

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

Departamento de Estomatología III (Medicina y Cirugía Bucofacial)



TESIS DOCTORAL

**Periodontitis asociada a *Porphyromonas gingivalis*: prevalencia,
susceptibilidades antimicrobianas y tratamiento**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Alfonso Oteo Pérez

Directores

David Herrera González
Mariano Sanz Alonso

Madrid, 2016

Departamento de Estomatología II
Facultad de Odontología
Universidad Complutense de Madrid

**PERIODONTITIS ASOCIADA A *Porphyromonas*
gingivalis: PREVALENCIA, SUSCEPTIBILIDADES
ANTIMICROBIANAS Y TRATAMIENTO.**

Alfonso Oteo Pérez

Tesis Doctoral

Dirigida por: Dr. D. David Herrera González
Prof. Dr. D. Mariano Sanz Alonso

A Arantxa, Claudia y Macarena.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a todas aquellas personas que han colaborado en la realización de esta tesis doctoral:

Prof. David Herrera,

Como co-director de esta tesis. Por haberme animado a empezar este trabajo, por tener siempre unos minutos que dedicarme cuando aparecía por su despacho sin importar el resto de tareas en las que estaba trabajando en ese momento, por su paciencia y por adaptarse a mis tiempos de trabajo. Tiene toda mi admiración por su inconmensurable capacidad de trabajo, su entusiasmo y dedicación a la docencia de la Periodoncia.

Prof. Mariano Sanz,

Como co-director de esta tesis. Por ser mi mentor como el de tantos otros en el mundo de la Periodoncia, por ser un ejemplo en el que todos nos fijamos. Gracias por compartir sus conocimientos con todos nosotros y por dejarnos ser parte de la familia que ha creado en el master de Periodoncia de la Universidad Complutense de Madrid.

Quiero agradecer a Itziar González y a Ana O'Connor su colaboración en la realización de todo el trabajo de laboratorio de las muestras microbiológicas analizadas en España. Es un placer bajar al laboratorio y veros siempre con una sonrisa.

A todos los profesores que han formado parte de mi formación como dentista y especialmente como periodoncista, desde el Dr. Prof. Antonio

Bascones hasta todos los profesores que acuden regularmente al postgrado, por dedicar su tiempo y esfuerzo en ayudar a formarnos.

A todos mis compañeros y amigos del master de Periodoncia especialmente a Daniel Rodrigo, quien me ayudo en el trabajo de campo de parte de esta investigación.

A mi padre y mis tíos dentistas: Agustín, Carlos, Jesús, Lola y Francisco. Todos ellos en algún momento de mi vida me han apoyado y ayudado a desarrollarme como dentista y gracias a los cuales aprendí a querer la profesión desde pequeño.

A mi madre y hermanos Ana y Alberto, que han estado a mi lado siempre de forma incondicional. Por haberme animado a terminar este trabajo.

A mis abuelos, especialmente a Agustín al que sé que le hubiera hecho mucha ilusión venir a ver a su nieto defender su tesis doctoral.

Y sobre todo a Arantxa, Claudia y Macarena, por las horas que este trabajo les ha robado de estar con ellas. Gracias Arantxa por animarme a terminarlo en las horas en que la motivación bajaba y el tiempo escaseaba, por estar siempre a mi lado y haber andado todo este camino conmigo.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

I. PREFACIO	10
II RESUMEN	11
III. INTRODUCCIÓN	13
1. Enfermedades periodontales: clasificación y prevalencia.	
2. Progresión de las enfermedades periodontales a nivel local y sistémico.	
3. Etiología de las enfermedades periodontales.	
4. El papel de las bacterias en la etiología de las enfermedades periodontales.	
5. Etiopatogenia de las enfermedades periodontales	
6. Tratamiento de las enfermedades periodontales	
IV. JUSTIFICACIÓN	58
V. HIPÓTESIS	61
VI. OBJETIVOS	63

VII. MATERIAL Y MÉTODOS. RESULTADOS	65
Estudio 1:	66
Antimicrobial profiles of periodontal pathogens isolated from periodontitis patients in the Netherlands and Spain. (2005)van Winkelhoff AJ, Herrera D, Oteo A, Sanz M. J Clin Periodontol;32:893-898.	
Estudio 2:	76
Subgingival microbial profiles in chronic periodontitis patients from Chile, Colombia and Spain. (2008) Herrera D, Contreras A, Gamonal J, Oteo A, Jaramillo A, Silva N, Sanz M, Botero JE, León R. J Clin Periodontol; 35:106-113.	
Estudio 3:	87
Azithromycin as an adjunct to scaling and root planing in the treatment of <i>Porphyromonas gingivalis</i> associated periodontitis: a pilot study. (2010) Oteo A, Herrera D, Figuero E, O'Connor A, González I, Sanz M. J Clin Periodontol;37:1005-1015.	
VIII. DISCUSIÓN	101
IX. CONCLUSIÓN	129
X. BIBLIOGRAFÍA	131

I. PREFACIO

La presente tesis doctoral está basada en los siguientes tres artículos:

Estudio 1: van Winkelhoff AJ, Herrera D, Oteo A, Sanz M (2005) Antimicrobial profiles of periodontal pathogens isolated from periodontitis patients in the Netherlands and Spain. *J Clin Periodontol*;32:893-898.

Estudio 2: Herrera D, Contreras A, Gamonal J, Oteo A, Jaramillo A, Silva N, Sanz M, Botero JE, León R. J (2008) Subgingival microbial profiles in chronic periodontitis patients from Chile, Colombia and Spain. *Clin Periodontol*; 35:106-113.

Estudio 3: Oteo A, Herrera D, Figuero E, O'Connor A, González I, Sanz M (2010) Azithromycin as an adjunct to scaling and root planing in the treatment of *Porphyromonas gingivalis* associated periodontitis: a pilot study. *J Clin Periodontol*;37:1005-1015.

II Resumen

Las enfermedades periodontales se definen como un grupo de enfermedades inflamatorias de los tejidos de soporte del diente causadas por un grupo específico de microorganismos organizados en el biofilm subgingival (Haffajee & Socransky 1994). Esta inflamación crónica produce destrucción del ligamento periodontal y del hueso de soporte, que resulta en la formación de bolsas periodontales, recesión gingival o ambas.

De entre las más de 700 especies bacterianas presentes en la cavidad oral, de las cuales 400 han sido detectadas en las bolsas periodontales (Paster., et al., 2006), sólo un número limitado de ellas se han asociado claramente con la periodontitis (Socransky & Haffajee 1994). De estas 700, tres especies bacterianas cumplen los criterios para ser bacterias periodontopatógenas con nivel de asociación fuerte de acuerdo a los criterios de Socransky, estas bacterias son: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* y *Tannerella forsythia*, si bien, las bacterias no se encuentran aisladas en la cavidad oral de forma plactónica, sino que se organizan en biofilms orales que las confieren propiedades particulares de defensas frente a microorganismos competidores, frente a factores ambientales como los mecanismos de defensa del huésped o frente a posibles sustancias tóxicas como los antibióticos (Kuboniwa & Lamont 2010; Marsh et al., 2011).

El tratamiento periodontal va encaminado a eliminar/reducir estas bacterias periodontopatógenas, mediante el desbridamiento subgingival, ya sea quirúrgico o no quirúrgico. Sin embargo, debido a las limitaciones microbiológicas del tratamiento periodontal estándar, en ciertos pacientes (como aquellos con perfiles microbiológicos determinados), el uso de tratamientos coadyuvantes, como los antimicrobianos, puede estar justificado (Herrera et al., 2002; Haffajee et al., 2003). Diferentes estudios

han demostrado que el consumo de antibióticos (Baquero 1996 et al., 2001), así como el no cumplimiento en la pauta adecuada de tratamiento (Pradier et al., 1997), en los países mediterráneos, comparados con los países del centro y norte de Europa, son mucho mayores, lo que ha conducido a un aumento de las resistencias bacterianas a los antibióticos en los países del sur de Europa en comparación con los del norte (Machka et al., 1988; Bronzwaer et al., 2004; Zinn et al., 2004).

P. gingivalis ha demostrado una alta prevalencia en los pacientes periodontales en España (Sanz et al., 2000; Herrera et al., 2008; Lau et al., 2004) y, por tanto, es razonable analizar los aspectos relacionados con su prevalencia, susceptibilidades a antibióticos y respuesta al tratamiento.

-El primer estudio fue encaminado a evaluar los diferentes patrones de resistencia bacteriana entre pacientes con periodontitis crónica en España y Holanda, mediante la comparación de los perfiles de susceptibilidades de *P. gingivalis* y otros periodonto-patógenos, usando la técnica de epsilometría (*E-test*) (van Winkelhoff et al., 2005).

-Para evaluar la prevalencia de *P. gingivalis* se diseñó un estudio comparativo de la flora subgingival de países geográficamente separados como son España, Chile y Colombia utilizando métodos de detección idénticos (Herrera et al., 2008)

-El tercer estudio fue diseñado para comparar los efectos clínicos y microbiológicos del uso de azitromicina o placebo, coadyuvante al tratamiento periodontal no quirúrgico, en el tratamiento de la periodontitis crónica asociada a *P. gingivalis* (Oteo et al., 2010).

Palabras clave: periodontitis, *Porphyromonas gingivalis*, prevalencia, susceptibilidades antimicrobianas, tratamiento, azitromicina

Abstract

Periodontitis associated to Porphyromonas gingivalis: Prevalence, antimicrobial susceptibility and treatment.

Introduction:

Periodontal diseases are defined as a group of inflammatory diseases of the tooth-supporting tissues caused by specific microorganisms residing in the subgingival biofilm (Haffajee & Socransky 1994). This chronic inflammation causes progressive destruction of the periodontal ligament and alveolar bone, resulting in pocket formation, gingival recession or both. Among the more than 700 bacterial species present in oral cavity, of which 400 have been detected in periodontal pockets (Paster et al., 2006), only a limited number of them are clearly associated to periodontitis (Socransky & Haffajee 1994). Out of this 700, three species fulfill the criteria to be periodontopathic with a high level of association according to the criteria described by Socransky, these species are: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* y *Tannerella forsythia*, although these species can't be isolated in the oral cavity in a planktonic way and are embedded in oral biofilms, which give them special defense properties against other microorganisms, against ambient factors as host defense mechanisms or against toxic substances as antibiotics (Kuboniwa & Lamont 2010; Marsh et al., 2011).

Periodontal treatment is focused on the elimination/reduction of these periodontopathic bacteria, through out non surgically or surgically subgingival debridement. Due to microbiologic limitations of standard treatment, in certain patients (as those with certain microbiological profiles), the use of coadjuvant treatments, as antibiotics, might be justified (Herrera et al., 2002; Haffajee et al., 2003). Different studies have shown a much higher antibiotics consumption (Baquero 1996; Cars et al., 2001), as

well as poor compliance with antibiotics regime (Pradier et al., 1997), in Mediterranean countries, compared to central and northern Europe countries. This, has led to an increase antimicrobial resistance in the southern European countries compared to the Northern (Machka et al., 1988; Bronzwaer et al., 2004; Zinn et al., 2004).

P. gingivalis has shown a high prevalence in Spanish periodontal patients (Sanz et al., 2000; Herrera et al., 2008; Lau et al., 2004), and so it seems reasonable to study the aspects related to its prevalence, antibiotics susceptibility and response to treatment.

Aim: The first study was conducted to compare antimicrobial susceptibility profiles of *P. gingivalis* and other periodontal bacteria isolated from periodontitis patients in the Netherlands and Spain using the Epsilometer (E-test) technique.

Methods: Subgingival plaque samples from adult patients with periodontitis were collected and cultured on selective and non-selective plates. *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotellaintermedia*, *Fusobacterium nucleatum* and *Micromonas micros* were isolated and used for minimal inhibitory concentration tests using the Epsilometer technique. Eight different antibiotics were tested on all bacterial isolates. MIC50 and MIC90 values for each antibiotic and each species were determined and the percentage of resistant strains was calculated.

Results: Significantly higher MIC values were noted in Spanish strains of *F. nucleatum* for penicillin, ciprofloxacin, of *P. intermedia* for penicillin, amoxicillin and tetracycline, of *M. micros* for tetracycline, amoxicillin and azithromycin, and of *P. gingivalis* for tetracycline and ciprofloxacin. Based on breakpoint concentrations, a higher number of resistant strains in Spain

were found in *F. nucleatum* for penicillin, amoxicillin and metronidazole, in *Prevotella intermedia* for tetracycline and amoxicillin, and in *A. actinomycetemcomitans* for amoxicillin and azithromycin.

Resistance of *P. gingivalis* strains was not observed for any of the antibiotics tested both in Spain and the Netherlands.

Aim: To evaluate the prevalence of *P. gingivalis*, a comparative study of the subgingival flora of geographically separated countries was conducted. To compare results properly,

Methods: the same clinical and microbiological methods (culture) were employed (Herrera et al., 2008)

Results: The Colombian population demonstrated greater severity of periodontitis, with significantly deeper mean probing pocket depth, and had a significantly lower percentage of current smokers. When comparing samples from the three patient populations, the total counts were significantly higher in the Colombian patients. The numbers of putative pathogens differed among groups. *Tannerella forsythia* was found less frequently in Chilean samples, while *Parvimonas micra* and enteric rods differed significantly among the three population groups.

Conclusion: Significant differences among Chile, Colombia and Spain existed regarding the frequency and proportions of specific periodontal pathogens in the subgingival microbiota of periodontitis patients.

Aim: The third study, was designed to compare the clinical and microbiological effects of the use of azithromycin or placebo as an adjunct to scaling and root planing in the treatment of *P. gingivalis*-associated chronic periodontitis (Oteo et al., 2010).

Methods: Scaling and root planning was completed within seven days. Test Group patients received azitromycin 500mg/24h/3d, placebo was administered to the control Group.

Results: Fifteen test and 11 placebo patients completed the study. Mean PPD decreased 0.34mm [95% confidence interval (CI) 0.19–0.49] in the placebo and 0.80mm (CI 0.57–1.04) in the test group after 6 months. For mean CAL gain, the correspondent figures were 0.29 (CI 0.08–0.49) and 0.76 (CI 0.46–1.05), respectively.

The frequency of detection of *P. gingivalis* decreased significantly ($p \leq 0.01$) in the test group after 1, 3 and 6 months.

As a general conclusion, the results of the three studies support the importance of *P. gingivalis* as a pathogen associated to chronic periodontitis: it has a high frequency of detection (>60%) in patients with different geographical locations; the use of antimicrobials when used due to its presence, enhances clinical and microbiological results; and by the moment *P. gingivalis* is susceptible to the most frequently used antibiotics, with no differences among different populations.

Key words: periodontitis, prevalence, antimicrobial susceptibility, treatment, azithromycin.

III. INTRODUCCIÓN

1. Enfermedades periodontales: clasificación y prevalencia

Las enfermedades periodontales se definen como un grupo de enfermedades inflamatorias de los tejidos de soporte del diente causadas por un grupo específico de microorganismos organizados en el biofilm subgingival (Haffajee & Socransky 1994). Esta inflamación crónica produce destrucción del ligamento periodontal y del hueso de soporte, que resulta en la formación de bolsas periodontales, recesión gingival o ambas.

De acuerdo con la clasificación vigente de las enfermedades periodontales, existen ocho categorías principales (Armitage 1999):

- I Enfermedades gingivales.
- II Periodontitis crónica.
- III Periodontitis agresiva.
- IV Periodontitis como manifestación de una enfermedad sistémica.
- V Enfermedades periodontales necrosantes.
- VI Abscesos periodontales.
- VII Periodontitis asociada a lesiones endodónticas.
- VIII Deformidades desarrolladas o adquiridas.

La clasificación define las periodontitis como agresivas o crónicas, de acuerdo al patrón de destrucción periodontal que siga, y a su vez se pueden clasificar como iniciales, moderadas o avanzadas en función de el grado de afectación.

Se definen como periodontitis agresivas, aquellas periodontitis en las que la pérdida de soporte, así como los signos clínicos asociados (sangrado,

supuración...), son avanzados en relación a la cantidad de factor etiológico causal presente (placa bacteriana y cálculo subgingival), mientras que las periodontitis crónicas siguen una progresión más lenta y generalmente se asocian a la presencia de factores etiológicos causales como placa bacteriana abundante, cálculo subgingival o consumo de tabaco. Algunos criterios clave para diagnosticar correctamente estos pacientes son: una temprana edad de comienzo de la enfermedad, generalmente antes de los 30 años, afectación de múltiples dientes con diferente patrón de destrucción tanto clínica como radiológicamente, un patrón de destrucción relativamente alto y la ausencia de enfermedades sistémicas que comprometan la defensa del huésped en su respuesta a la infección (Albandar 2014). Clínicamente son pacientes que presentan por lo general poca cantidad de placa bacteriana y no presentan una inflamación muy acusada (Armitage & Cullinan 2010)

Si bien no existe un consenso en la definición de los casos de periodontitis crónica (Holtfreter et al., 2015), esta afectación se produce con más frecuencia en personas de mayor edad, su progresión es más lenta y suele ir asociada a factores de riesgo como la presencia de placa bacteriana y sarro subgingival, consumo de tabaco, genética o estrés. Desde un punto de vista clínico suele apreciarse inflamación marcada y sangrado al sondaje (Armitage & Cullinan 2010)

Existen diferentes estudios epidemiológicos recientes que han evaluado la prevalencia de las enfermedades periodontales en países desarrollados.

- Un estudio epidemiológico, recientemente realizado en los Estados Unidos de América, ha evaluado la prevalencia de enfermedades periodontales en adultos en el periodo de 2009-2010 (Eke et al., 2012) Sobre una muestra de 3742 adultos mayores de 30 años, a los que se midió el nivel de inserción y

la profundidad de sondaje en 6 localizaciones por diente, se estimó que un 47% de la muestra, que representarían 64.7 millones de adultos en los Estados Unidos, tenían periodontitis, distribuidos en 8.7% con periodontitis inicial, 30% con periodontitis moderada y 8.5% con periodontitis avanzada.

- Otro estudio, realizado en Alemania (Holtfreter et al., 2010), en el que se evaluó el estado periodontal en diferentes zonas del país, subdividiendo a la población en adultos jóvenes (35-44 años) y adultos mayores (65-74 años), observó que el 52.7% de los adultos y el 48.9% de los adultos mayores presentaban bolsas periodontales moderadas (4-5 mm), mientras que el 25% de los más jóvenes y el 39% de los mayores, presentaban bolsas profundas (>6 mm). De acuerdo a la definición de periodontitis propuesta por Page y Eke en 2007 (Page & Eke 2007), el 70.9% de los pacientes de 35-44 años y el 87.9% de los pacientes de 65-74 años presentaban periodontitis. En este estudio, también se encontraron diferencias en función de la zona donde residían los sujetos. Los alemanes residentes en el este, presentaban mayor pérdida de inserción comparados con los del oeste, lo que se puede atribuir a las diferencias en los servicios de salud dental, estrategias de prevención y a un peor nivel de higiene oral.

- En el año 2012, se ha publicado la Encuesta de Salud Oral en España 2010 (Llodra Calvo 2012), en la que se ha evaluado una muestra de 2.657 pacientes divididos en cohortes etarias de 5-6 años, 12 años, 15 años, 35-44 años y 65-74 años. Entre otras variables analizadas, como el índice de caries, la presencia de dientes permanentes sellados o la presencia y necesidad de prótesis, este estudio ha evaluado la prevalencia de las enfermedades periodontales en España. Los resultados de este estudio indican que en España, el 19.7% de la población entre 35 y 44 años y el 26.8% de la

población entre 65 y 74 años, presenta una pérdida de inserción (PI) moderada (4-5 mm), mientras que el 6% de los adultos jóvenes y el 17.7% de los mayores, presentan pérdida de inserción avanzada (>6 mm). Las conclusiones del estudio indican que entre el 85-94% de la población española mayor de 35 años presenta algún problema relacionado con las encías, entre el 16-30% de los españoles mayores de 35 años tiene periodontitis, alcanzando el grado de avanzada en el 5-11% de la población adulta.

- Una publicación reciente (Konig et al., 2010), ha comparado los estudios epidemiológicos existentes de 17 países europeos. En el caso de España, los datos empleados son los correspondientes a la Encuesta de Salud Oral en España 2005 (Bravo Pérez et al., 2006). De acuerdo a los datos publicados, España se encuentra entre los países con una mejor salud periodontal junto a Suiza y Suecia, mientras que Noruega, Alemania y Lituania son, entre los países de los que se tienen datos, los que presentan peor salud periodontal.

2. Progresión de las enfermedades periodontales a nivel local y sistémico

Las enfermedades periodontales pueden tener consecuencias nocivas tanto a nivel local, como a nivel sistémico.

Progresión de la periodontitis a nivel local

La inflamación crónica de los tejidos de soporte de los dientes tiene como consecuencia la destrucción del ligamento periodontal y el hueso alveolar de soporte. Esta pérdida de soporte va a producir alteraciones funcionales como: movilidad en los dientes que puede llegar a la pérdida de éstos o a la

necesidad de ser extraídos con lo que se produce una disminución de la capacidad masticatoria; la formación de abscesos de origen periodontal por agudización del proceso crónico en bolsas profundas (Herrera et al., 2000) la aparición de trauma oclusal (Branschovsky et al., 2011), o el empaquetamiento de alimentos como consecuencia de un aumento, o el empaquetamiento de alimento en los espacios entre los dientes.

La pérdida de los tejidos de soporte también puede provocar alteraciones estéticas como recesiones, “dientes largos”, migraciones, “triángulos negros” y como ya se ha mencionado, la pérdida de dientes, que es la consecuencia final de la progresión de la periodontitis no tratada y que, además de un problema funcional muy relevante, puede ser un problema estético y social (Durham et al., 2013) o, incluso, interferir con la alimentación.

Progresión de la periodontitis a nivel sistémico

El paso de las bacterias a la circulación sanguínea sistémica (bacteriemia) y la respuesta inmuno-inflamatoria que producen las bacterias periodontales en el organismo, puede justificar la asociación entre las enfermedades periodontales y diferentes afectaciones sistémicas (Reyes et al., 2013).

Diferentes estudios han evaluado que aquellos pacientes que sufren periodontitis, tienen un riesgo aumentado de:

- sufrir enfermedades respiratorias como neumonía y enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), especialmente aquellos pacientes que se encuentran hospitalizados (Paju & Scannapieco 2007)
- enfermedades cardiovasculares (Tonetti 2009).

- resultados adversos del embarazo (Chambrone et al., 2011)

Además, existe una relación bidireccional entre la diabetes y la periodontitis, siendo los niveles glucémicos más inestables en los pacientes que tienen periodontitis y habiendo más afectación periodontal en los pacientes diabéticos mal controlados (Teeuw et al., 2010; Taylor et al., 2013), también se ha observado, que el tratamiento de la periodontitis puede ayudar a controlar la diabetes (Engebretson & Kocher 2013).

3. Etiología de las enfermedades periodontales.

La periodontitis crónica es una enfermedad inflamatoria cuyo factor causante principal es el sobrecrecimiento de biofilms bacterianos en el área subgingival. La presencia de bacterias periodontopatógenas es indispensable para el desarrollo de la enfermedad, pero la susceptibilidad o resistencia de los individuos a esta enfermedad, vendrá marcada por los factores de riesgo, que serán los que modificarán el progreso de la destrucción periodontal.

Los factores de riesgo para las enfermedades periodontales pueden ser sistémicos o locales. Los sistémicos incluyen comportacionales como el consumo de tabaco; condiciones médicas como diabetes mal controlada, posiblemente obesidad, estrés, osteopenia y una dieta inadecuada de consumo de calcio y vitamina D. Dentro del plan de tratamiento, parece razonable hablar de eliminar o “modificar” estos factores de riesgo como parte del tratamiento periodontal. Otros factores de riesgo como la susceptibilidad genética de cada individuo a la enfermedad, o la raza, no pueden ser modificados, pero identificar a los pacientes que tienen mayor

riesgo de sufrir destrucción periodontal, puede ayudarnos a dirigir nuestros objetivos intervencionistas.

Los factores de riesgo locales incluyen todas aquellas condiciones intra-orales que faciliten la retención de placa bacteriana y dificulten su limpieza como obturaciones o prótesis desbordantes o dientes mal posicionados (Genco & Borgnakke 2013)

La importancia de la presencia de estos factores de riesgo, convierten a las enfermedades periodontales en enfermedades multifactoriales, donde la presencia de bacterias es indispensable para su comienzo.

4. El papel de las bacterias en la etiología de las enfermedades periodontales

Organización de los patógenos periodontales en biofilms

Hay que tener en cuenta que los microorganismos presentes en la placa bacteriana no se encuentran aislados sobre la superficie dentaria, sino que se adhieren a esta, organizándose en complejas estructuras denominadas biofilms. La organización de bacterias en biofilms no es un concepto exclusivo de la cavidad oral, sino que se produce también en otras situaciones en las que las bacterias tienen oportunidad de adherirse a una superficie, como en prótesis artificiales colocadas en el organismo (traumatológicas, catéteres...) (Costerton et al., 1999) o como en cubas industriales o cascos de barcos.

El biofilm está compuesto de microcolonias bacterianas (15-20% del volumen) embebidas en una matriz (75-80% del volumen). Este método de crecimiento provee a las bacterias de varias ventajas, como la protección

frente a microorganismos competidores, frente a factores ambientales como los mecanismos de defensa del huésped o frente a posibles sustancias tóxicas como los antibióticos (Kuboniwa & Lamont 2010; Marsh et al., 2011).

El crecimiento bacteriano en biofilms, como la placa bacteriana, aumentan la tolerancia a los agentes antibacterianos, incluyendo aquellos incorporados en dentífricos y colutorios (Kinniment et al., 1996; Pratten & Wilson 1999; Marsh et al., 2011). Por ejemplo, la concentración de clorhexidina para matar *Streptococcus sobrinus* en un biofilm, fue 300 veces superior a la concentración necesaria en células planctónicas (Shani et al., 2000). Larsen evaluó la susceptibilidad de *P. gingivalis* a diferentes antibióticos, entre ellos metronidazol en células planctónicas, y las comparó con bacterias englobadas en un biofilm, y observó que la concentración bactericida mínima (CBM) necesaria para eliminar *P. gingivalis* en los biofilms, era 2-8 veces superior respecto a la CBM necesaria para eliminarla en las células planctónicas (Larsen 2002). La edad del biofilm también tiene importancia: Takahashi et al., (2007) observaron que la susceptibilidad de *A. actinomycetemcomitans* a seis tipos diferentes de antibióticos, disminuía cuanto mayor era la edad del biofilm (Takahashi et al., 2007).

El mecanismo por el que las resistencias aumentan en un biofilm varían de especie a especie, de antibiótico a antibiótico y de diferentes biofilms creciendo en diferentes hábitats (Socransky & Haffajee 2002). Entre los mecanismos de resistencia propuestos se encuentran:

- el crecimiento más lento de las bacterias dentro del biofilm, lo que las hace menos susceptibles a muchos antibióticos, aunque no a todos (Costerton et al., 1999; Brooun et al., 2000; Xu et al., 2000).

- la matriz exopolímera que reviste el biofilm, tiene una función homeostática, de tal forma, que las bacterias que se encuentran en la zona más profunda del biofilm, soportan diferentes condiciones, como son la concentración de ión hidrógeno o el potencial red-ox, que las bacterias que se encuentran en la periferia del biofilm o bacterias aisladas. Estas bacterias localizadas más profundamente, tienen un ritmo de crecimiento más lento, lo que les permite sobrevivir mejor que las bacterias que tienen un crecimiento más rápido y se encuentran en la periferia de el biofilm, cuando tienen una exposición a antibióticos.

- aunque el biofilm no es una barrera significativa en sí misma, ante la difusión de los antibióticos, sí tiene ciertas propiedades que pueden retrasar la difusión, reduciendo los niveles de antibiótico hacia las bacterias más profundas del biofilm (Foley & Gilbert 1996). Por ejemplo, los agentes químicos con una carga reactiva elevada, pueden fracasar en alcanzar las zonas más profundas del biofilm, porque el biofilm actúa como una zona de intercambio de iones, eliminando esas moléculas de la solución (Gilbert & Brown 1995)

- además, enzimas extracelulares como β -lactamasas o dehidrogenasa de formaldehído, pueden quedar atrapadas y concentradas en la matriz extracelular, con lo que se desactiva su susceptibilidad, ya que poseen una carga típicamente positiva de los antibióticos hidrofílicos. Algunos antibióticos como los macrólidos, que tienen una carga positiva, pero son hidrofóbicos, no se ven afectados por este proceso. De esta forma, la capacidad de la matriz para actuar como una barrera física, depende del tipo de antibiótico, la adherencia de la matriz a ese agente y de la concentración de este (Nichols 1993).

Identificación de patógenos periodontales

De entre las más de 700 especies bacterianas presentes en la cavidad oral, de las cuales 400 han sido detectadas en las bolsas periodontales (Paster et al., 2006), sólo un número limitado de ellas se han asociado claramente con la periodontitis (Socransky & Haffajee 1994).

Para determinar si una bacteria es periodontopatógena, ésta debe cumplir unos criterios, postulados por Socransky y Haffajee (AAP Consensus report 1996)

1. Criterio de asociación: la bacteria debe encontrarse más frecuentemente y/o en mayor número, en casos con infección que en individuos sin infección o con otras formas de enfermedad.
2. Criterio de eliminación: la eliminación de la especie debe ir acompañada de una remisión paralela (evaluada como mejoría clínica) de la enfermedad.
3. Criterio de respuesta del huésped: si una especie o su antígeno, accede a los tejidos periodontales y produce daño, parece plausible que el huésped produzca anticuerpos o una respuesta celular inmune dirigida específicamente contra esa especie.
4. Criterio de factores de virulencia: si la bacteria tiene capacidad para producir factores de virulencia bioquímicos, capaces de producir daño directo o indirecto sobre los tejidos del huésped, parece más factible que esas especies puedan tener un papel directo en el progreso de la enfermedad.
5. Criterio de modelos animales: la inoculación de una especie bacteriana en un modelo animal para inducir la enfermedad, provee evidencia de que una determinada especie juegue un papel importante en la enfermedad en los humanos.

6. Criterio de factor de riesgo: las técnicas microbiológicas actuales, permiten realizar estudios longitudinales en los que se puede evaluar el riesgo de progresión de enfermedad en función del perfil microbiológico de los pacientes.

De acuerdo a estos criterios, en el *Workshop* Mundial de Periodoncia de 1996 (AAP Consensus report 1996), se determinó que tres especies bacterianas cumplían los criterios para ser bacterias periodontopatógenas con nivel de asociación fuerte. Estas especies son: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* y *Tannerella forsythia*. Otras especies fueron calificadas como con asociación moderada (*Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens*, *Campylobacter rectus*, *Eubacterium nodatum*, *Fusobacterium nucleatum*, *Parvimonas micra*, *Streptococcus intermedius*, *Treponema denticola* y otras especies de espiroquetas) o inicial (*Eikenella corrodens*, bacilos entéricos, *Pseudomonas* spp., *Selenomonas* spp., *Staphylococcus* spp. y hongos).

Grupos de patógenos periodontales

Hay que tener en cuenta que la compleja combinación de especies bacterianas que colonizan el área subgingival, producen relaciones que pueden ser beneficiosas (los microorganismos previenen la aparición de la enfermedad) o perjudiciales (los organismos producen enfermedad). Estudios en animales han demostrado que la combinación de especies era capaz de producir abscesos periodontales en modelos experimentales, mientras que cada especie individualmente no era capaz (Socransky & Gibbons 1965). En humanos, la asociación de *P. gingivalis* y *T. forsythia*, puede ser importante en las localizaciones con infección y en localizaciones con progresión de la destrucción periodontal después del tratamiento

(Fujise et al., 2002). Las asociaciones bacterianas en el biofilm, no son aleatorias, al contrario, existen asociaciones bacterianas específicas entre diferentes especies. Tras examinar 13261 muestras de placa subgingival de 185 pacientes adultos, Socransky et al., demostraron la presencia de determinados grupos bacterianos dentro de la placa subgingival. Los autores determinaron la existencia de seis grupos de bacterias (Socransky et al., 1998):

- especie específica, *Actinomyces*.
- complejo amarillo, compuesto por miembros de género *Streptococcus*.
- complejo verde consistente en *Capnocytophaga* spp., *A. actinomycetemcomitans* serotipo a, *E. corrodens* y *Campylobacter concisus*.
- complejo violeta, compuesto por *Veillonella parvula* y *Actinomyces odontolyticus*.

Estos grupos de especies bacterianas serían colonizadores iniciales de la superficie dentaria y su crecimiento, generalmente, precede a la multiplicación de los grupos naranja y rojo, que están compuestos principalmente por bacterias Gram-negativas:

- grupo o complejo naranja, compuesto por *Campylobacter gracilis*, *C. rectus*, *Campylobacter showae*, *E. nodatum*, *F. nucleatum*, *Fusobacterium periodonticum*, *P. micra*, *P. intermedia*, *P. nigrescens* y *Streptococcus constellatus*.
- grupo rojo está compuesto por *T. forsythia*, *P. gingivalis* y *T. denticola*.

En estos últimos dos grupos, están las bacterias que tienen mayor capacidad periodonto-patógena.

Al analizar los resultados, los autores observaron que las bacterias del complejo rojo rara vez se encontraban aisladas y el 64% de las localizaciones no presentaba ninguna de ellas, mientras que cuando se detectaba alguna de ellas, generalmente también estaban presentes las otras dos: esta asociación de las tres especies se observó en el 10% de las localizaciones.

Los autores también descubrieron una relación entre diferentes complejos, y observaron que las especies del complejo rojo rara vez están presentes en ausencia de las bacterias del complejo naranja.

