

ABSTRACT

Tandpasta med enzymer og proteiner ændrer mikrobiomet i en positiv retning

Vi ved nu, at de mange arter, der udgør det orale mikrobiom, spiller en nøglerolle for opnåelse og vedligeholdelse af oral sundhed. Muligheden for at kunne foretage taksonomisk bestemmelse af mikrobiomet på artsniveau er en forudsætning for at kunne beskrive dets diversitet og dets sammenhæng med sundhed og sygdom. Vi rapporterer her, hvilke økologiske virkninger brugen af tandpasta med enzymer og proteiner har på plakkens mikrobiom sammenlignet med en kontrol tandpasta. Resultaterne påviser, at en tandpasta, der indeholder enzymer og proteiner, kan fremme spyttets naturlige forsvarsmekanismer og fremkalde en ændring i mikrobiometets sammensætning med et øget antal af bakterier, der er forbundet med parodontal sundhed, og et samtidigt fald i antallet af bakterier, der er forbundet med parodontal sygdom. Den statistiske analyse viser signifikant forøgelse af 12 arter, der er forbundet med parodontal sundhed, heriblandt *Neisseria*-arter, og signifikant reduktion af 10 arter, der er forbundet med parodontal sygdom, heriblandt *Treponema* arter. Resultaterne viser, at en tandpasta, der indeholder enzymer og proteiner, signifikant kan ændre det orale mikrobioms økologi (på artsniveau), så mikrobiomet fremtræder mere sundt.

En randomiseret klinisk undersøgelse belyser økologiske effekter af en tandpasta med enzymer og proteiner på plakkens mikrobiom

Suzi E. Adams, microbiologist, MSc, BSc, Unilever R&D Sunlight, Bebington, Wirral, UK

Dave Arnold, statistician, ph.d., BSc, Unilever R&D Sunlight, Bebington, Wirral, UK

Barry Murphy, microbiome science leader, ph.d., BSc, Unilever R&D Sunlight, Bebington, Wirral, UK

Pam Carroll, clinical research assistant, Unilever R&D Sunlight, Bebington, Wirral, UK

Alison K. Green, oral care R&D director, ph.d., BSc, Unilever R&D Sunlight, Bebington, Wirral, UK

Adrian M. Smith, bioinformatician, MSc, BSc, Unilever R&D Colworth Science Park, Sharnbrook, Bedfordshire, UK

Philip D. Marsh, professor, ph.d., BSc, School of Dentistry, University of Leeds, UK

Tsute Chen, associate research investigator, ph.d., MS, BS, Forsyth Dental Institute, Cambridge, Massachusetts, USA

Robert Marriott, R&D manager, ph.d., MA, BA, Unilever R&D Sunlight, Bebington, Wirral, UK

Melanie G. Brading, R&D manager, Unilever R&D Sunlight, Bebington, Wirral, UK

Denne artikel er oprindeligt publiceret i *Scientific Reports* 2017;7:43344. doi: 10.1038/srep43344.

Kroppens normale mikrobiota er ikke alene livsnødvendig, den spiller også en væsentlig rolle i udvikling af – og beskyttelse imod – forskellige sygdomstilstande (1). Som beskrevet af Kilian et al. har mennesket udviklet sig side om side med mikroorganismene, og vi har et symbiotisk eller mutualistisk forhold til vores residente mikrobiom (2). For det meste har forholdet mellem vært og mikrobiom karakter af homeostase (2); men de bakterier, virus og svampe, der koloniserer forskellige områder på kroppen, fx issen (3), ansigtet (4), tarmen (5) eller

EMNEORD

Toothpaste;
microbiome, oral;
ecology;
enzymes; proteins

mundhulen (6), kan også sættes i forbindelse med sygdomme og uønskede tilstande som skæl (7), akne (8), kroniske inflammatoriske tarmsygdomme (9) og marginal parodontitis (10).

Når mundhulens økosystem er i ligevægt, udfylder mikrobiomet en vigtig rolle med at fremme og vedligeholde den orale sundhed (11). Munden er hjemsted for et af de mest sammensatte mikrobiomer i kroppen. Der forekommer både virus, svampe, protozoer, archaebakterier og bakterier (12). Indtil nu har man identificeret mere end 700 forskellige mikroorganismer (13,14). Selv om værtsfaktorerets betydning for udvikling af oral sygdom ikke skal underkendes (15-17), må man overordnet sige, at tilstedeværelsen af en så mangfoldig mikroflora forhindrer overvækst af enkelte arter, som ellers kunne medføre et bakterietryk, der ville overskride den patologiske tærskel (18). Men det orale mikrobioms gavnlige virkninger indskrænker sig ikke til beskyttelse mod kolonisation af udefra kommende mikroorganismer; de omfatter også immunologisk aktivering og nedregulering af uhensigtsmæssige proinflammatoriske reaktioner (19). Det symbiotiske forhold kan dog ødelægges, fx ved dårlig mundhygiejne, så der opstår dysbiose og plakrelaterede sygdomme (20).

Spyttet spiller en vigtig rolle i forebyggelse af dysbiose og opretholdelse af sunde forhold i mundhulen (21,22). Spyt-komponenter, især antimikrobielle faktorer som enzymer og proteiner, udøver et betydeligt selektivt tryk på mikrofloraen og bidrager dermed til beskyttelsen mod patogene mikroorganismer (23,24) og sammensætningen af den permanente mikroflora (25). Spytet er desuden vigtigt for dannelsen af pellikelen, den tynde acellulære organiske film, der dannes på orale overflader, som udsættes for spyt (26). Det er påvist, at enzymer og proteiner fra spytet kan indlejres i aktiv form i pellikelen (27,28) og direkte påvirke den initiale kolonisation af mikroorganismer (29).

En af de vigtigste forsvarsmekanismer i spytet er laktoperoksidasesystemet (LPO) (28). Dette system aktiveres bl.a. af brintoverilte, som oksiderer thiocyanat til hypothiocyanit, en proces der har været grundigt diskuteret i den videnskabelige litteratur (30-32). Brintoverilte har i sig selv antimikrobiel virkning (33) og er blevet tilskrevet en vigtig rolle i den orale sundhed. I mundhulen dannes brintoverilte både af værtsceller (34) og af mikroorganismer. I laboratorieforsøg har nogle arter af streptokokker frembragt så store koncentrationer af brintoverilte, at det har kunnet hæmme væksten af mange plakbakterier (35). Brintoverilte indgår desuden i en række enzymatiske reaktioner ud over LPO-systemet, fx dannelse af ilt ved hjælp af enzymet katalase (23). Endvidere spiller hypothiocyanit en nøglerolle i den orale sundhed, idet det er et naturligt antimikrobielt middel, som er intensivt udforsket (34,36-40). Hypothiocyanit, som dannes af LPO-systemet, har antibakterielle virkninger på både cariogene bakterier (32) og sortpigmenterede anaerobe bakterier, der forbindes med marginal parodontitis, fx *Porphyromonas gingivalis* (41).

Ud over LPO-systemet er også andre spyt-komponenter såsom lysozym og laktoferrin væsentlige for mundens naturlige forsvar mod bakterier. Lysozym er et antibakterielt protein, der forekommer i en række slimhindesekreter (18). Kvantitativt er det det vigtigste antibakterielle stof i spytet på grund af dets evne til at nedbryde glykosidbindinger i peptidoglykaner (21,42). Denne effekt er mest udtalt mod Gram-positive bakterier, som har et tykt lag af peptidoglykan i cellevæggen, mens peptidoglykan hos Gram-negative bakterier er beskyttet af en ydre membran (43). Det er vist, at laktoferrin kan øge permeabiliteten af den ydre membran hos Gram-negative bakterier og dermed lette penetration af lysozym (44). Den vigtigste virkning af laktoferrin er dog, at det som jernbindende protein kan reducere mængden af tilgængeligt jern, der kan fungere som co-faktor for bakterielle enzymer, og dermed hæmme bakteriernes vækst. Ud over denne bakteriostatisk virkning har laktoferrin også baktericide egenskaber, som kommer til udtryk ved direkte kontakt mellem proteinet og bakterierne (45). Det er påvist, at laktoferrin og lysozym har synergistisk virkning, hvis de kombineres (46), og desuden øges den antimikrobielle virkning af både laktoferrin og lysozym, hvis de kombineres med LPO-systemet (39,47). Endvidere mener nogle forfattere, at laktoferrin har antiinflammatorisk virkning over for marginal parodontitis (48).

For at styrke spytets naturlige forsvarsmekanismer evne til at kontrollere det orale mikrobiom har man udviklet tandpastaer og andre mundplejemidler, som indeholder enzymer og proteiner. Zendium™ indeholder tre enzymsystemer (amylglukosidase, glukoseoksidase og laktoperoksidase), som er kombineret med henblik på at fremme dannelsen af brintoverilte og hypothiocyanit, samt tre andre proteinkomponenter (lysozym, laktoferrin og immunglobulin G), som tilfører yderligere antimikrobielle virkninger. Der er påvist øget forekomst af både lysozym og brintoverilte i spytet efter tandbørstning med Zendium™ sammenlignet med en kontrol-tandpasta uden enzymer og proteiner (49). Dette er et væsentligt fund, da tidligere rapporter tyder på, at normale fysiologiske koncentrationer af brintoverilte kan være utilstrækkelige til aktivering af LPO-systemet (31), og styrkelse af LPO-systemet *in vivo* kan være et effektivt middel til at regulere syreproducerende bakterier (50).

De fleste tidligere undersøgelser af effekten af tandpasta på det orale mikrobioms økologi har været baseret på traditionelle dyrkningsmetoder (51,52). Dette har begrænset vores indsigt, da en stor andel af den normale mikroflora ikke kan dyrkes i laboratoriet (53). Selv om der er fremkommet en lang række nye molekylærbiologiske metoder, er det stadig småt med videnskabelige undersøgelser af økologiske ændringer i det orale mikrobiom efter brug af tandpasta (54,55). Den seneste teknologiske udvikling inden for DNA-sekventering har imidlertid gjort det muligt at måle ændringer i det orale mikrobioms sammensætning, hvilket har ført til en overvældende mængde →

nye undersøgelser af mikrobiologiske forskelle mellem sunde og syge tilstande (16,56,57). Undersøgelser af den type lettes betydeligt gennem adgang til specifikke, velorganiserede databaser, der muliggør bestemmelse af humane mikrobiomer på artsniveau, fx Human Oral Microbiome Database (58,59).

