/aldrig $n=36$.



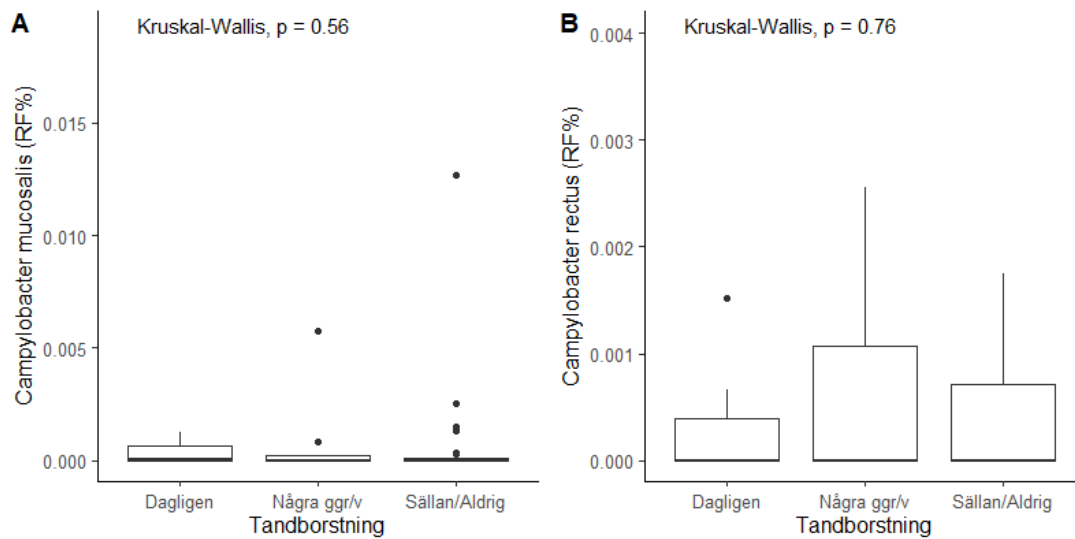
Figur 19: Boxplot för hundarnas tandborstningsrutiner och relativ förekomst i procent (RF%) av *N. animaloris* (A), *N. weaveri* (B), och *N. zoodegmatis* (C). Boxploten visar medianvärdet för den relativa förekomsten och övre och under kvartil, vertikala streck visar minimum respektive maxvärden och punkter visar outliers. Signifikansnivån är satt till <0.05 . Provstorlek i varje grupp: dagligen $n=9$, några ggr/v $n=17$, sällan/aldrig $n=36$.



Figur 20: Boxplot för hundarnas tandborstningsrutiner och relativ förekomst i procent (RF%) av *P. cangingivalis* (A), och *P. gulae* (B). Boxploten visar medianvärdet för den relativa förekomsten och övre och under kvartil, vertikala streck visar minimum respektive maxvärden och punkter visar outliers. Signifikansnivån är satt till <0.05 . Provstorlek i varje grupp: dagligen $n=9$, några ggr/v $n=17$, sällan/aldrig $n=36$.



Figur 21: Boxplot för hundarnas tandborstningsrutiner och relativ förekomst i procent (RF%) av *T. denticola* (A), och *T. porcinum* (B). Boxploten visar medianvärdet för den relativa förekomsten och övre och under kvartil, vertikala streck visar minimum respektive maxvärden och punkter visar outliers. Signifikansnivån är satt till <0.05 . Provstorlek i varje grupp: dagligen $n=9$, några ggr/v $n=17$, sällan/aldrig $n=36$.



Figur 22: Boxplot för hundarnas tandborstningsrutiner och relativ förekomst i procent (RF%) av *C. mucosalis* (A), och *C. rectus* (B). Boxploten visar medianvärdet för den relativa förekomsten och övre och under kvartil, vertikala streck visar minimum respektive maxvärden och punkter visar outliers. Signifikansnivån är satt till <0.05 . Provstorlek i varje grupp: dagligen $n=9$, några ggr/v $n=17$, sällan/aldrig $n=36$.

5. Diskussion

5.1 Mikrobiomet

Sekvenseringsresultat

Denna studie påvisade totalt 88 811 unika sekvenser som klustrade till 414 bakteriearter. I tidigare studier påvisades färre bakteriearter, såsom 714 (Niemiec *et al.* 2022) respektive 274 (Davis *et al.* 2013). En orsak till skillnaderna mellan studierna är troligen att illuminasekvensering ger mer data och tekniken har utvecklats sedan 2013. Artrikedom och diversitet mellan de olika parodontitkategorier i denna studie skiljde sig inte åt vilket stöds av tidigare studier (Niemiec *et al.* 2022; Santibáñez *et al.* 2021). I denna studie skiljde inte heller artsammansättningen (PCA) mellan parodontitkategorier. Däremot påvisade Niemiec *et al.* (2022) skillnader mellan hundar utan parodontit och gruppen med grav parodontit för artsammansättning (PCA) vilket denna studie inte kan bekräfta. Viktigt att ha i åtanke angående resultaten i denna studie är dock att det var väldigt få hundar i tre av fem grupper vilket kan vara en bidragande orsak till att inga skillnader mellan parodontitgrupperna kunde påvisas.