Al analizar la relación entre las bacterias presentes y los parámetros clínicos, observaron que las bacterias del complejo rojo mostraban una fuerte asociación con bolsas profundas: tanto *T. forsythia*, *P. gingivalis* como *T. denticola* aumentaban su prevalencia y cantidad al aumentar la profundidad de sondaje. Al analizar la relación entre los individuos y su flora bacteriana, observaron que aquellos pacientes que no presentaban bacterias de los complejos naranja y rojo, presentaban las profundidades de sondaje más bajas, mientras que los pacientes portadores de *P. gingivalis* aislada o junto a las otras dos especies del complejo rojo, presentaban las profundidades de sondaje medias más altas. Estos pacientes también mostraron una asociación mayor al sangrado al sondaje. La correlación de los resultados microbiológicos con los datos clínicos da una idea de la importancia de *P. gingivalis* en la etiología y progresión de la periodontitis.

Prevalencia de P. gingivalis

La prevalencia de *P. gingivalis* a nivel mundial, varía en función de las localizaciones geográficas. En Asia, se han encontrado prevalencias que

varían del 60% al 95% en Japón (Amano et al.,2000; Nozaki et al., 2001; Fujise et al., 2002; Tomita et al., 2013) o del 70% en China (Deng et al., 2011). En América, se han observado prevalencias de entre el 50% y el 87% en los Estados Unidos (McClellan et al.,1996; Tuite-McDonnell et al., 1997; Umeda et al.,1998; Rams et al., 2014) y del 78% en Brasil (Avila-Campos & Velasquez-Melendez 2002).

A nivel europeo, se han encontrado prevalencias del 50-65% en el Reino Unido (Darby et al., 2000; Doungudomdacha et al., 2001), del 36.7% en Holanda (Sanz et al., 2000) o del 75.8% en Rumanía (Ali et al., 1996).

Diferentes estudios han demostrado que la prevalencia de *P. gingivalis* en España, es elevada. Así, Sanz et al., (2000) al comparar la composición de la microbiota subgingival de dos poblaciones separadas, como Holanda y España, observaron que la prevalencia de las diferentes especies bacterianas analizadas variaba entre los dos países. La prevalencia de *P. gingivalis* en la población de pacientes periodontales españoles fue del 64.5%, frente al 36.7% de los pacientes periodontales holandeses (Sanz et al., 2000). En un estudio posterior en el que el objetivo era evaluar la correlación de los resultados de dos métodos de análisis microbiológico distintos en tres grupos de pacientes (sanos, con gingivitis y con periodontitis), se observó que la frecuencia de detección de *P. gingivalis* en los pacientes con periodontitis rondaba el 80% (84.4% si se empleaba cultivo y 81.3% si se empleaba la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), esta prevalencia disminuía notablemente en los pacientes con gingivitis (40% con cultivo y 30% con PCR) y en los pacientes sanos (20% con cultivo, 13.3% con PCR) (Lau et al., 2004).

Dos estudios recientes, han evaluado cual de los diferentes genotipos que puede presentar *P. gingivalis* es el más prevalente en España. Ambos estudios concluyeron que en los pacientes periodontales españoles, el gen *fimA* genotipo II es más prevalente que el genotipo I (Puig-Silla et al., 2012; Fabrizi et al., 2013), con una prevalencia encontrada en estos dos estudios del 39.5% y del 50.9% respectivamente.

La mayoría de estudios existentes se han realizado en países desarrollados; sin embargo, pocos estudios han evaluado la microbiota de pacientes de países en vía de desarrollo. Un estudio reciente, ha evaluado la flora bacteriana de pacientes marroquíes con periodontitis crónica severa y la ha comparado con pacientes con periodontitis agresiva severa. Los autores no encontraron diferencias estadísticamente significativas en la prevalencia de *P. gingivalis* entre ambos grupos de pacientes (53.3% y 37.5%, respectivamente) (Benrachadi et al., 2012). Existen pocos estudios representativos de la prevalencia de las enfermedades periodontales en Centroamérica y Sudamérica (Gjeramo et al., 2002), alguno de ellos, ha comparado la microflora de países de este entorno con la microflora de países europeos y norteamericanos. Así, Haffajee et al., (2004), compararon la composición de la microbiota subgingival en 4 países tan dispares geográfica y culturalmente como Estados Unidos, Chile, Brasil y Suecia y observaron que la microbiota subgingival de los 4 países era muy diferente. La prevalencia de *P. gingivalis* variaba entre las diferentes poblaciones, siendo de un 11.6% en los pacientes chilenos, 7.5% en los brasileños, 6.6% en los estadounidenses y de 1.9% en los suecos.

Prevalencia de *A. Actinomycetemcomitans*

La prevalencia *A. Actinomycetemcomitans* varía significativamente entre diferentes áreas geográficas y diferentes condiciones clínicas periodontales (Rylev & Kilian 2008).

La mayoría de estudios están de acuerdo en que la prevalencia de *A. Actinomycetemcomitans* en adolescentes con periodontitis agresiva es muy elevada (73-100%) (Slots & Ting 1999), aunque por otro lado, estudios realizados en pacientes con unas características similares en Chile presentaban una prevalencia del 39-44% (López et al., 1995;1996). Haubek et al., (2008) demostraron en un estudio longitudinal a dos años, que sólo el 17.4% de los pacientes adolescentes que eran portadores de *A. Actinomycetemcomitans* no tuvieron pérdida de inserción, frente al 79.4% de los que no eran portadores.

La prevalencia en pacientes adultos con periodontitis crónica en pacientes asiáticos fue elevada, encontrándose en un 83% de pacientes chinos y en un 88% de los pacientes tailandeses (Dahlén et al., 2002; Papapanou et al., 1997), también se ha observado una alta prevalencia de portadores (62%) en adultos jóvenes chinos que presentaban periodontitis crónica leve o moderada. La prevalencia en pacientes con periodontitis crónica en Europa es significativamente más baja (Slots & Ting 1999). Un estudio comparativo posterior entre España y Holanda encontró presencia de *A. Actinomycetemcomitans* en el 23% de pacientes holandeses mientras que sólo se detectó en el 3% de los pacientes españoles (Sanz et al., 2000). También parece tener importancia la etnia más que la localización geográfica, ya que la prevalencia de *A. Actinomycetemcomitans* en pacientes de origen hispano y asiático residentes en Estados Unidos, es significativamente mayor al compararlos con pacientes de raza caucásica (Umeda et al., 1998).

Prevalencia de *T. forsythia*

La prevalencia de *T. forsythia* en la cavidad oral no ha sido estudiada de forma tan específica como ha sido la presencia de de los dos bacterias analizadas anteriormente, si bien, podemos sacar resultados de diferentes estudios que han analizado la flora bacteriana de poblaciones con periodontitis y sanas en diferentes localizaciones geográficas. Al comparar la flora subgingival de pacientes españoles y holandeses, Sanz et al., (2000) observaron que la prevalencia de *T. forsythia* entre los pacientes de ambos países no difería significativamente, siendo de 64,5% en los pacientes españoles frente a 73,3% en los pacientes holandeses. En un estudio comparativo de la flora de pacientes con periodontitis crónica en países tan distantes como Estados Unidos, Suecia, Brasil y Chile (Haffajee et al., 2004), la prevalencia de *T. forsythia* no difería significativamente entre países, con una prevalencia que variaba entre el 6.2% y el 8.5%, en un estudio similar del mismo grupo, en el que evaluaban la flora de pacientes sanos de Suecia y Estados Unidos (Haffajee et al., 2005), la prevalencia de en pacientes suecos fue significativamente mayor al compararla con los pacientes estado unidenses (3.5% Vs 2.3%). Tomita et al., (2013) evaluaron la prevalencia de diferentes patógenos periodontales en pacientes japoneses sanos, con periodontitis crónica y con periodontitis agresiva. La prevalencia en pacientes con periodontitis crónica y agresiva fue similar (60%), mientras que no se detectó en los pacientes sanos. La prevalencia en pacientes marroquí fue similar en pacientes con periodontitis crónica severa (66.7%) y pacientes con periodontitis agresiva (50%), estos datos están en concordancia con los resultados encontrados en pacientes chilenos con periodontitis crónica (López et al., 2004) donde la prevalencia de *T. forsythia* fue del 55%.

5. Etiopatogenia de las enfermedades periodontales

Factores de virulencia bacterianos

Las enfermedades periodontales se inician y progresan como consecuencia de factores producidos por bacterias del biofilm subgingival; algunas de estas sustancias, pueden producir daño directo sobre los tejidos periodontales. Otros microorganismos pueden iniciar una respuesta inmune que puede producir daño sobre el periodonto.

Cada especie periodontopatógena, tiene factores de virulencia que favorecen la colonización y otros que sirven para causar daño al huésped. Entre los que sirven para colonizar, podemos subdividirlos en factores que favorezcan la adhesión, de multiplicación (nutricionales-reproductivos), de competición con otras bacterias y de evasión de las defensas del huésped. Los factores de virulencia de daño, se pueden dividir en directos, indirectos y para invasión.

Factores de virulencia de A. actinomycetemcomitans

Factores que facilitan la colonización:

- Adhesión.

A. actinomycetemcomitans es capaz de adherirse a células, a bacterias, a componentes de la matriz extracelular y a saliva. Para ello, utiliza fimbrias pili PilA, proteínas de la membrana externa (proteínas EmaA y Aae), el polímero extracelular poliglutámico (PGA) y vesículas (Fine et al., 2006). *A. actinomycetemcomitans* es capaz de coagregarse con *F. nucleatum* (Rosen et al., 2003) y con *P. gingivalis* (Suzuki et al., 2006).

- Multiplicación.

Este microorganismo utiliza diferentes mecanismos para adquirir nutrientes y poder diseminarse, como son la hemolisina (Kimizuka et al., 1996), las proteinasas (colagenasas) (Robertson et al., 1982), las proteínas reguladoras del hierro (Fine et al., 2006), las proteínas plasmáticas encargadas del hierro (Fine et al., 2006) y la proteína HgpA (Fine et al., 2006).

- Competición con otras bacterias.

Posee una bacteriocina (actinobacilina) que lisa o inhibe el crecimiento de otras bacterias (Hammond et al., 1987).

- Evasión de las defensas del huésped.

Este microorganismo posee diferentes factores capaces de atenuar la respuesta inmune del huésped, como son la leucotoxina (Fine et al., 2006), polisacáridos de superficie, una proteína citoplasmática de 14kDa (O'Brien-Simpson et al., 2004), una proteína de bajo peso molecular (van Dyke et al., 1982), proteinasas (Gregory et al., 1992) y la toxina de dilatación citoletal (Cdt) (Feng & Weinberg 2006).

La leucotoxina A ha demostrado capacidad para destruir leucocitos polimorfonucleares, monocitos y linfocitos, aunque de una forma lenta (Rabie et al., 1988; Mangan et al., 1991; Taichman et al., 1991), también es capaz de destruir leucocitos mediante el proceso de apoptosis (Kato et al., 1995). La apoptosis es un complejo proceso que puede ser inducido mediante los receptores de superficie celular de muerte y/o mediante un proceso mitocondrial: la leucotoxina A actúa mediante el proceso mitocondrial. Existe evidencia de que la leucotoxina A, produce activación

de la caspasa, una proteína selectiva que actúa en el proceso de apoptosis de los leucocitos (Korostoff et al., 1998).

Factores que destruyen los tejidos del huésped:

A. actinomycetemcomitans tiene la capacidad de lesionar el tejido periodontal mediante la liberación de sustancias que pueden destruir células, o la matriz extracelular (daño directo), o bien induciendo a otras células para que liberaren citoquinas (daño indirecto). Así, por ejemplo, la leucotoxina tiene capacidad de estimular la producción de interleuquina 8 (IL-8), inducir la producción de interleuquina (IL) 1 beta (IL-1 β) y la producción de IL-6 y factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), estimular la activación de la metaloproteinasa 8 (MMP-8) y la lisis celular. La leucotoxina A promueve la activación de la caspasa que induce la producción de IL-1 β (Kelk et al., 2003; Kelk et al., 2005). Existen marcadas diferencias en la expresión de leucotoxinas en función de los diferentes tipos de *A. actinomycetemcomitans*, se ha observado que determinadas cadenas (ej ATCC 33384) producen poca cantidad de leucotoxinas, mientras que otras (ej. Y4) producen una cantidad moderada y otras como la JP2 producen grandes cantidades (Kolodrubetz et al., 1996).

A. actinomycetemcomitans también tiene factores con capacidad para inducir una reacción inmune que produce reabsorción de tejido conectivo y hueso como el lipopolisacárido, el material en superficie de 2kDa, los polisacáridos de la cápsula, la proteína citoplásmática de 37 kDa y la toxina de dilatación citoletal. Las proteinasas, tienen capacidad de hidrolizar el fibrinógeno y el colágeno tipo I y de reducir la proliferación de células epiteliales y degradar fibronectina (Fives-Taylor et al., 1999; Feng & Weinberg 2006; O'Brien-Simpson et al., 2004)

Además, se puede causar daño a los tejidos del huésped por la invasión del tejido periodontal. *A. actinomycetemcomitans* tiene capacidad de penetrar en el epitelio e invadir el tejido conectivo en tan sólo 30 minutos (Feng & Weinberg 2006), siendo capaz de diseminarse en las células de alrededor. Esta capacidad de invasión, puede explicar la dificultad que existe para su eliminación mediante los tratamientos mecánicos convencionales, lo que puede justificar el uso de antimicrobianos para su eliminación (van Winkelhoff et al., 1992)

Factores de virulencia de T. forsythia

Factores que facilitan la colonización:

-Adhesión.

La capacidad de adhesión de *T. forsythia*, está relacionada con la capa S de la cápsula (Holt & Ebersole 2005) y con una proteína de superficie (proteína BspA) (O'Brien-Simpson et al., 2004).

-Multiplicación.

No se dispone de información sobre los mecanismos moleculares que posee para adquirir nutrientes, aunque se ha descubierto que se encuentra elevado en localizaciones positivas a compuestos de sulfuro (Holt & Ebersole 2005).

-Coagregación.

Es capaz de congregarse con *F. nucleatum* y con *T. denticola* (Holt & Ebersole 2005).

-Evasión de las defensas del huésped.

La lipoproteína BflP induce la apoptosis celular de leucocitos y linfocitos, y las proteinasas (α -D-glucosidasa y N-acetil- β -glucosaminodasa), le protegen frente a las proteínas del huésped (Holt & Ebersole 2005)

-Invasión de tejido periodontal.

La capa S de la cápsula, también está relacionada con la capacidad de invasión (Sabet et al., 2003).

Factores que destruyen tejidos del huésped:

La lipoproteína BflP (Holt & Ebersole 2005) y la proteína BspA (O'Brien-Simpson et al., 2004) inducen la producción de citoquinas proinflamatorias por parte del huésped. Además *T. forsythia* produce varias proteinasas relacionadas con la destrucción periodontal (Holt & Ebersole., 2005)

Factores de virulencia de P. gingivalis

Factores que facilitan la colonización:

-Adhesión.

P. gingivalis Es capaz de adherirse a diferentes tipos de células, con otras bacterias, con la matriz extracelular y con componentes salivares mediante la cápsula (Holt et al., 1999), hemaglutininas (Holt & Ebersole 2005), proteinasas (Holt et al., 1999), proteínas de la membrana externa (Abiko et al., 1997) y vesículas (Holt et al., 1999). Las fimbrias también juegan un papel importante (Feng & Weinberg 2006).

Existen seis variantes de genes que codifican la unidad proteica de las fimbrias (gen *fimA*) (tipo I al V y el Ib). Se ha observado que la progresión de la periodontitis está estrechamente ligada a las cepas que poseen el *fimA* tipo Ib, II y IV, las cepas tipo *fimA* tipo I y V se detectan mayoritariamente en pacientes adultos sanos (Feng & Weinberg 2006; Puig-Silla et al., 2012; Fabrizi et al., 2013).

-Multiplicación.

Proteinasas (Holt et al., 1999), proteínas de choque térmico (Lu & McBride 1994), proteínas de la membrana externa y hemolisinas (Holt & Ebersole 2005) proporcionan nutrientes para el crecimiento de la bacteria o la protegen cuando está expuesta a temperaturas elevadas o a factores ambientales.

-Coagregación.

Es capaz de coagregarse con *Actinomyces naeslundii* genotipo 2, *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus. oralis*, *Streptococcus mitis*, *F. nucleatum*, *P. intermedia*, *Treponema medium*, *T. denticola* y con *A. actinomycetemcomitans* serotipo c (Suzuki et al., 2006; Holt & Ebersole 2005).

-Evasión de las defensas del huésped.

La cápsula (O'Brien-Simpson et al., 2004), el lipopolisacárido (O'Brien-Simpson et al., 2004), y las proteinasas (Holt et al., 1999) de *P. gingivalis*, son capaces de paralizar la respuesta inicial del huésped.

Factores que destruyen los tejidos del huésped:

P. gingivalis posee diferentes factores capaces de destruir los tejidos del huésped tanto de forma directa como indirecta. En la Tabla 1 se pueden observar las diferentes acciones producidas por cada factor (cuadro adaptado de Iniesta et al., 2008).

P. gingivalis tiene capacidad para invadir las células epiteliales en aproximadamente 20 minutos (Feng & Weinberg 2006), se replica dentro de ellas y es capaz de diseminarse a las células de alrededor. Las cepas que expresan la *FimA* tipo II se adhieren e invaden células epiteliales más eficientemente que las cepas con otros tipos de *FimA*.

Tabla 1. Factores de virulencia de *Porphyromonas gingivalis* relacionados con la destrucción del tejido del huésped (cuadro adaptado de Iniesta et al., 2008).

Factor	Acción
Fimbrias	Estimula la producción de IL-1 α , IL-8, IL-12, factor de necrosis tumoral- α Y proteínas inflamatorias y quimiotácticas de los monocitos
Lipopolisacáridos	Modula la formación de colágeno y la proliferación de fibroblastos. Estimula la producción de IL-1, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10,IL-13 Induce la producción de factor de necrosis tumoral- α , PGE ₂ y la activación del complemento.
Proteínas de la membrana externa: De 24kDa (Omp24) De 75 kDa	Reabsorción ósea Estimula la secreción de IL-1 α ,
Vesículas	Hidrolizan caseína, colágeno, cromogénico-arginina y glicil-L-prolina
Proteinasas Gingipaínas	Degrada laminina y fibronectina Hidrólisis del colágeno tipo I, III,IV y V Degrada fibrinógeno Inactiva los inhibidores de las proteinasas (α antitripsina y α_2 macroglobulina) Activa las metaloproteinasas de la matriz Activa la cascada calicreína/quinina Lis-gingipaína degrada las uniones de las células epiteliales
Colagenasas, proteasas relacionadaí con la estreptopaina y peptidasa Pz	Degradan colágeno
Proteinasa tripsina de 80kDa	Estimula la producción de MMP-8 en los PMN y MMP-1 en los fibroblastos gingivales
Proteinasa tiol de 140kDa	Activa MMP-1 y MMP-3 en los fibroblastos gingivales
Proteinasa dipeptil aminopeptidasa IV	Activa MMP-1
Proteinasa de 35kDa	Induce la secreción de MMP-1 y factor activador del plasminógeno en fibroblastos gingivales
Proteinasa cisteina de 75kDa(periodontaina)	Inactiva el inhibidor de la proteinasa α_1 , produciéndose la liberación de altos niveles clínicos de elastasa.

Respuesta del huésped

Ante la agresión bacteriana, el organismo va a reaccionar produciendo una respuesta de defensa inflamatoria. Esta respuesta puede producir una resolución rápida de la agresión, si la respuesta es eficaz, o puede evolucionar hacia una lesión crónica que no se resuelve, en caso de que la respuesta sea ineficaz.

En 1976, Page y Schroeder (Page & Schroeder 1976) describieron la progresión de la lesión gingival/periodontal en cuatro fases: inicial, temprana, establecida y avanzada, Y posteriormente ha sido ligeramente modificada por Kinane et al., (2008).

Ante un agresión de bacterias, el huésped va a reaccionar con una respuesta inflamatoria mediada por leucocitos polimorfonucleares, a esta lesión se la denomina inicial. Si se mantiene la presencia bacteriana, se produce un aumento de los vasos sanguíneos dentogingivales, tanto en tamaño como en número, lo que se corresponde clínicamente con un aumento de la inflamación gingival. Esta situación fue definida por Page y Schroeder como lesión temprana y puede persistir durante largos periodos de tiempo; que evolucione hacia una lesión establecida, va a depender de la susceptibilidad del paciente.

Si la exposición a las bacterias del biofilm continúa, se produce un aumento de la respuesta inflamatoria, con aumento del fluido gingival y presencia de leucocitos en el epitelio de unión, con una lesión definida por la presencia de células plasmáticas. Continúa la pérdida de colágeno según avanza el infiltrado inflamatorio. Se produce una migración apical del epitelio de

unión que se transforma en epitelio de la bolsa, no adherida a la superficie radicular, lo que facilita la migración apical del biofilm bacteriano.

Según aumenta la profundidad de las bolsas, se produce la lesión avanzada. Además de la pérdida de tejido conectivo, se produce reabsorción ósea. La lesión se extiende lateral y apicalmente hacia el tejido conectivo y las células predominantes son las plasmáticas.

Durante el proceso inflamatorio, como respuesta al ataque bacteriano, el huésped libera mediadores como IL-1 α , IL-1 β y prostaglandina E2 (PGE₂). El objetivo de estos mediadores inflamatorios es iniciar y mantener la respuesta inmune e inflamatoria, regular el crecimiento y la diferenciación celular y comunicar a los leucocitos con otras células, en el caso de las citoquinas, y ser vasodilatadora e inducir la producción de citoquinas, por parte de otras células en el caso de la PGE₂. Estos mediadores inflamatorios junto a otros como IL-11 o IL-17, actúan como activadores de los osteoclastos, que van a producir la destrucción del hueso de soporte de los dientes (Crotti et al., 2003; Liu et al., 2003)

6. Tratamiento de las enfermedades periodontales

Tratamiento periodontal causal

El tratamiento periodontal irá encaminado a eliminar los depósitos de placa y cálculo supra y sub gingival causantes de la destrucción de los tejidos de soporte, lo que se conoce como terapia periodontal causal.

El tratamiento periodontal debe comenzar con una adecuada anamnesis para detectar todos los posibles factores de riesgo que puedan contribuir a la progresión, así como a la no correcta respuesta al tratamiento. En caso de ser necesario, se realizarán las consultas específicas que puedan ser necesarias con los médicos especialistas con los que el paciente pueda estar en tratamiento, uso de premedicación o cualquier otra consideración necesaria relativa a enfermedades sistémicas.

La fase del control de situaciones agudas, incluiría aquellas situaciones puntuales en las que el paciente presente dolor y/o infección y sea necesario tratarlas antes de comenzar la fase activa de tratamiento.

El tratamiento periodontal activo comienza con la eliminación mecánica de la placa y el cálculo subgingival, que se basa en la eliminación de los biofilms subgingivales, así como la eliminación de los factores que promueven la formación del biofilm y la consecuente destrucción periodontal. Un correcto control de placa bacteriana por parte del paciente es fundamental para alcanzar unos resultados óptimos en esta fase del tratamiento, así como para mantener los resultados obtenidos a largo plazo (Loe 1994; Axelsson et al., 2004). Por ello, es de vital importancia para el tratamiento, explicar, motivar e instruir a los pacientes para que consigan un adecuado control de placa personal.

A día de hoy, el raspado y alisado radicular, sigue siendo el tratamiento de referencia dentro del tratamiento periodontal no quirúrgico. El objetivo de este tratamiento es eliminar los biofilms subgingivales, toxinas y cálculo subgingival, así como re-establecer una superficie radicular biológicamente aceptable. Los signos clínicos que evidencian una mejoría tras el

tratamiento, incluyen: mejoría en el color, contorno y consistencia gingival, así como reducción del sangrado al sondaje, desaparición de la supuración, disminución de la profundidad de sondaje (PS) y ganancia del nivel clínico de inserción (NIC) (Dentino et al., 2013).

Diferentes revisiones sistemáticas han indicado que los instrumentos sónicos, ultrasónicos y piezoeléctricos, son al menos tan eficaces como el desbridamiento mecánico con curetas (Tunkel et al., 2002; Matulienė et al., 2010; Walmsley et al., 2008)

Tras una minuciosa reevaluación de los resultados obtenidos tras la fase básica, un elevado porcentaje de pacientes sólo necesitarán este tratamiento causal para controlar su periodontitis, siendo el tratamiento periodontal no quirúrgico el tratamiento final. En aquellos pacientes que tras la fase de raspado y alisado radicular y aún teniendo un adecuado control de placa, sigan presentando riesgo de progresión de la periodontitis, estará indicado seguir avanzando en el tratamiento causal mediante la realización de cirugíaa periodontal (Renvert & Persson 2002). En esta fase de tratamiento, se pueden emplear terapias regenerativas o resectivas, dependiendo de la arquitectura gingival y ósea (Dentino et al., 2013). Estudios recientes han demostrado que la presencia de bolsas residuales ≥ 5 mm después del tratamiento periodontal, es el factor de riesgo más importante de progresión de periodontitis en pacientes en fase de mantenimiento tras un periodo de 3 a 27 años (Matulienė et al., 2008; Matulienė et al., 2010), por lo que la fase quirúrgica periodontal estaría indicada en estos pacientes.

Una vez se ha conseguido controlar la periodontitis mediante tratamiento básico de raspado y alisado radicular y quirúrgico (en aquellos pacientes que lo necesiten), es fundamental, para obtener buenos resultados a largo plazo, que el paciente acuda regularmente a visitas de mantenimiento periodontal con el objetivo de prevenir una recidiva de la enfermedad (Dentino et al., 2013). Estas visitas de mantenimiento periodontal se establecerán a intervalos de 3-6 meses en función de los factores de riesgo que presente cada paciente de sufrir una recaída de la enfermedad (Axelsson & Lindhe 1981; Kers 1981; Lang & Tonetti 2003). En estas visitas se evaluará el control de placa personal, se evaluarán los niveles clínicos de salud periodontal (nivel de inserción clínica, sangrado, supuración, factores de retención de placa locales...) y se eliminará mediante instrumentos ultrasónicos y manuales la placa y el cálculo supra y subgingival. Una revisión sistemática confirma que los pacientes que acuden regularmente a mantenimiento periodontal, presentan menor pérdida de inserción y pierden menor número de dientes que los pacientes que no acuden o lo hacen de forma intermitente (Gaunt et al., 2008).

Eficacia y limitaciones microbiológicas del tratamiento periodontal causal

El protocolo de tratamiento descrito es efectivo en la mayoría de pacientes analizados en diferentes estudios longitudinales, independientemente de la modalidad de tratamiento elegida (Lindhe & Nyman 1975; Ramfjord et al., 1975; Rosling et al., 1976; Nyman et al., 1977; Knowles et al., 1979; Badersten et al., 1981; Hill et al., 1981; Lindhe et al., 1982; Pihlstrom et al., 1983; Westfelt et al., 1983; Westfelt et al., 1985; Isidor & Karring 1986; Badersten et al., 1987).

Sin embargo, también tiene algunas limitaciones, que hacen que el protocolo de tratamiento descrito no sea efectivo en algunos pacientes/localizaciones. Entre ellas está la falta de especificidad desde el punto de vista microbiológico: con el tratamiento descrito se consigue disminuir el número total de microorganismos presentes en las localizaciones subgingivales y producir un cambio en las proporciones relativas de diferentes especies bacterianas (Teles et al., 2006), así como producir un aumento de la proporción de especies Gram-positivas aerobias, lo que se asocia con salud (Cobb 2002; Haffajee et al., 2006). Sin embargo, como se comentó anteriormente, se ha demostrado que hay tres especies bacterianas que son periodontopatógenas con una asociación fuerte con la enfermedad (*A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* y *T. forsythia*) y cuya presencia en la flora subgingival se ha asociado a progresión de la enfermedad (Haffajee & Socransky 1994). El desbridamiento subgingival mediante raspado y alisado radicular, ha demostrado disminuir los recuentos medios y el número de localizaciones colonizadas por *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* (Van Winkelhoff et al., 1987; Renvert et al., 1990; Shiloah & Patters 1994) y *T. forsythia* (Darby et al., 2005); sin embargo, en la mayoría de pacientes, no consigue reducir los niveles bacterianos por debajo del nivel de detección a largo plazo (Renvert et al., 1990; Sbordone et al., 1990; Flemmig et al., 1998).

Por tanto, uno de los enfoques que se ha sugerido para evitar esta limitación, es el uso de terapias coadyuvantes con objetivos antimicrobianos, si fuera posible específicos, y entre ellas cabe destacar el uso de protocolos de desinfección a boca completa, los antimicrobianos locales, o los antimicrobianos sistémicos.

Protocolo de desinfección de boca completa

Tradicionalmente, el tratamiento no quirúrgico de la periodontitis se ha realizado en diferentes citas a intervalos de una o dos semanas, en las que se lleva a cabo el tratamiento de un cuadrante en cada sesión; de esta forma, cuando se realizaba el tratamiento del último cuadrante de la boca, han transcurrido 3-6 semanas desde que se comenzó el tratamiento en el primer cuadrante. En este protocolo tradicional, se hipotetiza que las bacterias de los cuadrantes no tratados podrían reinfestar las zonas ya tratadas (Quirynen et al., 2001; Zijngel et al., 2010). En 1995, el grupo de la Universidad de Lovaina (Quirynen et al., 1995), introdujo el protocolo de desinfección de boca completa, consistente en el desbridamiento mecánico de toda la boca en menos de 24 horas, acompañado de la irrigación subgingival de clorhexidina al 1%, cepillado de el dorso de la lengua con clorhexidina en gel al 1% y enjuagues con clorhexidina al 0.2%. El objetivo de este protocolo de tratamiento es disminuir la carga bacteriana en las bolsas periodontales, así como en el resto de nichos orales, para disminuir el riesgo de reinfestación de las zonas tratadas desde las áreas no tratadas.

El grupo de Quirynen, ha demostrado buenos resultados clínicos y microbiológicos empleando este protocolo de tratamiento, al compararlo con el protocolo tradicional en pacientes con periodontitis crónica (Quirynen et al., 1995; Bollen et al., 1996; Vandekerckhove et al., 1996; Bollen et al., 1998; Mongardini et al., 1999; Quirynen et al., 1999; Quirynen et al., 2000). A nivel microbiológico, encontraron una reducción significativa de las unidades formadoras de colonias por mililitro UFC/ml en el grupo test comparado con el grupo control a los dos meses, aunque esta diferencia se reducía a los cuatro meses (Bollen et al., 1998), mientras

que en otros estudios la diferencia se mantenía a los ocho meses (Quyrinen et al., 1999), el número de UFC/ml para determinadas bacterias periodontopatógenas como *P. gingivalis*, *F. nucleatum*, *P. intermedia* o *C. rectus* disminuyeron significativamente en el grupo test frente al control, no así para *A. actinomycetemcomitans* (Bollen et al., 1998, Quyrinen et al., 1999; Quyrinen et al., 2000). Otros grupos de investigación, no han encontrado diferencias significativas entre ambas modalidades de tratamiento (Apatzidou & Kinane 2004; Apatzidou & Kinane 2004; Apatzidou et al., 2004; Zijngel et al., 2010). En una revisión sistemática (Lang et al., 2008), se observaron diferencias significativas en cuanto a reducción de la PS y ganancia de inserción clínica en pacientes con periodontitis crónica con bolsas moderadas, al comparar los resultados de realizar el protocolo de desinfección de boca completa con o sin el uso coadyuvante de antisépticos (clorhexidina) o al compararlo con el grupo control en el que se realizaba el tratamiento en varias sesiones. Las diferencias clínicas eran modestas (0.2-0.4 mm), por lo que los autores recomiendan por igual el uso de los tres protocolos de tratamiento comparados. En esta revisión no se encontraron diferencias microbiológicas significativas entre los grupos estudiados. En una revisión narrativa posterior, en la que se incluyeron cuatro artículos publicados entre 2010 y 2012 (Sanz et al., 2012), los autores concluyeron que el protocolo de tratamiento no aportaba diferencias significativas respecto al protocolo convencional.

Uso de antimicrobianos locales en el tratamiento periodontal

El uso de antimicrobianos de aplicación local en el tratamiento periodontal se ha analizado en, al menos, tres revisiones sistemáticas (Hanes & Purvis 2003; Bonito et al., 2005; Matesanz-Perez et al., 2013). Estas revisiones incluyen estudios de cohortes y estudios clínicos aleatorizados, de al menos 3 meses de duración, con un diseño a boca partida o diseño en paralelo. Los productos analizados en estas revisiones incluyen las fibras de tetraciclinas, las microesferas de minociclina, la azitromicina subgingival, la doxiciclina en gel y la clorhexidina aplicada mediante tres vehículos diferentes: en chips, con gel de xantano y en barniz.

Los resultados obtenidos en las tres revisiones sistemáticas, al analizar todos los productos evaluados en su conjunto, demostraron un beneficio adicional al utilizar antimicrobianos locales coadyuvantes al desbridamiento subgingival frente al grupo control tanto en reducción de la PS (0.6 mm Hannes & Purvis 2003; Bonito et al., 2005) (0.407 mm Matesanz-Pérez et al., 2013), como en ganancia de inserción clínica (0.3 mm Hannes & Purvis 2003; Bonito et al., 2005), (0.310 mm Matesanz-Pérez et al., 2013),

Como se apreció una gran heterogeneidad, fue necesario analizar los resultados teniendo en cuenta los diferentes productos empleados, el tipo de estudio y el periodo de seguimiento, para reducir la heterogeneidad de algunas variables. En esos análisis se demostró que la eficacia de todos los productos analizados no fue la misma, encontrándose los mejores resultados para el uso de fibras de tetraciclina (reducción de PS de 0.727 mm), seguido por doxiciclina (0.573 mm) y minociclina (0.472 mm). El

empleo de metronidazol y de chips de clorhexidina, aportó resultados mínimos, con reducciones de profundidad de sondaje inferiores a 0.4 mm.