Når mikrobiomet er så komplekst, som det er, er det essentielt at kunne foretage bestemmelser på artsniveau, hvis man skal undersøge enkelte arters betydning for det samlede mikrobioms funktion. Formålet med dette arbejde var at undersøge effekten af tandpasta på det orale mikrobioms økologi på artsniveau, idet vi sammenlignede en fluortandpasta, der indeholder enzymer og proteiner, med en fluortandpasta uden enzymer og proteiner. Endvidere ønskede vi at opnå dybere indsigt i de mulige fordele ved at anvende en tandpasta med enzymer og proteiner med henblik på at styrke spytets naturlige forsvarsmekanismer, ændre mundhulens økologi og skabe sundhedsmæssige fordele.

Materialer og metoder

Dette afsnit kan ses i versionen af artiklen på Tandlægebladets hjemmeside, hvor det er placeret til sidst som et appendiks.

Resultater

Sekventering og taksonomisk klassifikation

220 prøver blev behandlet og analyseret ved hjælp af Illumina sekventering, hvilket i udgangspunktet resulterede i ca. 37,9 mio. parrede aflæsninger af råsekvenser, som efter yderligere behandling frembragte 26,9 mio. overlappende contigs (sæt af overlappende DNA-segmenter). 14,7 mio. contigs kunne klassificeres til slægts- eller artsniveau ved hjælp af en database på The Forsyth Institute, og dette resulterede i 17 phyla, 183 slægter og 1.220 arter. Artsprøver med mindre end 100 tællinger blev slået sammen; herefter var der 414 arter, der kunne underkastes statistisk analyse. Otte parrede prøver blev frasorteret på dette stadium på grund af mangelfulde data. De resterende 204 prøver blev analyseret statistisk.

Ændringer på slægtsniveau

Der blev foretaget analyser på slægtsniveau med henblik på at bestemme, hvilke slægter der blev påvirket ved brug af tandpasta i 14 uger. Forskelle mellem forsøgsgrupper blev undersøgt med betadiversitet og visualiseret i ordinationsdiagrammer. Ordinationsdiagrammet over random forest-analyse (Fig. 1)

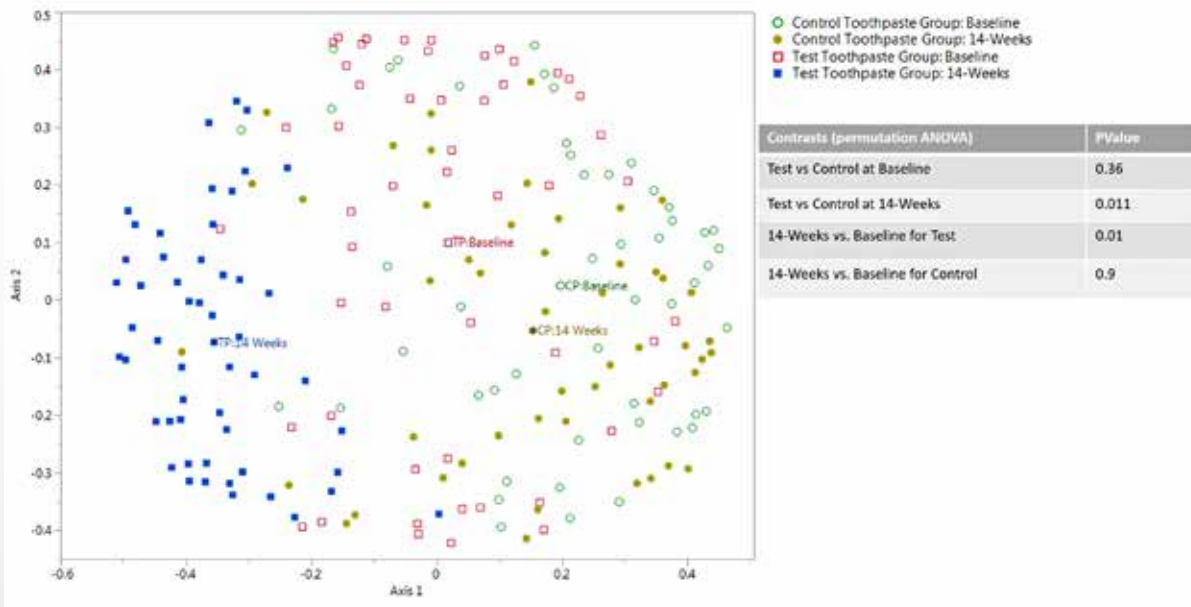


Fig. 1. Slægtsniveau: Ordinationsdiagram, der viser resultaterne af en random forest-analyse af data på slægtsniveau. Det geometriske centrum for de fire grupper (kontrollandpasta ved baseline, kontrollandpasta efter 14 uger, testtandpasta ved baseline og testtandpasta efter 14 uger) er markeret.

Fig. 1. Genus level: Ordination plot showing results of random forest analysis for genus level data for the four experimental groups. The label indicates the centroid for each experimental group.



KLINISK RELEVANS

Undersøgelsens data bekræfter, at en tandpasta, der er sammensat med henblik på at styrke spyttets naturlige forsvarsmekanismer, medfører positive ændringer i mikrobiomet, som er mere forenelige med sundhed. Nærmere

betegnet påvises det, at en tandpasta med enzymer og proteiner over tid kan føre til en forøget relativ forekomst af sundhedsrelaterede bakterier i plak og samtidig en faldende forekomst af sygdomsrelaterede bakterier.

viser den bakterielle sammensætning for begge tandpastagrupper ved baseline og efter 14 uger. De to tandpastagrupper blev sammenlignet ved hjælp af ANOVA. Der var ingen signifikant forskel i bakteriesammensætningen ved baseline ($p = 0,36$). Datamaterialet blev undersøgt for ændringer i bakteriesammensætningen i løbet af undersøgelsesperioden på 14 uger, og der blev påvist signifikante ændringer i testgruppen ($p = 0,01$), men ikke i kontrolgruppen ($p = 0,97$). Der blev desuden fundet signifikant forskel imellem de to tandpastagrupper efter 14 uger ($p = 0,011$).

Ændringer på artsniveau

Resultaterne af analysen på artsniveau stemte overens med resultaterne på slægtsniveau. ANOVA og de tilhørende ordinationsdiagrammer over random forest-analysen (Fig. 2) viste ingen signifikante forskelle i sammensætning ved baseline ($p = 0,23$), mens der sås signifikante ændringer i testgruppen i løbet af de 14 uger ($p = 0,025$). Der fandtes ingen forskelle i kontrolgruppen ($p = 1,0$). Der var statistisk signifikant forskel mellem test- og kontrolgruppe efter 14 uger ($p = 0,003$).

Om end todimensional fremstilling af data kan være informativ, giver en tredimensionel fremstilling dog et bedre indtryk

af den rumlige fordeling. Den tredimensionelle model gav en let fortolkelig visuel adskillelse mellem grupperne (Fig. 3). MicrobiVis blev brugt til at visualisere ændringer i relativ forekomst af udvalgte arter (Fig. 4). Denne type visualisering tillod bedømmelse af fordelingen af arter mellem de enkelte stikprøver.

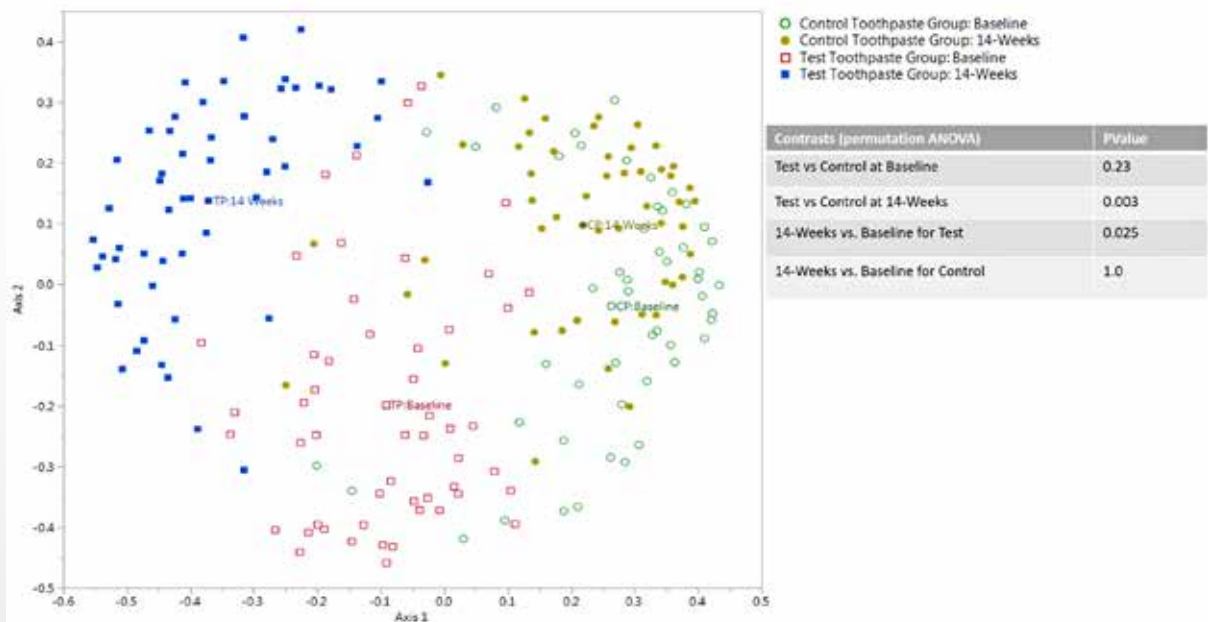


Fig. 2. Artsniveau: Ordinationsdiagram, der viser resultaterne af en random forest-analyse af data på artsniveau. Det geometriske centrum for de fire grupper (kontrollandpasta ved baseline, kontrollandpasta efter 14 uger, testandpasta ved baseline og testandpasta efter 14 uger) er markeret.