Fyla

Vid analys av den relativa frekvensen av olika bakteriefyla fann denna studie att den största förändringen skedde hos *Pseudomonadota* som minskade, och *Bacillota* som ökade i relativ frekvens hos hundarna med grav parodontit medan relativ frekvens för *Bacteroidota* inte ändrades lika tydligt. Om detta jämförs med en studie gjord av Santibáñez *et al.* (2021) som också analyserade relativ frekvens och hur den förändrades beroende på munstatus, finns det vissa likheter i resultatet. Det var nämligen *Bacteroidota* som ökade mest hos hundar med parodontit i den studien vilket denna studie inte kan bekräfta men däremot har båda studierna kunnat påvisa att *Pseudomonadota* minskar vid parodontit. *Bacillota* har också ökat för hundarna med parodontit i studien gjord av Santibáñez *et al.* (2021) men inte lika tydligt. Dock så bestod studien från 2021 endast av en studiepopulation på 12 hundar utan parodontit och 12 hundar med parodontit men båda studierna tenderar att ge liknande resultat och inga motsägande resultat.

Porphyromonas

I denna studie var *P. gulae* vanligare hos hundarna med parodontit och framförallt bland äldre hundar vilket överensstämmer med andra studier (Santibáñez *et al.* 2021; Niemiec *et al.* 2022; Yasuda *et al.* 2024). Det stämmer även överens med ålder eftersom det är en riskfaktor för parodontit. Även vikt har angetts som eventuell riskfaktor, men i denna studie fanns inget signifikant samband mellan *P. gu-*

lae och vikt, då *Porphyromonas cangingivalis* inte förekom oftare i någon av grupperna vilket även visats av tidigare studier (Wallis *et al.* 2021; Niemiec *et al.* 2022). Det finns dock en studie (Davis *et al.* 2013) som visat att *P. cangingivalis* var vanligare hos hundar utan parodontit. Däremot var *P. cangingivalis* vanligare hos hundar av större vikt i denna studie vilket skulle kunna indikera att bakterien är vanligare hos hundar utan parodontit då hundar av större vikt har generellt mindre parodontit men detta är inte bekräftat som orsak till resultatet (Hamp *et al.* 1984; Carreira *et al.* 2015).

Treponema

Denna studie kunde inte påvisa signifikanta skillnader i relativ förekomst av *T. denticola* för någon av variablerna parodontitstatus, ålder, vikt eller tandborstning vilket skulle kunna tyda på att *T. denticola* inte är av betydelse för sjukdomen. Däremot fanns en signifikant skillnad för *Treponema porcinum* i relativförekomst där förekomsten var högre i gruppen med grav parodontit men det var få prover som innehöll bakterien därför skulle mer forskning på just *T. porcinum* behövas för att förstå dess roll.

Tannerella forsythia

I denna studie har *T. forsythia* inte visats vara vanligare hos hundar med parodontit, men däremot har bakterien visats korrelera positivt med ålder vilket innebär att den är vanligare hos äldre hundar. *T. forsythias* relevans är som tidigare nämnt inte klarlagd och det finns motsäggande resultat (Kačirová *et al.* 2022; Kwon *et al.* 2022; Özavci *et al.* 2019). Tidigare studier har diskuterat hur *T. forsythia* och *P. gingivalis* vid samexistens varit vanligare hos sjuka hundar (Di Bello *et al.* 2014; Sharma 2010). I denna studie har endast ett prov testat positivt för *P. gingivalis* vilket skulle kunna vara en alternativ förklaring till varför *T. forsythia* inte haft högre förekomst i de sjuka grupperna.

Capnocytophaga canimorsus

I denna studie fanns en signifikant skillnad i relativ förekomst av *C. canimorsus* där bakterien var vanligare hos friska hundar vilket även visats av tidigare studier (Davis *et al.* 2013; Wallis *et al.* 2021; Niemiec *et al.* 2022). *C. canimorsus* var även i denna studie vanligare hos yngre hundar, större hundar och hos hundar som dagligen borstade tänderna vilket skulle kunna vara ett tecken på att *C. canimorsus* är vanligare hos hundar utan parodontit.