Los mejores resultados en cuanto a ganancia de nivel de inserción clínico fueron para la clorhexidina con gel de xantano, que obtuvo 0.9 mm, aunque estos resultados se basan sólo en un estudio (Matesanz et al., 2013). Por otro lado, el uso de metronidazol y otros productos con clorhexidina, no aportaron ningún beneficio sobre el tratamiento mecánico solo.

A la vista de estos resultados, resulta evidente, que el efecto de estos productos no depende sólo de el compuesto, sino de la farmacodinámica o del vehículo de administración empleado. Este efecto se ve claramente al analizar los resultados de tres formulaciones diferentes de clorhexidina: los mejores resultados se obtuvieron al emplear clorhexidina más gel de xantano, seguido por los chips de clorhexidina y de clorhexidina en barniz.

Una ventaja en la que coinciden las tres revisiones sistemáticas es que la incidencia de efectos adversos al emplear antimicrobianos locales es mínima, reportando sólo mínimas complicaciones gingivales, similares al grupo control, no podemos sacar conclusiones de los efectos microbiológicos, ya que no los analizan.

De acuerdo a la evidencia científica disponible, el empleo rutinario de antimicrobianos locales en la clínica se debe poner en duda, ya que a pesar del beneficio clínico adicional, el tiempo que requiere utilizarlos y el coste deben de tenerse en cuenta, y la indicación clínica más aceptada son aquellos pacientes con periodontitis crónica con bolsas localizadas que no han respondido al tratamiento (AAP 2006).

Uso de antimicrobianos sistémicos en el tratamiento periodontal

Durante muchos años se han empleado antibióticos sistémicos como parte del tratamiento periodontal. Los beneficios del uso de antibióticos en periodontitis han sido estudiados en revisiones sistemáticas presentadas en diferentes *Workshops* (Herrera et al., 2002; Haffajee et al., 2003; Herrera et al., 2008). Herrera et al., (2002) concluyeron que, en determinadas situaciones clínicas, como en pacientes con bolsas profundas, pacientes con enfermedad activa o con perfiles microbiológicos específicos, el uso de antibióticos coadyuvantes al raspado y alisado radicular, podría ser relevante desde el punto de vista clínico. Haffajee et al., (2003) concluyeron, que aunque existe suficiente evidencia para sugerir que el uso de antibióticos puede ayudar en el tratamiento de las periodontitis, no se ha definido un protocolo adecuado de uso.

En una revisión posterior, cuya intención era valorar cuales eran las condiciones más eficaces para administrar antibióticos sistémicos, Herrera et al., (2008), concluyeron que si el uso de antibióticos está indicado, estos deben administrarse coadyuvantes al tratamiento mecánico, no existiendo suficiente evidencia del beneficio de ser administrados tras cirugía periodontal. Además, la evidencia indirecta indica que el inicio de la toma del antibiótico debe comenzar el día en que se complete el desbridamiento, que este se debe completar en un periodo corto de tiempo (menos de una semana) y el desbridamiento debe ser de una calidad adecuada para optimizar los resultados. Un estudio posterior (Beliveau et al., 2012), en el que se comparó la administración de antibiótico en pacientes con periodontitis agresiva, inmediatamente tras la realización de el tratamiento mecánico, frente a administrarlo a los tres meses de realizar el tratamiento periodontal, ambos grupos obtuvieron mejoras clínicas, pero los pacientes a

los que se les administró el antibiótico inmediatamente tras el tratamiento, obtuvieron una reducción de la profundidad de sondaje, una ganancia clínica de inserción y disminución del sangrado al sondaje significativamente mejores que el grupo en el que el antibiótico se administró posteriormente.

Esta revisión también analizó qué antimicrobianos habían demostrado eficacia como coadyuvantes en el tratamiento de la periodontitis y si la calidad del desbridamiento y la secuencia en la que se administraba el antimicrobiano era importante. Por el contrario, no se tuvieron en cuenta los resultados microbiológicos del tratamiento, tan sólo los resultados clínicos, ya que la mayoría de estudios no presentaban datos microbiológicos, y la respuesta al tratamiento se evaluó clínicamente, independientemente del perfil microbiológico de los pacientes.

Respecto a la eficacia del metronidazol como coadyuvante al raspado y alisado radicular, de los catorce estudios analizados, ocho de los estudios demostraron resultados favorables, frente a seis que no encontraron diferencias significativas. De los resultados de estos estudios, se puede deducir que es más importante la dosis de medicamento empleado que los factores asociados a la secuencia de desbridamiento. Metronidazol requiere una estricta posología (para el tratamiento de la periodontitis), no existiendo unanimidad en los artículos analizados en la dosis a emplear, estas dosis varían de 200 a 500 mg de dos a cuatro veces al día durante 5-14 días (Herrera et al., 2002). Esta posología puede ser complicada de cumplir de forma adecuada por algunos pacientes, lo que puede conllevar a una falta de cumplimiento y a peores resultados (Loesche et al., 1993). Además, metronidazol produce algunos efectos adversos, incluida la

interferencia con bebidas alcohólicas, lo que puede disminuir aún más su eficacia (Sharma et al., 2009)

En la revisión realizada por Herrera et al., (2008), se encontraron cuatro estudios en los que se evaluó azitromicina. De estos cuatro estudios, dos encontraron resultados significativamente superiores en cuanto la profundidad de sondaje, el sangrado al sondaje o el nivel de inserción clínica, mientras que otros dos estudios no encontraron diferencias significativas. Los estudios donde se encontraron mayores diferencias fueron aquellos en los que el tratamiento de desbridamiento se realizó en un menor espacio de tiempo entre citas. Estudios posteriores a esta revisión han encontrado diferencias significativas favorables al uso de azitromicina (Haas et al., 2008; Pradeep et al., 2008; Yashima et al., 2009), mientras que otros estudios no han encontrado diferencias (Sampaio et al., 2011; Emingil et al., 2012; Han et al., 2012). Una de las ventajas de azitromicina frente a otros antibióticos, es que la posología es muy sencilla, ya que sólo requiere una toma al día durante 3 días.

Hay que tener en cuenta la especificidad microbiológica en la respuesta al tratamiento. Así, el uso de determinados antibióticos sistémicos parece tener efecto sobre determinadas bacterias pero no sobre otras. Flemmig et al., (1998) observaron que tras administrar amoxicilina y metronidazol, se produce una supresión por debajo de niveles detectables de *A. actinomycetemcomitans* que se mantenía a lo largo de los 12 meses del estudio en los pacientes del grupo test. Sin embargo, aquellos pacientes que tenían *P. gingivalis* raramente conseguían eliminarlo por debajo de niveles de detección a largo plazo. Clínicamente, los pacientes con *P. gingivalis* que no eran positivos para *A. actinomycetemcomitans* tuvieron mayor

incidencia de pérdida de inserción, al compararlo con el grupo control. Los resultados de este estudio indican que los pacientes con ciertos perfiles microbiológicos no se benefician del uso de determinados antibióticos, por lo que, en caso de administrárselo, obtendrán los efectos nocivos de los antibióticos anteriormente señalados pero ningún beneficio.

A pesar de estos datos favorables al uso de antibiótico, hay que tener en cuenta que el uso de antibióticos no está exento de polémica. Los antibióticos son drogas que pueden producir efectos adversos a nivel sistémico, como reacciones anafilácticas, y su uso irracional aumenta las resistencias bacterianas a estos medicamentos.

Las resistencias a antimicrobianos pueden clasificarse en tres tipos: intrínsecas, mutacionales y adquiridas. Las resistencias dependen del tipo de droga:

- Las resistencias bacterianas a la penicilina pueden ocurrir por una disminución en la permeabilidad de la bacteria al antibiótico, por alteración de la unión de la penicilina o por la producción de β -lactamasas.
- Las resistencias a las tetraciclinas y a los macrólidos, se producen por una limitación del acceso a la célula, mediante una alteración del ribosoma para evitar una unión adecuada del antibiótico o mediante la producción de enzimas inactivadoras de las tetraciclinas/macrólidos.
- Las resistencias a metronidazol son menos frecuentes, ya que requiere una activación metabólica por bacterias anaerobias estrictas (Soares et al., 2012).

Herrera et al., (2000) compararon la prevalencia de bacterias productoras de β -lactamasas en dos países con políticas antibióticas muy distintas,

España y Holanda. El 54% de los pacientes del grupo español había consumido antibióticos en los últimos 12 meses frente al 10% de el grupo holandés. Los resultados revelaron una mayor prevalencia y una microflora más compleja productora de β -lactamasas en la población española al compararla con la holandesa. Este mismo grupo también evaluó la influencia que tiene este consumo de antibióticos tan dispar sobre las resistencias que crean la bacterias a los antibióticos en los dos países y observaron que en los pacientes españoles, hubo una mayor prevalencia de resistencias con una diferencia estadísticamente significativa a penicilina, amoxicilina, metronidazol, clindamicina y tetraciclina al compararlo con los pacientes holandeses (van Winkelhoff et al., 2000).

IV. JUSTIFICACIÓN

Las enfermedades periodontales tienen una alta prevalencia en España y producen consecuencias tanto a nivel local (funcionales y estéticas) como a nivel sistémico (resultados adversos del embarazo, problemas cardiovasculares, pulmonares, alteración del control glucémico en pacientes diabéticos).

La etiología de las enfermedades periodontales es bacteriana, existiendo tres bacterias que han demostrado una evidencia fuerte de ser periodontopatógenas: *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* y *T. forsythia*. El tratamiento periodontal va encaminado a eliminar/reducir estas bacterias periodontopatógenas, mediante el desbridamiento subgingival, ya sea quirúrgico o no quirúrgico. Sin embargo, debido a las limitaciones microbiológicas del tratamiento periodontal estándar, en ciertos pacientes (como aquellos con perfiles microbiológicos determinados), el uso de tratamientos coadyuvantes, como los antimicrobianos, puede estar justificado (Herrera et al., 2002; Haffajee et al., 2003).

P. gingivalis ha demostrado una alta prevalencia en los pacientes periodontales en España (Sanz et al., 2000; Herrera et al., 2008; Lau et al., 2004) y, por tanto, es razonable analizar los aspectos relacionados con su prevalencia, susceptibilidades a antibióticos y respuesta al tratamiento.

Respecto a la prevalencia, la mayoría de estudios existentes sobre los perfiles microbiológicos de los pacientes periodontales se han realizado en Estados Unidos, Europa y Japón, existiendo pocos datos sobre la composición de la flora periodontal de los países en vías de desarrollo (Ali

et al., 1996; Gjermo et al., 2002; Benrachadi et al., 2012). Pocos estudios han comparado los diferentes perfiles microbiológicos entre diferentes países (Ali et al., 1996; Sanz et al., 2000; Haffajee et al., 2004; Lopez et al., 2004) y pocos de ellos han empleado la misma tecnología y métodos calibrados para comparar la composición microbiológica entre diferentes poblaciones. Parece razonable realizar un estudio sobre la prevalencia de periodontopatógenos, comparando diferentes poblaciones, con especial énfasis en la detección de *P. gingivalis*.

Respecto a las susceptibilidades a antibióticos, diferentes estudios han demostrado que el consumo de antibióticos (Baquero 1996; Cars et al., 2001), así como el no cumplimiento en la pauta adecuada de tratamiento (Pradier et al., 1997), en los países mediterráneos, comparados con los países del centro y norte de Europa, son mucho mayores, lo que ha conducido a un aumento de las resistencias bacterianas a los antibióticos en los países del sur de Europa en comparación con los del norte (Machka et al., 1988; Bronzwaer et al., 2004; Zinn et al., 2004). Este fenómeno también es extrapolable a otras zonas del mundo, en las que se ha visto que las resistencias bacterianas a antibióticos son muy distintas entre países (Ardila et al., 2010; Rams et al., 2013). Un estudio previo (van Winkelhoff et al., 2000) ya demostró que existe unos mayores niveles de resistencia bacteriana, estadísticamente significativa, a diferentes antibióticos en las bacterias de los pacientes españoles en comparación con los pacientes holandeses, pero en forma de bacterias agrupadas. Parece razonable completar la información aportada por ese estudio analizando diferentes especies bacterianas de manera aislada, con especial énfasis en *P. gingivalis*.

Respecto a la respuesta al tratamiento, diferentes estudios han demostrado que la eliminación de *P. gingivalis* mediante tratamiento mecánico no es predecible (Renvert et al., 1990; Winkel et al., 1997). De acuerdo a diferentes revisiones sistemáticas, los pacientes portadores de *P. gingivalis*, podrían beneficiarse del uso coadyuvante de antibióticos (Herrera et al., 2002; Haffajee et al., 2003).

De entre los antibióticos disponibles, metronidazol ha demostrado buenos resultados debido a su espectro antimicrobiano, pero requiere una estricta posología que necesita (para el tratamiento de la periodontitis) entre 200 y 500 mg de dos a cuatro veces al día, durante 5-14 días (Herrera et al., 2002), lo que puede conllevar falta de cumplimiento por parte de algunos pacientes (Loesche et al., 1993). Por otro lado, azitromicina ha demostrado eficacia *in vivo* e *in vitro* frente a microorganismos aeróbicos y anaeróbicos gram-negativos (Retsema et al., 1987; Williams et al., 1992; Muller et al., 2002). Además, diferentes estudios *in Vitro* (Pajukanta et al., 1993) e *in vivo* (Herrera et al., 2000), han demostrado la eficacia de azitromicina frente a *P. gingivalis*. Azitromicina, tiene una posología muy sencilla de cumplir, ya que requiere una toma al día de 500 mg durante 3 días, lo que en caso de demostrar eficacia en el tratamiento de la periodontitis asociada a *P. gingivalis*, puede suponer una ventaja importante respecto al cumplimiento, frente a antibióticos como metronidazol.

V. HIPÓTESIS

De acuerdo a lo expuesto anteriormente, la hipótesis general de trabajo fue que la prevalencia y las susceptibilidades frente a antimicrobianos de *P. gingivalis* en una población con periodontitis en España sería diferente, y superior, a los de otras poblaciones; esto podría comprometer la respuesta al tratamiento periodontal convencional en esa población, que se podría mejorar con el uso coadyuvante de antimicrobianos sistémicos.

Como hipótesis específicas, se plantearon:

P. gingivalis y diferentes especies bacterianas periodonto-patógenas, aisladas en pacientes en España, mostrarán mayores niveles de resistencia a antimicrobianos respecto a otras poblaciones (van Winkelhoff et al., 2005).

P. gingivalis y diferentes especies bacterianas periodonto-patógenas, aisladas en pacientes en España, diferirán de los perfiles microbiológicos de otros países (Herrera et al., 2008).

Los pacientes portadores de *P. gingivalis* se beneficiarán más, en términos de reducción de la profundidad de sondaje y ganancia de nivel de inserción clínica, con el uso coadyuvante de azitromicina, asociada a la eliminación/reducción de *P. gingivalis* (Oteo et al., 2010).

VI. OBJETIVOS

El objetivo general de este trabajo fue evaluar la importancia de *P. gingivalis* en pacientes con periodontitis crónica en España, estableciendo su prevalencia, susceptibilidades a antimicrobianos y respuesta al tratamiento periodontal no quirúrgico.

Los objetivos específicos fueron los siguientes:

- Comparar los diferentes patrones de resistencia bacteriana entre pacientes con periodontitis crónica en España y Holanda, mediante la comparación de los perfiles de susceptibilidades de *P. gingivalis* y otros periodonto-patógenos, usando la técnica de epsilometría (*E-test*) (van Winkelhoff et al., 2005).
- Evaluar la microbiota subgingival, con especial énfasis en *P. gingivalis*, de pacientes con periodontitis de Chile, Colombia y España, utilizando métodos de detección bacteriana idénticos (Herrera et al., 2008).
- Comparar los efectos clínicos y microbiológicos del uso de azitromicina o placebo, coadyuvante al tratamiento periodontal no quirúrgico, en el tratamiento de la periodontitis crónica asociada a *P. gingivalis* (Oteo et al., 2010).

VII. MATERIAL Y MÉTODOS. RESULTADOS

La descripción detallada del material y métodos, así como los resultados de investigación han sido publicados como artículos científicos en tres publicaciones independientes con las siguientes referencias:

Estudio 1: van Winkelhoff AJ, Herrera D, Oteo A, Sanz M (2005) Antimicrobial profiles of periodontal pathogens isolated from periodontitis patients in the Netherlands and Spain. *J Clin Periodontol* 2005;32:893-898.

Estudio 2: Herrera D, Contreras A, Gamonal J, Oteo A, Jaramillo A, Silva N, Sanz M, Botero JE, León R. (2008) Subgingival microbial profiles in chronic periodontitis patients from Chile, Colombia and Spain. *J Clin Periodontol*; 35:106-113.

Estudio 3: Oteo A, Herrera D, Figuero E, O'Connor A, González I, Sanz M (2010) Azithromycin as an adjunct to scaling and root planing in the treatment of *Porphyromonas gingivalis* associated periodontitis: a pilot study. *J Clin Periodontol*;37:1005-1015.

Artículo 1

Artículo 1:

van Winkelhoff AJ, Herrera D, Oteo A, Sanz M (2005) Antimicrobial profiles of periodontal pathogens isolated from periodontitis patients in the Netherlands and Spain. *J Clin Periodontol* 2005;32:893-898.

Antecedentes y objetivos: Las resistencias bacterianas de las bacterias periodontales hacia los antibióticos más habitualmente empleados en periodoncia, ha sido investigada en un estudio previo. En dicho estudio, se observaron resistencias microbianas en la flora periodontal más frecuentemente en los pacientes españoles en comparación con los pacientes holandeses. El objetivo del presente estudio fue comparar la susceptibilidad antimicrobiana de cinco bacterias periodontopatógenas aisladas de pacientes periodontales en España y Holanda.

Material y métodos: Se recogió y cultivó placa subgingival de pacientes adultos con periodontitis en placas de agar no selectivas. Se aislaron *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum* y *Pavimonas micra* y se emplearon para encontrar la concentración mínima inhibitoria empleando la técnica del Epsilómetro (E-test). Se analizaron ocho antibióticos diferentes para todas las bacterias aisladas.

Se evaluó la CMI50 y la CMI90 para cada antibiótico y cada especie y se calculó el porcentaje de cepas resistentes.

Resultados: Se encontraron CMI significativamente mayores para las cepas de pacientes españoles de *F. nucleatum* para penicilina, ciprofloxacino, de *P. intermedia* para penicilina, amoxicilina y tetraciclina, de *P. micra* para tetraciclina, amoxicilina y azitromicina y de *P. gingivalis* para tetraciclina y ciprofloxacino. Basándonos en el punto de rotura de concentración, se

encontró un mayor número de cepas de *F. nucleatum* resistentes en España para la penicilina, amoxicilina y metronidazol, para *Prevotella intermedia* para amoxicilina y azitromicina y para *A. Actinomycescomitans* para amoxicilina y azitromicina. No se observaron mayor resistencias de las cepas de *P. gingivalis* para ningún antibiótico analizado tanto para Holanda como para España.

Conclusiones: Existen diferentes susceptibilidades en las bacterias aisladas de pacientes holandeses y españoles. Esto, implica que es necesario realizar un análisis de susceptibilidad para determinar la eficacia de un agente antimicrobiano. Además, los estudios que analizan la eficacia de antibióticos deberían tener este hecho en cuenta. La información de este estudio indica que puede no ser posible desarrollar protocolos uniformes en el uso de antibióticos para el tratamiento de periodontitis severas en la Unión Europea.

Antimicrobial profiles of periodontal pathogens isolated from periodontitis patients in the Netherlands and Spain

A. J. van Winkelhoff¹, D. Herrera²,
A. Oteo² and M. Sanz²

¹Department of Oral Microbiology, Academic Centre for Dentistry Amsterdam, Amsterdam, The Netherlands; ²Section of Periodontology and Laboratory of Microbiology, Faculty of Dentistry, University Complutense, Madrid, Spain

van Winkelhoff AJ, Herrera D, Oteo A, Sanz M. Antimicrobial profiles of periodontal pathogens isolated from periodontitis patients in the Netherlands and Spain. *J Clin Periodontol* 2005; 32: 893–898. doi: 10.1111/j.1600-051X.2005.00782.x. © Blackwell Munksgaard, 2005.

Abstract

Background and Aim: Antimicrobial resistance of periodontal pathogens towards currently used antibiotics in periodontics has been investigated in a previous study. Microbial resistance in the periodontal microflora was more frequently observed in Spanish patients in comparison with Dutch patients. The aim of the present study was to compare antimicrobial susceptibility profiles of five periodontal bacteria isolated from periodontitis patients in Spain and in the Netherlands.

Material and Methods: Subgingival plaque samples from adult patients with periodontitis were collected and cultured on selective and non-selective plates. *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum* and *Micromonas micros* were isolated and used for minimal inhibitory concentration tests using the Epsilon meter (E-test) technique. Eight different antibiotics were tested on all bacterial isolates. MIC50 and MIC90 values for each antibiotic and each species were determined and the percentage of resistant strains was calculated.

Results: Significantly higher MIC values were noted in Spanish strains of *F. nucleatum* for penicillin, ciprofloxacin, of *P. intermedia* for penicillin, amoxicillin and tetracycline, of *M. micros* for tetracycline, amoxicillin and azithromycin, and of *P. gingivalis* for tetracycline and ciprofloxacin. Based on breakpoint concentrations, a higher number of resistant strains in Spain were found in *F. nucleatum* for penicillin, amoxicillin and metronidazole, in *Prevotella intermedia* for tetracycline and amoxicillin, and in *A. actinomycetemcomitans* for amoxicillin and azithromycin. Resistance of *P. gingivalis* strains was not observed for any of the antibiotics tested both in Spain and the Netherlands.

Conclusions: Differences exist in the susceptibility profiles of periodontal pathogens isolated from periodontitis patients in Spain and in the Netherlands. This implicates that antibiotic susceptibility testing is necessary to determine efficacy of antimicrobial agents. Also, clinical studies with antibiotics should take these differences into account. The information from the present study indicates that it may not be possible to develop uniform protocols for usage of antibiotics in the treatment of severe periodontitis in the European Union.

Key words: antibiotic susceptibility; Epsilon meter test; periodontal pathogens; Spain; the Netherlands

Accepted for publication 22 March 2005

The amount of antibiotics used in the European Union shows great variation between countries. Cars et al. (2001) analysed data on non-hospital sales of

antibiotics for 1997 from 15 European countries. They found that the number of defined daily doses (DDD) per 1000 inhabitants per day varied more than

fourfold. France (DDD = 36.5), Spain (DDD = 32.4), Portugal (DDD = 28.8) and Belgium (DDD = 26.7) were countries with the highest sales, whereas,

893

Denmark (DDD = 11.3), Sweden (DDD = 13.5), Germany (DDD = 13.6) and the Netherlands (DDD = 8.9) showed the lowest sales. The higher usage of antimicrobial drugs in Mediterranean countries when compared with central and northern countries has been reported earlier (Baquero 1996). Also, the non-compliance rates have shown to be higher in Spain (42%), Italy (34%) and France (16%) in comparison with the UK (9%) (Pradier et al. 1997). As a consequence of this abusive usage and poor compliance, antimicrobial resistance in southern European countries is higher when compared with northern countries (Machka et al. 1988, Voss et al. 1994, Bronzwaer et al. 2004, Zinn et al. 2004). For instance, the prevalence of penicillin-resistant pneumococci was reported to be higher in Spain and in France in comparison with UK, Germany and Italy (Baquero 1996). The proportion of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in various European countries shows great variation and ranges from 0.1% in Denmark and 1.5% in the Netherlands, to 30% in Spain, 34% in France, 34% in Italy and up to 53% in Greece (Voss et al. 1994, Veldhuijzen et al. 2000, Jones et al. 2003). Higher proportions of MRSA strains towards antibiotics other than methicillin were also observed in Spain in comparison with the Netherlands and amounted, respectively, to 84.7% versus 55.5% for ciprofloxacin, 96.8% versus 44.4% for clindamycin, and 96.8% versus 55.5% for erythromycin (Voss et al. 1994).

β -lactamase production is a mechanism responsible for bacterial resistance towards β -lactam antibiotics. The prevalence of β -lactamase-producing *Haemophilus influenzae* serotype b in Spain was reported to be 63.6%, which was significantly higher than in the Netherlands (12%) (Machka et al. 1988). Multi-drug resistance and resistance towards all β -lactam antibiotics was reported for clinical pneumococci isolates in Spain more than 15 years ago (Appelbaum et al. 1992).

Data on antimicrobial resistance of different periodontal bacteria in different European countries are scarce. Using whole plaque samples from periodontitis patients from the Netherlands and from Spain, our groups investigated the bacterial susceptibility towards different antibiotics (van Winkelhoff et al. 2000). Blood agar plates containing breakpoint concentrations of penicillin,

amoxicillin, amoxicillin and clavulanate, metronidazole, erythromycin, azithromycin, clindamycin and tetracycline were used to determine the proportion of subgingival plaque bacteria that were resistant to these antibiotics. Statistically significant higher bacterial resistance of these periodontal bacteria was reported for penicillin, amoxicillin, metronidazole, clindamycin and tetracycline in samples from Spanish patients when compared with samples from Dutch patients. The mean number of different bacterial species growing on the selective plates and the percentage of resistant strains were also higher in the Spanish group. When the frequency of occurrence of tetracycline-resistant periodontal pathogens was studied, five patients from the Spanish group harboured more than three tetracycline-resistant periodontal pathogens, whereas this was not observed in any of the Dutch patients. Also, the subgingival microflora from periodontitis patients harboured more β -lactamase-producing bacteria in Spain when compared with Dutch patients (Herrera et al. 2000).

The purpose of this study was to further investigate differential patterns of antimicrobial resistance between Spain and the Netherlands by comparing the antimicrobial susceptibility profiles of five periodontal bacteria isolated from periodontitis patients using the Epsilon-meter (E-test) technique.

Materials and Methods

Patients

Fifty-four patients from the periodontal graduate clinic at the University Complutense, Madrid, and 26 from the Periodontal Clinic at ACTA, Amsterdam, were selected for this study. This patient population fulfilled the following selection criteria: (1) age > 25 years; (2) destructive periodontal disease with pocket probing depth of ≥ 5 mm at ≥ 3 teeth in each quadrant of the dentition; (3) radiographic evidence of alveolar bone loss in each quadrant of the dentition; (4) no use of systemic or topical antimicrobial therapy. Once selected, each patient provided a pooled subgingival plaque sample.

Microbiological sampling

In each quadrant of the dentition, the deepest pocket, showing bleeding on probing and with the maximum of

attachment loss was selected for microbiological sampling. After careful removal of supragingival plaque deposits, isolation of the sampling sites with cotton rolls and after gentle air-drying, two consecutive sterile paper points were inserted to the depth of the pockets and left in place for at least 10 s. Paper points from all four selected periodontal sites were pooled in 2.0 ml of reduced transport fluid (RTF) (Syed & Loesche 1972). Samples were processed within 2 h after sampling.

Microbiological procedures

After vortexing for 30 s, samples were 10-fold serially diluted in RTF and 100 μ l of appropriate dilutions were plated on non-selective 5% horse blood agar plates (Oxoid no. 2, Oxoid Ltd., Basingstoke, UK) supplemented with haemin (5 mg/l) and menadione (1 mg/l). Samples were also plated onto trypticase soy serum-bacitracin-vancomycin plates (TSBV, Slots 1982) or on Dentaid-1 plates (Alsina et al. 2001) for selective isolation of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. Blood agar plates were incubated for up to 14 days at 37°C in 80% N₂, 10% CO₂ and 10% H₂. TSBV and Dentaid-1 plates were incubated in air plus 5% CO₂ at 37°C for 5 days.

The periodontal pathogens *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum* and *Micromonas micros* were identified using standard anaerobic techniques (van Winkelhoff et al. 1985, Winkel et al. 1997). *A. actinomycetemcomitans* was identified on the basis of its characteristic colony morphology (star-like inner structure), on the basis of a positive catalase reaction with 3% hydrogen peroxide and on a set of specific enzymes (APIZYM, BioMerieux, Boxtel, the Netherlands). Pure isolates were kept on plates, or were preserved at -70°C, until used for MIC determinations.

Susceptibility testing

The minimal inhibitory concentrations for penicillin, amoxicillin, amoxicillin plus clavulanate, tetracycline, clindamycin, ciprofloxacin, metronidazole and azithromycin were determined using the E-test (AB Biodisk, Solna, Sweden) (Citron et al. 1991, Nachnani et al. 1992). Bacterial strains were grown on blood agar plates (Oxoid no. 2, Basingstoke, UK) supplemented with 5% sheep

blood, haemin (5 mg/l) and menadione (1 mg/l) for 5 days. Then, test organisms were suspended in sterile phosphate-buffered saline equivalent to a 0.5 McFarland standard and streaked confluent over the surface of 150 mm diameter supplemented blood agar plates. In order to avoid drug interactions, only two strips were placed per plate. Plates were incubated in 80% N₂, 10% CO₂ and 10% H₂ for 3 days. Inhibition zones were measured according to the recommendations of the manufacturer. All strains were tested in duplicate in two separate experiments. *Bacteroides fragilis* (ATCC 25285) was used as a reference strain for susceptibility testing.

Data analyses

The concentrations to which 50% and 90% of the strains were susceptible were defined as MIC₅₀ and MIC₉₀, respectively. Results from each strain and each antibiotic were expressed in µg/ml, and were grouped by country. Quantitative results were compared using the Wilcoxon test.

Qualitative results were obtained by comparing each strain with a pre-defined breakpoint. When the value was lower, a strain was considered susceptible. Conversely, it was considered resistant if it was equal to or higher than the breakpoint. The pre-defined breakpoints were as follows: penicillin G, 0.5 µg/ml; amoxicillin, 3 µg/ml; amoxicillin plus clavulanate, 3.0+0.5 µg/ml; metronidazole, 8 µg/ml; tetracycline, 8 µg/ml; ciprofloxacin, 4 µg/ml; clindamycin, 4 µg/ml; and azithromycin, 2 µg/ml. The percentage of resistant strains was calculated for each pathogen and antimicrobial drug, and then comparisons were made between countries using the χ^2 test.

Results

The MIC values of the reference *B. fragilis* strain were all in the expected range.

Comparison of quantitative results

Table 1 summarizes the MIC₅₀ and MIC₉₀ values of five periodontal pathogens isolated from Spain and the Netherlands against a selected group of antibiotics. Penicillin G demonstrated significantly higher MIC values in Spanish isolates for *F. nucleatum* ($p = 0.002$)

and *P. intermedia* ($p = 0.011$). The MIC values of amoxicillin were higher in Spanish isolates for *P. intermedia* ($p = 0.002$) and *M. micros* ($p = 0.012$) strains. The MIC values for clindamycin of *M. micros* were higher for Dutch isolates ($p < 0.001$). The MIC values for tetracycline were higher in Spanish isolates for *P. intermedia* ($p = 0.003$), *M. micros* ($p = 0.029$) and *P. gingivalis* ($p < 0.001$) strains. Significantly higher MIC values were observed for ciprofloxacin in Dutch isolates for *F. nucleatum* ($p = 0.035$), and in Spanish isolates for *P. gingivalis* ($p = 0.002$). Azithromycin demonstrated significantly higher MIC values in Spanish isolates for *M. micros* ($p = 0.005$). No significant differences were detected for metronidazole and amoxicillin plus clavulanate.

Percentage of resistant strains

Table 2 shows the total number of strains, the number of susceptible strains and the percentage of resistant strains. A significantly higher number of *F. nucleatum* strains from Spain showed resistance for penicillin G ($p = 0.038$), amoxicillin ($p = 0.038$) and metronidazole ($p = 0.043$). The percentage of *P. intermedia* strains resistant to tetracycline ($p = 0.038$) and amoxicillin ($p = 0.012$) was higher in Spain. Some *M. micros* strains demonstrated resistance to azithromycin (three Dutch and two Spanish strains), and one Spanish strain was resistant to metronidazole. *A. actinomycetemcomitans* showed a high level of resistance to penicillin G, clindamycin and metronidazole in at least 20% of Dutch and Spanish strains. In addition, one Spanish strain was resistant to ciprofloxacin and amoxicillin+clavulanate, and three strains were resistant to azithromycin. Statistically significant differences between countries were detected for amoxicillin ($p = 0.013$) and azithromycin ($p = 0.009$). *P. gingivalis* strains from both countries were susceptible to all antibiotics tested.

Discussion

In a previous study, we demonstrated that bacterial resistance in subgingival plaque samples taken from adult periodontitis patients against a number of common antibiotics was higher in Spain than in the Netherlands (van Winkelhoff et al. 2000). In that study, whole subgingival plaque samples were plated on

antibiotic-containing blood agar plates and the level of resistance was expressed as the percentage of the microflora growing on plates containing antibiotics in concentrations above the breakpoint concentration of a given antimicrobial agent. A higher level of resistance in Spain was found for penicillin, amoxicillin, metronidazole, clindamycin and tetracycline. In the present study, selected periodontal bacterial species were isolated from subgingival plaque samples from adult patients with destructive periodontal disease and subjected to minimal inhibitory concentration tests. For this objective, strains of *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *M. micros* and *F. nucleatum* were selected.