Fig. 2. Species level: Ordination plot showing results of random forest analysis for species level data for the four experimental groups. The label indicates the centroid for each experimental group.

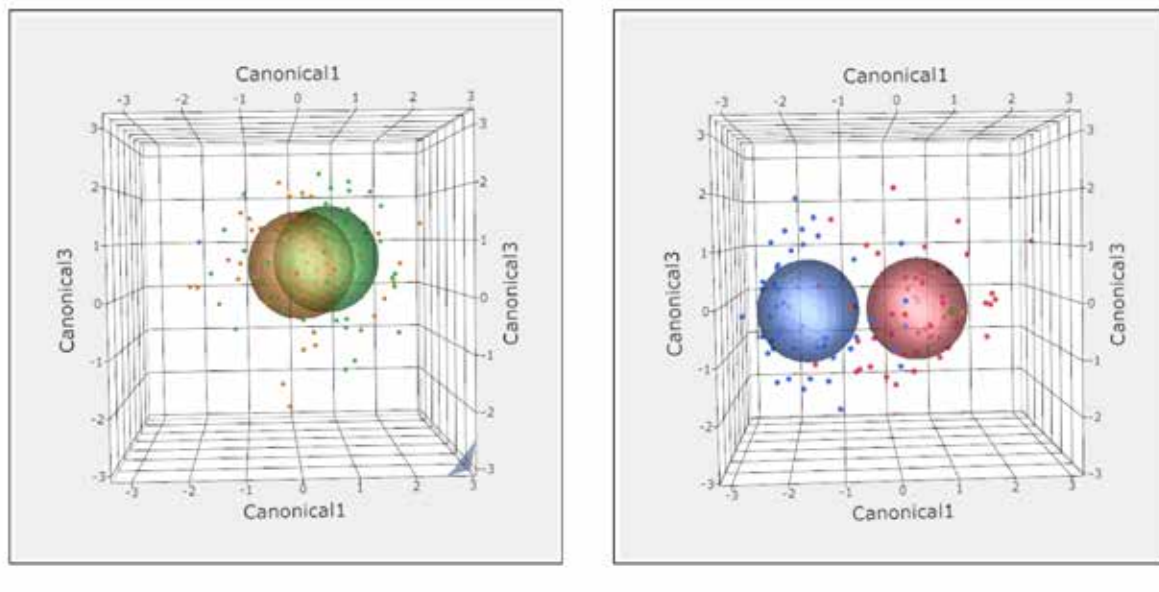


Fig. 3. Tredimensionelt ordinationsdiagram, der viser 95 % konfidensellipser for hver tandpasta og hvert tidspunkt. Grøn: Kontrolltandpasta ved baseline. Gul: Kontrolltandpasta efter 14 uger. Rød: Testtandpasta ved baseline. Blå: Testtandpasta efter 14 uger.

Fig. 3. Three dimensional ordination plots showing the 95% confidence ellipses for each toothpaste and time point at species level. Green – control toothpaste Group at baseline. Yellow – control toothpaste group at 14-weeks. Red – test toothpaste group at baseline., Blue – test toothpaste group at 14-weeks.

Analyse af ændringer på artsniveau

Med henblik på at opnå en mere detaljeret forståelse af de forskelle, der kunne observeres ved ANOVA og ordinationsdiagrammer, blev der foretaget sammenligninger af den gennemsnitlige relative forekomst af enkelte arter i de to forsøgsgrupper over tid. De 414 arter blev undersøgt for ændringer i relativ forekomst fra baseline til 14 uger for begge tandpastaer ved hjælp af Dirichlet Multinomial algoritmen (60). Den falske positive rate blev holdt under 5 % ved hjælp af q-værdien, som er en korrigeret p-værdi-metode (61). Dette tillod identifikation af statistisk signifikante arter med $q < 0,05$.

Der blev påvist signifikante ændringer i forekomst af 54 arter, 37 i testgruppen og 17 i kontrolgruppen (Fig. 4, Fig. 5). To arter havde ændret forekomst i begge tandpastagrupper; den ene tilhørte gruppen af mitis streptokokker, og den anden var en *Fretibacterium* art. For hver tandpastatype blev de signifikante arters stigende eller faldende relative forekomst udtrykt i procent af det totale mikrobiom. I testgruppen havde 18 arter forøget relativ forekomst, og 19 arter havde nedsat relativ forekomst. I kontrolgruppen havde syv arter forøget relativ forekomst, og 10 arter havde nedsat relativ forekomst.

Den art, der havde størst stigning i relativ forekomst i testgruppen efter 14 uger, var *Neisseria flava* med en stigning på 2,9 %. Tre andre *Neisseria* arter udviste også stigning i relativ forekomst. Der sås ingen signifikante ændringer i forekomst af *Neisseria* arter i kontrolgruppen, hvor *Fusobacterium nucleatum* subspecies *polymorphum* udviste den højeste ændring med 0,8 %. Den art, der havde det største fald i relativ forekomst i testgruppen efter 14 uger, var *Rothia dentocariosa* med et fald på 3,2 %. Fire arter fra slægten *Treponema* udviste ligeledes fald i relativ forekomst i testgruppen. I kontrolgruppen var det også en *Rothia*-art, i dette tilfælde *Rothia aerea*, der udviste det største fald i relativ forekomst, nemlig 0,9 %.

Diskussion

Dette arbejde er den første *in vivo*-undersøgelse, der ved hjælp af molekylær metataksometri (62) påviser ændringer på artsniveau i det orale mikrobioms økologi efter brug af tandpasta. Vi påviser, at tandbørstning med en tandpasta, der indeholder enzymer og proteiner, Zendium™, over tid fremkalder en ændring i det orale mikrobioms økologi hos raske individer sammenlignet med en tandpasta, der ikke indeholder enzymer og protei-

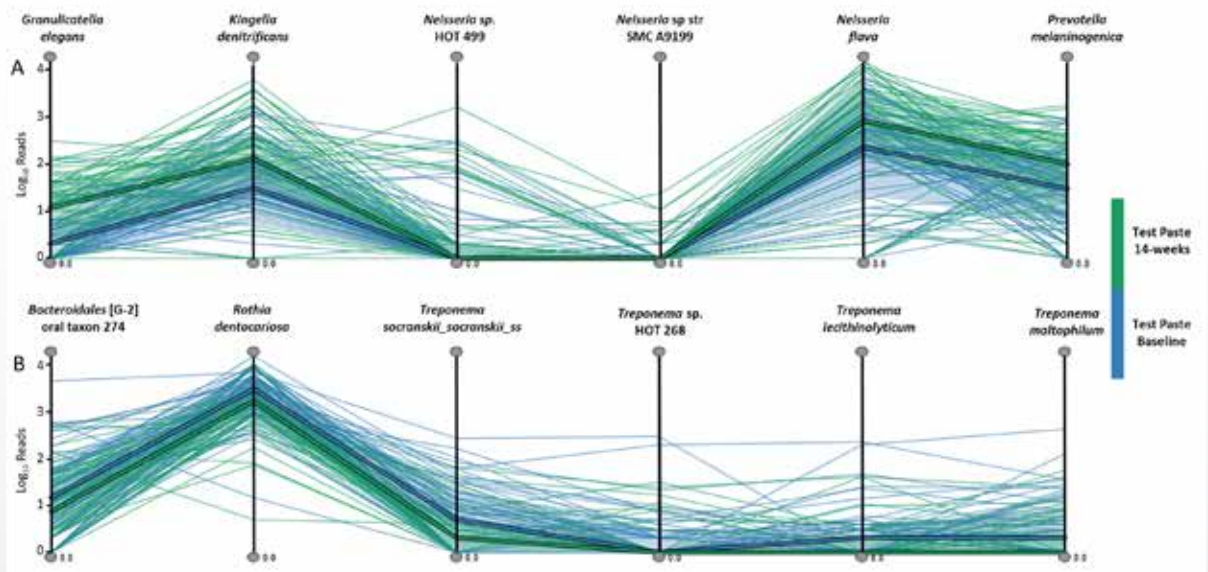


Fig. 4. MicrobiVis-visualisering, der viser fordelingen af tællinger for udvalgte arter, der havde enten (A) forøget eller (B) nedsat relativ forekomst efter brug af testtandpasta i 14 uger. De lodrette linjer repræsenterer de navngivne arter, og de tynde linjer repræsenterer forekomsten (logaritmisk angivet) i hver enkelt prøve for de forskellige arter ved baseline (blå) og efter 14 uger (grøn). De tykke linjer repræsenterer medianniveauet for hver art, og de skraverede områder angiver den interkvartile variationsbredde.

Fig. 4. MicrobiVis visualisation examining the distribution of counts for selected species observed to have (A) increased or (B) decreased in relative abundance following the use of the test toothpaste over the 14-week time period. The vertical lines represent the named taxa with the thin lines representing the logarithmic abundance for each sample for the different taxa at baseline (blue) and at 14-weeks (green). The thick line represents the median level for each taxon and the shaded area the interquartile range.

ner. Resultaterne var konsistente både på slægts- og artsniveau og analyseret med de mest moderne metoder til databehandling og statistisk analyse uden behov for rarefaktionsanalyse.

Et vigtigt fund er, at sammenligninger mellem mikrobiomer på slægtsniveau kan være informative; men de giver ikke tilstrækkelig udredning af de enkelte arters rolle i de økologiske ændringer. Inden for en bakterieslægt kan nært beslægtede arter have vidt forskellige funktioner i et givet mikrobiom og således inducere enten sundhed eller sygdom. Pålidelig artsbestemmelse kan derfor give en dybere indsigt i, hvilken virkning en given art har på mikrobiomet. Fx er det sådan inden for slægten *Porphyromonas*, at *P. gingivalis* er forbundet med parodontal sygdom (63,64), mens *P. catoniae* er forbundet med sundhed (16). En gennemgang af litteraturen gjorde det muligt at associere de fundne arter med parodontal sygdom og/eller sundhed (Fig. 5, Fig. 6). Det viste sig, at der ved brug af testtandpastaen skete en stigning i relativ forekomst af arter, der er associeret med parodontal sundhed, og et tilsvarende fald i forekomst af arter, der er associeret med parodontal sygdom.