Neisseria

Neisseria weaveri och *N. zoodegmatis* var i denna studie signifikant vanligare i den friska gruppen jämfört med de sjuka. Dessutom var *N. weaveri* vanligare hos större hundar medan *N. zoodegmatis* var vanligare hos yngre hundar vilket skulle

kunna styrka föregående resultat att bakterierna är vanligare hos hundar utan parodontit. Detta resultat stöds inte av tidigare studie gjord av Tavares *et al.* (2023) som dock endast mäter prevalens och inte relativ förekomst och som endast hade sju hundar positiva för *N. weaveri* där en var frisk, tre hade gingivit och tre med parodontit samt liknande resultat för *N. zoodegmatidis* som endast analyserades för prevalens med noll friska, två hundar med gingivit och sex hundar med parodontit. Den relativa förekomsten av *N. animaloris* var i denna studie oberoende av parodontitstatus, ålder, vikt och tandborstningsrutiner. Tidigare studier har varit motsägande där en kopplar bakterien till parodontit (Tavares *et al.* 2023) medan en andra kopplar bakterien till friska hundar (Niemiec *et al.* 2022). Den förstnämnda studien har som tidigare nämnt endast analyserat prevalens och har endast fem prover med *N. animaloris* medan den senare nämnda studien analyserade relativ förekomst samt diskuterade till och med *N. animaloris* som en potentiell biomarkör för friska hundar.

Campylobacter

Campylobacter rectus och *Campylobacter mucosalis* har i denna studie inte kunnat kopplas till parodontit men bakterierna har visat sig vara signifikant vanligare hos yngre hundar. Det fanns inget signifikant samband mellan bakteriernas relativa förekomst och vikt hos hundarna. I tidigare studie har *C. rectus* visats vara vanligare hos hundar med parodontit (Kwon *et al.* 2022), dock tittade man endast på prevalens och ej relativ prevalens men denna studie kan inte bekräfta att bakterien skulle ha en koppling till parodontit.

Moraxella

Moraxella cuniculi har i denna studie visat sig vara vanligare hos hundar utan parodontit men även hos yngre hundar och hos hundar av större ras. Detta resultat stöds av tidigare studier men viktigt att nämna är att ingen av dessa studier har analyserat bakterieart utan anger endast *Moraxella* sp. som vanligare hos friska hundar (Davis *et al.* 2013a; Sturgeon *et al.* 2013; Wallis *et al.* 2021a; Niemiec *et al.* 2022b). Denna studie har inte tittat på släktet i helhet med anledning av att många arter inom släktet inte kunde hittas i tillräckligt många prov.

Eikenella corrodens

Endast tre prover innehöll bakterien *E. corrodens* i denna studie varav en hund var frisk, en hund hade måttlig parodontit och en hund hade grav parodontit. Därför kan denna studie varken bekräfta eller argumentera emot tidigare studier angående bakteriens roll vid parodontit. En studie fick dock fram en prevalens på 4 % (Özavci *et al.* 2019) vilket är ungefär samma som denna studie har fått (4,3 %).

5.2 Styrkor och svagheter med denna studie

Resultatet i denna studie stärks av bland annat att det är den relativa förekomsten som har analyserats och att sjukdomsgradering samt provtagning framförallt har utförts av veterinärer som är utbildade inom tandsjukdomar. Dock så finns det risk att hur proverna togs skiljt sig åt trots instruktioner vilket kan innebära att veterinärerna provtagit olika stora områden och fått med sig olika mycket provmaterial. För ett tydligare och säkrare resultat hade studiens populationsstorlek, speciellt i grupperna med gingivit, lindrig och måttlig parodontit behövt öka. Det hade varit optimalt ifall grupperna var lika stora eller om det fanns lika många hundar med parodontit som utan parodontit. Nu är tre av fem grupper väldigt få vilket gör att resultaten angående dessa blir mindre trovärdiga. Det finns dessutom en risk att PCR-steget kan ge upphov till ett bias i artrikedomen om primrarna binder olika bra till de olika arternas 16s. Detta kan resultera i att vissa bakterier som primrarna lättare binder till blir överrepresenterade medan andra blir underrepresenterade. Det finns också risk för kontaminering vid laborationen och då primrarna fungerar på alla bakterier, så finns det viss risk för att de tar med omgivningsbakterier. Även den mänskliga faktorn kan nämnas med eventuella misstag och variationer i provinsamling.

Confounders (förväxlingsfaktorer) är något som behöver nämnas. Variabler såsom ålder och vikt i denna studie innebär en risk för missvisande resultat då det finns risk för att dessa är confounders. Grupperna har inte överensstämmande ålder, vikt, foder eller tandborstningsrutiner. För att kunna göra en korrekt bedömning hade dessa variabler behövts vara likartade i alla grupper. Då hundar av mindre storlek och högre ålder, som är kända riskfaktorer för parodontit, blir överrepresenterade i parodontitgrupperna blir det inte lika många prover från större eller yngre hundar med parodontit vilket gör det svårt att få tillförlitliga resultat vid jämförelse av mikrobiotan. Detta gör att mikrobiotan som analyserats i grupperna med parodontit framförallt är mikrobiota från mindre och äldre hundar. En annan eventuell confounder är tandborstning. Många hundar med grav parodontit har mycket ont och tillåter ej att djurägaren borstar deras tänder vilket kan ge en missvisande bild av fördelningen mellan grupperna. Att analysera kausala samband tillsammans med den orala mikrobiotan skulle därför vara en intressant studie för framtiden.