We used the E-test, as this technique has shown to be reliable in the determination of MIC values of anaerobic bacteria (Citron et al. 1991, Nachnani et al. 1992). The results from the present study confirm our previous observations that several Spanish bacterial species isolated from periodontal lesions demonstrated higher MIC values when compared with Dutch isolates. Differences were observed for the β -lactam antibiotics, such as penicillin and amoxicillin, against *P. intermedia*, *F. nucleatum* and *A. actinomycetemcomitans* strains. Production of β -lactamase has been reported in the subgingival microflora from periodontitis patients (van Winkelhoff et al. 1997) and this production was found more frequently in Spanish patients when compared with Dutch patients (Herrera et al. 2000). This was corroborated in this study by showing that protected amoxicillin (with clavulanic acid) showed a significant improvement of the MIC₉₀ values in comparison with unprotected amoxicillin. For tetracycline, the MIC₉₀ values were higher for all species isolated from Spanish samples. Metronidazole is active against a wide range of anaerobic bacterial species. As the subgingival microflora in periodontitis is dominated by strict anaerobic species, it is a common antibiotic in the treatment of severe periodontitis and it is often the first drug of choice. The majority of test species showed good susceptibility towards this drug, with the exception of *A. actinomycetemcomitans*, which is not a strict anaerobic species. However, it is known that the hydroxy metabolite of metronidazole is three to four times more active against *A. actinomycetemcomitans* (Pavićić et al. 1992) and that it

Table 1. The mean MIC50 ($\mu\text{g/ml}$) and MIC90 ($\mu\text{g/ml}$) of five periodontal pathogens isolated from periodontitis patients from SP and NL toward selected antibiotics

	Penicillin		Amoxicillin		Amoxicillin+clavunilate		Tetracycline		
	SP	NL	SP	NL	SP	NL	SP	NL	
<i>A. actinomycetemcomitans</i>									
Range	0.094–256	0.047–1.5	0.064–32	0.032–0.75	0.094–6	0.02–0.75	0.001–2	0.015–0.55	
MIC50	0.5	0.5	0.25	0.25	0.25	0.25	0.064	0.125	
MIC90	1	1	32	0.38	1.5	0.5	0.38	0.19	
<i>P. gingivalis</i>									
Range	<0.016	<0.016	<0.016	<0.016	<0.016	<0.016	0.25–1*	0.015–0.32	
MIN50	<0.016	<0.016	<0.016	<0.016	<0.016	<0.016	0.75	0.015	
MIC90	<0.016	<0.016	<0.016	<0.016	<0.016	<0.016	0.5	0.023	
<i>P. intermedia</i>									
Range	0.015–56*	0.001–33	0.015–56*	0.015–5	0.015–0.5	0.015–0.05	0.015–8*	0.015–3	
MIC50	0.015	0.015	0.25	0.015	0.015	0.015	1.5	0.032	
MIC90	24	5	256	1.5	0.25	0.032	8	2	
<i>F. nucleatum</i>									
Range	0.015–56*	0.001–0.064	0.015–256	0.05–0.094	0.015–0.25	0.015–0.064	0.015–0.47	0.015–1	
MIC50	0.015	0.008	0.015	0.015	0.015	0.015	0.032	0.04	
MIC90	1	0.015	256	0.023	0.125	0.023	0.064	0.5	
<i>M. micros</i>									
Range	<0.016	<0.016	0.015–0.75*	0.015–0.125	<0.016	0.015–0.125	0.015–0.75*	0.015–0.04	
MIC50	<0.016	<0.016	0.015	0.015	<0.016	0.015	0.015	0.023	
MIC90	<0.016	<0.016	0.015	0.047	<0.016	0.032	0.25	0.032	
		Clindamycin		Ciprofloxacin		Metronidazole		Azithromycin	
		SP	NL	SP	NL	SP	NL	SP	NL
<i>A. actinomycetemcomitans</i>									
Range	0.016–256	0.04–5	0.001–32	0.001–0.094	0.5–256	0.125–256	0.19–256	0.047–1	
MIC50	1.5	1.5	0.001	0.003	48	1	1	0.38	
MIC90	8	4	2	0.008	256	64	3	0.875	
<i>P. gingivalis</i>									
Range	<0.016	<0.016	0.15–0.75*	0.001–2	<0.016	<0.016	<0.016	0.015–1.5	
MIN50	<0.016	<0.016	0.25	0.125	<0.016	<0.016	<0.016	0.25	
MIC90	<0.016	<0.016	0.75	0.38	<0.016	<0.016	<0.016	0.5	
<i>P. intermedia</i>									
Range	0.015–256	<0.016	0.001–0.64	0.047–0.58	0.015–0.19	0.015–0.047	0.015–256	0.015–0.94	
MIC50	0.015	<0.016	0.19	0.19	0.015	0.015	0.094	0.064	
MIC90	0.015	<0.016	0.38	0.38	0.125	0.032	1.5	0.38	
<i>F. nucleatum</i>									
Range	0.015–256	0.015–0.575	0.001–1	0.25–4*	0.015–256	0.015–0.023	0.094–256	0.047–8	
MIC50	0.015	0.015	0.5	1	0.015	0.015	0.25	0.23	
MIC90	0.75	0.047	1	1.5	256	0.016	1.5	2	
<i>M. micros</i>									
Range	0.015–0.64	0.015–0.5*	0.001–0.94	0.094–0.5	0.015–256	0.015–0.25	0.19–256*	0.015–256	
MIC50	0.015	0.22	0.125	0.16	0.015	0.015	0.5	1	
MIC90	0.094	0.38	0.38	0.38	0.015	0.125	1	2	

*Statistically significant higher value ($p < 0.05$, Wilcoxon's test).

SP, Spain; NL, the Netherlands.

acts synergistically with amoxicillin against this pathogen (Pavičić et al. 1991). For this reason, metronidazole in combination with amoxicillin has been shown to be effective in the treatment of *A. actinomycetemcomitans*-associated periodontal disease (van Winkelhoff et al. 1989, Berglundh et al. 1998, Winkel et al. 2001). However, the MIC90 value of $> 256 \mu\text{g/ml}$ of the Spanish *A. actinomycetemcomitans* may indicate that the clinical efficacy of this combination therapy may not be identi-

cal in Spain as it is in other European countries.

The higher MIC values among Spanish bacterial isolates and the higher percentage of resistant periodontal bacterial strains is most likely because of the higher antibiotic consumption (Baquero 1996, Cars et al. 2001) and poor compliance to the medication (Pradier et al. 1997) in Spain. This study provides evidence that supports the view that standard guidelines for antimicrobial use in the treatment of periodontal infec-

tions should not be recommended, as major differences in the antimicrobial profile of major periodontal pathogen were found when studied in two European countries. Antimicrobial susceptibility testing may therefore be needed as an integrated step in the microbial diagnosis of severe periodontitis patient. Moreover, further studies are needed in other countries of the European Union to investigate these geographical variations in the antimicrobial drug resistance of the periodontal microflora.

Table 2. Number of strains of five periodontal pathogens from NL and SP susceptible and resistant towards PG, CM, TC, CL, XL, AC and AZ based on selected breakpoint values

	PG		CM		TC		CL		MZ		XL		AC		AZ	
	NL	SP	NL	SP	NL	SP	NL	SP	NL	SP	NL	SP	NL	SP	NL	SP
<i>F. nucleatum</i>																
n susceptible	20	8	20	9	20	10	19	10	19	8	20	10	20	8	18	9
n total	20	10	20	10	20	10	20	10	19	10	20	10	20	10	20	10
% resistant	0.0	20.0*	0.0	10.0	0.0	0.0	5.0	0.0	0.0	20.0*	0.0	0.0	0.0	20.0*	10.0	10.0
<i>P. intermedia</i>																
n susceptible	18	11	24	16	24	15	24	18	24	18	24	18	23	12	24	16
n total	24	18	24	18	24	18	24	18	24	18	24	18	24	18	24	18
% resistant	25.0	38.9	0.0	11.1	0.0	16.7*	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	4.2	33.3*	0.0	11.1
<i>M. micros</i>																
n susceptible	23	19	23	19	22	19	23	19	23	18	23	19	23	19	20	17
n total	23	19	23	19	22	19	23	19	23	19	23	19	23	19	23	19
% resistant	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	5.3	0.0	0.0	0.0	0.0	13.0	10.5
<i>A. actinomycetemcomitans</i>																
n susceptible	8	4	14	7	18	10	18	9	13	4	18	9	18	6	18	6
n total	18	10	18	10	18	10	18	10	18	10	18	10	18	9	18	9
% resistant	55.6	60.0	22.2	30.0	0.0	0.0	0.0	10.0	27.8	60.0	0.0	10.0	0.0	33.3*	0.0	33.3*
<i>P. gingivalis</i>																
n susceptible	26	15	26	15	26	15	26	15	26	15	26	15	26	15	26	15
n total	26	15	26	15	26	15	26	15	26	15	26	15	26	15	26	15
% resistant	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

*Statistically significant higher value ($p < 0.05$, χ^2).

Selected breakpoint values: PG, 0.5 µg/ml; AC, 3 µg/ml; XL, 3.0+0.5 µg/ml; MZ, 8 µg/ml; TC, 8 µg/ml; CL, 4 µg/ml; CM, 4 µg/ml; AZ, 2 µg/ml. PG, penicillin; CM, clindamycin; TC, tetracycline; CL, ciprofloxacin; XL, amoxicillin+clavulanate; AC, amoxicillin; AZ, azithromycin; SP, Spain; NL, the Netherlands.

Acknowledgements

We acknowledge the assistance of Ana O'Connor and Itziar González in Madrid. Also, the input of Adriana Jaramillo from the University of Cali (Colombia) is greatly appreciated.

References

- Alsina, M., Olle, E. & Frias, J. (2001) Improved, low-cost selective culture medium for *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Journal of Clinical Microbiology* **39**, 509–513.
- Appelbaum, P. C., Spangler, S. K., Shiman, R. & Jacobs, M. R. (1992) Susceptibilities of 540 anaerobic gram-negative bacilli to amoxicillin, amoxicillin-BRL 42715, amoxicillin-clavulanate, temafloxacin and clindamycin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **36**, 1140–1143.
- Baquero, F. (1996) Antibiotic resistance in Spain: what can be done? *Clinical Infectious Diseases* **23**, 819–823.
- Berglundh, T., Krok, L., Liljenberg, B., Westfelt, E., Serino, G. & Lindhe, J. (1998) The use of metronidazole and amoxicillin in the treatment of advanced periodontal disease. A prospective, controlled clinical trial. *Journal of Clinical Periodontology* **25**, 354–362.
- Bronzwaer, S., Lonroth, A. & Haigh, R. (2004) The European community strategy against antimicrobial resistance. *European Surveillance* **9**, 1–3.
- Cars, O., Mölstad, S. & Melander, A. (2001) Variation in antibiotic use in the European Union. *The Lancet* **357**, 1851–1853.
- Citron, D. M., Ostavari, M. I., Karlsson, A. & Goldstein, E. J. C. (1991) Evaluation of the Epsilon meter (E-test) for susceptibility testing of anaerobic bacteria. *Journal of Clinical Microbiology* **29**, 2197–2203.
- Herrera, D., Van Winkelhoff, A. J., Dellembijn, N., Winkel, E. G. & Sanz, M. (2000) Beta-lactamase producing bacteria in the subgingival microflora of adult patients with periodontitis. A comparison between Spain and The Netherlands. *Journal of Clinical Periodontology* **27**, 520–525.
- Jones, M. E., Karlowsky, J. A., Draghi, D. H., Thornsbury, C., Sahm, D.F. & Nathwani, D. (2003) Epidemiology and antibiotic susceptibility of bacteria causing soft tissue infections in the USA and Europe: a guide to appropriate antimicrobial therapy. *International Journal of Antimicrobial Agents* **22**, 406–419.
- Machka, K., Braveny, I., Dabernat, H., Dornbusch, K., Van Dyck, E., Kayser, F. H., Van Klingeren, B., Mittermayer, H., Perea, E. & Powell, M. (1988) Distribution and resistance patterns of *Haemophilus influenzae*: A European cooperative study. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* **7**, 14–24.
- Nachnani, S., Scuteri, A., Newman, M. G., Avenessain, A. B. & Lomeli S, L. (1992) E-test: a new technique for antimicrobial susceptibility testing for periodontal microorganisms. *Journal of Periodontology* **63**, 576–583.
- Pavičić, M. J. A. M. P., Van Winkelhoff, A. J. & De Graaff, J. (1991) Synergistic effects between amoxicillin, metronidazole and its hydroxymetabolite against *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **35**, 961–966.
- Pavičić, M. J. A. M. P., Van Winkelhoff, A. J. & De Graaff, J. (1992) In vitro susceptibility of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* to a number of antimicrobial combinations. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **36**, 2634–2638.
- Pradier, C., Dunais, B., Carsenti-Etesse, H. & Dellamonica, P. (1997) Pneumococcal resistance patterns in Europe. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* **16**, 644–647.
- Slots, J. (1982) Selective medium for isolation of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Journal of Clinical Microbiology* **15**, 606–609.
- Syed, S. A. & Loesche, W. J. (1972) Survival of human dental plaque flora in various transport media. *Applied Microbiology* **24**, 638–644.
- Veldhuijzen, I., Bronzwaer, S., Degener, J. & Kool, J. (2000) European Antimicrobial Resistance Surveillance System (EARSS): susceptibility testing of invasive *Staphylococcus aureus*. *European Surveillance* **5**, 34–36.
- Voss, A., Milatovic, D., Wallrauch-Schwarz, C., Rosdahl, V. T. & Braveny, I. (1994) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Europe. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* **13**, 50–55.
- Winkel, E. G., Van der Weijden, G. A., Van Winkelhoff, A. J., Timmerman, M. F. & Van der Velden, U. (2001) Metronidazole plus amoxicillin in the treatment of adult perio-

- dentitis patients. A double-blind placebo-controlled study. *Journal of Clinical Periodontology* **28**, 296–305.
- Winkel, E. G., van Winkelhoff, A. J., Timmerman, M. F., Vangsted, T. & van der Velden U. (1997) Effects of metronidazole in the patients with refractory periodontitis associated with *Bacteroides forsythus*. *Journal of Clinical Periodontology* **24**, 573–579.
- van Winkelhoff, A. J., Carlée, A. W. & De Graaff, J. (1985) *Bacteroides endodontalis* and other black-pigmented *Bacteroides* species in odontogenic abscesses. *Infection and Immunity* **49**, 494–497.
- van Winkelhoff, A. J., Herrera Gonzales, D., Winkel, E. G., Dellemijn-Kippuw, N., Vandenbroucke-Grauls, C. M. J. E. & Sanz, M. (2000) Antimicrobial resistance in the subgingival microflora in patients with adult periodontitis. A comparison between The Netherlands and Spain. *Journal of Clinical Periodontology* **27**, 79–86.
- van Winkelhoff, A. J., Rodenburg, J. P., Goené, R. J., Abbas, F., Winkel, E. G. & de Graaff, J. (1989) Metronidazole plus amoxicillin in the treatment of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*-associated periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology* **16**, 128–131.
- van Winkelhoff, A. J., Winkel, E. G., Barendregt, D. S., Dellemijn-Kippuw, N., Stijne, A. & van der Velden, U. (1997) Beta-lactamase producing bacteria in adult periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology* **24**, 538–543.
- Zinn, C. S., Westh, H. & Rosdahl, V.T, Sarisa Study Group. (2004) An international multicenter study of antimicrobial resistance typing of hospital *Staphylococcus aureus* isolates from 21 laboratories in 19 countries or states. *Microbiological Drug Resistance* **10**, 160–168.

Address:
 A. J. van Winkelhoff
 Department of Oral Microbiology
 Academic Centre for Dentistry Amsterdam
 Van der Boechorststraat 7
 1081 BT Amsterdam
 The Netherlands
 E-mail: aj.vanwinkelhoff@vumc.nl

Clinical Relevance

Scientific rationale for the study: Antibiotic resistance among human pathogens is higher in Southern European countries and is related to a high intake of these drugs. We studied antibiotic resistance among periodontal pathogens isolated in the Netherlands and Spain.

Principal findings: Periodontal pathogens from Spain showed higher minimal inhibitory concentrations for multiple antibiotics in comparison with Dutch isolates. The percentage of resistant periodontal strains was significantly higher for most species tested in Spain.

Practical implications: The findings of this study indicate that a uniform adjunctive systemic antimicrobial therapy to treat severe periodontitis may not be possible and antimicrobial susceptibility testing may be necessary for a predictable treatment outcome.

Artículo 2

Artículo 2:

Herrera D, Contreras A, Gamonal J, Oteo A, Jaramillo A, Silva N, Sanz M, Botero JE, León R. (2008) Subgingival microbial profiles in chronic periodontitis patients from Chile, Colombia and Spain. *J Clin Periodontol*; 35:106-113.

El objetivo del estudio fue analizar la microbiota subgingival de pacientes periodontales de poblaciones distantes como Chile, Colombia y España, empleando métodos clínicos y microbiológicos idénticos.

Material y métodos: Se realizó un estudio multicéntrico en el que se analizaron 114 pacientes. Los pacientes se exploraron utilizando un protocolo clínico idéntico así como una muestra subgingival de cada paciente. Las muestras fueron procesadas en tres laboratorios por medio de cultivo bajo los mismos protocolos clínicos y microbiológicos. Se calcularon los recuentos bacterianos totales, así como la frecuencia de detección y las proporciones en flora de nueve patógenos periodontales.

Resultados: La población de pacientes colombianos demostró tener una afectación periodontal más severa que los pacientes chilenos y españoles, con profundidades de sondaje medias significativamente mayores, por otro lado, tuvieron un menor porcentaje de pacientes fumadores. Al comparar las muestras de las tres poblaciones, los recuentos totales eran significativamente mayores en los pacientes colombianos. El número de patógenos difería entre los grupos. Se encontró más frecuentemente *Tannerella forsythia* en las muestras de los pacientes chilenos, mientras que la frecuencia de *Pavimonas micra* y bacterias entéricas difería significativamente entre los tres grupos.

Conclusión: Existen diferencias significativas en cuanto a la frecuencia y proporción de patógenos periodontales específicos en la flora de los tres grupos analizados.

Subgingival microbial profiles in chronic periodontitis patients from Chile, Colombia and Spain

David Herrera¹, Adolfo Contreras², Jorge Gamonal³, Alfonso Oteo¹, Adriana Jaramillo², Nora Silva³, Mariano Sanz¹, Javier Enrique Botero² and Rubén León³

¹ETEP Research Group, Faculty of Dentistry, University Complutense, Madrid, Spain; ²Periodontal Medicine Group, School of Dentistry, University del Valle, Cali, Colombia; ³Faculty of Dentistry, University de Chile, Santiago de Chile, Chile

Herrera D, Contreras A, Gamonal J, Oteo A, Jaramillo A, Silva N, Sanz M, Botero JE, León R. Subgingival microbial profiles in chronic periodontitis patients from Chile, Colombia and Spain. *J Clin Periodontol* 2008; 35: 106–113. doi: 10.1111/j.1600-051X.2007.01170.x.

Abstract

Aim: To investigate the subgingival microbiota of distinct periodontitis patient populations, in Chile, Colombia and Spain, using identical clinical and bacteriological methods.

Material and Methods: In this multicentre study, 114 chronic periodontitis patients were selected. Patients were examined using an identical clinical protocol and pooled subgingival samples were obtained from each patient. Samples were processed in the three laboratories by means of culturing under identical clinical and microbiological protocols. Total anaerobic counts and frequency of detection and proportions of nine periodontal pathogens were calculated. Variables were analysed by means of ANOVA, χ^2 , Kruskal–Wallis and Dunn’s multiple comparison tests.

Results: The Colombian population demonstrated greater severity of periodontitis, with significantly deeper mean probing pocket depth, and had a significantly lower percentage of current smokers. When comparing samples from the three patient populations, the total counts were significantly higher in the Colombian patients. The numbers of putative pathogens differed among groups. *Tannerella forsythia* was found less frequently in Chilean samples, while *Parvimonas micra* and enteric rods differed significantly among the three population groups.

Conclusion: Significant differences among Chile, Colombia and Spain existed regarding the frequency and proportions of specific periodontal pathogens in the subgingival microbiota of periodontitis patients.

Key words: Chile; Colombia; periodontitis; Spain; subgingival microbiota

Accepted for publication 22 October 2007

Periodontal diseases are widely distributed in the world and represent a major oral health problem both in developed and in developing countries. The role

of subgingival microbial species in the etiology of periodontal disease has been extensively documented (Socransky & Haffajee 1994, Curtis et al. 2005, van Winkelhoff & Boutaga 2005). The current body of knowledge indicates that specific microorganisms, including *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* and *Tannerella forsythia*, occur more frequently and/or in higher numbers of organisms in periodontitis sites and subjects, whereas other bacterial species, such as members of the genera *Strepto-*

coccus and *Actinomyces*, have been associated with periodontal health (Haffajee & Socransky 1994, Haffajee et al. 1998).

Knowledge on the microbial risk factors associated with periodontal disease in various populations is limited. Most of the knowledge available on the microbial composition of subgingival plaque is based on studies from the United States, Western Europe and Japan, in where preventive and therapeutic oral care programmes are available to significant proportions of the population. Thus, only limited data are

Conflict of interest and source of funding statement

The authors declares that they have no conflict of interests.

The Chilean group was supported by ‘‘Fondo Nacional Desarrollo Ciencia y Tecnología: Fondecyt Número 1050518’’.

available on the subgingival microbial composition of periodontitis subjects in developing countries (Gjerme et al. 2002), and few studies have compared the microbial differences among countries (Ali et al. 1994, Sanz et al. 2000, Haffajee et al. 2004, Lopez et al. 2004) and seldom have investigators using the same technology and previously calibrated methods to compare the microbial composition among different populations. The relative contribution of different bacterial species may vary in geographically or racially different groups. Compiling data from various populations by different researchers will confirm common risk factors or uncover risk factors unique to a specific group in the population. These differences may have an impact on the diagnosis, prognosis and treatment of periodontal disease.

Different studies using both cultural and molecular bacterial detection techniques have tried to associate the presence of different putative pathogens with gingivitis and periodontitis, demonstrating a wide variety of results in different populations from different geographical origins (Sanz et al. 2000, 2004). These studies have concluded that the prevalence of specific periodontal pathogens varies between individuals from the same environment and among different ethnicities and/or countries (Umeda et al. 1998, Haffajee et al. 2004). Such findings raise the concern that results from studies reporting the efficacy of different protocols of periodontal treatment in a given population may not be directly extrapolated to subjects in other locations.

Some studies have revealed differences in microbial profiles when comparing different ethnic groups. Using 16S rRNA-based polymerase chain reaction (PCR), Umeda et al. (1998) demonstrated that Hispanics and Asians living in Los Angeles (USA) harboured higher proportions of *P. gingivalis* and *A. actinomycetemcomitans* than Caucasians. Michalowicz et al. (2000), using the same PCR technology, demonstrated that Jamaicans with localized aggressive periodontitis (formerly localized juvenile periodontitis) had a higher prevalence of *P. gingivalis* and Cytomegalovirus, rather than *A. actinomycetemcomitans*, the aetiologic agent in most forms of localized aggressive periodontitis in subject groups studied in the United States, Finland and Africa.

Other studies have revealed country-specific differences in subgingival

microbial composition. Sanz et al. (2000), using cultural methods, compared the microbial composition of subgingival plaque samples from Dutch and Spanish periodontitis patients. The results showed that *A. actinomycetemcomitans* and *Parvimonas micra* (formerly *Micromonas micros*) were more prevalent in the Dutch patients (23.3% versus 2.3%; 96.7% versus 74.2%), while *P. gingivalis* was more prevalent in the Spanish subjects (64.5% versus 36.7%). In another study from the same research group, Herrera et al. (2000) demonstrated an increase in β -lactamase-producing bacteria among bacterial isolates from the Spanish group. Using the checkerboard DNA–DNA hybridization technique, Lopez et al. (2004) compared the microbial composition of subgingival plaque samples between Chilean subjects and subjects from the USA with chronic periodontitis. Their results indicated that Chilean subjects harboured significantly higher proportions of *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *T. denticola* and *T. forsythia*. Haffajee et al. (2004) evaluated the subgingival microbiota of 300 chronic periodontitis subjects from Sweden, the United States, Chile and Brazil using the checkerboard technique. Brazilians harboured significantly higher proportions of *Actinomyces naeslundii* genospecies 1 and 2, *Streptococcus intermedius*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus constellatus*, *Eubacterium nodatum* and *T. denticola* than the other study populations. Compared with Brazilians and Chileans, the United States and Swedish populations presented significantly lower proportions of *T. denticola* and *P. gingivalis*.

Enteric rods and pseudomonads are opportunistic organisms that can be detected in the subgingival environment of periodontitis subjects. Their prevalence varies around the world and they are resistant to the majority of adjunctive therapeutic agents (antibiotics) used to treat periodontitis (Slots et al. 1990a, b, Ali et al. 1994, Barbosa et al. 2001, Botero et al. 2007a, b, Lafaurie et al. 2007). Geographical differences in the distribution of these microbes could impact periodontal treatment protocols.

Although it has become apparent that there are substantial differences in the composition of the subgingival microbiota in subjects from various geographical locations, there is a need for a global understanding of the bacterial

composition in different periodontal infections, which may enable the establishment of specific preventive and therapeutic strategies.

The objective of this study, therefore, was to investigate the subgingival microbiota of defined periodontitis patient populations in Chile, Colombia and Spain, using identical bacteriological methods.

Material and Methods

Patients diagnosed with chronic periodontitis at the dental clinics in the University Complutense of Madrid (Spain), University of El Valle (Cali, Colombia) and University of Chile (Santiago, Chile) were invited to participate in the study and were recruited into this multi-centre investigation if they fulfilled the inclusion criteria and manifested their voluntary participation by signing an Institutional Review Board (IRB) approved informed consent. The IRB of each University had also approved the protocol and study design of the study.

Selection of patients

An initial screening visit was performed to assess whether the patients fulfilled the following inclusion criteria: individuals aged 25 years and older; with at least 12 teeth present; excluding third molars; that had no previous periodontal treatment; and were free of systemic diseases such as diabetes, arthritis, ulcerative colitis, Crohn's disease, HIV infection, cancer and heart disease. Pregnant women were also excluded from participating in the study, in addition to subjects who, in the previous month, had taken antibiotics and/or anti-inflammatory drugs.

Chronic periodontitis was defined according to the American Academy of Periodontology consensus report on the Classification of Periodontal Diseases (Armitage 1999). A full-mouth clinical examination was performed in each patient using a manual probe (UNC 15, Hu Friedy, Chicago, IL, USA) and the following parameters were recorded at six sites per tooth: probing depth (PD in mm), clinical attachment loss (CAL in mm), bleeding on probing (BOP in percentage of sites) and plaque index (PII in percentage of sites). Patients were selected if they presented four or more sites with a PD of 5 mm or higher

and an attachment loss of 2 mm or higher (Offenbacher et al. 2001). Patients with initial periodontitis were not included in the study.

Selection of sampling sites

Four sites were selected in each quadrant based on the patient's clinical and radiographic periodontal records. Sites presenting PD > 5 mm, CAL > 5 mm and BOP were selected (Lang et al. 1990, Mombelli et al. 1991a,b). The selection of sites was made based on the data recorded during the screening visit. No further evaluation of the selected sites was performed before subgingival sampling.

Microbiological sampling

At selected sites, supragingival plaque was carefully removed to avoid bleeding using sterile gauze and/or cures. Then, these sites were dried with sterile cotton rolls and gentle air drying. Two consecutive sterile paper points (medium size, Maillefer, Ballaigues, Switzerland) were inserted as deep as possible into the pocket, and left in place for 15 s. The paper points were transferred to a vial containing 1.5 ml of reduced transport fluid (Syed & Loesche 1972), and pooled with all the other paper points. The vial was sent to the laboratory and processed within 24 h.

At the laboratory, the vials were vortexed (30 s), serially diluted and plated in two different media: blood agar medium (No. 2 of Oxoid; Oxoid Ltd, Basingstoke, UK), with 5% horse blood, and haemin (5 mg/l) and menadione (1 mg/l) and Dentaid-1 medium (Alsina et al. 2001). The blood agar plates were studied after 7 and 14 days of anaerobic incubation (80% N₂; 10% H₂; 10% CO₂ at 37°C), and the Dentaid-1 plates after 3–5 days of 37°C incubation in air with 5% CO₂. Plates were carefully examined for the identification of *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *Prevotella intermedia/nigrescens*, *T. forsythia*, *P. micra*, *Capnocytophaga* spp., *Eikenella corrodens* and *Fusobacterium* spp., based on the morphology of the colony and using different standard biochemical tests to confirm the initial identification (RAPID ANA II). Other relevant colonies (those representing an important proportion of the flora) were also isolated for further characterization. Colonies of each bacterial species were

Table 1. Demographics of the selected populations

	Chile	Colombia	Spain	Statistics
<i>n</i>	37	41	36	
Age				
Mean	44.6	41.5	44.9	One-way ANOVA <i>p</i> = 0.3731
Standard deviation	8.1	10.6	11.7	
Maximum	60	64	67	
Minimum	31	25	26	
Gender				
Female	25	25	20	χ^2 NS
Male	12	16	16	
% Female	67.6	61.0	55.6	
% Male	32.4	39.0	44.4	
Smoking				
Non-smokers	26	37	21	χ^2 Spain–Chile, NS Spain–Colombia, <i>p</i> = 0.004 Colombia–Chile, <i>p</i> = 0.01
Smokers	11	3	12	
Former smokers	0	1	3	
% Non-smokers	70.3	90.2	63.6	
% Smokers	29.7	7.3	36.4	
% Former	0.0	2.4	9.1	

NS, not statistically significant (*p* > 0.05).

counted, as was the total number of colonies in a representative plate (between 30 and 300 colonies). Counts of *A. actinomycetemcomitans* were performed on Dentaid-1 plates, based on its typical colony morphology, a catalase reaction and a set of specific enzymes. Additionally, any colony growing on Dentaid-1 medium, suspected of being an enteric rod, was isolated. Dentaid-1 medium, as a TSBV medium (Slots 1982), has demonstrated excellent recovery of *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonadaceae* species. Suspect non-oral, Gram-negative, facultatively anaerobic rods (Slots et al. 1990b) were subcultured on McConkey agar, purified and classified using a commercial identification kit system (API 20 E, Baxter Healthcare, West Sacramento, CA, USA). The panels and bacterial inoculae were prepared following the recommendations of the manufacturer, and incubated for 18–24 h at 35°C in a non-CO₂ incubator. Bacterial speciation, based on 34 taxonomic test reactions, was performed using the software provided by the manufacturer.

The laboratory technicians at the three study centres had been previously trained and calibrated in the use of the same bacterial culture technology and followed an identical microbiological methodology.

Statistical analysis

Age was compared among groups using ANOVA, while the χ^2 test was used for gender and smoking. PPD and CAL

were averaged by patient and group, and the percentage of sites with plaque and BOP were calculated first by patient and then by group. Differences among population groups were determined using the Kruskal–Wallis test and the post-hoc test selected was Dunn multiple comparison test. Total anaerobic counts were log transformed and compared following the same procedures as those applied to the clinical variables. The frequency of detection of different bacterial pathogens was compared by the χ^2 test. The proportions of bacterial pathogens in positive samples were compared as described for the clinical variables. Statistical significance was assumed when *P* ≤ 0.05.

Results

Demographics of the selected populations (Table 1)

The sample population of moderate to severe chronic periodontitis patients included 41 patients in Cali (Colombia), 37 patients in Santiago (Chile) and 36 patients in Madrid (Spain). No statistically significant differences for age and gender were observed among the groups. The percentage of smokers was significantly lower in the Colombian population (7.3%), when compared with the Chileans (29.7%, *p* = 0.01) and the Spanish subjects (36.4%, *p* = 0.004).

Clinical data at sampled sites (Table 2)

The mean PD (mm) of the sampled sites was significantly deeper in the

Table 2. Comparison of clinical data at sampled sites: probing pocket depth (PPD), clinical attachment level (CAL), percentage of sites with bleeding on probing (BOP), percentage of sites with plaque (PII)

	Chile	Colombia	Spain	Statistics*
PPD				
Mean	5.401	7.963	5.757	K-W, $p < 0.0001$
SD	0.489	1.303	0.942	Chile-Colombia, $p < 0.0001$
Maximum	6.5	11.5	9.3	Chile-Spain, NS
Minimum	5.0	5.2	4.5	Colombia-Spain, $p < 0.001$
CAL				
Mean	5.905	8.088	6.458	K-W, $p < 0.0001$
SD	0.350	1.679	1.326	Chile-Colombia, $p < 0.0001$
Maximum	6.5	12.1	11.5	Chile-Spain, NS
Minimum	5.0	3.1	4.8	Colombia-Spain, $p < 0.001$
BOP				
Mean	68.92%	100.00%	90.28%	K-W, $p < 0.0001$
SD	22.36%	0.00%	20.07%	Chile-Colombia, $p < 0.001$
Maximum	100%	100%	100%	Chile-Spain, $p < 0.001$
Minimum	0%	100%	25%	Colombia-Spain, NS
PII				
Mean	77.03%	59.15%	47.22%	K-W, $p < 0.015$
SD	21.55%	28.92%	41.31%	Chile-Colombia, $p < 0.05$
Maximum	100%	100%	100%	Chile-Spain, $p < 0.01$
Minimum	25%	25%	0%	Colombia-Spain, NS

*Kruskal-Wallis (K-W) test was selected to compare the three groups. As post-hoc test, Dunn's Multiple Comparison test, performed paired comparisons.

NS, not statistically significant ($p > 0.05$); SD, standard deviation.