Ved brug af testtandpastaen sås en stigning i relativ fore-

komst af 12 arter, der er forbundet med sundhed. Der sås samtidig et fald i forekomst af 10 arter, der er associeret med parodontal sygdom. Af de resterende arter var der 11, som ikke har nogen kendt relation til parodontal sundhed eller sygdom (Fig. 5). Én art, *R. dentocariosa*, har været associeret med både sundhed og sygdom (65,66).

Ved brug af kontroltandpastaen sås en stigning i relativ forekomst af én art, der er forbundet med sundhed. Der sås desuden fald i forekomst af fire arter, som er associeret med parodontal sygdom. Af de resterende arter var der 10, som ikke har kunnet knyttes til parodontal sundhed eller sygdom (Fig. 6). Den enlige sundhedsforbundne art, der steg i kontrolgruppen (mitis streptokokker), steg også i testgruppen, og stigningen i testgruppen var omtrent dobbelt så stor (0,097 %) som den stigning, der blev observeret i kontrolgruppen (0,057 %).

Arter med øget forekomst efter brug af testtandpasta

Analyse på artsniveau er en nødvendig forudsætning for at kunne vurdere, om ændringer i mikrobiomet er forbundet med sundhed eller sygdom. Dette synspunkt understøttes ved ana- ➔

lyse af ændringer i relativ forekomst inden for slægten *Prevotella*. Nogle medlemmer af slægten *Prevotella*, fx *Prevotella intermedia*, er forbundet med sygdom (67). I denne undersøgelse fandt vi, at *Prevotella melaninogenica* og en række nærtstående phylotyper havde forøget forekomst. Det bør bemærkes, at *P. melaninogenica* er en bakterie, der hyppigt forekommer i sund plak (68). Dette fund understreger nødvendigheden af at bestemme på artsniveau for at kunne opnå præcis information om den biologiske betydning af økologiske ændringer inden for mikrobiomet.

De ændringer, der blev observeret på artsniveau, kan forklares ud fra den måde, enzymer og proteiner i Zendium tandpasta virker på. Fx steg den relative forekomst af *Neisseria* arter. Disse kommensale bakterier er blandt de få aerobe arter i mundhulen og forbindes almindeligvis med sundhed (69). *Neisseria* arter gror godt i iltrig blandingskultur (70), og da de er katalase-positive (71), kan de beskytte sig mod den antibakterielle virk-

ning af brintoverilte og samtidig øge den lokale koncentration af ilt. Vi mener, at dette vil give *Neisseria* en konkurrencefordel over for katalase-negative arter. Den organisme, der havde den næststørste øgning i relativ forekomst, var *Kingella denitrificans*. Denne bakterie er sparsomt beskrevet i faglitteraturen; men taksonomisk set er den nærtbeslægtet med *Neisseria*, så man må formode, at den har en tilsvarende økologisk niche og derfor sandsynligvis vil forøges i antal under de samme betingelser, der fremmer vækst af *Neisseria* arter. Det er tidligere påvist, at *K. denitrificans* har forøget relativ forekomst i områder med stabile parodontale forhold, men ikke i områder med parodontal sygdomsaktivitet (72); men i den aktuelle undersøgelse var alle forsøgspersoner raske og fri for marginal parodontitis.

Blandt de øvrige bakterier, der havde forøget relativ forekomst i testgruppen efter 14 uger, var *Granulicatella elegans*. *G. elegans* forekommer i signifikant større mængder i sunde områder hos parodontalt sunde individer sammenlignet med

Significant Taxa	Change in Mean Relative Abundance (%)	Mean Relative abundance at Baseline (%)	Mean Relative abundance after 14 weeks (%)	p values	q values	Association
<i>Neisseria flavescens</i>	2.86856	1.46198	4.33054	0.00069	0.01057	Genus associated with health ^{18,19}
<i>Kingella denitrificans</i>	0.69843	0.30868	1.00711	0.00165	0.01830	Inactive periodontal sites ²¹
<i>Prevotella melaninogenica</i>	0.39312	0.25247	0.54559	0.00167	0.01830	Health ¹⁸
<i>Clostridium</i> [F-2][G-5] sp. Oral_Taxon_075	0.09468	0.04143	0.13611	0.00086	0.01240	Unknown
<i>Fusobacterium</i> sp. Oral_Taxon_370	0.12791	0.02324	0.15116	0.00059	0.01020	Unknown
G02 [G-2] sp. Oral_Taxon_878	0.10463	0.01329	0.11782	0.00064	0.01020	Unknown
<i>Granulicatella elegans</i>	0.03026	0.01080	0.04106	0.00190	0.01973	Health ^{18,19}
<i>Neisseria</i> [MOT499] sp. str. SMC_A9199	0.07572	0.00598	0.08170	0.00000	0.00008	Genus associated with health ^{18,19}
<i>Streptococcus</i> [mitis] [mitis] bv. 2 [oralis] [pneumoniae] [HOT058] [HOT064] [HOT070] sp. str. C300	0.09715	0.00540	0.10255	0.00043	0.00789	Health ¹⁸
<i>Prevotella</i> [melaninogenica] [MOT314]	0.03618	0.00419	0.04036	0.00000	0.00007	Health ¹⁸
<i>Porphyromonas</i> sp. Oral_Taxon_275	0.02156	0.00323	0.02479	0.00008	0.00180	Unknown
<i>Neisseria</i> sp. Oral_Taxon_020	0.08806	0.00104	0.08910	0.00000	0.00000	Genus associated with health ^{18,19}
<i>Porphyromonas</i> sp. Oral_Taxon_C34	0.00615	0.00038	0.00652	0.00000	0.00004	Unknown
<i>Neisseria</i> sp. str. SMC_A9199	0.00126	0.00026	0.00152	0.00062	0.01020	Genus associated with health ^{18,19}
<i>Veillonella</i> sp. Oral_Taxon_917	0.00290	0.00020	0.00310	0.00000	0.00000	Unknown
<i>Streptococcus</i> [infantis] [mitis] [mitis] bv. 2 [pneumoniae] [HOT064]	0.00073	0.00017	0.00090	0.00037	0.00701	Health ¹⁸
<i>Prevotella</i> [histiolytica] [melaninogenica]	0.00342	0.00006	0.00347	0.00000	0.00000	Health ¹⁸
<i>Lactobacillus gasseri</i>	0.00152	0.00003	0.00155	0.00000	0.00005	Health ¹⁸
<i>Rothia dentocariosa</i>	-3.19555	6.40244	3.20689	0.00000	0.01240	Unclear ^{18,19}
<i>Bacteroidales</i> [G-2] sp. oral_taxon_274	-20.20360	0.25521	0.05161	0.00124	0.01535	Periodontitis ¹⁸
<i>Trigonema</i> [saccharis] [saccharis] ss. [saccharis]	-0.08081	0.09115	0.01035	0.00002	0.00067	Periodontitis ¹⁸
<i>Streptococcus</i> [solivarius] sp. str. AC52 [sp. str. C150] [thermophilus] [vestibularis]	-0.03873	0.04496	0.00622	0.00451	0.04224	Unknown
<i>Capnocytophaga</i> sp. Oral_Taxon_335	-0.02551	0.03429	0.00867	0.00104	0.01337	Unknown
<i>Eubacterium</i> [X][G-3] brachy	-0.02224	0.03367	0.01142	0.00427	0.04207	Periodontitis ^{18,19}
<i>Staphylococcus</i> [aureus] [haemolyticus]	-0.03083	0.03101	0.00017	0.00000	0.00000	Periodontitis (S. aureus only) ¹⁸
<i>Trigonema</i> [multiphilum]	-0.02134	0.02529	0.00395	0.00482	0.04402	Periodontitis ^{18,19}
<i>Trigonema</i> [leitchinolyticum]	-0.01425	0.01715	0.00290	0.00534	0.04767	Periodontitis ^{18,19}
<i>Trigonema</i> sp. Oral_Taxon_268	-0.01440	0.01685	0.00265	0.00098	0.01301	Periodontitis ¹⁸
<i>Capnocytophaga</i> sp. Oral_Taxon_302	-0.01324	0.01192	0.00067	0.00003	0.00077	Unknown
<i>Prevotella intermedia</i>	-0.00941	0.01016	0.00075	0.00001	0.00022	Periodontitis ^{18,19}
<i>Prevotella nigrescens</i>	-0.00811	0.01011	0.00200	0.00448	0.04224	Neutral ¹⁸
TM7 [G-5] sp. Oral_Taxon_356	-0.00669	0.00681	0.00012	0.00000	0.00000	Periodontitis ^{18,19}
<i>Fusobacterium</i> [noniforme] [nucleatum] [nucleatum] ss. [vincentii]	-0.00651	0.00661	0.00010	0.00000	0.00000	Core ¹⁸
<i>Actinomyces</i> sp. Oral_Taxon_525	-0.00442	0.00479	0.00037	0.00139	0.01668	Unknown
<i>Mycoplasma salivarium</i>	-0.00243	0.00300	0.00057	0.00033	0.00666	Unknown
<i>Fretibacterium</i> [HOT359] [HOT452]	-0.00282	0.00297	0.00015	0.00000	0.00000	Periodontitis ^{18,19}
<i>Gemella bergeri</i>	-0.00200	0.00205	0.00005	0.00009	0.00202	Genus associated with health ¹⁸

Fig. 5. Resumé af signifikante ændringer for arter, der er associeret med parodontal sundhed og/eller sygdom, efter brug af testtandpasta i 14 uger. *Rothia dentocariosa* har i den videnskabelige litteratur været associeret med både parodontal sundhed og sygdom.