Motsägande resultat har varit en återkommande utmaning i denna studie och att jämföra studier innebär därför vissa svårigheter. Orsaker till detta kan vara många och det finns flertalet faktorer som kan påverka resultatet som är viktiga att nämna. Studier som använt annan sjukdomsgradering, olika insamlingsmetoder som exempelvis subgingivala, supragingivala eller orala prover och olika populationer är exempel på sådana faktorer. Vissa studier har endast haft studiepopulationer på

ett tiotal hundar medan andra har kommit upp i hundratal. Dessutom finns det stora variationer i rassammansättning mellan olika studier.

Det faktum att vissa studier endast mäter bakteriers prevalens medan andra, inklusive denna studie, mäter bakteriers relativa förekomst försvårar jämförelsen av studiers resultat. Ifall prevalensen är det som analyseras kommer en hund med en enda bakterie av arten x att klassas likadant som en annan hund som har tusentals av samma bakterie medan detta är något man tar hänsyn till vid analys av relativ förekomst. Det denna studie visar är att det är informativt att presentera båda resultaten då majoriteten av bakterierna analyserade i denna studie kan påvisas i majoriteten av alla prover. När sedan relativ förekomst analyseras påvisas skillnader som inte syns vid enbart analys av absoluta frekvenser.

5.3 Framtida forskning

Denna studie har inriktat sig på skillnader i det supragingivala plackets mikrobiom. Det som automatiskt blir nästa fråga är varför det finns en skillnad och vilka bakomliggande verkningsmekanismer hos bakterierna gör att parodontiet reagerar eller inte. Det har diskuterats bland annat LPS och skapandet av dysbios i både denna och tidigare studier men för att förstå på artnivå behövs mer forskning inriktad på varje bakterie enskilt och i samspel.

En framtida forskningsmålsättning skulle kunna vara att studera biomarkörer som diagnostiskt redskap vilket redan har börjat diskuteras i tidigare studier. Det finns en studie som analyserat plack och visat att bakterieprov från vakna hundar kan fungera som ett diagnostiskt hjälpmedel vid parodontit (Ruparell *et al.* 2021). En annan studie har analyserat och diskuterat "kärnfloran" (the core microbiom) i plack från hundar av olika sjukdomsstadie och både plockat fram bakterier som har visat sig vara unika för de olika stadierna men även visat att *P. gulae* signifikant ökade i gruppen med grav parodontit och inte fanns med i den friska gruppens "kärnflora" (Niemiec *et al.* 2022). I samma studie kunde vissa bakterier endast hittas hos hundar med friskt parodontium däribland *C. canimorsus*. Med denna kunskap skulle det inte vara omöjligt att det är just *P. gulae* och *C. canimorsus* som kommer att bli framtidens biomarkörer för parodontit och att provtagning sker på kliniken på vakna hundar.

Något som inte har varit i fokus i denna studie, men som skulle kunna vara intressant för framtida forskning eller litteratursammanställning är vilket foder eller mer specifikt fodertillsatser som kan förebygga utvecklingen av parodontit. Denna studie hade som ambition att undersöka detta men fick begränsas till övriga faktorer. Detta var dels på grund av tidsbrist men även då majoriteten av hundarna i

studien blandade flera olika fodertyper vilket hade försvårat analyserna i hög grad. Än så länge har tidigare studier tittat på bland annat kalcium, zink och folsyra med en del bevisning (Aziz *et al.* 2021; Carreira *et al.* 2015; Harvey 2005) där intag av folsyra ledde till en minskning av *P. gulae* i den orala mikrobiotan (Shirahata *et al.* 2024).

5.4 Konklusion

Parodontit är en komplex sjukdom som drabbar många hundar runt om i världen. Sjukdomen är komplex i den mening att det inte endast är plackbildning och dysbios som avgör utbredningen utan även individens immunförsvar och immunförsvarets reaktion på mikrober. Detta i sin tur innebär att faktorer som kan påverka immunförsvaret även kan ha en roll för utvecklingen av parodontit. Diagnostik och behandling är ofta invasiva åtgärder som kräver generell anestesi vilket innebär risker för hunden och kostnader för djurägaren.

Syftet med den här studien var att få en ökad förståelse för sjukdomens etiologi genom att besvara frågeställningen om det finns en skillnad i supragingival mikrobiota hos hundar med respektive utan parodontit. Denna studien har kommit fram till att det finns skillnad på bakterieartnivå. Det finns bakterier som är vanligare hos hundar med konstaterad parodontit däribland *P. gulae* och *T. porcinum* och det finns bakterier som är vanligare hos hundar friska från parodontit däribland *C. canimorsus*, *M. cuniculi*, *N. weaveri* och *N. zoodegmatis*. Denna studie är av stor vikt då den antyder att ifall det finns metoder som gör att den orala mikrobiotan skulle kunna påverkas, genom exempelvis probiotika eller genom att gynna de ”goda” bakterierna, skulle man vara ett steg närmare att lättare kunna förebygga parodontit hos hundar.