Table 3. Comparison of log of total anaerobic colony forming unit (per ml)

	Chile	Colombia	Spain	Statistics*
Mean	6.688	8.379	7.351	K-W, $p < 0.0001$
SD	1.01	0.26	0.54	Chile-Colombia, $p < 0.001$
Maximum	9.6	8.8	8.5	Chile-Spain, NS
Minimum	4.7	7.6	5.9	Colombia-Spain, $p < 0.001$

*Kruskal-Wallis (K-W) test was selected to compare the three groups. As post-hoc test, Dunn's Multiple Comparison test, performed paired comparisons.

NS, not statistically significant ($p > 0.05$); SD, standard deviation.

Colombian sample, when compared with the Chilean and Spanish patients. Similar results were found for the CAL data.

The proportion of sites with BOP was significantly lower in the Chilean when compared with Colombian and Spanish patients. Conversely, the presence of plaque was significantly higher in Chileans when compared with patients from the other two countries.

Total anaerobic counts (Table 3)

Total counts, expressed as log of colony-forming units per ml, were significantly different when comparing the groups, showing a higher amount of colonies in the Colombian when compared with the Chilean and Spanish samples. Colombian patients not only harboured more bacterial cells but also showed a narrower range of variability.

Conversely, Chilean samples harboured less bacterial cells and showed a wider range of variability.

Frequency of detection of different bacterial species (Table 4)

The frequency of detection of *A. actinomycetemcomitans* was less than 20% in all groups, and no significant differences were detected among the groups. Conversely, the prevalence of *P. gingivalis* was higher than 65% in all groups, also without significant differences among the three groups.

P. intermedia/nigrescens varied among groups, with a low frequency of detection in the Chilean population, a high frequency in Colombia and almost 100% in the Spanish group. Differences between groups were statistically significant. *T. forsythia* demon-

strated a prevalence of 36–39% in Spain and Colombia, while in Chile it showed a lower frequency of detection, and these differences were statistically significant when compared with Spain ($p = 0.02$), but not with Colombia ($p = 0.05$).

Capnocytophaga sp. demonstrated low prevalences in all groups, and no differences were detected. Conversely, the prevalence of *Fusobacterium* spp. was high in all groups, reaching 100% in Spain, which was significantly higher as compared with the South-American groups.

P. micra demonstrated important and significant differences among groups, with a very low prevalence in Colombia, intermediate in Chile and high in Spain.

E. corrodens showed relatively low proportions in all groups, with statistically significant differences between subjects from Chile and Spain.

Enteric rods demonstrated important and significant differences among groups, with a complete absence in Spain, intermediate levels in Chile and a 36% rate of detection in Colombia.

Proportions in positive samples of different bacterial species (Table 5)

Low proportions of *A. actinomycetemcomitans* were detected in all groups, with the highest proportion detected in the Chilean subjects, although not significantly different. The proportions of *P. gingivalis* were significantly different among groups ($p < 0.001$), with a lower percentage in Colombia when compared with the other two groups. *P. intermedia/nigrescens* showed higher proportions in Chile, and very similar percentages in Spain and Colombia. These differences were not significant. *T. forsythia* demonstrated similar proportions in all groups, and no significant differences were detected. *Capnocytophaga* sp. represented low proportions in all groups, but the differences were statistically significant, due to higher values in Chile as compared with Spain ($p < 0.05$). The percentages of *Fusobacterium* spp. were significantly different among groups ($p = 0.01$), with lower proportions in Chile, which were statistically significant when compared with Colombia ($p > 0.05$). The proportions of *P. micra* were lower in samples from Spanish and Colombian subjects compared with samples from Chile ($p = 0.01$), due to a significantly lower value in Spanish subjects ($p > 0.01$).

Table 4. Comparison of the frequency of detection of different bacterial species

	Frequency of detection			<i>p</i> value (χ^2)		
	Chile (%)	Colombia (%)	Spain (%)	Spain versus Chile	Spain versus Colombia	Chile versus Colombia
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	19.4	17.1	16.7	NS	NS	NS
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	83.8	65.9	77.8	NS	NS	NS
<i>Prevotella intermedia</i>	19.4	72.5	97.2	<0.001	0.004	<0.001
<i>Tannerella forsythia</i>	16.2	39.0	36.1	NS	NS	0.02
<i>Capnocytophaga</i> spp.	13.5	9.8	16.7	NS	NS	NS
<i>Fusobacterium</i> spp.	63.9	82.9	100.0	<0.001	0.009	NS
<i>Parvimonas micra</i>	29.7	2.4	61.1	0.007	<0.001	<0.001
<i>Eikenella corrodens</i>	34.3	27.5	11.1	0.008	NS	NS
Enteric rods	17.6	36.6	0.0	0.01	<0.001	0.04

NS, not statistically significant ($p > 0.05$).

Table 5. Comparison of the proportions in positive samples of different bacterial species

	Mean percentage of flora in positive sites			Kruskal–Wallis <i>p</i> value	<i>p</i> -value (Dunn's multiple comparison)		
	Chile	Colombia	Spain		Spain versus Chile	Spain versus Colombia	Chile versus Colombia
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	2.86	0.22	0.20	0.1678	NS	NS	NS
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	34.01	5.49	22.21	<0.0001	NS	<0.01	<0.001
<i>Prevotella intermedia</i>	15.23	6.71	6.74	0.069	NS	NS	NS
<i>Tannerella forsythia</i>	6.43	4.39	5.54	0.8997	NS	NS	NS
<i>Capnocytophaga</i> spp.	4.62	2.00	0.77	0.0155	<0.05	NS	NS
<i>Fusobacterium</i> spp.	2.76	5.08	5.31	0.0107	NS	NS	<0.05
<i>Parvimonas micra</i>	10.83	2.00	2.41	0.0118	<0.01	NS	NS
<i>Eikenella corrodens</i>	10.14	1.77	0.83	0.0025	<0.01	NS	NS
Enteric rods	14.22	8.10	0.00	NA	NS	NA	NA

NS, not statistically significant ($p > 0.05$).

NA, test not possible to be performed.

The same findings were found for *E. corrodens*. Enteric rods were not found in Spain, and its proportions were relatively high in both South-American countries.

Discussion

This study investigated the microbiological composition of the subgingival microbiota in subjects with chronic periodontitis from three different countries. Taken together, the results indicated that the subgingival microbiota from Chile, Colombia and Spain differed with regard to the frequency of detection and the proportions of important periodontal pathogens, especially red complex microorganisms, *P. gingivalis* and *T. forsythia* and enteric rods. While no differences in terms of demographic variables were observed among the groups, the Colombian subjects showed higher mean PD and CAL values at sampled sites in comparison with Chile and Spain (Tables 1 and 2), indicating a more severe level of perio-

dontal disease. Although other demographic variables such as economic status and education level were not studied, it has been observed that specific living conditions particular to a country may account for differences in the clinical presentation of periodontitis (Gjerme et al. 2002, Sheiham & Netuveli 2002). In addition, genetic background may have also been implicated (Loos et al. 2005). Interestingly, cigarette smoking was more frequent in Chile and Spain but was not correlated to increased periodontal destruction as compared with Colombia. Differences in tobacco exposure, host response, oral hygiene habits, oral health care access and microbial composition may help explain these differences in the clinical expression of periodontitis in the three locations studied (Mager et al. 2003, Van der Velden et al. 2003). More detailed studies addressing the relationship between periodontitis and environmental, economic and genetic variables are needed in South America and Europe.

Most studies on the composition of the subgingival microbiota in perio-

dontitis patients have been performed in North American, European and Japanese populations. There are few studies on the subgingival microbial composition in Latin Americans (Lopez 2000, Gajardo et al. 2005, Ximenez-Fyvie et al. 2006a,b, Botero et al. 2007a,b, Lafaurie et al. 2007) and even fewer studies addressing differences between countries (Sanz et al. 2000, Haffajee et al. 2004, Lopez et al. 2004). Owing to this, the study of the subgingival microbiota in a particular country becomes relevant not only for understanding its implications in the pathogenesis of periodontal disease but also to identify its possible impact on outcomes after treatment.

The red complex species *P. gingivalis*, *T. forsythia* and *T. denticola* are considered important a etiological agents in the pathogenesis of periodontitis (Haffajee et al. 1998, Umeda et al. 1998, Sanz et al. 2000, Gajardo et al. 2005). In the present study, *P. gingivalis* and *T. forsythia* were detected in high frequencies in most of the patients. The prevalence of *P. gingivalis* was high (>50%) in Colombia, Spain and Chile,

while the frequency of *T. forsythia* was lower in Chile than in Colombia and Spain (Table 3). The most frequently detected microorganisms in Chileans were *P. gingivalis*, *Fusobacterium* spp., *E. corrodens*, *P. micra* and, with the same frequency, *P. intermedia/nigrescens* and *A. actinomycetemcomitans*. Conversely, the least frequently detected species were *Capnocytophaga* spp. On the other hand, the most prevalent bacteria in Colombians were *Fusobacterium* spp., *P. intermedia/nigrescens*, *P. gingivalis*, *T. forsythia* and Gram-negative enteric rods, and with less frequency *P. micra*. In patients from Spain, *Fusobacterium* spp., *P. intermedia/nigrescens*, *P. gingivalis*, *P. micra* and *T. forsythia* were the most commonly isolated. In contrast, Gram-negative enteric rods were absent in Spanish subjects (Tables 3 and 4). Interestingly, a frequently reported periodontal pathogen, *A. actinomycetemcomitans*, was detected in low proportions and frequency in the three populations studied. Recent studies (Gajardo et al. 2005, Botero et al. 2007a,b, Lafaurie et al. 2007) have reported that *A. actinomycetemcomitans* is not the most prevalent and prominent organism in aggressive periodontitis and in chronic periodontitis among Chileans and Colombians as compared with other North America populations. The same was found for chronic periodontitis in a Spanish population when compared with a Dutch population (Sanz et al. 2000). Conversely, *P. gingivalis* in this study emerged as an important pathogen in chronic periodontitis, similar to other studies conducted in Latin American populations (Michalowicz et al. 2000, Lopez et al. 2004, Cortelli et al. 2005, Gajardo et al. 2005, Ximenez-Fyvie et al. 2006a,b). Subgingival proportions of *P. gingivalis* were significantly different in Chilean and Spanish patients as compared with Colombians (Table 5). This finding is consistent with the studies from Brazil and Chile in subjects with chronic periodontitis (Lopez et al. 2004, Cortelli et al. 2005), in which *P. gingivalis* was a prevalent organism. Furthermore, a previous study showed similar results when Spain was compared with the Netherlands (Sanz et al. 2000). In addition, the higher frequency of detection of *P. micra* in the populations with the highest levels of smoking (Chile and Spain) agrees with previous studies assessing the influence

of smoking on the subgingival microflora (van Winkelhoff et al. 2001).

The association between periodontopathic bacteria and superinfecting bacteria has been described previously in the literature (Slots et al. 1990b), although its pathogenic implications are unclear. In this study, Gram-negative enteric rods were prevalent in Colombians and Chilean subjects; however, they were absent in Spanish subjects (Tables 3 and 4). The role of these microorganisms in the pathogenesis of periodontitis is still ill defined, although they are frequently associated as superinfecting microorganisms, or associated with antibiotic resistance when antibiotics, such as amoxicillin and metronidazole, are frequently used in the treatment of periodontitis (Wroblewska et al. 2002, Goncalves et al. 2007). In this study, it is difficult to know whether their presence is the result of an adaptation of the subgingival biofilm or a transient infection. However, poor antibiotic prescription control is frequent in Latin-American countries and this fact may have an influence on antibiotic resistance and thus on the possible overgrowth of these pathogens in periodontal pockets.

Mechanical debridement of the subgingival biofilm is the standard treatment of periodontal infections demonstrating good therapeutic clinical outcomes in most of the cases. The adjunctive use of systemic antibiotics has been usually limited to acute periodontal infections, severe forms of chronic and aggressive periodontitis and whenever there is a risk of systemic complications. Current protocols for antibiotic prescription in periodontal therapy are based on published microbiological studies from Western and Asian populations and therefore, the occurrence of significant differences in the composition of the subgingival flora in different geographical or ethnic populations may increase the risk of developing antibiotic resistance or even promoting a subgingival overgrowth of Gram-negative enteric rods and other superinfecting microorganisms. These problems would be avoided if the selection of antibiotics is based on prior microbiological diagnosis. The results of this study support this approach, because relevant differences in subgingival microbiota have been detected among populations of different geographical origin, in spite of having a similar clinical presentation. For instance,

because of the fact that 18% of Chilean and 37% of Colombian patients harboured Gram-negative enteric rods, the appropriate antibiotic would likely be ciprofloxacin in conjunction with mechanical therapy (Slots et al. 1990a). In contrast, the presence of *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans* and *T. forsythia* would require the use of amoxicillin/metronidazole. In patients allergic to penicillin, azithromycin would be the antibiotic of choice (Gomi et al. 2007). The presence of specific or a combination of periodontal and superinfecting pathogens in high levels should determine antibiotic selection. We therefore consider that before systemic antibiotic administration, it is important to determine the composition of the subgingival microbiota.

One concern for the researchers in this study was the methodology used for the microbiological analysis. Owing to this, before the start of the study the three laboratories agreed on an identical protocol and standardized and calibrated their processes in order to ensure the homogeneity and reproducibility of the obtained results. Clinical sampling of subgingival plaque from the selected patients was also identical following a standard approach (Casas et al. 2007) and a specially designed transport and agar media were used for culturing periodontal pathogens, also following current microbiological standards. In this way, we ensured that any variability in the composition of the microbiota that may be the result from microbial processing would be the same in all three laboratories. However, one cannot rule out completely that the reported microbial differences might have resulted from variations in the amounts of plaque recovered. In addition, the differences in disease severity (probing PD) and smoking habits among the populations, detected in the present study, could have had an impact on the microbiological results, because both factors have been shown to have an influence on the subgingival microflora, but their particular impact on the present populations could not be assessed.

In summary, the results from this study support the existence of geographic variations in the subgingival microbiota in chronic periodontitis patients that may be linked to geographic and environmental factors. These results could impact periodontal treatment, mainly with regard to the

selection of adjunctive systemic antibiotics in a given population.

References

- Ali, R. W., Bakken, V., Nilsen, R. & Skaug, N. (1994) Comparative detection frequency of 6 putative periodontal pathogens in Sudanese and Norwegian adult periodontitis patients. *Journal of Periodontology* **65**, 1046–1052.
- Alsina, M., Olle, E. & Frias, J. (2001) Improved, low-cost selective culture medium for *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Journal of Clinical Microbiology* **39**, 509–513.
- Armitage, G. C. (1999) Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Annals of Periodontology* **4**, 1–6.
- Barbosa, F. C., Mayer, M. P., Saba-Chujfi, E. & Cai, S. (2001) Subgingival occurrence and antimicrobial susceptibility of enteric rods and pseudomonads from Brazilian periodontitis patients. *Oral Microbiology and Immunology* **16**, 306–310.
- Botero, J. E., Arce, R. M., Escudero, M., Betancourth, M., Jaramillo, A. & Contreras, A. (2007a) Frequency of detection of periodontopathic and superinfecting bacteria in HIV-positive patients with periodontitis. *Journal of the International Academy of Periodontology* **9**, 13–18.
- Botero, J. E., Contreras, A., Lafaurie, G., Jaramillo, A., Betancourth, M. & Arce, R. M. (2007b) Occurrence of periodontopathic and superinfecting bacteria in chronic and aggressive periodontitis subjects in a Colombian population. *Journal of Periodontology* **78**, 696–704.
- Casas, A., Herrera, D., Martin-Carnes, J., Gonzalez, I., O'Connor, A. & Sanz, M. (2007) Influence of sampling strategy on microbiological results before and after periodontal treatment. *Journal of Periodontology* **78**, 1103–1112.
- Cortelli, J. R., Cortelli, S. C., Jordan, S., Haraszthy, V. I. & Zambon, J. J. (2005) Prevalence of periodontal pathogens in Brazilians with aggressive or chronic periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology* **32**, 860–866.
- Curtis, M. A., Slaney, J. M. & Aduse-Opoku, J. (2005) Critical pathways in microbial virulence. *Journal of Clinical Periodontology* **32**, 28–38.
- Gajardo, M., Silva, N., Gomez, L., Leon, R., Parra, B., Contreras, A. & Gamonal, J. (2005) Prevalence of periodontopathic bacteria in aggressive periodontitis patients in a Chilean population. *Journal of Periodontology* **76**, 289–294.
- Gjermo, P., Rosing, C. K., Susin, C. & Oppermann, R. (2002) Periodontal diseases in Central and South America. *Periodontology* **2000** **29**, 70–78.
- Gomi, K., Yashima, A., Nagano, T., Kanazashi, M., Maeda, N. & Arai, T. (2007) Effects of full-mouth scaling and root planing in conjunction with systemically administered azithromycin. *Journal of Periodontology* **78**, 422–429.
- Goncalves, M. O., Coutinho-Filho, W. P., Pimenta, F. P., Pereira, G. A., Pereira, J. A., Mattos-Guaraldi, A. L. & Hirata, R. Jr. (2007) Periodontal disease as reservoir for multi-resistant and hydrolytic enterobacterial species. *Letters of Applied Microbiology* **44**, 488–494.
- Haffajee, A. D., Bogren, A., Hasturk, H., Feres, M., Lopez, N. J. & Socransky, S. S. (2004) Subgingival microbiota of chronic periodontitis subjects from different geographic locations. *Journal of Clinical Periodontology* **31**, 996–1002.
- Haffajee, A. D., Cugini, M. A., Tanner, A., Pollack, R. P., Smith, C., Kent, R. L. Jr. & Socransky, S. S. (1998) Subgingival microbiota in healthy, well-maintained elder and periodontitis subjects. *Journal of Clinical Periodontology* **25**, 346–353.
- Haffajee, A. D. & Socransky, S. S. (1994) Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. *Periodontology* **2000** **5**, 78–111.
- Herrera, D., van Winkelhoff, A. J., Dellemijn-Kippuw, N., Winkel, E. G. & Sanz, M. (2000) Beta-lactamase producing bacteria in the subgingival microflora of adult patients with periodontitis. A comparison between Spain and The Netherlands. *Journal of Clinical Periodontology* **27**, 520–525.
- Lafaurie, G. I., Contreras, A., Baron, A., Botero, J., Mayorga-Fayad, I., Jaramillo, A., Giraldo, A., Gonzalez, F., Mantilla, S., Botero, A., Archila, L. H., Diaz, A., Chacon, T., Castillo, D. M., Betancourth, M., Del Rosario-Aya, M. & Arce, R. (2007) Demographic, clinical, and microbial aspects of chronic and aggressive periodontitis in Colombia: a multicenter study. *Journal of Periodontology* **78**, 629–639.
- Lang, N. P., Adler, R., Joss, A. & Nyman, S. (1990) Absence of bleeding on probing. An indicator of periodontal stability. *Journal of Clinical Periodontology* **17**, 714–721.
- Loos, B. G., John, R. P. & Laine, M. L. (2005) Identification of genetic risk factors for periodontitis and possible mechanisms of action. *Journal of Clinical Periodontology* **32**, 159–179.
- Lopez, N. J. (2000) Occurrence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, and *Prevotella intermedia* in progressive adult periodontitis. *Journal of Periodontology* **71**, 948–954.
- Lopez, N. J., Socransky, S. S., Da, S. I., Japlit, M. R. & Haffajee, A. D. (2004) Subgingival microbiota of Chilean patients with chronic periodontitis. *Journal of Periodontology* **75**, 717–725.
- Mager, D. L., Haffajee, A. D. & Socransky, S. S. (2003) Effects of periodontitis and smoking on the microbiota of oral mucous membranes and saliva in systemically healthy subjects. *Journal of Clinical Periodontology* **30**, 1031–1037.
- Michalowicz, B. S., Ronderos, M., Camara-Silva, R., Contreras, A. & Slots, J. (2000) Human herpesviruses and *Porphyromonas gingivalis* are associated with juvenile periodontitis. *Journal of Periodontology* **71**, 981–988.
- Mombelli, A., McNabb, H. & Lang, N. P. (1991a) Black-pigmenting gram-negative bacteria in periodontal disease. I. Topographic distribution in the human dentition. *Journal of Periodontal Research* **26**, 301–307.
- Mombelli, A., McNabb, H. & Lang, N. P. (1991b) Black-pigmenting gram-negative bacteria in periodontal disease. II. Screening strategies for detection of *P. gingivalis*. *Journal of Periodontal Research* **26**, 308–313.
- Offenbacher, S., Lief, S., Boggess, K. A., Murtha, A. P., Madianos, P. N., Champagne, C. M., McKaig, R. G., Jared, H. L., Mauriello, S. M., Auten, R. L. Jr., Herbert, W. N. & Beck, J. D. (2001) Maternal periodontitis and prematurity. Part I: obstetric outcome of prematurity and growth restriction. *Annals of Periodontology* **6**, 164–174.
- Sanz, M., Lau, L., Herrera, D., Morillo, J. M. & Silva, A. (2004) Methods of detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* and *Tannerella forsythensis* in periodontal microbiology, with special emphasis on advanced molecular techniques: a review. *Journal of Clinical Periodontology* **31**, 1034–1047.
- Sanz, M., van Winkelhoff, A. J., Herrera, D., Dellemijn-Kippuw, N., Simon, R. & Winkel, E. (2000) Differences in the composition of the subgingival microbiota of two periodontitis populations of different geographical origin. A comparison between Spain and The Netherlands. *European Journal of Oral Sciences* **108**, 383–392.
- Sheiham, A. & Netuveli, G. S. (2002) Periodontal diseases in Europe. *Periodontology* **2000** **29**, 104–121.
- Slots, J. (1982) Selective medium for isolation of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Journal of Clinical Microbiology* **15**, 606–609.
- Slots, J., Feik, D. & Rams, T. E. (1990a) In vitro antimicrobial sensitivity of enteric rods and pseudomonads from advanced adult periodontitis. *Oral Microbiology and Immunology* **5**, 298–301.
- Slots, J., Feik, D. & Rams, T. E. (1990b) Prevalence and antimicrobial susceptibility of Enterobacteriaceae, Pseudomonadaceae and Acinetobacter in human periodontitis. *Oral Microbiology and Immunology* **5**, 149–154.
- Socransky, S. S. & Haffajee, A. D. (1994) Evidence of bacterial etiology: a historical perspective. *Periodontology* **2000** **5**, 7–25.
- Syed, S. A. & Loesche, W. J. (1972) Survival of human dental plaque flora in various transport media. *Applied Microbiology* **24**, 638–644.
- Umeda, M., Chen, C., Bakker, I., Contreras, A., Morrison, J. L. & Slots, J. (1998) Risk indicators for harboring periodontal pathogens. *Journal of Periodontology* **69**, 1111–1118.

Van der Velden, U., Varoufaki, A., Hutter, J. W., Xu, L., Timmerman, M. F., van Winkelhoff, A. J. & Loos, B. G. (2003) Effect of smoking and periodontal treatment on the subgingival microflora. *Journal of Clinical Periodontology* **30**, 603–610.

van Winkelhoff, A. J., Bosch-Tijhof, C. J., Winkel, E. G. & van der Reijden, W. A. (2001) Smoking affects the subgingival microflora in periodontitis. *Journal of Periodontology* **72**, 666–671.

van Winkelhoff, A. J. & Boutaga, K. (2005) Transmission of periodontal bacteria and models of infection. *Journal of Clinical Periodontology* **32**, 16–27.

Wroblewska, M. M., Marchel, H. & Luczak, M. (2002) Multidrug resistance in bacterial isolates from blood cultures of haematology patients. *International Journal of Antimicrobial Agents* **19**, 237–240.

Ximenez-Fyvie, L. A., Almaguer-Flores, A., Jacobo-Soto, V., Lara-Cordoba, M., Moreno-Borjas, J. Y. & Alcantara-Maruri, E. (2006a) Subgingival microbiota of periodontally untreated Mexican subjects with generalized aggressive periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology* **33**, 869–877.

Ximenez-Fyvie, L. A., Almaguer-Flores, A., Jacobo-Soto, V., Lara-Cordoba, M., Sanchez-Vargas, L. O. & Alcantara-Maruri, E. (2006b) Description of the subgingival microbiota of periodontally untreated Mexican subjects: chronic periodontitis and periodontal health. *Journal of Periodontology* **77**, 460–471.

Address:
 David Herrera
 Faculty of Odontology – Universidad
 Complutense
 Plaza. Ramón y Cajal, s/n
 28040 Madrid
 Spain
 E-mail: davidher@odon.ucm.es

Clinical Relevance

Scientific rationale for the study: The subgingival profile of periodontal infections, in different geographical populations, changes independently of the patient clinical status, and it is, therefore, important to carry out an adequate microbiological diagnosis in order to establish a more effective therapy.

Principal findings: Colombian subjects with chronic periodontitis present higher numbers and proportions of *T. forsythia* and Gram-negative enteric rods than Chilean and Spanish subjects. In addition, Spanish subjects showed higher numbers and proportions of *P. intermedia-nigrescens* than Chilean and Colombian subjects.

Practical implications: The microbiological profile of chronic periodontitis patients varies markedly among geographical locations. The results could impact the choice of periodontal therapy and the adjunctive antibiotic selection in subjects living in specific geographic locations or with different ethnic backgrounds.

Artículo 3

Artículo 3:

Oteo A, Herrera D, Figuero E, O'Connor A, González I, Sanz M (2010) Azithromycin as an adjunct to scaling and root planing in the treatment of *Porphyromonas gingivalis* associated periodontitis: a pilot study. J Clin Periodontol;37:1005-1015.

El objetivo de este estudio fue evaluar de forma clínica y microbiológica el efecto de la administración sistémica de azitromicina como coadyuvante al raspado y alisado radicular (RAR) en el tratamiento de periodontitis crónica asociada a *Porphyromonas gingivalis*.

Material y método: Se aleatorizó a veintinueve pacientes portadores de *P. gingivalis* en los grupos test y control. Los pacientes del grupo test recibieron RAR más 500mg de azitromicina al día durante tres días y los pacientes del grupo control recibieron RAR más placebo. Se analizaron variables clínicas (índices de placa y de sangrado, profundidad de sondaje (PS), nivel de inserción clínica (NIC)) y microbiológicas (análisis de cuatro localizaciones por paciente mediante cultivo) al inicio, 1, 3 y 6 meses post tratamiento.

Resultados: Quince pacientes en el grupo test y 11 en el placebo finalizaron el estudio. La PS media disminuyó en el grupo placebo 0.34mm (intervalo de confianza (IC) del 95% 0.19-0.49) y 0.80mm (IC 0.57-1.04) en el grupo test a los 6 meses. La ganancia de inserción clínica media fue de 0.29 (IC 0.08-0.49) y 0.76 (IC 0.46-1.05) respectivamente. La frecuencia de detección de *P. gingivalis* disminuyó significativamente en el grupo test a los 1, 3 y 6 meses.

Conclusiones: Dentro de las limitaciones de este estudio, el uso coadyuvante de azitromicina sistémica en el tratamiento de periodontitis crónica asociada a *P. gingivalis* ha demostrado beneficios significativos tanto clínicos como microbiológicos al compararlo con RAR más placebo.

Azithromycin as an adjunct to scaling and root planing in the treatment of *Porphyromonas gingivalis*-associated periodontitis: a pilot study

Alfonso Oteo¹, David Herrera²,
Elena Figuero^{1,3}, Ana O'Connor³,
Itziar González³ and Mariano Sanz²

¹Section of Graduate Periodontology, Faculty of Odontology; ²Etiology and Therapy of Periodontal Disease (ETEP) Research Group; ³Laboratory of Microbiology, Complutense University, Madrid, Spain

Oteo A, Herrera D, Figuero E, O'Connor A, González I, Sanz M. Azithromycin as an adjunct to scaling and root planing in the treatment of *Porphyromonas gingivalis*-associated periodontitis: a pilot study. J Clin Periodontol 2010; 37: 1005–1015. doi: 10.1111/j.1600-051X.2010.01607.x.

Abstract

Objective: To evaluate the clinical and microbiological effects of systemic azithromycin as an adjunct to scaling and root planing (SRP) in the treatment of *Porphyromonas gingivalis*-associated chronic periodontitis.

Methods: Twenty-nine patients harbouring *P. gingivalis* were randomized into test and placebo groups. Test patients received SRP plus 500 mg of azithromycin per day (3 days), and control patients received SRP plus placebo. Clinical [plaque and bleeding indexes, probing pocket depth (PPD), clinical attachment level (CAL)] and microbiological data (four-sites pooled samples, processed by culture) were collected at baseline, and 1, 3 and 6 months, post-therapy. Clinical variables were compared by ANOVA, and microbiological variables by chi-square, signed-rank and Wilcoxon tests.

Results: Fifteen test and 11 placebo patients completed the study. Mean PPD decreased 0.34 mm [95% confidence interval (CI) 0.19–0.49] in the placebo and 0.80 mm (CI 0.57–1.04) in the test group after 6 months. For mean CAL gain, the correspondent figures were 0.29 (CI 0.08–0.49) and 0.76 (CI 0.46–1.05), respectively. The frequency of detection of *P. gingivalis* decreased significantly ($p \leq 0.01$) in the test group after 1, 3 and 6 months.

Conclusions: Within the limitations of this study, the adjunctive use of systemic azithromycin in the treatment of *P. gingivalis* periodontitis demonstrated significant clinical and microbiological benefits when compared with SRP plus placebo.

Key words: azithromycin; periodontitis; *P. gingivalis*; microbiology; scaling and root planing

Accepted for publication 24 June 2010

Chronic periodontitis is defined as an inflammatory disease of the tooth-supporting tissues caused by specific micro-

Conflict of interest and source of funding statement

The authors declare that they have no conflict of interest.

The research was self-supported by the ETEP Research Group. Placebo and test pills were provided by Pfizer, Alcobendas, Madrid, Spain.

organisms residing in the subgingival biofilm. This chronic inflammation causes progressive destruction of the periodontal ligament and alveolar bone resulting in pocket formation, gingival recession or both (Armitage 1999). The aetiology of periodontitis is multi-factorial, but it is an infection and bacterial species are the primary aetiologic agents. Among the bacterial species present in the subgingival biofilm, only a limited number has been clearly associated with the disease (Socransky &

Haffajee 1997). In this group, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* are known as the most relevant species, due to their strong association with periodontal pathology and their pathogenic potential.

Periodontal diseases can be treated successfully by mechanical therapy. However, in certain diseases and patients, the clinical outcome may be impaired by the presence and persistence of defined periodontal pathogens. The elimination of these pathogens during

the treatment will enhance the clinical response and minimize the risk of future attachment loss (Winkel et al. 1997). However, research has shown that the elimination of these bacterial species is not predictable after mechanical periodontal therapy (Renvert et al. 1990a,b, Winkel et al. 1997). The adjunctive use of systemic anti-microbials has been shown to add relevant benefits (van Winkelhoff et al. 1996, Herrera et al. 2002, Haffajee et al. 2003) in certain patients and conditions, such as aggressive or active forms of periodontitis, severe diseases or diseases associated with specific microbiological profiles (Lindhe & Palmer 2002). Among these specific microbiological profiles, it has been reported that *A. actinomycetemcomitans* can be predictably eradicated with the adjunctive administration of amoxicillin plus metronidazole (Pavicic & van Winkelhoff 1994). However, *A. actinomycetemcomitans*-associated periodontitis is not frequent, and this bacterial species is only frequently found in aggressive periodontitis. Conversely, *P. gingivalis* is more prevalent, especially in chronic periodontitis, and it has also been found more frequently in certain geographical locations, such as in Spain, when compared with other European (Sanz et al. 2000) or American (Herrera et al. 2008b) countries. For *P. gingivalis*-positive patients, the eradication of the pathogen may be a microbiological goal of the periodontal therapy, and the administration of systemic anti-microbial therapy could help to achieve this goal. Among the different anti-microbials available, metronidazole may be a reasonable choice, due to its anti-microbial spectrum. However, metronidazole may have a demanding dosage regime, which may require (when used in the treatment of periodontitis) between 200 and 500 mg, two to four times per day, during 5–14 days (Herrera et al. 2002), and the lack of compliance of some patients may be associated with poorer outcomes (Loesche et al. 1993). In addition, adverse effects, including the interference with alcoholic drinks, may make difficult for some patients the use of this drug (Sharma et al. 2009).

To overcome some of the described limitations of metronidazole, azithromycin may be a good alternative. It is a macrolide antibiotic with a very simple dosage regime (administration once a day, 500 mg, during 3 consecutive days) and limited side effects. This short dosage regime improves patient compli-

ance. Azithromycin has a wide antimicrobial spectrum with in vitro activity against aerobic and anaerobic gram-negative microorganism (Retsema et al. 1987, Willians et al. 1992, Muller et al. 2002) and a long half-life in human serum and periodontal tissues (Foulds et al. 1990, Malizia et al. 1997, Blandizzi et al. 1999, Gomi et al. 2007a). Azithromycin is found in high concentrations in fibroblasts and phagocytes (McDonald & Pruul 1991) and is carried to areas of inflammation as a result of chemotactic effects exerted on the phagocytes (Schentag & Ballow 1991), thus targeting the drug at those sites. Different in vitro (Pajukanta 1993) and in vivo (Herrera et al. 2000) studies have demonstrated the efficacy of azithromycin against *P. gingivalis*.