Fig. 5. Summary of the significant species changes associated with gum health and/or disease for the test toothpaste after 14-week test period. *Rothia dentocariosa* has been reported in the literature to be associated with both health and periodontal disease.

parodontitis-patienter (73). Lourenco et al. har endog antydnet, at fravær af *G. elegans* er forbundet med højere risiko for generaliseret aggressiv parodontitis (73). *Lactobacillus gasseri*, som ligeledes steg i antal i testgruppen, er for nylig blevet undersøgt som mulig kandidat til anvendelse som probiotikum, da det i laboratorieundersøgelser har vist sig, at den har antibakteriel virkning mod *P. gingivalis* (ATCC 33277) (74).

Arter med nedsat forekomst efter brug af testtandpasta

De ændringer, der blev observeret, kan forklares ud fra testtandpastaens virkningsmekanismer. Under enzymkaskaden, der fører til dannelse af hypothiocyanit, bliver der også dannet brintoverilte, og der er påvist øget forekomst af brintoverilte *in vivo* (49), hvilket kunne føre til øget iltkoncentration fx via katalaseaktivitet. Sådanne ændringer i det lokale miljø må forventes at hæmme væksten af anaerobe arter, og en række obligat anaerobe arter faldt faktisk i antal efter brug af testtandpastaen (fx arter fra slægterne *Treponema*, *Bacteroidales*, *Eubacterium*, *Prevotella*, *Fusobacterium* og *Fretibacterium*; Fig. 5). *Treponema* arter optræder hyppigt ved marginal parodontitis (16,65), og de er yderst følsomme for ilt (75).

Det største fald i relativ forekomst sås hos *R. dentocariosa*. Denne bakteries rolle i sundhed og sygdom er imidlertid uafklaret, da den både har været forbundet med parodontal sygdom (66,76,77) og parodontal sundhed (16,65,78). *R. dentocariosa* er en katalase-positiv aerob bakterie (79) og optager dermed en niche tilsvarende *Neisseria* arter, så det er usandsynligt, at faldet i antal af *Rothia* skyldes øgede koncentrationer af brintoverilte og ilt. *R. dentocariosa* er imidlertid en Gram-positiv bakterie og dermed sandsynligvis mere følsom for lysozym, der

optræder i næsten dobbelt så høj koncentration efter tandbørstning med testtandpastaen (49). Dette giver et rationale for det påviste fald i relativ forekomst af denne bakterie i testgruppen. Som nævnt er det ikke afklaret, hvilken rolle *R. dentocariosa* spiller; men der sås i øvrigt faldende forekomst i testgruppen af andre arter, der har velkendt relation til parodontal sygdom, fx *Bacteroidales* [G-2] sp._oral_taxon_274, *P. intermedia* og *Eubacterium* [XI][G-3] *brachy*.

De fremlagte data bekræfter, at en tandpasta, der er sammensat med henblik på at styrke spyttets naturlige forsvarsmekanismer, medfører positive ændringer i mikrobiomet, som er mere forenelige med sundhed. Nærmere betegnet påvises det, at en tandpasta med enzymer og proteiner, Zendium™, over tid kan føre til en forøget relativ forekomst af sundhedsrelaterede bakterier i plak og samtidig en faldende forekomst af sygdomsrelaterede bakterier, når man sammenligner med en tandpasta uden enzymer og proteiner. I den aktuelle gruppe af sunde forsøgspersoner var de statistisk signifikante ændringer i forekomst af enkelte arter relativt beskedne; men vi fremsætter den hypotese, at den kumulative økologiske effekt af mange små, men gunstige ændringer i antallet af gavnlige og skadelige bakterier har biologisk betydning. Der begynder i faglitteraturen at dukke belæg op for, at forskelle i sundhedstilstanden kan hænge sammen med beskedne ændringer i sammensætningen af lokale mikrobiomer (80). Vi formoder, at regelmæssig brug af en tandpasta med enzymer og proteiner kan medvirke aktivt til at bibeholde et afbalanceret mikrobiom med en sammensætning, der er forenelig med oral sundhed, og dermed bidrage til at reducere risikoen for skadelige ændringer, der kan medføre sygdom. Undersøgelsen blev udført på personer med sunde for-

Final Species	Change in Mean Relative Abundance (%)	Mean Relative abundance at Baseline (%)	Mean Relative abundance after 14 weeks (%)	p values	q values	Association
<i>Fusobacterium nucleatum</i> ss. polymorphum	0.80406	0.95194	1.75600	0.00173	0.03166	Core ¹⁸
<i>Alloprevotella</i> sp. Oral Taxon 473	0.05818	0.00556	0.06374	0.00012	0.00345	Unknown
<i>Streptococcus</i> [mitis] [mitis] [bv 2] [oralis] [pneumoniae] [HO1058] [HO1064] [HO1070] [sp. str. C100]	0.05783	0.00167	0.05950	0.00000	0.00000	Health ¹⁹
<i>Aggregatibacter</i> sp. Oral Taxon 512	0.02522	0.00074	0.02596	0.00000	0.00000	Unknown
<i>Streptococcus</i> sp. Oral Taxon 074	0.01148	0.00077	0.01224	0.00004	0.00137	Unknown
<i>Bacteroidetes</i> [G-5] sp. Oral Taxon 511	0.00389	0.00044	0.00433	0.00232	0.03965	Unknown
<i>Alloprevotella</i> sp. [HO1308] [HO1914]	0.00289	0.00019	0.00308	0.00007	0.00242	Unknown
<i>Rothia</i> <i>oria</i>	-0.93646	1.77341	0.83695	0.00083	0.01830	Unknown
<i>Streptococcus</i> [massiliensis] [HOT04]	-0.14233	0.14747	0.00515	0.00001	0.00058	Unknown
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	-0.10693	0.10695	0.00003	0.00000	0.00000	Unknown
<i>Porphyromonas</i> sp. Oral Taxon 277	-0.02613	0.03085	0.00472	0.00177	0.03166	Unknown
<i>Prevotella</i> <i>oralis</i>	-0.01028	0.01170	0.00141	0.00173	0.03166	Attachment loss ¹⁸
<i>Selenomonas</i> [HOT143] [spu] [gena]	-0.00844	0.01263	0.00419	0.00052	0.01215	Periodontitis ¹⁸
<i>Treponema</i> sp. Oral Taxon 270	-0.00480	0.00542	0.00062	0.00039	0.01038	Unknown
<i>Parvimonas</i> [micro] [HO1110] [HO1391]	-0.00465	0.00474	0.00008	0.00000	0.00027	Periodontitis ^{18, 20}
<i>Fretibacterium</i> [HO1359] [HO1452]	-0.00129	0.00132	0.00003	0.00000	0.00001	Periodontitis ¹⁸
<i>Fusobacterium</i> [nucleatum] [nucleatum] ss. <i>animalis</i> [nucleatum] ss. <i>vincentii</i> [sp. str. 3133]	-0.00085	0.00088	0.00003	0.00009	0.00279	Core

Fig. 6. Resumé af signifikante ændringer for arter, der er associeret med parodontal sundhed og/eller sygdom, efter brug af kontroltandpasta i 14 uger.

Fig. 6. Summary of the significant species changes associated with gum health or disease for the control toothpaste after 14-week test period.

hold i mundhulen over en periode på 14 uger, og det er tænkeligt, at der kunne opstå mere omfattende taksonomiske og/eller procentuelle ændringer, hvis produktet bliver anvendt igennem længere tid eller af personer med større sygdomsrisiko eller dårligere oral sundhedstilstand.

Undersøgelsen giver fornyet indsigt i denne tandpastas virkningsmekanismer og dens evne til at omstrukturere mikrofloraen. Vi påviser, at en økologisk indfaldsvinkel med DNA-sekventering, relevante bakteriedatabaser og grundig statistisk analyse er velegnet til bedømmelse af tandplejemidlers virkning på det orale mikrobioms økologi. Endvidere påviser vi, at tandbørstning med Zendium™ medfører en signifikant positiv ændring i plakkens mikrobiom, og vi finder dermed belæg for, at det er biologisk relevant at forøge mængden af forsvarsstoffer i spyttet med henblik på at forbedre den orale sundhed.

Yderligere undersøgelser foretaget på mRNA-niveau (*metatranscriptomics*) vil gøre det muligt at bestemme mikrobiomets funktionelle profil og dets metaboliske produkter (72,81,82). Sammen med analyser af plakkens rumlige struktur ved hjælp af teknikker som fx fluorescens *in situ* hybridisering (83) vil dette fremskaffe flere detaljer om virkningerne af de gavnlige ændringer, vi her har fremlagt.

Materials and Methods (Appendix)

Ethics statement

Written informed consent was obtained from all enrolled individuals. The study protocol was reviewed and approved by the Unilever R&D Port Sunlight independent ethics committee. The methods were carried out in accordance with the approved guidelines.

Participants

Subjects in good health aged 18 or over were recruited onto the study. The mean age of subjects was 42, with 33 male and 78 female participants completing the study. Key inclusion criteria included: minimum age 18 years, minimum number of teeth 20, no antibiotic therapy or professional cleaning within one month of the start of the study. Key exclusion criteria included: pregnancy, nursing mothers, diabetics, denture wearers, smoking within the last 6 months, medical conditions and/or regular use of any medication which might affect the outcome of the study and obvious signs of untreated caries/significant periodontal disease.

Study design

This study was a double-blind, randomised, parallel group study conducted by an independent third party. A study flow diagram is shown in Fig. 7. Subjects were enrolled on to the study according to the inclusion/exclusion criteria. After recruitment, subjects were given a fluoride toothpaste to use for four weeks prior to the commencement of the study. Following the initial 4-week at home use, baseline supra-gingival plaque from

the upper jaw was collected for the assessment of microbiome composition. Subjects were randomly allocated to one of two toothpastes, a fluoride toothpaste (1450 ppm) containing enzymes and proteins (Zendium) or a control fluoride toothpaste (1450 ppm) without enzymes and proteins. Subjects were instructed to use the toothpaste at home, brushing twice a day for 14-weeks. Supragingival plaque from the upper jaw was collected at week 14 for the assessment of microbiome composition. Each plaque sample was placed in 1 ml TE buffer in a low-DNA-binding Eppendorf tube. The samples were stored at -25°C until analysis.