Särskilt tack

Tack till Svelands stiftelse som har finansierat förbrukningsmaterial och sekvenseringen hos Science for Life Laboratory.

The author acknowledge support from the National Genomics Infrastructure in Stockholm funded by Science for Life Laboratory, the Knut and Alice Wallenberg Foundation and the Swedish Research Council, and SNIC/NAISS/Uppsala Multidisciplinary Center for Advanced Computational Science for assistance with massively parallel sequencing and access to the UPPMAX computational infrastructure.

Tack till Uppsala Veterinärklinik Evidensia som hjälpt till med provinsamling.

Tack till Veterinär Garland som hjälpt till med provinsamling.

Tack till Universitetsdjursjukhuset, UDS, som hjälpt till med provinsamling.

Tack till alla djurägare som låtit sina hundar vara med i studien.

Referenser

- de Andrade, K.Q., Almeida-da-Silva, C.L.C. & Coutinho-Silva, R. (2019). Immunological pathways triggered by *Porphyromonas gingivalis* and *Fusobacterium nucleatum*: Therapeutic possibilities? *Mediators of Inflammation*, 2019, 7241312. <https://doi.org/10.1155/2019/7241312>
- Aziz, J., Rahman, M.T. & Vaithilingam, R.D. (2021). Dysregulation of metallothionein and zinc aggravates periodontal diseases. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 66, 126754. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2021.126754>
- Callahan, B.J., McMurdie, P.J., Rosen, M.J., Han, A.W., Johnson, A.J.A. & Holmes, S.P. (2016). DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods*, 13 (7), 581–583. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3869>
- Carreira, L.M., Dias, D. & Azevedo, P. (2015). Relationship between gender, age, and weight and the serum ionized calcium variations in dog periodontal disease evolution. *Topics in Companion Animal Medicine*, 30 (2), 51–56. <https://doi.org/10.1053/j.tcam.2015.07.001>
- Davis, I.J., Wallis, C., Deusch, O., Colyer, A., Milella, L., Loman, N. & Harris, S. (2013). A cross-sectional survey of bacterial species in plaque from client owned dogs with healthy gingiva, gingivitis or mild periodontitis. *PLoS One*, 8 (12), e83158. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0083158>
- Di Bello, A., Buonavoglia, A., Franchini, D., Valastro, C., Ventrella, G., Greco, M.F. & Corrente, M. (2014). Periodontal disease associated with red complex bacteria in dogs. *Journal of Small Animal Practice*, 55 (3), 160–163. <https://doi.org/10.1111/jsap.12179>
- Dilegge, S.K., Edgcomb, V.P. & Leadbetter, E.R. (2011). Presence of the oral bacterium *Capnocytophaga canimorsus* in the tooth plaque of canines. *Veterinary Microbiology*, 149 (3), 437–445. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2010.12.010>
- Enlund, K.B., Brunius, C., Hanson, J., Hagman, R., Höglund, O.V., Gustås, P. & Pettersson, A. (2020). Dental home care in dogs - a questionnaire study among Swedish dog owners, veterinarians and veterinary nurses. *BMC Veterinary Research*, 16 (1), 90. <https://doi.org/10.1186/s12917-020-02281-y>
- Flancman, R., Singh, A. & Weese, J.S. (2018). Evaluation of the impact of dental prophylaxis on the oral microbiota of dogs. *PLoS One*, 13 (6), e0199676. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0199676>
- Gaastra, W. & Lipman, L.J.A. (2010). *Capnocytophaga canimorsus*. *Veterinary Microbiology*, 140 (3), 339–346. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.01.040>
- Gołyńska, M., Polkowska, I., Bartoszcze-Tomaszewska, M., Sobczyńska-Rak, A. & Matuszewski, Ł. (2017). Molecular-level evaluation of selected periodontal pathogens from subgingival regions in canines and humans with periodontal disease. *Journal of Veterinary Science*, 18 (1), 51–58. <https://doi.org/10.4142/jvs.2017.18.1.51>