In the last years, different studies have reported the effects of administering azithromycin in the treatment of periodontitis (Smith et al. 2002, Mascarenhas et al. 2005, Dastoor et al. 2007, Gomi et al. 2007b, Haffajee et al. 2007, Haas et al. 2008, Pradeep et al. 2008, Yashima et al. 2009) reporting different clinical and microbiological outcomes. To our knowledge, no study has assessed the effects of the adjunctive administration of azithromycin plus scaling and root planing (SRP) in *P. gingivalis*-positive patients. Our hypothesis is that patients with *P. gingivalis* will benefit, in terms of reduction in probing pocket depth (PPD) and gain in clinical attachment levels (CAL), together with the elimination of *P. gingivalis* from the adjunctive use of azithromycin, because this drug is effective against this target pathogen, and the effects of mechanical therapy on *P. gingivalis* are not predictable.

Hence, the aim of this pilot investigation was to compare the clinical and microbiological effect of the adjunctive use of azithromycin or placebo with non-surgical periodontal therapy in the treatment of chronic periodontitis patients harbouring *P. gingivalis*.

Material and Methods

This was a pilot, double-blind, placebo-controlled, randomized clinical trial. The protocol was approved by the local ethical committee at the Hospital Clínico San Carlos, Madrid, Spain.

Patients

A microbiological screening to detect *P. gingivalis*-positive patients was per-

formed in moderate chronic periodontitis patients, seeking for periodontal treatment at the Postgraduate Clinic of Periodontology, Faculty of Odontology, University Complutense, Madrid, Spain. The screening period lasted from January 2003 to July 2004.

Patients had to fulfill the following inclusion criteria: (i) older than 30 years, (ii) untreated moderate chronic periodontitis (Armitage 1999) with radiographic evidence of generalized alveolar bone loss >30%, (iii) presence of at least one pocket with PPD >5 mm per quadrant with bleeding on probing (BoP), (iv) presence of at least three teeth per quadrant and (v) detection of *P. gingivalis* in subgingival samples taken at the screening visit and processed by culture.

Patients were excluded if (i) they had received periodontal treatment in the last 3 years, (ii) severe periodontitis with more than one tooth with a site with PPD >7 mm per quadrant except if it was scheduled for extraction, (iii) antibiotic intake in the month previous to the screening visit, (iv) pregnant or lactating females, (v) chronic diseases as diabetes, (vi) necrotizing periodontal diseases, (vii) HIV infection, (viii) use of non-steroidal anti-inflammatory drugs or (ix) intolerance or allergy to any of Zitromax[®] (Pfizer, Alcobendas, Madrid, Spain) components.

Microbiological samples

From each quadrant, the most accessible site with the deepest PPD and BoP was selected. Clinical variables (presence of plaque, bleeding on sampling, PPD and gingival recession) were specifically recorded at these sites, in addition to full-mouth clinical recording. Samples were taken with two consecutive sterile medium paper-points (Maillefer, Ballaigues, Switzerland) per site. Subgingival plaque was sampled after the removal of all supragingival plaque and debris (Wikstrom et al. 1991). Before sampling, the sites were isolated from the saliva by applying cotton rolls and then gently dried with compressed air, in order to avoid contamination. The paper-points were kept in place for 10 s and were then transferred into a screw-capped vial, containing 1.5 ml of RTF (Syed & Loesche 1972). Samples were transferred to the microbial laboratory within 2 h, where they were homogenized by vortexing for 30 s (Dahlen et al. 1990), and serially diluted in PBS.

At the laboratory, aliquots of 0.1 ml were plated manually for the detection of *A. actinomycetemcomitans* on the specific medium Dentaaid-1 (Dentaid, Cerdanyola del Vallés, Spain) (Alsina et al. 2001). These plates were incubated for 3 days in air with 5% CO₂ at 37°C. Suspected isolates were identified on the basis of colony morphology (small colony, 1 mm in diameter, with a dark border and a 'star' or 'crossed cigars' shaped inner structure) and positive catalase reaction. Sample dilutions were also plated onto a non-selective blood agar plate (Blood Agar Base II[®], Oxoid, Basingstoke, UK), supplemented with haemine (5 mg/l), menadione (1 mg/l) and 5% sterile horse blood. After 7–14 days of anaerobic incubation (80% N₂, 10% CO₂ and 10% H₂), total counts and counts of representative colonies (those with colony morphologies compatible with target pathogen morphology) were performed in the most suitable plates, those harbouring between 30 and 300 colonies. Suspected colonies were further identified by microscopy, studying gram staining and enzyme activity (including *N*-acetyl- β -D-glucosaminidase, α -glucosidase, α -galactosidase, α -fucosidase, esculin, indole and trypsin-like activity). Counts were transformed in colony-forming units per millilitre of the original sample. Total anaerobic counts were calculated, as well as counts of the detected periodontal pathogens (*A. actinomycetemcomitans*, *Tannerella forsythia*, *P. gingivalis*, *Prevotella intermedia/nigrescens*, *Parvimonas micra*, *Campylobacter rectus* and *Fusobacterium nucleatum*). In addition to the quantitative microbiological data, the frequency of detection and proportions for each bacterial species were also calculated.

To assess microbiological adverse effects, the overgrowth of other species, mainly super-infecting or opportunistic bacteria, such as enterics, was monitored, especially in Dentaaid-1 plates.

Study visits

Screening visit

A full-mouth periodontal evaluation was performed in order to assess the inclusion/exclusion criteria and to select the sampling sites. For consecutive patients fulfilling the inclusion criteria, the purpose of the study was explained and they were asked to participate by signing an Internal Review Board-approved

written consent. They were informed that participation would only occur if they were positive for *P. gingivalis*. If negative, they were conventionally treated. If the microbiological sample was positive, patients were scheduled for the baseline visit. The microbiological sample of the screening visit was then considered as the baseline sample.

Baseline visit

All clinical outcome variables were recorded using the Florida Probe System[®] (Florida Company, Gainesville, FL, USA) by one single trained (2 years of previous experience with Florida probe) and calibrated operator (A. O.). Intra-examiner calibration was performed twice, before and during the study, by assessing PPD and CAL in duplicate, with a degree of agreement within ± 1 mm higher than 85% at both tests.

A baseline visit was appointed and the following outcome variables were assessed:

- PPD and recession (REC) in millimetres at six sites per tooth in all teeth, excluding third molars. CAL calculated as the sum of PPD and REC.
- BoP, as present/absent 30 s after probing, and plaque index (PII), as present/absent, visually or detected with the probe, at six sites per tooth in all teeth except third molars.
- Relative attachment level (RAL) was evaluated at four selected sites (those selected for microbiological sampling) with the stent probe (Florida Probe[®]) and the use of a customized acrylic stent.

At this visit, standardized oral hygiene instructions were explained, including the use of a manual toothbrush and inter-dental brushes (Vitis Access soft[®] and Interprox[®], Dentaid).

Treatment visits

Within 15 days from baseline, the first appointment for SRP was scheduled, and the treatment was performed under local anaesthesia by a post-graduate student (A. O.) using an ultrasonic device and hand curettes. Treatment was carried out in two 1.5-h appointments, within 7 days. Oral hygiene instructions were reinforced at each visit

and the adjunctive use of a 0.12% chlorhexidine and 0.05% cetyl-pyridinium chloride rinse (Perio Aid Tratamiento[®], Dentaid) was prescribed twice a day for 15 days, with 15 ml for 30 s, immediately after rinsing with water after brushing.

After the last SRP session, the adjunctive medication was prescribed. By means of a computer-generated randomization list, stratified for smokers (> 10 cigarettes per day) and non-smokers (non-smokers, former smokers or smokers of < 10 per day), sealed envelopes provided identification numbers for the patients, which were associated with the numbers of the blisters containing either the drug or the placebo. Subjects in the test group received a blister containing three 500 mg azithromycin tablets, and the control group received identical blisters with three placebo tablets. Test and control tablets were identical in colour, form and size. Codes were not open until the study was finished. The subjects were instructed to take one tablet in the presence of the operator, and to take the other two tablets the following 2 days at same moment of the day and in the hours away from the meals.

Follow-up visits

One month after treatment, the first follow-up visit was scheduled. Microbiological samples were taken as described previously (from the same sites selected at baseline), clinical parameters were recorded both full mouth and at the selected sites and subjects were asked if they have had any kind of problem with the medication and if they had taken the remaining two pills. In addition, oral hygiene instructions were reinforced. New follow-up visits were scheduled 3 and 6 months after treatment, for microbiological sampling and clinical evaluation.

Statistical analyses

Primary outcome variable was PPD changes. Secondary outcome variables include changes in CAL, BoP, RAL and microbiological variables, especially the presence/absence of *P. gingivalis*. PII was evaluated as a control variable.

Clinical variables (PII, BoP, PPD, CAL and RAL) were calculated by patient and visit and then by group. In addition, PPD was divided in two categories (1–3 and 4–6 mm) and the

proportions of each category were calculated at each visit. After evaluating the normality of the distribution (assessing skewness and kurtosis, and the Kolmogorov–Smirnov test), and whether significant differences existed between variances (*F*-test), ANOVA and the multiple rank test were used to compare the baseline visit with the 1-, 3- and 6-month visits (intra-group comparisons), and ANCOVA was selected to compare both groups, either at baseline or in changes baseline follow-up visits (inter-group comparison), including baseline values of the examined variable, smoking and gender as cofactors.

Four microbiological variables were used: total anaerobic counts, frequency of detection of target pathogens, counts of each studied pathogen and proportions of flora of each pathogen. Total anaerobic counts were log transformed to fit a normal distribution and the statistical evaluation was carried out as described for the clinical variables. Frequencies of detection were compared using the chi-square test in the inter-group assessment, at baseline and at each follow-up visit, or by the McNemar test for intra-group assessment, in changes between baseline and follow-up visits. Proportions of flora and log-transformed pathogen counts were compared using the Wilcoxon signed-rank test (intra-group) or by the Wilcoxon rank-sum test for inter-group assessment.

The level of statistical significance was set at $p < 0.05$. However, because multiple comparisons were carried out for the inter-group assessment, the Bonferroni correction was used. Thus, the inter-group assessment of changes baseline with every follow-up visit include three comparisons, the level was set $p < 0.0167$. When the p value was in between the corrected level and 0.05, it was considered as a tendency towards significance.

Sample size calculation was performed for the primary outcome variable, changes in PPD, considering a standard deviation of 0.8 mm and a desirable difference between groups of 1.02 mm, with a 90% of power, resulting in sample of 14 patients per arm (Herrera et al. 2002, Haffajee et al. 2003, Guerrero et al. 2005). However, this study was considered as a pilot study, because (to our knowledge) no previous studies have been performed on *P. gingivalis*-positive patients.

Demographic variables at baseline were compared by means of *t*-test

(age) or Fisher's exact test (smoking and gender).

Results

After the microbiological screening of 40 patients, 29 patients were included in the study and scheduled for the baseline visit (see Fig. 1 for the flowchart of the study and Table 1 for the main characteristics of the patient sample at baseline). At the end of the baseline evaluation, 15 patients were randomized to the test group (seven males and eight females; eight smokers and seven non-smokers; mean age 46.6, range 38–62). All of them were treated according to the protocol and complied with the follow-up visits, with the exception of two patients (one male and one female, both smokers) that could not attend the 3-month visit. Fourteen patients were assigned to the placebo group, but one left the study after a partial baseline evaluation and the data were excluded. Out of the 13 patients who were treated (eight males and five females; six smokers and seven non-smokers; mean age 46.9, range 37–65), two patients provided only data at the baseline visit (one non-smoker male had to take a systemic antibiotic due to another disease and one non-smoker female left the study after the treatment phase was finished, due to personal reasons). Data from 11 patients were available at 1-month and 6-month visits, because two patients (smokers male) of this group missed the 3-month visit. An intention-to-treat analysis was carried out.

Clinical variables

Mean values at each study visit are shown in Table 2, and changes between baseline and each follow-up visit are shown in Table 3.

PPD

Both groups were comparable at baseline, with mean PPD ranging between 2.84 and 2.99 mm. The proportion of the sites with PPD of 4–6 mm ranged between 24 and 29%. Mean PPD significantly decreased in the test group ($p < 0.001$) after 1, 3 or 6 months. The reduction amounted 0.78 mm [95% confidence interval (CI) 0.59–0.97] after 6 months in the test group and 0.38 mm (CI 0.16–0.60) in the placebo group,

being the difference between groups statistically significant ($p = 0.009$).

The proportion of pockets in the 1–3 mm category increased in both groups, reaching statistical significance in the test group ($p < 0.001$) for all follow-up visits. The increase was 10% after 6 months in the placebo group and 24% in the test group, with statistically significant inter-group differences in the changes ($p = 0.005$). The reduction in the percentage of pockets in 4–6 mm category was 20% in the test group after 6 months, while the placebo group showed 11%. Inter-group differences were significant ($p = 0.003$).

CAL and RAL

Both groups were comparable at baseline, with mean CAL ranging 3.46–3.56 mm. A significant gain in mean CAL was observed ($p = 0.004$) when comparing baseline with the other study visits in the test group. Changes in the placebo group were not significant. Significant inter-group differences were detected for changes at baseline–1 month ($p = 0.015$) and tendencies were observed for changes after 3 ($p = 0.026$) and 6 months ($p = 0.016$).

Placebo patients demonstrated an increase in RAL at every follow-up visit, totaling a loss of 0.23 mm after 6 months. Conversely, a relative gain was observed in the test group. No significant inter- or intra-group differences were detected.

PII

Mean PII showed a tendency towards significant differences at baseline ($p = 0.022$) due to the higher levels in the test group (88.5 versus 63.4%). Statistically significant reductions were observed in both groups after treatment ($p < 0.001$ for each follow-up visit), although the 6-month levels were still higher in the test group (32.9%) than in the placebo group (15.4%), and differences were not significant. No significant inter-group differences were detected.

BoP

Mean BoP showed significant differences at baseline ($p = 0.004$) due to the higher levels in the test group (54.5 versus 38.6%). Significant reductions were observed in both groups after treatment ($p < 0.001$), ranging from 35

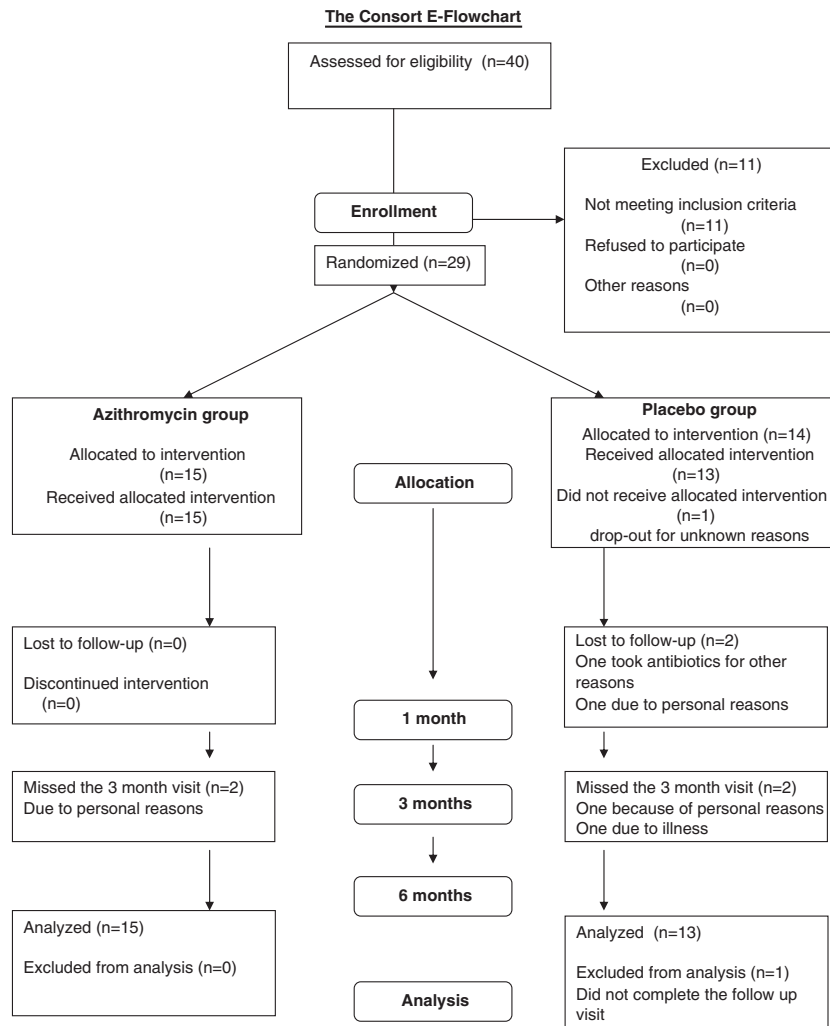


Fig. 1. The consort E-flowchart.

to 39% in the test group and 19–24% in the placebo group. No significant inter-group differences in the changes detected.

Adverse events

One patient in the test group reported diarrhoea probably associated with the study medication. No adverse events were reported in the control group.

© 2010 John Wiley & Sons A/S

Table 1. Demographic features of the selected sample

	Placebo	Test	<i>p</i> Value
<i>n</i>	13	15	
Females (<i>n</i>)	5	8	0.4757*
Smokers (<i>n</i>)	6	8	1.000*
Age mean (range) (years)	47.1 (36–65)	46.6 (38–62)	0.929†

*Fisher's exact test.

†Student's *t*-test.

Table 2. Mean values, standard error (SE) and 95% confidence intervals (CI) of clinical variables at study visits and intra-group comparison (ANOVA and multiple rank test)

Variables	Visit	Test				Placebo				
		mean	SE	95% CI	ANOVA	mean	SE	95% CI	ANOVA	
PPD (mm)	Baseline	2.99	0.11	2.83	3.14	2.84	0.14	2.65	3.04	$p = 0.2597$, no differences
	1 month	2.18	0.11	2.03	2.34	2.62	0.15	2.41	2.84	
	3 months	2.07	0.12	1.90	2.24	2.42	0.17	2.18	2.66	
CAL (mm)	Baseline	2.18	0.11	2.03	2.34	2.57	0.15	2.35	2.78	$p = 0.5349$, no differences
	1 month	3.46	0.18	3.21	3.71	3.56	0.31	3.12	4.00	
	3 months	2.73	0.18	2.48	2.98	3.53	0.33	3.05	4.01	
PPD 1–3 mm (%)	Baseline	2.58	0.19	2.31	2.85	2.91	0.37	2.38	3.44	$p = 0.182$, baseline versus 3-month visit
	1 month	2.70	0.18	2.45	2.95	3.32	0.33	2.84	3.79	
	3 months	0.66	0.03	0.63	0.70	0.72	0.04	0.66	0.78	
PPD 4–6 mm (%)	Baseline	0.90	0.03	0.87	0.94	0.78	0.04	0.72	0.85	$p = 0.268$, no differences
	1 month	0.92	0.03	0.88	0.95	0.86	0.05	0.79	0.93	
	3 months	0.90	0.03	0.86	0.94	0.80	0.04	0.73	0.86	
PII (%)	Baseline	0.29	0.02	0.25	0.32	0.24	0.04	0.18	0.30	$p < 0.001$, baseline versus other visits
	1 month	0.09	0.02	0.06	0.13	0.19	0.04	0.13	0.26	
	3 months	0.07	0.03	0.03	0.10	0.12	0.05	0.05	0.19	
BoP (%)	Baseline	0.08	0.02	0.04	0.11	0.17	0.04	0.11	0.23	$p < 0.001$, baseline versus other visits
	1 month	88.50	6.02	79.89	97.10	63.41	6.70	53.78	73.04	
	3 months	19.09	6.02	10.48	27.69	22.24	6.36	13.10	31.38	
RAL (mm)	Baseline	27.04	6.96	17.10	36.97	15.48	6.70	5.84	25.11	$p < 0.001$, baseline versus other visits
	1 month	32.90	6.02	24.29	41.50	15.45	6.36	6.31	24.59	
	3 months	54.52	3.45	49.59	59.44	38.62	2.65	34.81	42.42	
RAL (mm)	Baseline	17.92	3.45	12.99	22.84	16.54	2.51	12.93	20.15	$p = 0.9179$, no differences
	1 month	17.00	3.98	11.31	22.68	16.74	2.65	12.93	20.55	
	3 months	19.25	3.45	14.32	24.17	20.31	2.51	16.70	23.92	
RAL (mm)	Baseline	8.57	0.39	8.02	9.12	8.85	0.56	8.05	9.64	$p = 0.9179$, no differences
	1 month	8.07	0.37	7.54	8.60	8.40	0.64	7.49	9.31	
	3 months	7.92	0.40	7.35	8.49	8.78	0.67	7.82	9.74	
RAL (mm)	Baseline	8.40	0.37	7.87	8.93	9.00	0.61	8.13	9.87	$p = 0.9179$, no differences
	1 month	8.40	0.37	7.87	8.93	9.00	0.61	8.13	9.87	
	3 months	8.40	0.37	7.87	8.93	9.00	0.61	8.13	9.87	

CAL, clinical attachment level; PPD, probing pocket depth in mm; PPD 1–3 mm (%), mean proportion of pockets in the 1–3 mm category; PPD 4–6 mm (%), mean proportion of pockets in the 4–6 mm category; PII, plaque index; BoP, bleeding on probing; RAL, relative attachment level.

Microbiological variables

Out of the 15 test patients, 15 samples were available at baseline and after 1 month, 13 after 3 months and 14 after 6 months. Out of the 13 placebo patients, 13 samples were available at baseline, 12 after 1 month and 10 samples at the 3- and 6-month visits.

Total anaerobic counts (Table 4a and b)

Comparable counts in log of colony-forming units were recovered at baseline (7.07–7.18). Both groups demonstrated reductions that amounted 0.24 in the placebo group and 0.54 in the test group (significantly different as compared with baseline). No inter-group significant differences were detected at any visit or in changes between visits.

Frequency of detection of target pathogens (Table 5)

No significant differences were detected at baseline in frequencies of detection of target pathogens. However, test patients harboured more frequently *T. forsythia* and *C. rectus*, while placebo patients had more *P. micra*, *P. intermedia* and *F. nucleatum* demonstrating prevalences close to 100% (as *P. gingivalis* did, as inclusion criteria). *A. actinomycetem-comitans* was detected in 23.1% in the placebo and 13.3% in the test group.

The prevalence of *P. gingivalis* decreased significantly after 1 ($p < 0.001$), 3 ($p = 0.003$) and 6 months ($p = 0.001$), with a 6-month frequency of 42.9%. Non-significant reductions were observed in the placebo, with a tendency after 1 month ($p = 0.023$), and a 6-month prevalence of 80%.

P. intermedia prevalence was significantly reduced after 1 month ($p = 0.001$) in the test group, from 100.0 to 46.7%. Reductions were also observed in the placebo samples after 1 month, from 92.3 to 75%. After 3 months, prevalences rose again and were always over 80%.

T. forsythia was not detected after the treatment in the test group, at 1 ($p = 0.004$), 3 ($p = 0.010$) and 6 months ($p = 0.006$). Minor changes were observed in the placebo group.

P. micra prevalence was clearly reduced after 1 month in the test group, while an increase was observed in the placebo group. A rebound was observed later, making final values in the test group even higher than at baseline.

In the test group, *A. actinomycetem-comitans* was not detected after 1 and 6

Table 3. Mean values, standard error (SE) and 95% confidence intervals (CI) of changes of clinical variables between visits and inter-group comparison (ANCOVA, with treatment as factor and baseline value, smoking and gender as cofactors; significant cofactors are listed)

Variables	Change	Group	Mean	SE	95% CI	<i>p</i> Value	Cofactors	
PPD (mm)	Baseline versus 1 month	Placebo	0.30	0.11	0.06	0.54	0.004	Baseline PPD
		Test	0.80	0.10	0.59	1.00		
	Baseline versus 3 months	Placebo	0.45	0.09	0.26	0.64	0.005	Baseline PPD, smoking
		Test	0.83	0.07	0.67	0.99		
	Baseline versus 6 months	Placebo	0.38	0.11	0.16	0.60	0.009	Baseline PPD
		Test	0.78	0.09	0.59	0.97		
CAL (mm)	Baseline versus 1 month	Placebo	0.07	0.19	-0.32	0.46	0.015	None
		Test	0.73	0.16	0.40	1.06		
	Baseline versus 3 months	Placebo	0.34	0.13	0.06	0.62	0.026	Baseline CAL, smoking
		Test	0.77	0.11	0.53	1.00		
	Baseline versus 6 months	Placebo	0.28	0.14	0.00	0.57	0.016	Baseline CAL, smoking
		Test	0.76	0.12	0.52	1.01		
PPD 1–3 mm (%)	Baseline versus 1 month	Placebo	-0.10	0.04	-0.18	-0.01	0.016	Baseline %
		Test	-0.23	0.03	-0.30	-0.16		
	Baseline versus 3 months	Placebo	-0.16	0.02	-0.19	-0.12	0.009	Baseline %, smoking
		Test	-0.22	0.01	-0.25	-0.19		
	Baseline versus 6 months	Placebo	-0.11	0.03	-0.17	-0.06	0.005	Baseline %
		Test	-0.23	0.02	-0.28	-0.18		
PPD 4–6 mm (%)	Baseline versus 1 month	Placebo	0.07	0.04	0.00	0.15	0.027	Baseline %
		Test	0.19	0.03	0.12	0.26		
	Baseline versus 3 months	Placebo	0.14	0.01	0.11	0.17	0.005	Baseline %, smoking
		Test	0.20	0.01	0.18	0.23		
	Baseline versus 6 months	Placebo	0.11	0.02	0.06	0.15	0.003	Baseline %
		Test	0.20	0.02	0.17	0.24		
RAL (mm)	Baseline versus 1 month	Placebo	0.02	0.30	-0.61	0.65	0.329	None
		Test	0.42	0.26	-0.12	0.95		
	Baseline versus 3 months	Placebo	-0.09	0.26	-0.63	0.45	0.067	None
		Test	0.57	0.22	0.10	1.04		
	Baseline versus 6 months	Placebo	-0.23	0.27	-0.79	0.32	0.346	None
		Test	0.11	0.24	-0.38	0.60		
PII (%)	Baseline versus 1 month	Placebo	46.70	8.12	29.49	63.92	0.158	None
		Test	63.90	6.83	49.41	78.39		
	Baseline versus 3 months	Placebo	60.27	7.97	42.90	77.64	0.432	Baseline PII
		Test	50.36	7.41	34.22	66.49		
	Baseline versus 6 months	Placebo	61.65	8.17	44.32	78.98	0.183	Baseline PII
		Test	45.39	6.88	30.80	59.97		
BoP (%)	Baseline versus 1 month	Placebo	30.15	3.49	22.76	37.54	0.953	Baseline GI, gender
		Test	30.45	2.93	24.25	36.66		
	Baseline versus 3 months	Placebo	31.83	2.85	25.61	38.04	0.978	Baseline GI
		Test	31.71	2.65	25.93	37.48		
	Baseline versus 6 months	Placebo	24.55	4.66	14.67	34.43	0.331	Baseline GI
		Test	31.27	3.91	22.98	39.57		

CAL, clinical attachment level; PPD, probing pocket depth in mm; % PPD 1–3 mm, mean proportion of pockets in the 1–3 mm category; % PPD 4–6 mm, mean proportion of pockets in the 4–6 mm category; PII, plaque index; BoP, bleeding on probing; RAL, relative attachment level.

months, and only one patient was positive after 3 months. Conversely, no impact of treatment was observed in the placebo group.

No significant impact was observed with regard to other target pathogens.

Significant inter-group differences were detected at the 1-month visit for *P. gingivalis* ($p = 0.004$) and *P. micra* ($p < 0.001$), and the 6-month visit for *A. actinomycetemcomitans* ($p = 0.010$).

Proportions of flora of target pathogens (Table 5)

No significant differences were detected at baseline in proportions of flora of target

pathogens. However, test patients harboured higher proportion (11.4 versus 4.3%; tendency towards significance, $p = 0.032$) of *P. intermedia*. *P. gingivalis* represented the highest proportion of the flora in both groups (21.5% in placebo and 17.7% in test samples). Higher proportions of *P. micra* were observed in the placebo group (4.4 versus 1.3%). Proportions of other pathogens were similar at baseline.

Proportions of *P. gingivalis* were significantly reduced in the test group after 1 ($p = 0.002$) and 3 months ($p = 0.006$), and showed a tendency after 6 months ($p = 0.021$), with a final figure of 5.1%. In the placebo group, some non-significant reductions were

observed after 1 month, but baseline values were achieved at 3 and 6 months.

The percentage of the flora of *P. intermedia* was reduced in the test group, being significant after 6 months ($p = 0.010$) with a final percentage of 2.2%. In the placebo group, an increase was initially observed, and then a return to baseline values after 6 months.

For *P. micra*, a non-significant increase in the proportions was observed in the test group after 6 months, as compared with some reductions in the placebo patients.

For other pathogens, non-significant limited changes were observed in proportions of flora.

Table 4a. Mean values, standard error (SE) and 95% confidence intervals (CI) of log of colony-forming units at study visits and intra-group comparison (ANOVA and multiple rank test)

Visit	Test				Placebo				
	mean	SE	95% CI	ANOVA	mean	SE	95% CI	ANOVA	
Baseline	7.18	0.15	6.88	7.47	7.07	0.16	6.75	7.40	$p = 0.511$
1 month	6.79	0.14	6.51	7.07	6.72	0.17	6.38	7.06	no differences
3 months	6.81	0.16	6.50	7.13	6.96	0.18	6.59	7.34	
6 months	6.62	0.15	6.33	6.92	6.92	0.19	6.53	7.32	

Table 4b. Mean values, standard error (SE) and 95% confidence intervals (CI) of changes in log of colony-forming units between visits and inter-group comparison (ANCOVA, with treatment as factor and baseline value as cofactors; significant cofactors are listed)

Change	Group	Mean	SE	95% CI	p Value	Cofactors
Baseline versus 1 month	Placebo	0.40	0.18	0.02	0.79	Baseline
	Test	0.32	0.17	-0.03	0.67	
Baseline versus 3 months	Placebo	0.22	0.13	-0.06	0.50	Baseline
	Test	0.42	0.13	0.16	0.69	
Baseline versus 6 months	Placebo	0.24	0.20	-0.17	0.66	Baseline
	Test	0.54	0.16	0.20	0.87	

Table 5. Frequency of detection (in percentage) and mean proportions of flora (in percentage) of different periodontal pathogens in subgingival samples, at every study visit

	Aa	Pg	Pi	Tf	Pm	Cr	Fn	Capno	Ec	Eu
Frequency of detection										
Placebo										
Baseline	23.1	100.0	92.3	15.4	69.2	15.4	92.3	7.7	0.0	0.0
1 month	16.7	66.7	75.0	16.7	91.7	16.7	100.0	8.3	0.0	0.0
3 months	20.0	80.0	100.0	20.0	70.0	20.0	100.0	10.0	20.0	0.0
6 months	40.0	80.0	80.0	10.0	60.0	30.0	80.0	10.0	10.0	0.0
Test										
Baseline	13.3	100.0	100.0	40.0	46.7	40.0	100.0	0.0	0.0	0.0
1 month	0.0	13.3	46.7	0.0	20.0	20.0	93.3	26.7	13.3	6.7
3 months	7.7	53.8	92.3	0.0	69.2	7.7	100.0	30.8	15.4	0.0
6 months	0.0	42.9	85.7	0.0	71.4	14.3	100.0	35.7	21.4	0.0
Mean proportions of flora										
Placebo										
Baseline	0.0	21.5	4.3	0.7	4.4	0.2	6.5	0.2	0.0	0.0
1 month	0.0	11.6	10.6	0.3	6.6	0.5	7.4	0.0	0.0	0.0
3 months	0.0	19.6	10.3	0.7	2.4	0.6	3.9	0.0	0.1	0.0
6 months	0.6	22.7	4.0	0.9	2.3	0.5	4.9	0.0	0.0	0.0
Test										
Baseline	0.0	17.7	11.4	1.2	1.3	0.3	4.9	0.0	0.0	0.0
1 month	0.0	0.3	3.9	0.0	0.3	0.8	4.5	0.3	0.3	0.1
3 months	1.5	2.9	5.5	0.0	3.0	1.1	8.1	0.4	0.1	0.0
6 months	0.0	5.1	2.2	0.0	5.4	0.3	7.5	0.5	0.2	0.0

Aa, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*; Pg, *Porphyromonas gingivalis*; Pi, *Prevotella intermedia*; Tf, *Tannerella forsythia*; Pm, *Parvimonas micra*; Cr, *Campylobacter rectus*; Fn, *Fusobacterium nucleatum*; Capno, *Capnocytophaga* sp.; Ec, *Eikenella corrodens*; Eu, *Eubacterium* sp.

Inter-group comparisons revealed that the proportions of *P. gingivalis* at the 1-month visit showed a tendency towards statistical significance ($p = 0.019$).

Discussion

The present randomized-controlled trial compared the clinical and microbiologi-

cal effects of the adjunctive use of azithromycin or placebo with SRP in moderate chronic periodontitis patients harbouring *P. gingivalis*. The clinical results revealed clear differences between the test and the control groups. After 6 months, the PPD reduction was 0.80 mm in the test group and 0.34 mm in the control group. CAL gains after 6 months were 0.76 and 0.29 mm, respectively. In addition, significant differ-

ences in microbiological outcomes were also detected, specifically those related with *P. gingivalis*. Conversely, no adverse events were observed, except mild diarrhoea in one test patient.