DNA extraction

Samples were defrosted, vortexed for 30 seconds in the original TE buffer, sonicated for 20 seconds and vortexed for a further 30 seconds. 500 μl of each sample was transferred into an individual well of a 96-well Lysis plate containing pre-aliquoted matrix beads B (116981001, MPBio, California, USA). 3 μl aliquots of Ready-Lyse lysozyme (Epicenter, Wisconsin, USA) were added and the plate incubated using an Eppendorf Thermomixer at 37°C with shaking at 300 rpm for 18 hours. Following incubation, a bead-beating step was performed using a Tissue Lyser (Qiagen, Germany) for 3 minutes at 20 Hz. An off-board lysis was performed by incubating the samples at 68°C for 15 minutes in the presence of Proteinase K, Carrier RNA, ATL and ACL buffer in a Qiagen S-plate following manufacturer guidelines. Post-incubation, the plate was loaded on to the QIASymphony and the samples processed using the QIASymphony Virus/Bact Midi Kit (931055, Qiagen).

DNA quantification was performed using a Quant-IT high sensitivity DNA Assay kit (Invitrogen, California, USA) following manufacturers guidelines. Each sample was normalised to 1 ng/ μl using molecular grade water on a QIAgility robot (Qiagen) prior to PCR amplification.

16S rRNA gene amplicon library preparation

Oligonucleotide primers targeting the V4-V6 hypervariable region of the 16S rRNA gene were evaluated *in silico* using PrimerProspector (84). PCRs were conducted using the primers listed below (underlined section of the primer denotes the PCR attachment sequence). Primers were modified from the standard 533f and 1061r to include recognition sequences allowing a secondary nested PCR process facilitating the addition of standard Illumina adapters and sample specific indexes.

533f 52ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTNN
NNNGTGCCAGCMGCCGCGGTRA3'

and

1061r 5 GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT-
CRRACACGAGCTGACGAC3'

PCRs consisted of 0.25 μl (10 μM) of each primer, 7 μl of HotStar Taq Plus Mastermix (Qiagen), 5 μl of normalized template DNA and 4.5 μl molecular grade water (Qiagen). Samp-

les were amplified in triplicate using the following parameters: 95 °C for 5 minutes, then 10 cycles of: 94 °C for 45 seconds, 65 °C for 30 seconds, and 72 °C for 60 seconds, with a final extension of 10 minutes at 72 °C using a Biorad T100 (Biorad, California, USA). Replicate PCR amplicons were pooled and sent to

an external sequencing provider. Positive (mock community) controls were included in all PCR batches to highlight erroneous PCR amplification.

PCR products were purified using Axygen SPRI Beads (Axygen, California, USA). A second round PCR incorporated Illumi-

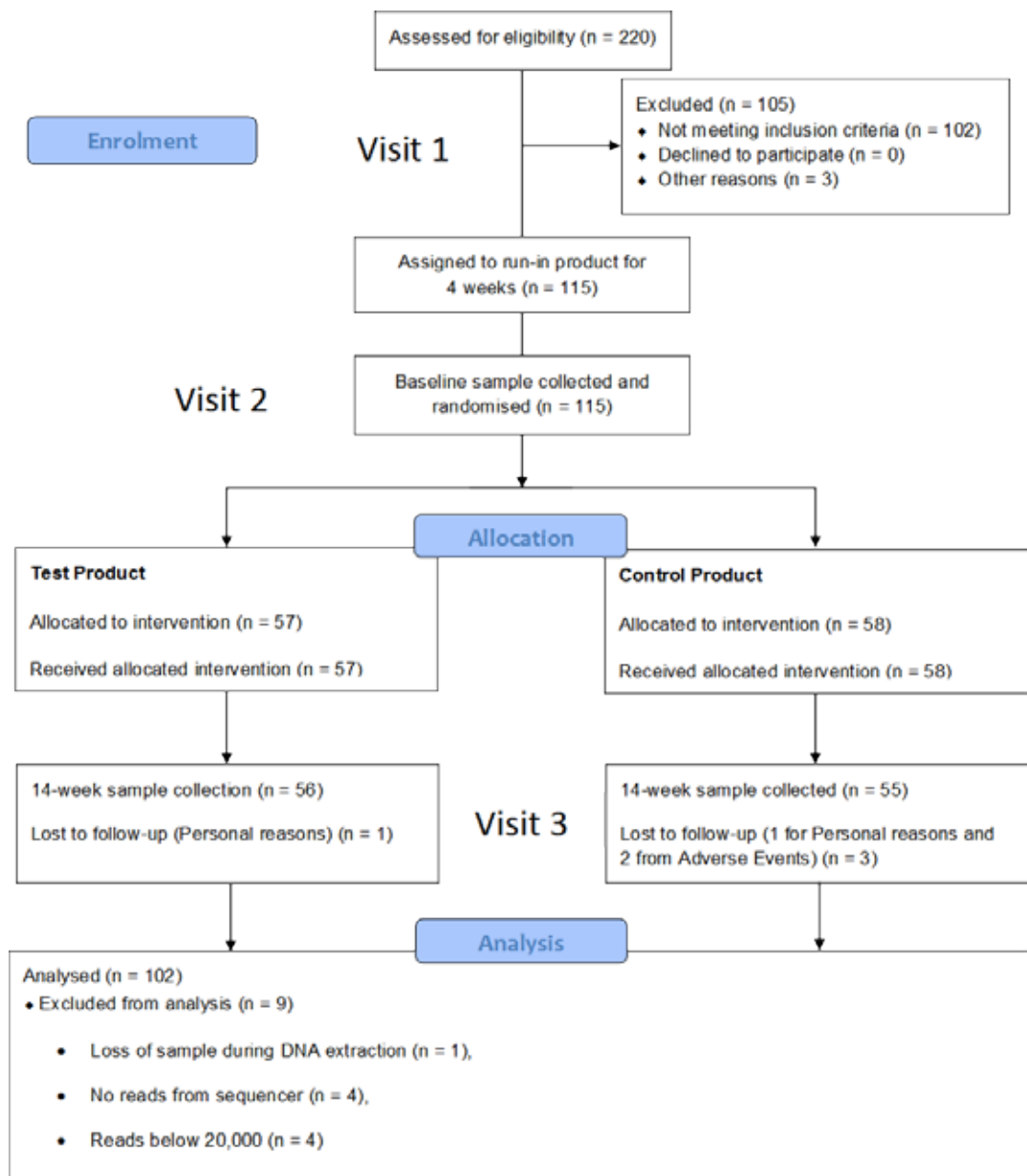


Fig. 7. Study Flow Diagram

na adapters containing indexes (i5 and i7) for sample identification utilising eight forward primers and twelve reverse primers each of which contained a separate barcode allowing up to 96 different combinations. General sequences of the primers are illustrated below with the variable 8 bp barcode underlined.

N501 f

5' AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTAGATCGCA-
CACTCTTTCCCTACACGACGCTC3'

N701

r5' CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATTCGCCTTAGTGACT
GGAGTTCAGACGTGTGCTC3*.

Second round PCRs consisted of 0.5 μ l (10 μ M) of each primer, 10 μ l of 2 x Kapa Mastermix (Kapa Biosystems, Massachusetts) and 9 μ l of purified sample from the first PCR reaction. Samples were amplified using the following parameters: 98 °C for 2 minutes, then 15 cycles of; 20 seconds at 95 °C, 15 seconds at 65 °C, 30 seconds at 70 °C with a final extension of 5 minutes at 72 °C. Samples were purified using Axygen SPRI Beads before being quantified using Qubit fluorimeter (Invitrogen, California, USA) and assessed using the Fragment Analyzer (Advanced Analytical Technologies, Iowa, USA). Resulting amplicon libraries were taken forward and pooled in equimolar amounts using the Qubit and Fragment Analyzer data and size selected on the Pippin prep (Sage Science, Massachusetts, USA) using a size range of 300–600 bps. The quantity and quality of each pool was assessed by Bioanalyzer (Agilent Technologies, California, USA) and subsequently by qPCR using the Illumina Library Quantification Kit (Kapa) on a Light Cycler LC480II according to manufacturer's instructions (Roche, Switzerland). Each pool of libraries was sequenced on one flowcell of an Illumina MiSeq with 2 x 300 bp paired-end sequencing using v3 chemistry (Illumina, California, USA).

Informatics processing

All raw reads were processed simultaneously. Fastq files were trimmed for the presence of Illumina adapters using Cutadapt (85) version 1.2.1. 16S rRNA gene amplification primers were removed from each fragment using Trim Galore v 0.4 (86) to account for the presence of degenerate bases that might impact downstream taxonomic assignment. Reads were further trimmed using Sickle v1.33 (87) with a minimum window quality score of 28. Reads shorter than 100 bp after trimming were removed. If only one of a read-pair passed this filter, its read-pair was removed from the dataset. Surviving read pairs were merged using Pandaseq v2.9 (88) generating contigs with a minimum overlap of at least 20 bp. Merged reads greater than 450 bp were taken forward for taxonomic classification.

Species level taxonomic assessment

Species level classification was carried out at The Forsyth Institute using an in-house pipeline. Briefly, unique assembled

reads were compared to three reference databases using ncbi-blast-2.2.30+ in a sequential manner. For a successful result to be taken, sequences had to match the reference at 99% similarity across 98% of the amplicon. Reads not assigned to species level against these three databases were discarded. The databases used were the Human Oral Microbiome Database (HOMD), HOMD extended (HOMDTEXT) and GreenGenes Gold, each of which had been curated to facilitate accurate species level assignment (59).

Statistical Analysis

Statistical analyses were performed on the table of counts produced from the bioinformatics pipeline. Counts were analysed at genus and species level, corrected for heteroscedasticity and unequal library sizes. It is common practice to employ a rarefaction process to correct for these variances in microbiome datasets (54). However, this has been shown to be statistically inadmissible (89). Our approach was to deal with the normalisation dependent on the context being examined. A variance stabilising transformation (VST) (89) was applied prior to ordination using a random forest dissimilarity measure (90-92). Alternatively, model-based approaches were employed for comparative testing of relative abundance between groups which explicitly model the uneven sample read numbers and sparseness. Analysis of variance (ANOVA) was conducted in parallel to determine the statistical significance using a between sample distance measure (Canberra Distance) based on taxonomic profile (93,94). Analyses were performed using the R packages Vegan (95), Party (96) and HMP (60).