- Hajishengallis, G. & Lamont, R. j. (2012). Beyond the red complex and into more complexity: the polymicrobial synergy and dysbiosis (PSD) model of periodontal disease etiology. *Molecular Oral Microbiology*, 27 (6), 409–419. <https://doi.org/10.1111/j.2041-1014.2012.00663.x>
- Hamp, S.-E., Olsson, S.-E., Farsø-Madsen, K., Viklands, P. & Fornell, J. (1984). A Macroscopic and radiologic investigation of dental diseases of the dog. *Veterinary Radiology*, 25 (2), 86–92. <https://doi.org/10.1111/j.1740-8261.1984.tb01916.x>
- Harvey, C.E. (2005). Management of periodontal disease: Understanding the options. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 35 (4), 819–836. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2005.03.002>
- Kačírová, J., Sondorová, M., Maďari, A., Styková, E., Mucha, R., Nemcová, R., Marečáková, N., Farbáková, J. & Maďar, M. (2022). Detection of periodontal pathogens from dental plaques of dogs with and without periodontal disease. *Pathogens*, 11 (4), 480. <https://doi.org/10.3390/pathogens11040480>
- Kassambara, A. (2023). *ggpubr: 'ggplot2' Based Publication Ready Plots*. Package version 0.6.0 <https://doi.org/10.32614/CRAN.package.ggpubr>
- Kwon, D., Bae, K., Kim, H., Kim, S.-H., Lee, D. & Lee, J.-H. (2022). *Treponema denticola* as a prognostic biomarker for periodontitis in dogs. *PLoS One*, 17 (1), e0262859. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0262859>
- Lamont, R.J. & Hajishengallis, G. (2015). Polymicrobial synergy and dysbiosis in inflammatory disease. *Trends in Molecular Medicine*, 21 (3), 172–183. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2014.11.004>
- Mattei, V., Murugesan, S., Al Hashmi, M., Mathew, R., James, N., Singh, P., Kumar, M., Lakshmanan, A.P., Terranegra, A., Al Khodor, S. & Tomei, S. (2019). Evaluation of methods for the extraction of microbial DNA from vaginal swabs used for microbiome studies. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00197>
- McMurdie, P.J. & Holmes, S. (2013). phyloseq: An R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. *PLoS One*, 8 (4), e61217. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061217>
- Meyle, J. & Chapple, I. (2015). Molecular aspects of the pathogenesis of periodontitis. *Periodontology 2000*, 69 (1), 7–17. <https://doi.org/10.1111/prd.12104>
- Niemiec, B., Gawor, J., Nemec, A., Clarke, D., McLeod, K., Tutt, C., Gioso, M., Steagall, P. v., Chandler, M., Morgenegg, G. & Jouppe, R. (2020). World Small Animal Veterinary Association Global Dental Guidelines. *Journal of Small Animal Practice*, 61 (7), E36–E161. <https://doi.org/10.1111/jsap.13132>
- Niemiec, B.A., Gawor, J., Tang, S., Prem, A. & Krumbeck, J.A. (2022). The bacteriome of the oral cavity in healthy dogs and dogs with periodontal disease. *American Journal of Veterinary Research*, 83 (1), 50-58. <https://doi.org/10.2460/ajvr.21.02.0027>
- Nises, J., Rosander, A., Pettersson, A. & Backhans, A. (2018). The occurrence of *Treponema* spp. in gingival plaque from dogs with varying degree of periodontal

- dogs. *Journal of Veterinary Dentistry*, 41 (4), 281–287.
<https://doi.org/10.1177/08987564231189650>
- Stella, J.L., Bauer, A.E. & Croney, C.C. (2018). A cross-sectional study to estimate prevalence of periodontal disease in a population of dogs (*Canis familiaris*) in commercial breeding facilities in Indiana and Illinois. *PLoS One*, 13 (1), e0191395.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191395>
- Sturgeon, A., Stull, J.W., Costa, M.C. & Weese, J.S. (2013). Metagenomic analysis of the canine oral cavity as revealed by high-throughput pyrosequencing of the 16S rRNA gene. *Veterinary Microbiology*, 162 (2), 891–898.
<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.11.018>
- Summers, J.F., O'Neill, D.G., Church, D., Collins, L., Sargan, D. & Brodbelt, D.C. (2019). Health-related welfare prioritisation of canine disorders using electronic health records in primary care practice in the UK. *BMC Veterinary Research*, 15 (1), 163. <https://doi.org/10.1186/s12917-019-1902-0>
- Suzuki, M., Kimura, M., Imaoka, K. & Yamada, A. (2010). Prevalence of *Capnocytophaga canimorsus* and *Capnocytophaga cynodegmi* in dogs and cats determined by using a newly established species-specific PCR. *Veterinary Microbiology*, 144 (1), 172–176. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2010.01.001>
- Tavares, M.D.O., Dos Reis, L.D., Lopes, W.R., Schwarz, L.V., Rocha, R.K.M., Scariot, F.J., Echeverrigaray, S. & Delamare, A.P.L. (2023). Bacterial community associated with gingivitis and periodontitis in dogs. *Research in Veterinary Science*, 162, 104962. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2023.104962>
- Wallis, C. & Holcombe, L.J. (2020). A review of the frequency and impact of periodontal disease in dogs. *Journal of Small Animal Practice*, 61 (9), 529–540.
<https://doi.org/10.1111/jsap.13218>
- Wallis, C., Milella, L., Colyer, A., O'Flynn, C., Harris, S. & Holcombe, L.J. (2021). Subgingival microbiota of dogs with healthy gingiva or early periodontal disease from different geographical locations. *BMC Veterinary Research*, 17 (1), 7.
<https://doi.org/10.1186/s12917-020-02660-5>
- Watanabe, K., Hayashi, K., Kijima, S., Nonaka, C. & Yamazoe, K. (2015). Tooth brushing inhibits oral bacteria in dogs. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 77 (10), 1323–1325. <https://doi.org/10.1292/jvms.14-0193>
- Wickham, H. (2016). *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. Springer-Verlag New York. ISBN 978-3-319-24277-4, <https://ggplot2.tidyverse.org> [2024-12-09]
- Yamasaki, Y., Nomura, R., Nakano, K., Naka, S., Matsumoto-Nakano, M., Asai, F. & Ooshima, T. (2012). Distribution of periodontopathic bacterial species in dogs and their owners. *Archives of Oral Biology*, 57 (9), 1183–1188.
<https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2012.02.015>
- Yasuda, J., Yasuda, H., Nomura, R., Matayoshi, S., Inaba, H., Gongora, E., Iwashita, N., Shirahata, S., Kaji, N., Akitomo, T., Mitsuhata, C., Uchiyama, J., Fukuyama, T., Matsumoto-Nakano, M., Nakano, K. & Murakami, M. (2024). Investigation of periodontal disease development and *Porphyromonas gulae* FimA genotype