These results, however, should be interpreted with caution due to some relevant limitations. Only 15 patients in the test group and 11 patients in the placebo group provided data for 6-month visit, and this may be considered as a limited sample size. Moreover, the drop-outs in the control group caused differences in size between both groups. Also, the effect of smoking in the results could not be properly assessed. An effort to control this variable was made by stratification in the randomization process, selecting a threshold of 10 cigarettes per day, because previous studies have failed to find significant differences in periodontal disease severity between non-smokers and patients who consumed <10 cigarettes per day (Martinez-Canut et al. 1995). Moreover, smoking was included as a cofactor in the statistical analyses. Finally, it is important to consider the lack of homogeneity between groups in terms of baseline (statistically significant, $p = 0.022$) and 6-month (non-significant) plaque levels, which may hamper the comparison between groups. This factor has been assessed previously by Kornman et al. (1994), concluding that supragingival plaque control is an essential factor in attaining certain clinical and microbial outcomes following systemic antibiotic therapy in periodontitis. In the present study, the test group achieved significant better clinical and microbiological results, despite the fact that plaque levels were higher at baseline and after 6 months than in the control patients. It can be speculated that the differences could have been higher if the plaque control was homogeneous in both groups. Other baseline difference detected corresponded to higher BoP levels in the test group ($p = 0.004$).

To the best of our knowledge, this is the first study in which azithromycin has been evaluated as an adjunct to SRP in patients with a specific microbiological profile. Other authors have followed previously a similar strategy (selection of patients with a specific microbiological profile, in order to prescribe an adequate drug) with other anti-microbials: a pre-defined proportion of spirochaetes when assessing metronidazole (Loesche et al. 1984); presence of *A. actinomycetemcomitans* or *P. gingivalis*

when assessing amoxicillin plus metronidazole (Flemmig et al. 1998); or *A. actinomycetemcomitans* and metronidazole in localized juvenile periodontitis (Saxen & Asikainen 1993). All the above-mentioned studies have in common excellent outcomes in the test groups, suggesting better results of adjunctive systemic antibiotics if the target pathogen has been identified previously (Herrera et al. 2002).

The patients selected for the present study, besides the presence of *P. gingivalis*, had the diagnosis of moderate chronic periodontitis, thus excluding severe patients that would clearly be in need of periodontal surgery after SRP. In consequence, the selected patients had a mean initial PPD of 2.99 mm for the test and 2.84 mm for the control group, which can be considered as a relatively low PPD, and hence the expected PPD reductions will be smaller when compared with other studies selecting patients with a deeper initial mean PPD. Previous studies have demonstrated that the additional benefit of antibiotics is more evident in deep sites (Herrera et al. 2002, Guerrero et al. 2005, Haffajee et al. 2007). With the administration of azithromycin adjunctive to SRP, different studies have rendered different results depending on baseline PPDs. In a clinical trial with aggressive periodontitis patients assessing clinical outcomes at 1 year (Haas et al. 2008), with initial PPDs 6.7–6.3 mm, the PPD reduction was 2.88–1.85 mm (for test and placebo patients, respectively). With baseline PPD of around 5 mm, the observed change was 1.60–1.10 mm (Yashima et al. 2009), while with around 4 mm, changes were 1.62–0.75 mm (Gomi et al. 2007b), or 1.33–0.45 mm (Mascarenhas et al. 2005). Other studies, however, have failed to find significant clinical differences when comparing SRP plus azithromycin versus SRP plus placebo (Smith et al. 2002) or SRP plus metronidazole, sub-anti-microbial doses of doxycycline or SRP alone (Haffajee et al. 2007). In these two studies, debridement was completed within 2 (Smith et al. 2002) or 3 weeks (Haffajee et al. 2007), while in the rest of studies that reported positive results for adjunctive azithromycin, debridement was completed within 1 week (Mascarenhas et al. 2005, Gomi et al. 2007b, Pradeep et al. 2008, Yashima et al. 2009), with the exception of one study, in which debridement was carried out in multiple

visits on a quadrant/sextant basis within 14 days (Haas et al. 2008).

The influence of the strategy of debridement is a matter of controversy. In a recent consensus review, it was concluded that the quality and the chronology of the debridement may affect the results of the adjunctive use of systemic anti-microbials (Herrera et al. 2008a). When specifically evaluating the results of clinical trials with the use of adjunctive azithromycin, a recent study comparing ‘‘full-mouth’’ (within 24 h) versus ‘‘partial-mouth’’ (within 7 days) SRP during the effective half life of systemically administered azithromycin concluded that both treatment protocols were equally effective clinically and microbiologically (Yashima et al. 2009). In the present study, periodontal treatment was completed in two visits within 7 days and systemic administration of azithromycin started on the last treatment day, as recommended in a recent consensus (Herrera et al. 2008a, Sanz & Teughels 2008). As azithromycin concentration in inflamed periodontal tissues decreases from 50% after 7 days to 20% after 14 days (Gomi et al. 2007a), not exceeding this time period when completing debridement seems to be important to enhance positive results, and it seems reasonable to try to complete treatment within 7 days rather than 14, to benefit from the much higher concentration of drug found in periodontal tissues. In addition, the recommended administration of azithromycin provides an easy dosage, while the reported adverse events are very low (in 0.7% of the patients) (Contopoulos-Ioannidis et al. 2001). In the present study, only one patient reported mild diarrhoea related to azithromycin intake.

The selection of azithromycin dosage may be controversial, because the approved dosages in the United States (5-day regime, first dose of 500 mg and then 250 mg daily) and in Europe (3-day regime of 500 mg daily) were different. Both regimens have demonstrated clinical benefits when compared with 10-day courses of other antibiotics in the treatment of respiratory infections, while the 3-day regime has proven better results as compared with the 5-day course, when bacterial cure rate was analysed (Casey & Pichichero 2005). As the present study was conducted in Europe, the 3-day, 500 mg/day, regime was selected, which is also the most commonly evaluated in the periodontal

literature (Smith et al. 2002, Dastoor et al. 2007, Gomi et al. 2007b, Haffajee et al. 2007, Haas et al. 2008, Yashima et al. 2009), while less studies have evaluated the 5-day regime (Mascarenhas et al. 2005).

Uncontrolled use of anti-microbials is of great health concern due to the increasing bacterial resistance, thus resulting in different bacterial antibiotic susceptibility profiles in different European countries according to more or less prescription control (van Winkelhoff et al. 2005). In order to optimize the use of anti-microbials to only those subjects who would benefit most, all the subjects included in the present study harboured *P. gingivalis* irrespective of the other bacteria detected. After treatment, *P. gingivalis* detection was significantly reduced in the test group at 1-, 3- and 6 months; conversely, in the control group, the decrease in *P. gingivalis* was less pronounced after 1 month and rebounded at 3 and 6 months. Previous studies also found significant reductions of *P. gingivalis* after 1 and 3 months (Sefton et al. 1996, Mascarenhas et al. 2005, Gomi et al. 2007b, Yashima et al. 2009), with rebounds after 5 months (Sefton et al. 1996), 6 months (Gomi et al. 2007b) or 9 months (Yashima et al. 2009), while others did not find any significant impact (Haffajee et al. 2008). With regard to *T. forsythia*, in our study, the frequency of detection was 40% at baseline, and it was not detected at any follow-up visit, as opposite to the placebo group. In two other studies, significant reductions after 12 months (Haffajee et al. 2008) and 6 months (Mascarenhas et al. 2005) were observed in the test groups. In another study (Gomi et al. 2007b), *T. forsythia* was not detected after 1 and 3 months, but it was found at 6 months. Recently, the study by Yashima et al. (2009) detected *T. forsythia* at all time periods in all study groups.

However, microbiological variables should be interpreted with caution because they have not been clearly defined in the literature; thus, it is not easy to select a clear outcome variable, and a description of a combination of variables is usually reported (total flora, frequency of detection, proportions and counts of different pathogens). However, in the present study, microbiological inclusion criteria were used (presence of *P. gingivalis* in culture) and thus an outcome variable appears as evident: presence or absence of

P. gingivalis after treatment. However, there is a clear need to clearly define microbiological outcome variables and to design studies with an appropriate size to evaluate those variables.

In the present study, improved clinical and microbiological outcomes were attained in the test group using adjunctive azithromycin, including PPD reduction, CAL gain and reductions in the frequency of detection of *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans* and *T. forsythia*. These results together with the recommended easy dosage and limited side effects make the use of this antibiotic recommendable in the treatment of periodontitis patients. Hence, we can conclude that within the limitations of the present study, patients with untreated moderate chronic periodontitis harbouring *P. gingivalis* in their subgingival biofilm may benefit from the systemic administration of azithromycin as an adjunct to SRP.

References

- Alsina, M., Olle, E. & Frias, J. (2001) Improved, low-cost selective culture medium for *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Journal of Clinical Microbiology* **39**, 509–513.
- Armitage, G. C. (1999) Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Annals of Periodontology* **4**, 1–6.
- Blandizzi, C., Malizia, T., Lupetti, A., Pesce, D., Gabriele, M., Giuca, M. R., Campa, M., Del, T. M. & Senesi, S. (1999) Periodontal tissue disposition of azithromycin in patients affected by chronic inflammatory periodontal diseases. *Journal of Periodontology* **70**, 960–966.
- Casey, J. R. & Pichichero, M. E. (2005) Higher dosages of azithromycin are more effective in treatment of group A streptococcal tonsillopharyngitis. *Clinical Infectious Diseases* **40**, 1748–1755.
- Contopoulos-Ioannidis, D. G., Ioannidis, J. P., Chew, P. & Lau, J. (2001) Meta-analysis of randomized controlled trials on the comparative efficacy and safety of azithromycin against other antibiotics for lower respiratory tract infections. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **48**, 691–703.
- Dahlen, G., Renvert, S., Wikstrom, M. & Egelberg, J. (1990) Reproducibility of microbiological samples from periodontal pockets. *Journal of Clinical Periodontology* **17**, 73–77.
- Dastoor, S. F., Travas, S., Neiva, R. F., Rayburn, L. A., Giannobile, W. V. & Wang, H. L. (2007) Effect of adjunctive systemic azithromycin with periodontal surgery in the treatment of chronic periodontitis in smokers: a pilot study. *Journal of Periodontology* **78**, 1887–1896.
- Flemmig, T. F., Milian, E., Karch, H. & Klaiher, B. (1998) Differential clinical treatment outcome after systemic metronidazole and amoxicillin in patients harboring *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and/or *Porphyromonas gingivalis*. *Journal of Clinical Periodontology* **25**, 380–387.
- Foulds, G., Shepard, R. M. & Johnson, R. B. (1990) The pharmacokinetics of azithromycin in human serum and tissues. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **25** (Suppl. A), 73–82.
- Gomi, K., Yashima, A., Iino, F., Kanazashi, M., Nagano, T., Shibukawa, N., Ohshima, T., Maeda, N. & Arai, T. (2007a) Drug concentration in inflamed periodontal tissues after systemically administered azithromycin. *Journal of Periodontology* **78**, 918–923.
- Gomi, K., Yashima, A., Nagano, T., Kanazashi, M., Maeda, N. & Arai, T. (2007b) Effects of full-mouth scaling and root planing in conjunction with systemically administered azithromycin. *Journal of Periodontology* **78**, 422–429.
- Guerrero, A., Griffiths, G. S., Nibali, L., Suvan, J., Moles, D. R., Laurell, L. & Tonetti, M. S. (2005) Adjunctive benefits of systemic amoxicillin and metronidazole in non-surgical treatment of generalized aggressive periodontitis: a randomized placebo-controlled clinical trial. *Journal of Clinical Periodontology* **32**, 1096–1107.
- Haas, A. N., de Castro, G. D., Moreno, T., Susin, C., Albandar, J. M., Oppermann, R. V. & Rosing, C. K. (2008) Azithromycin as an adjunctive treatment of aggressive periodontitis: 12-months randomized clinical trial. *Journal of Clinical Periodontology* **35**, 696–704.
- Haffajee, A. D., Patel, M. & Socransky, S. S. (2008) Microbiological changes associated with four different periodontal therapies for the treatment of chronic periodontitis. *Oral Microbiology Immunology* **23**, 148–157.
- Haffajee, A. D., Socransky, S. S. & Gunsolley, J. C. (2003) Systemic anti-infective periodontal therapy. A systematic review. *Annals of Periodontology* **8**, 115–181.
- Haffajee, A. D., Torresyap, G. & Socransky, S. S. (2007) Clinical changes following four different periodontal therapies for the treatment of chronic periodontitis: 1-year results. *Journal of Clinical Periodontology* **34**, 243–253.
- Herrera, D., Alonso, B., Leon, R., Roldan, S. & Sanz, M. (2008a) Antimicrobial therapy in periodontitis: the use of systemic antimicrobials against the subgingival biofilm. *Journal of Clinical Periodontology* **35**, 45–66.
- Herrera, D., Contreras, A., Gamonal, J., Oteo, A., Jaramillo, A., Silva, N., Sanz, M., Botero, J. E. & Leon, R. (2008b) Subgingival microbial profiles in chronic periodontitis patients from Chile, Colombia and Spain. *Journal of Clinical Periodontology* **35**, 106–113.
- Herrera, D., Roldán, S., O'Connor, A. & Sanz, M. (2000) The periodontal abscess: II. Short-term clinical and microbiological efficacy of two systemic antibiotics regimes. *Journal of Clinical Periodontology* **27**, 395–404.
- Herrera, D., Sanz, M., Jepsen, S., Needleman, I. & Roldan, S. (2002) A systematic review on the effect of systemic antimicrobials as an adjunct to scaling and root planing in periodontitis patients. *Journal of Clinical Periodontology* **29** (Suppl. 3), 136–159.
- Kornman, K. S., Newman, M. G., Moore, D. J. & Singer, R. E. (1994) The influence of supragingival plaque control on clinical and microbial outcomes following the use of antibiotics for the treatment of periodontitis. *Journal of Periodontology* **65**, 848–854.
- Lindhe, J. & Palmer, R. (2002) Group C Summary. *Journal of Clinical Periodontology* **29** (Suppl. 3), 160–162.
- Loesche, W. J., Grossman, N. & Giordano, J. (1993) Metronidazole in periodontitis (IV). The effect of patient compliance on treatment parameters. *Journal of Clinical Periodontology* **20**, 96–104.
- Loesche, W. J., Syed, S. A., Morrison, E. C., Kerry, G. A., Higgins, T. & Stoll, J. (1984) Metronidazole in periodontitis. I. Clinical and bacteriological results after 15 to 30 weeks. *Journal of Periodontology* **55**, 325–335.
- Malizia, T., Tejada, M., Ghelardi, E., Senesi, S., Gabriele, M., Giuca, M., Blandizzi, C., Danesi, R., Campa, M. & Del Tacca, M. (1997) Periodontal tissue disposition of Azithromycin. *Journal of Periodontology* **68**, 1206–1209.
- Martinez-Canut, P., Lorca, A. & Magan, R. (1995) Smoking and periodontal disease severity. *Journal of Clinical Periodontology* **22**, 743–749.
- Mascarenhas, P., Gapski, R., Al-Shammari, K., Hill, R., Soehren, S., Fenno, J. C., Giannobile, W. V. & Wang, H. L. (2005) Clinical response of azithromycin as an adjunct to non-surgical periodontal therapy in smokers. *Journal of Periodontology* **76**, 426–436.
- McDonald, P. J. & Pruil, H. (1991) Phagocyte uptake and transport of azithromycin. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* **10**, 828–833.
- Muller, H. P., Holderrieth, S., Burkhardt, U. & Hoffer, U. (2002) In vitro antimicrobial susceptibility of oral strains of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* to seven antibiotics. *Journal of Clinical Periodontology* **29**, 736–742.
- Pajukanta, R. (1993) In vitro antimicrobial susceptibility of *Porphyromonas gingivalis* to azithromycin, a novel macrolide. *Oral Microbiology and Immunology* **8**, 325–326.
- Pavlicic, M. & van Winkelhoff, A. J. (1994) Microbiological and clinical effects of metronidazole and amoxicillin in *Actinobacillus actinomycetemcomitans* associated periodontitis. A 2-year evaluation. *Journal of Clinical Periodontology* **21**, 107–112.
- Pradeep, A. R., Sagar, S. V. & Daisy, H. (2008) Clinical and microbiologic effects of subgingivally delivered 0.5% azithromycin in the treatment of chronic periodontitis. *Journal of Periodontology* **79**, 2125–2135.
- Renvert, S., Wikstrom, M., Dahlen, G., Slots, J. & Egelberg, J. (1990a) Effect of root debridement on the elimination of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Bacteroides gingivalis* from periodontal pockets. *Journal of Clinical Periodontology* **17**, 345–350.
- Renvert, S., Wikstrom, M., Dahlen, G., Slots, J. & Egelberg, J. (1990b) On the inability of root debridement and periodontal surgery to eliminate *Actinobacillus actinomycetemcomitans* from periodontal pockets. *Journal of Clinical Periodontology* **17**, 351–355.
- Retsema, J., Girard, A., Schelkly, W., Manousos, M., Anderson, M., Bright, G., Borovoy, R., Brennan, L. & Mason, R. (1987) Spectrum and mode of action of azithromycin (CP-62,993), a new 15-membered-ring macrolide with improved potency against gram-negative organisms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **31**, 1939–1947.
- Sanz, M. & Teughels, W. (2008) Innovations in non-surgical periodontal therapy: consensus report of the sixth european workshop on periodontology. *Journal of Clinical Periodontology* **35**, 3–7.
- Sanz, M., van Winkelhoff, A. J., Herrera, D., Dellemling-Kippuw, N., Simón, R. & Winkel, E. G. (2000) Differences in the composition of the subgingival microbiota of two periodontitis populations of different geographic origin. A comparison between Spain and The Netherlands. *European Journal of Oral Sciences* **108**, 383–392.
- Saxen, L. & Asikainen, S. (1993) Metronidazole in the treatment of localized juvenile periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology* **20**, 166–171.
- Schentag, J. J. & Ballow, C. H. (1991) Tissue-directed pharmacokinetics. *American Journal of Medicine* **91**, 5S–11S.
- Sefton, A. M., Maskell, J. P., Beington, D., Whiley, A., Shain, H., Foyle, D., Smith, S., Smales, F. & Williams, J. D. (1996) Azithromycin in the treatment of periodontal disease. Effect on microbial

- flora. *Journal of Clinical Periodontology* **23**, 998–1003.
- Sharma, V., Sharma, A., Kumar, V. & Aggarwal, S. (2009) Disulfiram-like reaction with ornidazole. *Journal of Postgraduate Medicine* **55**, 292–293.
- Smith, S. R., Foyle, D. M., Daniels, J., Joyston-Bechal, S., Smales, F. C., Sefton, A. & Williams, J. (2002) A double-blind placebo-controlled trial of azithromycin as an adjunct to non-surgical treatment of periodontitis in adults: clinical results. *Journal of Clinical Periodontology* **29**, 54–61.
- Socransky, S. S. & Haffajee, A. D. (1997) Microbiology of periodontal disease. In: Lindhe, J., Karring, T. & Lang, NP. (eds), *Clinical Periodontology and Implant Dentistry*, pp. 138–188. Copenhagen: Munksgaard.
- Syed, S. A. & Loesche, W. J. (1972) Survival of human dental plaque flora in various transport media. *Applied Microbiology* **24**, 638–644.
- van Winkelhoff, A. J., Herrera, D., Oteo, A. & Sanz, M. (2005) Antimicrobial profiles of periodontal pathogens isolated from periodontitis patients in The Netherlands and Spain. *Journal of Clinical Periodontology* **32**, 893–898.
- van Winkelhoff, A. J., Rams, T. E. & Slots, J. (1996) Systemic antibiotic therapy in periodontics. *Periodontology* **2000** **10**, 45–78.
- Wikstrom, M., Renvert, S., Dahlen, G. & Johnsson, T. (1991) Variance in recovery of periodontitis-associated bacteria caused by sampling technique and laboratory processing. *Oral Microbiology and Immunology* **6**, 102–106.
- Williams, J. D., Maskell, J. P., Shain, H., Chrysos, G., Sefton, A. M., Fraser, H. Y. & Hardie, J. M. (1992) Comparative in-vitro activity of azithromycin, macrolides (erythromycin, clarithromycin and spiramycin) and streptogramin rp 59500 against oral organism. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **30**, 27–37.
- Winkel, E. G., van Winkelhoff, A. J., Timmerman, M. F., Vangsted, T. & van der Velden, U. (1997) Effects of metronidazole in patients with "refractory" periodontitis associated with *Bacteroides forsythus*. *Journal of Clinical Periodontology* **24**, 573–579.
- Yashima, A., Gomi, K., Maeda, N. & Arai, T. (2009) One-stage full-mouth versus partial-mouth scaling and root planing during the effective half-life of systemically administered azithromycin. *Journal of Periodontology* **80**, 1406–1413.

Address:

David Herrera

Etiology and Therapy of Periodontal Disease

(ETEP) Research Group

Complutense University

Madrid

Spain

E-mail: dhg2587@teleline.es

Clinical Relevance

Scientific rationale for study: Periodontitis is a chronic oral infection associated with a limited number of pathogens, being *P. gingivalis* one of the most relevant. The eradication of this bacterial species during periodontal treatment will enhance the clinical response and minimize the risk of future attachment loss. The adjunctive use of systemic anti-

microbials (such as azithromycin) has been shown to add relevant benefits in the treatment of periodontal diseases associated with specific microbiological profiles.

Principal findings: SRP plus the adjunctive use of azithromycin resulted in additional clinical and microbiological benefits compared with SRP plus placebo. Patients in the test group showed a significant

decrease in PPD and gain in CAL after 6 months. The frequency of detection of *P. gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and *T. forsythia* was also significantly reduced in the test group.

Practical implications: In *P. gingivalis* periodontitis, SRP plus the systemic administration of azithromycin may result in additional clinical and microbiological benefits.

VIII. DISCUSIÓN

En este trabajo se han incluido tres estudios centrados en el papel de *P. gingivalis* en las enfermedades periodontales. En el primer estudio se encontró que los patógenos periodontales son menos susceptibles a antimicrobianos en España que en Holanda, pero no se encontraron diferencias respecto a *P. gingivalis* (van Winkelhoff et al., 2005). En el segundo estudio, la microbiota subgingival de diferentes pacientes de Chile, Colombia y España, presentaban algunas diferencias relevantes, que afectaban a las proporciones de *P. gingivalis* (Herrera et al., 2008). Finalmente, se comprobó que el uso coadyuvante con el raspado de azitromicina en la periodontitis asociada a *P. gingivalis*, mejoraba significativamente los resultados clínicos y microbiológicos (Oteo et al., 2010).

Respecto al **primer estudio (van Winkelhoff et al., 2005)** se demostró que la CMI50 y la CMI90 varía entre dos países con diferentes políticas de uso de antibióticos históricamente, como son Holanda y España (Baquero 1996; Cars et al., 2001). Los resultados mostraron diferencias significativas para los antibióticos β -lactámicos, como penicilina G, para los que fue necesaria una CMI mayor en las muestras aisladas en pacientes españoles frente a *P. intermedia* ($p=0.011$) y *F. nucleatum* ($p=0.002$). Los valores CMI para amoxicilina eran mayores en las muestras de pacientes españoles para *P. intermedia* ($p=0.002$) y *P. micra* ($p=0.012$). Estudios previos (van Winkelhoff et al., 1997) ya demostraron la producción de β -lactamasas en la microflora subgingival de pacientes con periodontitis; en el presente estudio, la amoxicilina reforzada con ácido clavulánico mostró mejoras de

la CMI90 al compararlo con la amoxicilina sin protección, no encontrándose diferencias entre los dos países.

La CMI90 para la tetraciclina fue mayor en las cepas de los pacientes españoles para todas las bacterias analizadas al compararlas con los pacientes holandeses. La CMI necesaria para ciprofloxacino fue mayor en las cepas de *F. nucleatum* ($p=0.035$) de los pacientes holandeses y mayor para las cepas de *P. gingivalis* ($p=0.005$) de los pacientes españoles.

La CMI para azitromicina fue mayor para *P. micra* en las cepas españolas ($p=0.005$), y no se encontraron diferencias significativas para metronidazol ni para amoxicilina más clavulánico como se acaba de comentar. Aún así, la CMI90 de metronidazol de 256 $\mu\text{g/ml}$ necesaria para las cepas españolas de *A. actinomycetemcomitans*, frente a las 64 $\mu\text{g/ml}$ necesarias para las cepas holandesas, puede hacer pensar que la eficacia clínica al combinar este antimicrobiano con amoxicilina para actuar frente a *A. actinomycetemcomitans*, tal y como han demostrado eficacia estudios previos (van Winkelhoff et al., 1989; Berglundh et al., 1998; Winkel et al., 2001) puede no ser suficiente en España al compararlo con otros países europeos.

Las resistencias bacterianas a los diferentes antibióticos también fue mayor en líneas generales para las cepas de pacientes españoles. Un número significativo de cepas de *F. nucleatum* de pacientes españoles mostraron resistencia a penicilina G ($p=0.038$), amoxicilina ($p=0.038$) y metronidazol ($p=0.043$). Las cepas de *P. micra* mostraron resistencia a azitromicina (tres cepas holandesas y dos españolas) y una cepa española fue resistente al metronidazol.

A. actinomycetemcomitans mostró un alto nivel de resistencias frente a penicilina G, clindamicina y metronidazol, siendo resistente en al menos un 20% de las cepas españolas y holandesas, las cepas españolas eran resistentes además a ciprofloxacino y amoxicilina más clavulánico y tres cepas eran resistentes a azitromicina. Se encontraron diferencias significativas entre países para amoxicilina ($p=0.013$) y azitromicina ($p=0.009$). Las cepas de *P. gingivalis* de ambos países eran susceptibles para todos los antibióticos analizados.

El objetivo del **segundo estudio de este trabajo (Herrera et al., 2008)** fue evaluar la composición de la microflora de países geográficamente alejados, como son Chile, Colombia y España. Los resultados microbiológicos más destacados fueron que la frecuencia de detección de dos de los periodontopatógenos más importantes fue similar en los tres países. Así, *A. actinomycetemcomitans* se detectó en menos del 20% de los pacientes en todos los grupos poblacionales analizados, mientras que *P. gingivalis* se detectó en una prevalencia superior al 65% en todos los grupos, no encontrándose diferencias significativas entre los tres países para ambos patógenos. Tampoco se encontraron diferencias en la frecuencia de detección entre países para *Capnocytophaga* spp. mientras que en el resto de bacterias analizadas (*T. forsythia*, *Fusobacterium* spp., *P. micra*, *E. corrodens*), sí se apreciaron diferencias entre países.

Respecto a la proporción de cada bacteria en las muestras positivas, se encontraron bajas proporciones para *A. actinomycetemcomitans*, sin diferencias significativas entre países, mientras que sí se encontraron

diferencias entre países para *P. gingivalis* ($p<0.001$) con menores porcentajes en Colombia, al compararlos con Chile y España. También se encontraron diferencias entre todos los grupos para *P. intermedia/nigrescens*. La proporción de *Capnocytophaga* spp. en todos los grupos fue baja, pero sí se encontraron diferencias significativas ($p<0.05$, entre Chile y España). Los porcentajes de *Fusobacterium* spp. fueron diferentes entre grupos ($p=0.01$, entre Chile y Colombia) así como para *P. micra* ($p=0.01$, entre España y Colombia con Chile). No se encontraron diferencias significativas entre los tres grupos analizados para *T. forsythia*.

Por último, en el **tercer estudio de este trabajo (Oteo et al., 2010)** se evaluó la eficacia clínica y microbiológica del raspado y alisado radicular, en pacientes que presentaban *P. gingivalis*, asociado con azitromicina, al compararlo con un grupo placebo. Los resultados clínicos mostraron reducción de la PS estadísticamente significativa ($p<0.001$) en el grupo test frente al placebo (0.78 mm frente a 0.38 mm, respectivamente) al final del estudio (6 meses). La ganancia de inserción mostró cambios significativos ($p=0.004$) en el grupo test al compararlo con la visita inicial, mientras que no se encontraron diferencias para el grupo control; de manera adicional, las diferencias inter-grupo fueron significativas al comparar las visitas inicial y a 1 mes ($p=0.015$) y se observaron tendencias tras 3 ($p=0.026$) y 6 meses ($p=0.016$).

Los principales resultados microbiológicos mostraron una reducción significativa de la frecuencia de detección de *P. gingivalis* en el grupo test tras 1 ($p<0.001$), 3 ($p=0.003$) y 6 meses ($p=0.001$), siendo esta de un 42.9% en el grupo test a los 6 meses frente a un 80% en el grupo control, donde no

se observaron reducciones significativas. Cabe destacar también la reducción de la frecuencia de detección de *T. forsythia* y *A. actinomycetemcomitans* en el grupo test al comparar la visita inicial con los 6 meses, pasando de 40% a 0% para el primero y de 13.13% a 0% para el segundo, mientras que apenas se produjo disminución para *T. forsythia* en el grupo control entre la visita inicial y los 6 meses (de 15.4% a 10.0%) e incluso se produjo un aumento para *A. actinomycetemcomitans*, pasando de 23.1% a 40.0%. La diferencia inter-grupo para *A. actinomycetemcomitans* fue significativa a los 6 meses, mientras que sólo la visita del primer mes lo fue al comparar *P. gingivalis* ($p=0.004$).

En cuanto a la evolución en el porcentaje de flora presente, en el grupo test se observó una reducción significativa del porcentaje de *P. gingivalis* al mes ($p=0.002$) y 3 meses ($p=0.006$) y una tendencia a los 6 meses ($p=0.021$), el grupo control mostró reducciones no significativas al mes, pero se recuperaron los valores iniciales a los 3 y los 6 meses. Además de la evolución mencionada para *P. gingivalis*, sólo se observaron reducciones significativas en el porcentaje de flora para *P. intermedia* a los 6 meses ($p=0.010$) y un aumento no significativo para *P. micra* a los 6 meses en el grupo test. No se observaron variaciones importantes en la proporción de flora de los otros patógenos evaluados.

Considerando de manera conjunta los resultados de los tres estudios que componen este trabajo, puede sugerirse una diferente eficacia de los antimicrobianos en función del país donde se empleen, lo que puede hacer variar la estrategia antimicrobiana, que deberá ser adaptada a la localización geográfica. Los resultados del segundo estudio indicaron que la

frecuencia de detección de las principales bacterias periodontopatógenas es similar en países tan distantes como Chile, Colombia y España, pero sí se encontraron diferencias en las proporciones de esas bacterias en la flora en los pacientes positivos. El empleo de antimicrobianos específicos, dirigidos frente a patógenos como *P. gingivalis* que, como se ha visto se encuentra en torno a un 65% de los pacientes con periodontitis independientemente del país, ha demostrado su eficacia coadyuvante al raspado y alisado radicular (Herrera et al., 2008; Haffajee et al., 2003). Aunque la primera opción para el manejo de la periodontitis asociada a *P. gingivalis* suele ser metronidazol, el empleo de un antimicrobiano más sencillo en su posología y con escasa frecuencia de efectos adversos, como azitromicina, puede ser de gran utilidad en el tratamiento de la periodontitis.

Resistencias bacterianas en pacientes con periodontitis crónica

Estudios previos han demostrado que las resistencias de las bacterias del biofilm bacteriano subgingival frente a diferentes antibióticos fue mayor en España que en Holanda (van Winkelhoff et al., 2000). Esta mayor prevalencia de resistencias, frente a los antimicrobianos sistémicos, puede ser debida al mayor consumo de antibióticos (Baquero 1996; Cars et al., 2001) o a una peor colaboración en la pauta de administración (Pradier et al., 1997) en España, entre otros factores. Como ejemplo, en el estudio realizado por Herrera et al., (2000) para comparar la prevalencia de bacterias productoras de β -lactamasas en España y Holanda, el 54% de los pacientes del grupo español habían consumido antibióticos en los últimos 12 meses frente al 19% de el grupo holandés.