Visualisation

Visual exploration of trends in the samples at species level was accomplished using a novel visualisation tool MicrobiVis (97). The bespoke MicrobiVis tool provides functionality for interactive visual analysis of microbial communities and enables interactive selection of subsets of species for in-depth detailed investigation. The selected subset of species is displayed using a Parallel Coordinates plot (98), where each vertical axis represents one species. The individual samples are displayed as polylines that intersect the axes at positions corresponding to their microbial count for that particular species, with minimum count at the bottom of the axes and maximum count at the top. The samples at baseline were coloured blue and the samples at 14-weeks were coloured green. This approach provides an overview of the microbial profiles of the samples within the subset of species, while also facilitating the identification of outlier samples that do not follow the general profile trends. Additionally, the median profiles of the two sample groups are represented by thicker lines to provide overview of the general profile patterns of the groups. Whilst the distri-

bution differences for individual species may be visualized using, for instance, box plots, the approach taken here has the ability to represent profiles across a group/set of species, and through this reveal sample clusters and correlations between species in more detail.

ABSTRACT (ENGLISH)

A randomised clinical study to determine the effect of a toothpaste containing enzymes and proteins on plaque oral microbiome ecology

The numerous species that make up the oral microbiome are now understood to play a key role in establishment and maintenance of oral health. The ability to taxonomically identify community members at the species level is important to elucidating its diversity and association to health and disease. We report the overall ecological effects of using a toothpaste containing enzymes and proteins compared to a control toothpaste on the plaque microbiome. The results reported here demonstrate that

Tak

DNA sekventering blev udført af Centre for Genomic Research, Liverpool, UK. Bioinformatik processen blev gennemført af Eagle Genomics, Cambridge, UK. Forfatterne er taknemmelige for Interteks støtte af studiet.

a toothpaste containing enzymes and proteins can augment natural salivary defences to promote an overall community shift resulting in an increase in bacteria associated with gum health and a concomitant decrease in those associated with periodontal disease. Statistical analysis shows significant increases in 12 taxa associated with gum health including Neisseria spp. and a significant decrease in 10 taxa associated with periodontal disease including Treponema spp. The results demonstrate that a toothpaste containing enzymes and proteins can significantly shift the ecology of the oral microbiome (at species level) resulting in a community with a stronger association to health.

Litteratur

1. Cho I, Blaser MJ. The human microbiome: at the interface of health and disease. *Nat Rev Gen* 2012;13260-70.
2. Kilian M, Chapple IL, Hannig M et al. The oral microbiome – an update for oral health care professionals. *Br Dent J* 2016;221:657-66.
3. Clavaud C, Jourdain R, Bar-Hen A et al. Dandruff is associated with disequilibrium in health and in disease. *Curr Opin Gastroenterol* 2015;31:69-75.
4. Dewhirst FE, Chen T, Izard J et al. The human oral microbiome. *J Bacteriol* 2010;192:5002-17.
5. Piérard-Franchimont C, Xhauflaire-Uhoda E, Piérard G. Revisiting dandruff. *Int J Cosmet Sci* 2006;28:311-18.
6. Fitz-Gibbon S, Tomida S, Chiu BH et al. Propionibacterium acnes strain populations in the human skin microbiome associated with acne. *J Invest Dermatol* 2013;133:2152-60.
7. Kostic AD, Xavier RJ, Gevers D. The microbiome in inflammatory bowel disease: current status and the future ahead. *Gastroenterology* 2014;146:1489-99.
8. Costalonga M, Herzberg MC. The oral microbiome and the immunobiology of periodontal disease and caries. *Immunol Lett* 2014;162:22-38.
9. Zarco MF, Vess TJ, Ginsburg GS. The oral microbiome in health and disease and the potential impact on personalized dental medicine. *Oral Dis* 2012;18:109-20.
10. Wade WG. The oral microbiome in health and disease. *Pharmacol Res* 2013;69:137-43.
11. Zaura E, Nicu EA, Krom BP et al. Acquiring and maintaining a normal oral microbiome: current perspective. *Front Cell Infect Microbiol* 2014;4:85.
12. Aas JA, Paster BJ, Stokes LN et al. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *J Clin Microbiol* 2015;43:5721-32.
13. Meyle J, Chapple I. Molecular aspects of the pathogenesis of periodontitis. *Periodontol* 2000 2015;69:7-17.
14. Abusleme L, Dupuy AK, Dutzan N et al. The subgingival microbiome in health and periodontitis and its relationship with community biomass and inflammation. *ISME J* 2013;7:1016-25.
15. Hajishengallis G. The inflammatory character of the periodontitis-associated microbiota. *Mol Oral Microbiol* 2014;29:248-57.
16. van't Hof W, Veerman EC, Nieuw Amerongen AV et al. Antimicrobial defense systems in saliva. In: Ligtenberg JM, Veerman EC, eds. *Saliva: Secretion and Functions*. Monogr Oral Sci Basel: Karger 2014;24:40-51.
17. Marsh PD, Head DA, Devine DA. Ecological approaches to oral biofilms: control without killing. *Caries Res* 2015;49:46-54.
18. Marsh PD, Head DA, Devine DA. Prospects of oral disease control in the future – an opinion. *J Oral Microbiol* 2014;6:26176.
19. Mandel ID. The role of saliva in maintaining oral homeostasis. *J Am Dent Assoc* 1989;119:298-304.
20. Dawes C, Pedersen AM, Villa A et al. The functions of human saliva: A review sponsored by the World Workshop on Oral Medicine VI. *Arch Oral Biol* 2015;60:863-74.
21. Marsh P.D, Martin M. *Oral Microbiology*. 4th ed. Oxford: Wright, 1999.
22. de Almeida Pdel V, Grégio AM, Machado MA et al. Saliva composition and functions: a comprehensive review. *J Contemp Dent Pract* 2008;9:72-80.
23. Marsh PD, Do T, Beighton D et al. Influence of saliva on the oral microbiota. *Periodontol* 2000 2016;70:80-92.
24. Lindh L, Aroonsang W, Stores J et al. Salivary pellicles. In: Ligtenberg AJM, Veerman ECI, eds. *Saliva: Secretion and Functions*. Monogr Oral Sci Basel: Karger 2014;24:30-9.
25. Hannig M, Joiner A. The structure, function and properties of the acquired pellicle. In: Duckworth RM, ed. *The teeth and their environment*. Monogr Oral Sci Basel: Karger 2006;19:29-64.
26. Hannig C, Hannig M, Attin T. Enzymes in the acquired enamel pellicle. *Eur J Oral Sci* 2005;113:2-13.
27. Marsh PD. Dental plaque as a microbial biofilm. *Caries Res* 2014;38:204-11.
28. Tenovuo J, Pruitt K. Relationship of the human salivary peroxidase system to oral health. *J Oral Pathol* 1984;13:573-84.
29. Middel M, Cooksey M. Clinical uses of an enzyme-containing dentifrice. *J Clin Periodontol* 1986;13:950-6.