- distribution in small dogs. *Scientific Reports*, 14, 5360.
<https://doi.org/10.1038/s41598-024-55842-8>
- Yilmaz, P., Parfrey, L.W., Yarza, P., Gerken, J., Pruesse, E., Quast, C., Schweer, T., Peplies, J., Ludwig, W. & Glöckner, F.O. (2014). The SILVA and “All-species Living Tree Project (LTP)” taxonomic frameworks. *Nucleic Acids Research*, 42 (Database issue), D643–D648. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1209>
- Özavci, V., Erbas, G., Parin, U., Yüksel, H.T. & Kirkan, Ş. (2019). Molecular detection of feline and canine periodontal pathogens. *Veterinary and Animal Science*, 8, 100069. <https://doi.org/10.1016/j.vas.2019.100069>

Populärvetenskaplig sammanfattning

Tanden hålls på plats i munnen med hjälp av vävnad som heter parodontalligament, alveolärt ben, cement och gingiva. I munnen finns också flera hundra olika bakteriearter som tillsammans bildar en mikrobiota (bakterieflora). När man inte rengör munnen regelbundet kan dessa bakterier bilda kolonier på och mellan tänderna som kallas plack. Detta plack kan sedan omvandlas till tandsten där nytt plack kan fästa och på detta sätt växer bakteriekolonierna. I en frisk mun samspelar bakterierna med varandra och med värdens immunförsvarsceller på ett balanserat vis men när mycket plack och tandsten bildas kan det också bildas en obalans i mikrobiotan. Detta kan resultera i att vissa arter blir fler medan andra blir färre och obalansen förvärras. Ofta är det bakterier som inte behöver syre för att överleva som växer i antal då det inte finns mycket syre under allt plack. Obalansen påverkar även immunförsvarscellerna och en inflammation i tandens stödvävnad uppstår. Det är denna inflammationen som kallas parodontit och detta gör mycket ont för hunden och kan förstöra vävnaden.

Tidigare studier har analyserat bakterier i placket och jämfört mellan friska hundar och hundar med parodontit och hittat skillnader. Denna studien syftade också till att undersöka vilka bakterier som finns i placket hos hundarna med och utan parodontit men genom att använda modernare metoder och analysera bakteriernas förekomst på ett mer realistiskt vis. Detta gjordes genom att samla in provmaterial (bomullstopps som stryks längs placket vid tandkanten) från 69 hundar i Uppsala. Proverna analyserades så att man fick ut rent DNA som kunde amplifieras med hjälp av PCR som innebär att bakteriers DNA multipliceras upp i ett mycket stort antal för att lättare kunna analysera det. Själva analysen av DNA-proverna gjorde ett sekvenseringsföretag som sedan skickade tillbaka all information som behövdes för att kunna koppla samman DNA med rätt bakterier. Detta behövde sorteras i olika statistiska modeller för att se om det fanns några skillnader. Fördelen med statistiska modeller är att man får reda på om resultatet är signifikant eller inte vilket betyder att det inte är ett slumpmässigt resultat utan går att lita på.

Resultatet av denna studie var bland annat att det fanns två olika bakteriearter som ökade i förekomst hos hundarna med parodontit och det var *Porphyromonas gulae* och *Treponema porcinum*. Detta resultatet stämde relativt bra överens med tidigare studiers resultat vilket styrker denna studies resultats trovärdighet. Det fanns också bakterier som var vanligare hos hundar utan parodontit vilket hade olika grader av stöd från tidigare studier men en bakterie som många är överens om är vanligare hos hundar utan parodontit var *Capnocytophaga canimorsus*.

Resultaten från studie är viktig för framtiden då parodontit är en väldigt vanlig och förödande sjukdom som är svår att diagnosticera (ta reda på om hunden har den) eller behandla utan att söva hunden vilket i sig kan vara riskfyllt. Med denna kunskapen är man ett steg närmare att kunna diagnosticera sjukdomen utan att behöva söva hunden. Man kan också med hjälp av denna studie förebygga sjukdomen någorlunda med hjälp av framför allt tandborstning.

Bilaga 1 – Blankett vid provtagning

Djurägarmedgivande för examensarbete i veterinärmedicin:

Information om studien:

Jag heter Louise Lundmark och gör ett examensarbete om parodontit hos hundar. Parodontit utgör betydande hälsoproblem eftersom tandens stödjevävnader bryts ner gradvis vilket kan resultera i smärta och påverka hundens övergripande hälsa. Några studier har visat att bakteriesamhällena i munnen är förknippade med parodontit och att de förändras under sjukdomsförloppet, men det saknas forskning om vilken roll de har. Projektet kommer att öka förståelsen för betydelsen av bakteriefloran och kommer att hjälpa oss förbättra munhälsan hos hundar.

Information om provtagning:

Provet tas med en provtagningspinne som gnuggas vid tandköttskanten på djuret. Därefter analyseras provet på laboratorium genom odling, PCR och efterföljande typningssekvensering för att identifiera specifika bakterier.

Härmed godkänner jag att mitt djur medverkar i detta studentarbete och till att SLU behandlar personuppgifter om mig inklusive namn samt mejladress och känsliga uppgifter om jag lämnar sådana.

Datum: _____

Underskrift:

Namnförtydligande:

Efter arbetet är klart finns det möjlighet att få tillgång till resultatet av vad vi hittat i proverna. Detta resultat kommer att vara anonymiserat och det kommer därmed inte gå att få resultat specifikt för ditt djur.

Vill du ta del av resultatet, fyll i mejladress nedan!

Om hunden

Kön: ☐ Hane ☐ Tik

Alder: _____ Ras: _____

Vikt: _____

Foder (kryssa i alla som stämmer): ☐ Torrfood ☐ Blötfoder/Burkfoder ☐ Färskfoder

Vilket foder äter ditt djur: _____

Hur ofta under den senaste månaden har du borstat din hunds tänder med tandborste?

- ☐ Dagligen
- ☐ 4-6 dagar / vecka
- ☐ 1-3 dagar / vecka
- ☐ Mer sällan / enstaka tillfälle
- ☐ Aldrig
- ☐ Vet ej

Ev. kommentar, t ex om du istället använder textilier för rengöring, eller produkter som används för tandhälsa:

Kända sjukdomar / medicinering:

Veterinärens utlåtande om munstatus

Parodontal status (Kryssa för det som passar):

- ☐ Normal: Kliniskt normal, ingen gingivit eller parodontit.
- ☐ Gingivit: Enbart gingivit, ingen klinisk fästeförlust.
- ☐ Tidig parodontit - mindre än 25% klinisk fästeförlust, eller furkation grad 1.
- ☐ Måttlig parodontit - 25-50% klinisk fästeförlust, eller furkation grad 2.
- ☐ Grav parodontit - mer än 50% klinisk fästeförlust, eller furkation grad 3.

Övriga kommentarer om munstatus, t ex tandsten, frakturer, stomatit/kissing lesions etc:

Provmaterial: svabbprov från tandköttsskanten innan behandling påbörjas. Svabben dras längs hela den buccala tandköttsskanten i över och underkäke, rotera gärna svabben för att få så mycket plack-material som möjligt.

Provnummer/märkning: _____

Datum och tidpunkt för provtagning:

Publicering och arkivering

Godkända självständiga arbeten (examensarbeten) vid SLU publiceras elektroniskt. Som student äger du upphovsrätten till ditt arbete och behöver godkänna publiceringen. Om du kryssar i **JA**, så kommer fulltexten (pdf-filen) och metadata bli synliga och sökbara på internet. Om du kryssar i **NEJ**, kommer endast metadata och sammanfattning bli synliga och sökbara. Även om du inte publicerar fulltexten kommer den arkiveras digitalt. Om fler än en person har skrivit arbetet gäller krysset för samtliga författare. Du hittar en länk till SLU:s publiceringsavtal på den här sidan:

- <https://libanswers.slu.se/sv/faq/228316>

☒ JA, jag ger härmed min/vår tillåtelse till att föreliggande arbete publiceras enligt SLU:s avtal om överlåtelse av rätt att publicera verk.

☐ NEJ, jag ger inte min/vår tillåtelse att publicera fulltexten av föreliggande arbete. Arbetet laddas dock upp för arkivering och metadata och sammanfattning blir synliga och sökbara.