32. Tenovuo J, Lumikari M, Soukka T. Salivary lysozyme, lactoferrin and peroxidases: antibacterial effects on cariogenic bacteria and clinical applications in preventive dentistry. *Proc Finn Dent Soc* 1990;87:197-208.
33. García-Mendoza A, Liébana J, Castillo AM et al. Evaluation of the capacity of oral streptococci to produce hydrogen peroxide. *J Med Microbiol* 1993;39:434-9.
34. Thomas EL, Milligan TW, Joyner R E et al. Antibacterial activity of hydrogen peroxide and the lactoperoxidase-hydrogen peroxide-thiocyanate system against oral streptococci. *Infect Immun* 1994; 62:529-35.
35. Ryan C, Kleinberg I. Bacteria in human mouths involved in the production and utilization of hydrogen peroxide. *Arch Oral Biol* 1995;40:753-63.
36. Carlsson J, Edlund MB, Hånström L. Bactericidal and cytotoxic effects of hypothiocyanite-hydrogen peroxide mixtures. *Infect Immun* 1984;44:581-6.
37. Hoogendoorn H, Moorer W. Lactoperoxidase in the prevention of plaque accumulation, gingivitis and dental caries. I. Effect on oral streptococci and lactobacilli. *Odontol Revy* 1972;24:355-66.
38. Hoogendoorn H, Piessens J, Scholtes W et al. Hypothiocyanite ion; the inhibitor formed by the system lactoperoxidase-thiocyanate-hydrogen peroxide. *Caries Res* 1977;11:77-84.
39. Lenander-Lumikari M, Månsson-Rahemtulla B, Rahemtulla F. Lysozyme enhances the inhibitory effects of the peroxidase system on glucose metabolism of *Streptococcus mutans*. *J Dent Res* 1992;71:484-90.
40. Lenander-Lumikari M, Tenovuo J, Mikola H. Effects of a lactoperoxidase system-containing toothpaste on levels of hypothiocyanite and bacteria in saliva. *Caries Res* 1993;27:285-91.
41. Fadel M, Courtois P. Effect of peroxidase-generated hypothiocyanite on the survival rate of *Porphyromonas gingivalis* NCTC 11834. *Med Sci Res* 1999;27:667-9.
42. Schenkels LC, Veerman EC, Nieuw Amerongen AV. Biochemical composition of human saliva in relation to other mucosal fluids. *Crit Rev Oral Biol Med* 1995;6:161-75.
43. Nikaido H, Vaara M. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. *Microbiol Rev* 1985;49:1-32.
44. Ellison RT 3rd, Giehl TJ. Killing of gram-negative bacteria by lactoferrin and lysozyme. *J Clin Invest* 1991; 88:1080-91.
45. Farnaud S, Evans RW. Lactoferrin – a multifunctional protein with antimicrobial properties. *Mol Immunol* 2003;40:395-405.
46. Fábíán TK, Hermann P, Beck A et al. Salivary defense proteins: their network and role in innate and acquired oral immunity. *Int J Mol Sci* 2012;13:4295-4320.
47. Soukka T, Lumikari M, Tenovuo J. Combined inhibitory effect of lactoferrin and lactoperoxidase system on the viability of *Streptococcus mutans*, serotype c. *Scand J Dent Res* 1991;99:390-6.
48. Berlutti F, Pilloni A, Pietropaoli M et al. Lactoferrin and oral diseases: current status and perspective in periodontitis. *Ann Stomatol* 2011;2:10-18.
49. Brading MG. In: 47th Meeting of CED-IADR (Oral Presentation. #0027 Antalya, Turkey, 2015).
50. Tenovuo J, Månsson-Rahemtulla B, Pruitt K et al. Inhibition of dental plaque acid production by the salivary lactoperoxidase antimicrobial system. *Infect Immun* 1981;34:208-14.
51. Kirstilä V, Lenander-Lumikari M, Tenovuo J. Effects of a lactoperoxidase-system-containing toothpaste on dental plaque and whole saliva in vivo. *Acta Odontol Scand* 1994;52:346-53.
52. Shin K, Horigome A, Wakabayashi H et al. In vitro and in vivo effects of a composition containing lactoperoxidase on oral bacteria and breath odor. *J Breath Res* 2008;2:017014.
53. Paster B J, Boches SK, Galvin JL et al. Bacterial diversity in human subgingival plaque. *J Bacteriol* 2001;183:3770-783.
54. Huang S, Li Z, He T et al. Microbiota-based Signature of Gingivitis Treatments: A Randomized Study. *SciRep* 2016;6:24705.
55. Poole AC, Pischel L, Ley C et al. Crossover Control Study of the Effect of Personal Care Products Containing Triclosan on the Microbiome. *mSphere* 2016;1:e00056-15.
56. Belda-Ferre P, Alcaraz LD, Cabrera-Rubio R et al. The oral metagenome in health and disease. *ISME J* 2012;6:46-56.
57. Peterson SN, Snesrud E, Lui J et al. The Dental Plaque Microbiome in Health and Disease. *PLoS One* 2013;8: e58487.
58. Chen T, Yu WH, Izard J et al. The Human Oral Microbiome Database: a web accessible resource for investigating oral microbe taxonomic and genomic information. *Database (Oxford)* 2010;baq013.
59. Al-Hebshi NN, Nasher AT, Idris AM et al. Robust species taxonomy assignment algorithm for 16S rRNA NGS reads: application to oral carcinoma samples. *J Oral Microbiol* 2015;7:28934.
60. La Rosa PS, D, E., Shands B, Shannon WD. (Set 2017 april). Tilgængelig fra: URL: <http://CRAN.R-project.org/package=HMP>
61. Storey JD. A direct approach to false discovery rates. *J Royal Stat Soc: Series B (Statistical Methodology)* 2002;64:479-98.
62. Marchesi JR, Ravel J. The vocabulary of microbiome research: a proposal. *Microbiome* 2015;3:31.
63. How KY, Song KP, Chan KG. *Porphyromonas gingivalis*: an overview of periodontopathic pathogen below the gum line. *Front Microbiol* 2016;7:53.
64. Griffen AL, Becker MR, Lyons SR et al. Prevalence of *Porphyromonas gingivalis* and periodontal health status. *J Clin Microbiol* 1998;36:3239-242.
65. Griffen AL, Beall CJ, Campbell JH et al. Distinct and complex bacterial profiles in human periodontitis and health revealed by 16S pyrosequencing. *ISME J* 2012;6:1176-185.
66. Kumar PS, Griffen AL, Barton JA et al. New bacterial species associated with chronic periodontitis. *J Dent Res* 2003;82:338-44.
67. Fukui K, Kato N, Kato H et al. Incidence of *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens* carriage among family members with subclinical periodontal disease. *J Clin Microbiol* 1999;37:3141-5.
68. Nadkarni MA, Chhour KL, Browne GV et al. Age-dependent changes in *Porphyromonas gingivalis* and *Prevotella* species/phylogenies in healthy gingiva and inflamed/diseased sub-gingival sites. *Clin Oral Invest* 2015;19:911-9.
69. Marsh PD. Microbiological aspects of the chemical control of plaque and gingivitis. *J Dent Res* 1992;71:1431-8.
70. Bradshaw DJ, Marsh PD, Allison C et al. Effect of Oxygen, Inoculum Composition and Flow Rate on Development of Mixed-Culture Oral Biofilms. *Microbiology* 1996;142:623-9.
71. UK STANDARDS FOR MICROBIOLOGY INVESTIGATIONS. Identification of *Neisseria* species 2015. (Set 2017 April). Tilgængelig fra: URL: file:///C:/Users/sk/Downloads/identification_of_neisseria_species.pdf
72. Yost S, Duran-Pinedo AE, Teles R et al. Functional signatures of oral dysbiosis during periodontitis progression revealed by microbial metatranscriptome analysis. *Genome Med* 2015;7:27.
73. Lourenço TG, Heller D, Silva-Boghossian CM et al. Microbial signature profiles of periodontally healthy and diseased patients. *J Clin Periodontol* 2014;41:1027-36.
74. Terai T, Okumura T, Imai S et al. Screening of probiotic candidates in human oral bacteria for the prevention of dental disease. *PLoS One* 2015;10:e0128657.
75. Nakano MM, Zuber P. Strict and facultative anaerobes: medical and environmental aspects. Oregon Health and Science University, Beaverton: CRC Press, 2004.
76. Tanner A, Maiden M, Macuch P et al. Microbiota of health, gingivitis, and initial periodontitis. *J Clin Periodontol* 1998;25:85-98.
77. Petroche-Llacsahuanga H, Reichhart E, Schmitt W et al. Investigation of infectious organisms causing pericoronitis of the mandibular third molar. *J Oral Maxillofac Surg* 2000;58:611-6.
78. Kistler JO, Booth V, Bradshaw DJ et al. Bacterial Community Development in Experimental Gingivitis. *PLoS One* 2013;8:e71227.
79. Brown JM, Georg LK, Waters LC. Laboratory Identification of *Rothia dentocariosa* and its occurrence in human clinical materials. *Appl Microbiol* 1969;17:150-6.
80. Chng KR, Tay AS, Li C et al. Whole metagenome profiling reveals skin microbiome-dependent susceptibility to atopic dermatitis flare. *Nat Microbiol* 2016;1:16106.
81. Simón-Soro A, Guillén-Navarro M, Mira A. Metatranscriptomics reveals overall active bacterial composition in caries lesions. *J Oral Microbiol* 2014;6:25443.
82. Zaura E, Mira A. Editorial: The oral microbiome in an ecological perspective. *Front Cell Infect Microbiol* 2015;5:39.
83. Mark Welch JL, Rossetti BJ, Rieken CW et al. Biogeography of a human oral microbiome at the micron scale. *Proc Natl Acad Sci USA* 2016;113:E791-800.
84. Walters WA, Caporaso JG, Luber CL et al. PrimerProspector: de novo design and taxonomic analysis of barcoded polymerase chain reaction primers. *Bioinformatics* 2011;27:1159-61.
85. Martin M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet. journal* 2011;17:10-12.
86. Gioti A, Nystedt B, Li W et al. Genomic insights into the atopic eczema-associated skin commensal yeast *Malassezia sympodialis*. *MBio* 2013;4:e00572-12.
87. Joshi NA, Fass JN. Sickle: A sliding-window, adaptive, quality-based trimming tool for FastQ files (version 1.33) [Software]. (Set 2017 April). Tilgængelig fra: URL: <https://github.com/najoshi/sickle>
88. Masella AP, Bartram AK, Truszkowski JM et al. PANDAseq: paired-end assembler for illumina sequences. *BMC Bioinformatics* 2012;13:31.
89. McMurdie PJ, Holmes S. Waste not, want not: why rarefying microbiome data is inadmissible. *PLoS Comput Biol* 2014;10:e1003531.
90. Hornoth T, Bühlmann P, Dudoit S et al. Survival ensembles. *Biostatistics* 2006;7:355-73.
91. Strobl C, Boulesteix AL, Zeileis A et al. Bias in random forest variable importance measures: Illustrations, sources and a solution. *BMC Bioinformatics* 2007;8:25.

92. Strobl C, Boulesteix AL, Kneib T et al. Conditional variable importance for random forests. *BMC Bioinformatics* 2008;9:307.
93. Anderson MJ. A new method for non-parametric multivariate analysis of variance. *Austral Ecology* 2001;26:32-46.
94. Gower J C, Krzanowski WJ. Analysis of distance for structured multivariate data and extensions to multivariate analysis of variance. *J Royal Stat Soc: Series C (Applied Statistics)* 1991;48:505-19.
95. Oksanen J et al. *Vegan: Community Ecology Package*. R package version 2.0-10. 2013.
96. Hothorn T, Buehlmann P, Dudoit S et al. Survival ensembles. *Biostatistics* 2006;7:355-73.
97. Fernstad S J, Johansson J, Adams S et al. In: *Biological Data Visualization (BioVis)*, 2011;127-34
98. Inselberg A. The plane with parallel coordinates. *The Visual Computer* 1985;2:69-91.
99. Bik EM, Long CD, Armitage GC et al. Bacterial diversity in the oral cavity of 10 healthy individuals. *ISME J* 2010;4:962-74.
100. Colombo AP, Boches SK, Cotton SL et al. Comparisons of subgingival microbial profiles of refractory periodontitis, severe periodontitis, and periodontal health using the human oral microbe identification microarray. *J Periodontol* 2009;80:1421-32.
101. Souto R, de Andrade AFB, Uzeda M et al. Prevalence of "non-oral" pathogenic bacteria in subgingival biofilm of subjects with chronic periodontitis. *Braz J Microbiol* 2006;37:208-15.
102. van Steenberghe TJ, Bosch-Tijhof CJ, Petit M et al. Intra-familial transmission and distribution of *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens*. *J Periodontal Res* 1997;32:345-50.
103. You M, Mo S, Watt RM et al. Prevalence and diversity of *Synergistetes* taxa in periodontal health and disease. *J Periodontal Res* 2013;48:159-68.