Estudios más recientes han evaluado la prevalencia de resistencias a diferentes antibióticos, con resultados dispares. Ardila et al., (2010), evaluaron la susceptibilidad *in vitro* de diferentes bacterias peridontopatógenas a metronidazol, amoxicilina, amoxicilina/ácido clavulánico, clindamicina y moxifloxacino de 76 pacientes con periodontitis crónica en Colombia. Estos autores encontraron que todas las bacterias aisladas eran sensibles a amoxicilina/ácido clavulánico y a moxifloxacino, pero mostraban una susceptibilidad más variable a metronidazol y clindamicina: el 21.56% de las cepas de *P. gingivalis* aisladas eran resistentes a metronidazol, así como el 25% de las cepas de *F. nucleatum* y el 26.66% de las cepas de *Prevotella* spp. (Ardila et al., 2010). Rams et al., (2013) evaluaron la presencia de bacterias productoras de β -lactamasas en 564 pacientes con periodontitis crónica residentes en Estados Unidos y evaluaron la resistencia *in vitro* a metronidazol a una dosis de 4 μ g/mL en aquellas bacterias que hubieran demostrado ser productoras de β -lactamasas. Los autores observaron que el 52.1% de los pacientes tenían bacterias productoras de β -lactamasas, siendo estas principalmente *P. intermedia/nigrescens*, *F. nucleatum* y otras especies de *Prevotella*. Ninguna de las cepas de *P. gingivalis* y *A. actinomycetemcomitans* estudiadas mostraron actividad β -lactamasa. De aquellas bacterias que demostraron tener actividad β -lactamasa, el 98.9% eran susceptibles a metronidazol (Rams et al., 2013). En este segundo estudio no se evaluó la eficacia de metronidazol frente a *P. gingivalis* y *A. actinomycetemcomitans*, ya que no demostraron tener actividad β -lactamasa, pero resulta interesante comparar ambos estudios y valorar como el 98.9% de las cepas de *F. nucleatum* y *Prevotella* spp. eran susceptibles al metronidazol en la población estadounidense, mientras que en la población colombiana existen unas resistencias del 26.66% y del 25%, respectivamente, además de un

21.56% de las cepas de *P. gingivalis*. Esto puede sugerir que las susceptibilidades de las bacterias periodontopatógenas a los antibióticos varían en función de la localización geográfica y que las pautas antibióticas efectivas pueden ser diferentes en función de cada país. El mismo grupo de trabajo (Rams et al., 2014), ha realizado un estudio en el que ha evaluado *in vitro*, la resistencia a varios antibióticos en 400 pacientes norteamericanos, tomando las muestras de múltiples clínicas privadas de la costa este, y han observado, que siendo la prevalencia de *P. gingivalis* de un 78% en la población analizada, era muy raro que esta bacteria presentara resistencia a los antibióticos evaluados. Sólo se encontraron resistencias a la clindamicina en el 1% de los pacientes, a la amoxicilina en el 2.4% y a la doxiciclina en el 29.5% de los pacientes, y no se encontró ningún paciente en el que *P. gingivalis* fuera resistente a metronidazol o a amoxicilina más metronidazol

Los dos métodos más frecuentemente empleados para evaluar las resistencias bacterianas a antimicrobianos en el biofilm subgingival son el empleo de placas de agar que contienen concentraciones de diferentes antibióticos y la técnica de E-test. Con la primera se determina la proporción de placa bacteriana susceptible a los antimicrobianos analizados, y se puede evaluar la media de diferentes especies bacterianas que crecen en las placas y el porcentaje de colonias bacterianas resistentes a los antimicrobianos analizados. El segundo método empleado, el E-test, es el que se utilizó en esta investigación. Tras obtener el crecimiento bacteriano en placas de agar sangre mediante el método descrito en el material y métodos, se sembraron en placas en las que además se colocaban dos tiras que contienen diferentes concentraciones de antibiótico a lo largo de la tira, tras lo que se incuban las placas durante 3 días. Tras este periodo,

se analizaban las zonas de inhibición bacteriana, es decir, a partir de que concentración no crecen bacterias, determinándose la concentración mínima inhibitoria (CMI). Con los datos de todas las cepas analizadas, se calculó la CMI90, es decir, la concentración de antimicrobiano necesaria para impedir el crecimiento bacteriano *in vitro* del 90% de las cepas y la CMI50 (lo mismo, para el 50% de las cepas estudiadas). El E-test ha demostrado ser una técnica fiable para la evaluación de las susceptibilidades antibióticas de bacterias anaerobias (Citron et al., 1991) mostrando una excelente correlación con el método de referencia hasta el momento (método de dilución en agar) a lo que hay que añadir la ventaja de ser un método comercialmente preparado y estandarizado muy sencillo de utilizar y con menos posibles errores de procesado al compararlo con otros métodos como los métodos de dilución, La técnica también ha demostrado ser efectiva para la evaluación de la susceptibilidad antimicrobiana de la flora subgingival (Nachnani et al., 1992). Como ya se ha comentado, los valores de la CMI y el mayor porcentaje de bacterias periodontales resistentes en España, puede ser debido a un mayor consumo de antibióticos y a una peor colaboración en la pauta de administración (Pradier et al., 1997).

Como acabamos de comentar, determinadas bacterias periodontopatógenas han demostrado producir β -lactamasas (van Winkelhoff et al., 1997; Herrera et al., 2000; Rams et al., 2013), siendo la producción de este compuesto mayor en las bacterias aisladas en pacientes españoles que en pacientes holandeses (Herrera et al., 2000). En nuestro estudio, la eficacia de penicilina y amoxicilina frente a cepas de *P. intermedia*, *F. nucleatum* y *A. actinomycetemcomitans*, era menor en los pacientes españoles que en los holandeses, siendo necesaria una CMI mayor para estos antimicrobianos. Al

añadirle a estos antimicrobianos un compuesto β -lactámico como el ácido clavulánico, se observó una reducción clara de los valores CMI90 al compararlos con los de la amoxicilina. La CMI90 para tetraciclina fue significativamente mayor en los pacientes españoles frente a los holandeses, mientras que la susceptibilidad a metronidazol, que es uno de los antibióticos de elección en el tratamiento de las periodontitis, fue similar en las bacterias de ambos países, salvo para *A. actinomycetemcomitans*. *A. actinomycetemcomitans* no es un anaerobio estricto y se ha visto que responde bien a la combinación de metronidazol más amoxicilina (van Winkelhoff al., 1989; Berglundh et al., 1998; Winkel et al., 2001), aunque la CMI90 para metronidazol de $>256 \mu\text{g/ml}$ de las cepas de *A. actinomycetemcomitans* aisladas en España, frente a $>64\mu\text{g/ml}$ de las aisladas en Holanda, sugieren que las pautas antibióticas pueden o deben ser diferentes en los distintos países europeos, no pudiéndose recomendar una pauta única para todas las poblaciones.

Caracterización de la microbiota subgingival

Además de conocer la eficacia que tienen los tratamientos antimicrobianos en las diferentes poblaciones debido a las diferentes prevalencias de resistencias bacterianas, resulta interesante conocer si la flora bacteriana subgingival es similar entre los pacientes de diferentes localizaciones geográficas, ya que en caso de que la composición de la microbiota subgingival tenga una composición diferente, las estrategias terapéuticas pueden diferir entre los diferentes países. No existen muchos estudios que hayan comparado la flora subgingival de diferentes países y la mayoría se han realizado en Norte América, Europa y Japón. Existen muy pocos estudios que hayan comparado la composición de la flora subgingival en países latinoamericanos (López 2000; Gajardo et al., 2005; Ximenez-Fyvie

et al., 2006; Botero et al., 2007; Botero et al., 2007; Lafaurie et al., 2007) e incluso menos que hayan comparado las diferencias entre diferentes países (Sanz et al., 2000; Haffajee et al., 2004; López et al., 2004).

Los pacientes analizados en el presente estudio mostraron diferencias entre países en un aspecto que puede tener influencia en la composición de la flora subgingival como es el consumo de tabaco. Así, el porcentaje de pacientes fumadores era significativamente mayor en los pacientes españoles (36.4%) y chilenos (29.7%), respecto a los colombianos (7.3%). A pesar de esta mayor frecuencia de pacientes fumadores, la PS media de los pacientes colombianos era significativamente mayor en los pacientes colombianos (7.9 mm), al compararlos con los españoles (5.7 mm) y los chilenos (5.4 mm).

El tabaco ha demostrado que puede influir en la composición de la flora subgingival. van Winkelhoff et al., (2001) estudiaron la composición de la flora en pacientes periodontales fumadores y no fumadores tratados y no tratados. En el grupo de pacientes periodontales fumadores, no tratados previamente, que es el grupo que se puede comparar con los resultados del presente estudio, observaron que había mayor prevalencia de *P. intermedia/nigrescens* y mayor prevalencia de *T. forsythia*, *P. micra* y *F. nucleatum* frente a los pacientes no fumadores no tratados. La prevalencia de estas bacterias en los pacientes tratados también fue mayor en el grupo de pacientes fumadores. Al comparar el recuento total de la flora anaerobia, los autores también observaron que el porcentaje medio de *P. micra* y *F. nucleatum* eran mayores en ambos grupos de pacientes fumadores al compararlos con los no fumadores. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre pacientes fumadores y no fumadores

en la prevalencia de *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans* o *P. intermedia*, así como tampoco en el porcentaje de estas bacterias en el recuento total de flora anaerobia. En un estudio posterior, utilizando PCR como método de análisis, Gomes et al., (2006) también encontraron mayores recuentos de *P. micra* en los pacientes fumadores. Otros estudios no han encontrado diferencias en la microflora presente al comparar pacientes fumadores con pacientes no fumadores (Van der Velden et al., 2003). En el presente estudio, los pacientes españoles y chilenos presentaban una mayor frecuencia de detección de *P. micra* que los pacientes colombianos.

De manera general, se puede decir que la flora subgingival de los pacientes chilenos, colombianos y españoles difiere en cuanto a la frecuencia de detección y la proporción de bacterias periodontopatógenas importantes, como las del complejo rojo *P. gingivalis* y *T. forsythia*, y bacilos entéricos. Los pacientes colombianos presentaron una cantidad de unidades formadoras de colonias por mL significativamente diferentes que los otros grupos: estos pacientes no solo tenían un mayor recuento bacteriano, también mostraban una variabilidad menor. Por el contrario, los pacientes chilenos presentaban menor cantidad de bacterias pero con un rango de variabilidad más amplio. La prevalencia de *A. actinomycetemcomitans* y *P. gingivalis* fue similar en los tres países (20% y 65%, respectivamente), sin diferencias estadísticamente significativas entre los tres grupos. La proporción de *A. actinomycetemcomitans* en las muestras positivas en los tres países no mostró diferencias estadísticamente significativas; sin embargo, la proporción de *P. gingivalis* en las muestras positivas sí varió, siendo mayor en Chile y España que en Colombia (34.1% y 22.21%, frente a 5.49%, respectivamente). Las diferencias eran estadísticamente significativas entre Chile y España, al comparar con Colombia, y también se

encontraron diferencias significativas entre los tres grupos, tanto en la frecuencia de detección como en la proporción bacteriana, en las muestras positivas para *E. corrodens*, *P. micra*, y *Fusobacterium* spp. Se encontraron diferencias en la proporción de *Capnocytophaga* spp. entre los tres grupos, pero no en el porcentaje de detección. Por el contrario, sí se encontraron diferencias entre grupos para la frecuencia de detección de *P. intermedia* pero no para la proporción bacteriana en las muestras positivas. No se encontró ningún paciente portador de bacterias entéricas en los pacientes españoles, frente a un 17.7% de los chilenos y un 36.6% de los colombianos.

En un estudio similar en el que se comparó la microbiota subgingival, mediante sondas con hibridación ADN-ADN en tablero de ajedrez, de poblaciones distantes como Santiago de Chile y Boston. Además el nivel económico-educacional era muy diferente: medio-bajo en los pacientes chilenos, en los que sólo uno de ellos había visitado un dentista en los últimos 8 años, frente a los norteamericanos, donde todos los pacientes habían acudido al dentista en los últimos 2 años y la mayoría de ellos en los últimos 3-6 meses. Los autores observaron que, tras ajustar para las diferencias clínicas entre ambas poblaciones, los pacientes chilenos presentaban niveles más elevados de las bacterias del grupo rojo al compararlo con los pacientes de Boston. De las 40 especies analizadas, 16 diferían significativamente entre los pacientes chilenos y los estadounidenses, tanto en porcentaje de localizaciones colonizadas, como en proporción de las especies (Lopez et al., 2004). Haffajee et al., (2004) compararon mediante la misma técnica la composición de la microbiota subgingival de Estados Unidos, Chile, Brasil y Suecia y observaron que la microbiota subgingival existente entre los pacientes de los cuatro países era muy diferente. Trece de las 40 especies analizadas mostraron diferencias

entre los pacientes de los cuatro países: los pacientes brasileños mostraron las mayores proporciones de *A. naeslundii* genoespecie 1, *S. gordonii*, *S. sanguis*, *Streptococcus intermedius*, *Streptococcus constellatus*, *E. nodatum* y *T. denticola*. Los pacientes chilenos mostraron las mayores proporciones medias de *P. gingivalis* y *F. periodonticum* y los pacientes suecos mostraron las proporciones medias más elevadas de *Capnocytophaga gingivalis*, *C. gracilis*, *P. micra* y *Leptotrichia buccalis*. Respecto a las bacterias del grupo rojo, *P. gingivalis* se encontró en mayores proporciones en los pacientes chilenos, *T. denticola* en los sujetos brasileños, y no se encontraron diferencias entre los cuatro países en la proporción de *T. forsythia*.

Efectos del tratamiento periodontal no quirúrgico con el uso coadyuvante de azitromicina

Los resultados de las dos primeras publicaciones de este trabajo, comparando las resistencias bacterianas en pacientes de diferentes localizaciones geográficas, así como la composición de la microbiota en países geográficamente alejados, pueden hacer pensar que el tratamiento de las enfermedades periodontales puede requerir pautas diferentes en función de cada país y que la interpretación de los estudios realizados en diferentes áreas geográficas, puede no ser aplicable a todas las poblaciones.

El uso de antimicrobianos sistémicos coadyuvantes al raspado y alisado radicular ha sido evaluado en diferentes revisiones sistemáticas presentadas en reuniones de consenso de la Federación Europea de Periodoncia y de la Academia Americana de Periodoncia (Herrera et al., 2002; Haffajee et al., 2003; Herrera et al., 2008). Estas revisiones han evidenciado que su uso puede estar justificado en determinadas

condiciones clínicas, como en pacientes con bolsas profundas, pacientes con enfermedad activa o con perfiles microbiológicos específicos. Además, de acuerdo a la revisión de Herrera et al., (2008), estos antimicrobianos van a ser más efectivos si se cumplen una serie de recomendaciones, como son realizar el tratamiento en el menor tiempo posible (menos de una semana), realizar un desbridamiento de calidad y administrar el antimicrobiano el día que se complete el tratamiento. Para obtener los mejores resultados posibles, en el presente trabajo se siguieron estas recomendaciones, todos los pacientes eran portadores de *P. gingivalis*, los pacientes completaron el tratamiento en menos de una semana y éste fue realizado por un periodoncista.

Los resultados obtenidos fueron favorables al uso de la azitromicina, a los 6 meses: la reducción de PS fue de 0.78 mm en el grupo test frente a 0.38 mm en el grupo control, siendo esta diferencia estadísticamente significativa ($p=0.009$). La ganancia de inserción clínica también fue favorable para el grupo test, con 0.76 mm frente a 0.28 mm ($p=0.016$). Los pacientes incluidos en este estudio eran pacientes con periodontitis moderada, siendo la profundidad de sondaje inicial de 2.99 mm en el grupo test y 2.84 mm en el grupo control, por lo que no se podían esperar grandes reducciones en la profundidad de sondaje, ya que estudios previos han demostrado que la reducción en la profundidad de sondaje es mayor en las localizaciones profundas (Herrera et al., 2002; Guerrero et al., 2005).

Los resultados de los estudios en los que se ha evaluado la eficacia de azitromicina, como coadyuvante al raspado y alisado radicular, muestran resultados dispares: mientras que hay estudios que sí han encontrado diferencias significativas favorables a la azitromicina, tanto en pacientes

con profundidades de sondaje iniciales elevadas (>6 mm) (Haas et al., 2008), moderadas de 5 mm (Yashima et al., 2009) o iniciales, de alrededor de 4 mm (Mascarenhas et al., 2005; Gomi et al., 2007; Botero et al., 2013) otros, no encontraron diferencias favorables al grupo que usaba azitromicina (Smith et al., 2002; Haffajee et al., 2008; Sampaio et al., 2011; Emingil et al., 2012; Haas et al., 2012; Han et al., 2012).

De los estudios que han obtenido mejores resultados clínicos en el grupo que tomó azitromicina, el que ha conseguido unos resultados más llamativos es el estudio de Haas et al., (2008), en el que evaluaron la respuesta al tratamiento en un grupo de pacientes con periodontitis agresiva que presentaban una PS inicial media de 6.3-6.7 mm, en el que obtuvieron una reducción media de la PS de 2.88 mm en el grupo test frente a 1.85 mm en el grupo placebo. Otros estudios con periodontitis iniciales más moderadas, como el de Yashima et al., (2009), obtuvieron reducciones de la PS de 1.60 mm en el test frente a 1.10 mm en el placebo, y estudios con periodontitis más parecidas a las de los pacientes del presente estudio, en las que la PS inicial era alrededor de 4 mm, los cambios fueron de 1.62 mm frente a 0.75 mm (Gomi et al., 2007) o de 1.33 mm frente a 0.45 mm (Mascarenhas et al., 2005), para los grupos test y placebo, respectivamente. Botero et al., (2013) compararon la respuesta clínica al raspado y alisado radicular más azitromicina frente a un grupo control al que se le administró un placebo en un grupo de pacientes diabéticos. Los resultados observaron una mayor reducción de la PS media en el grupo test, sin embargo no encontraron diferencias en el NIC entre ambos grupos tras 9 meses. Este estudio evaluó los resultados microbiológicos que fueron publicados en un artículo separado (Hincapié et al., 2015) no observando diferencias microbiológicas entre ambos grupos.

A continuación, se describen algunos de los estudios que no detectaron diferencias significativas a favor del grupo que empleaba azitromicina, y se discuten las posibles razones para esa falta de resultados favorables:

- Sampaio et al., (2011) evaluaron, a 6 meses y 1 año, un grupo de pacientes con periodontitis severa, en el que el 5% de las localizaciones presentaba una PS>10 mm, y compararon un grupo placebo frente a un grupo test en el que administraban azitromicina 500mg/24h/5 días. En ambos grupos obtuvieron una respuesta clínica al tratamiento muy buena, ya que la PS media se redujo de 4.82 mm a 3.24 mm en el grupo test y de 5.02 mm a 3.36 mm en el grupo control, siendo la diferencia estadísticamente significativa intragrupo, pero no intergrupo. Al evaluar el resultado del tratamiento en función de la profundidad de sondaje inicial, las localizaciones profundas, con una PS>7 mm obtuvieron una reducción de la profundidad de sondaje de 3.56 mm en el grupo test y de 3.65 mm en el grupo control, y el nivel de inserción clínica medio pasó de 5.51 mm a 4.43 mm en el grupo test y de 5.74 mm a 4.70 mm en el grupo control. Uno de los motivos por los que puede que no obtuvieran diferencias entre grupos, es por los excelentes resultados obtenidos en el grupo control, en el que consiguieron transformar bolsas muy profundas en bolsas profundas, obteniendo resultados mucho mejores que en otros estudios del mismo grupo (Carvalho y cols 2004, Matarazzo y cols 2008, Feres y cols 2009, Mestnik y cols 2010).
- Emingil et al., (2012) evaluaron el efecto clínico y microbiológico (mediante PCR cuantitativa), al comparar un grupo control al que realizaron raspado más placebo, frente a un grupo test al que

realizaron raspado más azitromicina 500mg/24h/3d y evaluaron los resultados a los 6 meses en un grupo de pacientes con periodontitis agresiva. Los resultados no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos en la reducción de la PS ni en la ganancia de inserción clínica en ninguno de los periodos analizados (1, 3 y 6 meses), tanto para la media de las localizaciones, como estratificando por profundidades de sondaje. La única diferencia observada entre grupos fue que el porcentaje de localizaciones que en la visita inicial presentaban una PS >7 mm y obtuvieron una reducción >3 mm al mes, fue significativamente mayor en el grupo test. Sin embargo, a los 3 y 6 meses no se apreciaron diferencias entre grupos.

- Han et al., (2012) tampoco encontraron diferencias estadísticamente significativas entre grupos, obtuvieron una reducción de la PS de 1.81 mm en el grupo test frente a 1.66 mm en el grupo control.

El presente estudio es uno de los pocos existentes en la literatura en el que se selecciona a los pacientes en función de un perfil microbiológico específico (presencia de *P. gingivalis*). Además, para evitar confusiones debido a la severidad de la periodontitis, todos los pacientes seleccionados presentaban periodontitis moderadas, que debían en principio sólo requerir tratamiento periodontal básico de raspado y alisado radicular, aquellos pacientes que presentaban una localización con PS >7 mm por cuadrante eran excluidos del estudio.. De hecho, la PS media inicial se puede considerar relativamente baja (2.99 mm en el test, 2.84 mm en el control).

De los estudios publicados que evalúan la eficacia microbiológica de azitromicina en el tratamiento periodontal, algunos encontraron reducciones significativas de *P. gingivalis* tras 1 y 3 meses (Sefton et al.,

1996; Mascarenhas et al., 2005; Gomi et al., 2007) o 9 meses (Yashima et al., 2009), con rebotes a los 5 meses (Sefton et al., 1996), 6 meses (Gomi et al., 2007) o 9 meses (Yashima et al., 2009). Otros no encontraron ningún impacto microbiológico a los 6 (Haffajee et al., 2008; Sampaio et al., 2011; Haas et al., 2012; Emingil et al., 2012; Han et al., 2012) ni a los 12 meses (Haffajee et al., 2008; Sampaio et al., 2011; Haas et al., 2012) en comparación con los resultados del grupo control.

En la mayoría de estos estudios, algunos de los pacientes presentaban presencia de *P. gingivalis* al comienzo del estudio, si bien este microorganismo no se detectó en el 100% de los pacientes, por lo que los resultados en cuanto a la eficacia de azitromicina frente a esta bacteria no son comparables a los del presente trabajo.

Algunos de estos estudios, si bien no seleccionaron a los pacientes en función de su perfil microbiológico, sí presentan resultados microbiológicos en los que el 100% de los pacientes tanto del grupo test como del grupo control, eran portadores de *P. gingivalis* al comienzo del estudio (Sampaio et al., 2011; Emingil et al., 2012; Han et al., 2012), por lo que, microbiológicamente, serían grupos comparables al del presente estudio. Los pacientes de estos tres estudios, presentaban periodontitis más avanzadas que los pacientes de nuestro estudio, con PS medias iniciales que variaban de 5 a 5.5 mm frente a los cerca de 3 mm de PS inicial de los pacientes de nuestro estudio. Resulta llamativa la diferencia en los resultados microbiológicos obtenidos: en el presente estudio, en el grupo test la detección de *P. gingivalis* se redujo al 13.3% de los pacientes al mes, aumentando al 42.9% a los 6 meses; en los otros estudios, la reducción en el porcentaje de pacientes en los que *P. gingivalis* no era detectada no era tan

relevante, con niveles de detección del 85% (Emingil et al., 2012), 80% (Sampaio et al., 2011) y 85.7% (Han et al., 2012) al mes. A los 6 meses, este dato no está disponible en el estudio de Sampaio et al., (2011), mientras que en el de Emingil et al., (2012) los niveles de detección se mantuvieron estables en el 85% de los pacientes a los 6 meses, y en el de Han et al., (2012) aumentaron al 100%.

Mientras que en el presente estudio se ha empleado el cultivo como método diagnóstico, los otros autores emplearon hibridación ADN-ADN en tablero de ajedrez (Sampaio et al., 2011) o PCR cuantitativa (Han et al., 2012; Emingil et al., 2012). Una causa por la que pueda existir tanta disparidad en el porcentaje de detección de *P. gingivalis* post raspado, al compararlo con nuestro estudio, podría ser el método de detección empleado. El cultivo, tiene un límite de detección de 10^3 - 10^4 frente a las sondas de ADN-ADNA empleadas por Sampaio et al., (2011), que tienen un límite de detección de 10^5 , lo que podría producir falsos negativos con cultivo al compararlos con sondas de DNA. Los estudios que emplearon PCR cuantitativa como método diagnóstico (Han et al., 2012; Emingil et al., 2012), no especifican el límite de detección que tiene el método empleado, si bien existen estudios (Lau et al., 2004) que han comparado ambos métodos diagnósticos en pacientes sanos, con gingivitis y con periodontitis, demostrando una elevada especificidad y sensibilidad entre ambos métodos en la detección de *P. gingivalis*. Aún así, en ese estudio comparativo se detectaron 13 casos positivos para el cultivo que fueron negativos para PCR y 7 casos negativos para cultivo y positivos para PCR. Estos últimos podrían explicarse como falsos negativos por los menores límites de detección de el cultivo, pero los 13 casos positivos para cultivo y negativos para PCR tienen una explicación más difícil. Once de esos 13 casos se produjeron en pacientes sanos o con

gingivitis y los autores argumentan que se pueda deber a la existencia de *P. gingivalis* no patogénica, filotípicamente similar con características fenotípicas idénticas (Lau et al., 2004).

Respecto a las proporciones de flora, *P. gingivalis* representaba el 21.5% de la flora de los pacientes del grupo test y el 17.7% en los pacientes del grupo control. Este porcentaje se consiguió reducir significativamente tras 1 y 3 meses, mostrando una tendencia a los 6 meses en el grupo test, mientras que en el grupo control no se encontraron diferencias significativas en ninguno de los periodos de estudio. El porcentaje de *P. gingivalis* en los estudios de Sampaio et al., (2011) y Emingil et al., (2012) se redujo significativamente en ambos grupos, sin diferencias significativas entre ellos. Sampaio et al., (2011) observaron una recolonización importante del grupo rojo en el periodo de los 6 meses al año, mientras que otros estudios no encontraron este rebote entre los 6 y los 12 meses (Haffajee et al., 2008; Haas et al., 2012)

Siguiendo las recomendaciones del *Workshop* Europeo de 2008 (Herrera et al., 2008; Sanz & Teughels 2008) el tratamiento periodontal de los pacientes fue realizado por un operador con experiencia, en el menor tiempo posible (una semana) y el antibiótico o placebo fue administrado justo al finalizar la última sesión de desbridamiento. En los otros estudios mencionados, con evaluación microbiológica, y que no obtienen tan buenos resultados, el tratamiento periodontal también lo realizó un operador experimentado, y el antibiótico o placebo se suministró después de la última sesión de desbridamiento mecánico. En los estudios en los que se obtuvieron unos resultados clínicos favorables al grupo test, el tratamiento se realizó en menos de una semana (Mascarenhas et al., 2005; Gomi et al.,

2007; Pradeep et al., 2008; Yashima et al., 2009) a excepción de el estudio de Haas et al., (2008), donde el tratamiento se realizó en varias sesiones a lo largo de 14 días. Curiosamente, este estudio es el que obtiene mejores resultados clínicos, pero no encontraron diferencias significativas entre grupos a nivel microbiológico (Haas et al., 2012).

En los estudios en los que los resultados clínicos no fueron favorables para el grupo test, el tratamiento se realizó en dos (Smith et al., 2002; Sampaio et al., 2011) o tres semanas (Haffajee et al., 2007), aunque también hubo estudios en los que el tratamiento se realizó en menos de una semana y no obtuvieron resultados favorables al grupo test (Han et al., 2012; Emingil et al., 2012).

La concentración de azitromicina en los tejidos periodontales inflamados desciende del 50% a los 7 días, al 20% a los 14 días, por lo que parece razonable intentar completar el tratamiento periodontal en menos de una semana. Las diferencias en los resultados microbiológicos pueden achacarse a la diferencia en la severidad de la periodontitis, sugiriendo que azitromicina puede ser un buen antimicrobiano para pacientes con periodontitis moderadas, pero puede no ser tan eficaz microbiológicamente en pacientes con periodontitis severas, ya que sólo Haas et al., (2008) encontraron una muy buena respuesta clínica al emplear azitromicina en pacientes con periodontitis agresiva, aunque los resultados microbiológicos no mostraron diferencias significativas entre los grupos.

Selección del antimicrobiano coadyuvante en función de los perfiles microbiológicos

El uso indiscriminado de antibióticos en el tratamiento de la periodontitis no está exento de polémica, ya que los antimicrobianos no son inocuos, pudiendo producir efectos adversos tales como un aumento de las resistencias bacterianas, presencia de náuseas, dolor de cabeza, alteración del gusto o incluso colitis pseudomembranosa (Winkel et al., 1997; Guerrero et al., 2005; Cionca et al., 2010). Por ello, parece recomendable restringir el uso de antimicrobianos sistémicos en el tratamiento de la periodontitis, a ciertos pacientes y ciertas condiciones.

Para prevenir el desarrollo de cepas bacterianas resistentes a los antibióticos, es recomendable seguir las directrices recogidas por Preus et al., (2014) de acuerdo a las recomendaciones marcadas por la Organización Mundial de la Salud (OMS) y por la Unión Europea (UE) que son las siguientes: 1) Evitar el uso innecesario de cualquier antimicrobiano; 2) Utilizar antibióticos de bajo espectro siempre que sea posible; y 3) evitar la combinación de diferentes antimicrobianos salvo en caso de grandes infecciones que no respondan de otra forma. En concordancia con estos consejos, se recomienda realizar un diagnóstico microbiológico antes de recomendar un antimicrobiano frente a cualquier infección en general y frente a la periodontitis en particular.

Existe cierta evidencia que indica que los pacientes con perfiles microbiológicos determinados, responden mejor al uso de antibióticos que aquellos pacientes que no lo tienen. Winkel et al., (2001) observaron que la mejoría clínica tras la realización de un tratamiento de desinfección de boca

completa, con administración de amoxicilina más metronidazol, se producía principalmente en los pacientes positivos para *P. gingivalis* en la visita inicial. También observaron que los pacientes que no presentaban *P. gingivalis* al comienzo respondieron igual de bien en los grupos test y placebo, en términos de reducción de la PS y la reducción de bolsas >5 mm. Otros estudios como los de Cionca et al., (2009; 2010) observaron excelentes resultados clínicos, independientemente del perfil microbiológico inicial de los pacientes, al comparar el grupo test (amoxicilina 500 mg y metronidazol 350 mg) con el grupo placebo, aunque sí observaron diferencias significativas en la frecuencia de detección de *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* y *T. forsythia* a los tres meses, favorable a los pacientes del grupo test, aunque esta diferencia no era significativa entre los grupos a los 6 meses.

La mayoría de estudios que evalúan el efecto clínico y microbiológico de una o varias terapias antimicrobianas frente a un placebo, no selecciona a los pacientes en función del perfil microbiológico que presentan, sino en función de parámetros clínicos (Listgarten et al., 1978; Lindhe et al., 1983; Joyston-Bechal et al., 1984; Loesche et al., 1984; Al-Joburi et al., 1989; McCulloch et al., 1990; Söder et al., 1990; Kulkarni et al., 1991; Saxén et al., 1993; Walker et al., 1993; Magnusson et al., 1994; Bain et al., 1994; Berglundh et al., 1998; Ng & Bissada 1998; Palmer et al., 1999; Soder et al., 1999; Winkel et al., 1999; Caton et al., 2000; Golub et al., 2001; Ramberg et al., 2001; Sigusch et al., 2001; Rooney et al., 2002; Ehmke et al., 2005; Guerrero et al., 2005; Mascarenhas et al., 2005; Xajigeorgiou et al., 2006; Gomi et al., 2007; Haas et al., 2008; Haffajee et al., 2008; Cionca et al., 2009; Yashima et al., 2009; Cionca et al., 2010; Mestnik et al., 2010; Yek et al., 2010; Sampaio et al., 2011; Heller et al., 2011; Varela et al., 2011; Emingil et

al., 2012; Goodson et al., 2012; Preus et al., 2013; Silva-Senem et al., 2013). Esto puede sugerir que la terapia antimicrobiana puede administrarse indiscriminadamente, independientemente del perfil microbiológico inicial o de la agresividad de la periodontitis (Gionca 2009), lo cual no está exento de polémica debido a los posibles efectos adversos anteriormente señalados (van Winkelhoff & Winkel 2009) y, a su vez, a los excelentes resultados clínicos observados en la mayoría de estudios clínicos (Haffajee et al., 2006).

Sin embargo, si se busca la optimización en el uso de estos tratamientos, los resultados del presente trabajo observan resultados prometedores del uso de azitromicina en el tratamiento de pacientes con periodontitis crónica moderada portadores de *P. gingivalis*, tanto clínicos como microbiológicos, con las ventajas de facilidad de cumplimiento que presenta la azitromicina respecto a otros antimicrobianos.

Puntos fuertes de los estudios realizados

La utilización de un mismo método diagnóstico en dos laboratorios de microbiología, fácil de reproducir (cultivo y E-test), así como un protocolo similar (análisis de las muestras en menos de 2 horas desde la toma) facilitaron el análisis conjunto de los resultados y su comparación (primer trabajo, van Winkelhoff et al., 2005).

Se consiguió obtener tres grupos de pacientes con unas características similares de edad, así como un número similar de pacientes por grupo. Los procedimientos de laboratorios fueron idénticos mediante la estandarización obtenida a través del trabajo de calibración entre el

personal de los diferentes laboratorios (segundo trabajo, Herrera et al., 2008).

Para conseguir una adecuada homogeneidad de la muestra, la selección de los pacientes siguió unos estrictos criterios de inclusión, ya que todos debían ser portadores de *P. gingivalis* al comienzo del estudio. Tampoco debían de presentar periodontitis avanzadas para de esta forma no introducir el factor de confusión de localizaciones que requirieran luego tratamiento quirúrgico, por lo que se excluyeron aquellos pacientes que presentaran más de una localización con PS>7 mm; esto hizo que la profundidad de sondaje inicial media fuera baja en ambos grupos. Además, los pacientes fueron estratificados entre fumadores y no fumadores para de esta forma tener en cuenta el efecto del tabaco sobre los resultados clínicos y microbiológicos.

Limitaciones de los estudios realizados

Primer estudio (van Winkelhoff et al., 2005). La limitación más importante de este estudio puede ser la diferencia de tamaño muestral entre los dos grupos analizados, siendo 54 los pacientes del grupo español y 26 los del grupo holandés, aunque la n final en este estudio está condicionado por las cepas analizadas y no por los pacientes reclutados. En todo caso, se trata de metodología in vitro, y la información derivada debe de ser interpretada con cautela. De manera adicional, las bacterias fueron analizadas de manera aislada, planktónica, cuando sería óptimo conocer las susceptibilidades de

las mismas especies bacterianas en su forma sésil, esto es, dentro de un biofilm.

Segundo estudio (Herrera et al., 2008). Se destaca como limitación que entre los datos iniciales, los pacientes colombianos presentaron una PS inicial media significativamente mayor que los chilenos y españoles, además de presentar un porcentaje de pacientes fumadores significativamente menor. Estos dos factores podrían haber influido en la composición de la microbiota de los pacientes colombianos, y limitar el valor de las comparaciones establecidas, aunque parece que las diferencias de la población analizada, corresponden a las diferencias que existen en la población general.

Tercer estudio (Oteo et al., 2010). Como importante limitación, se debe de resaltar que el tamaño muestral resultó relativamente bajo, con 15 pacientes en el grupo test y 14 en el placebo al comienzo del estudio, dado que se trataba de una análisis piloto.

Implicaciones clínicas

De acuerdo a estos resultados, no se deberían de recomendar pautas de tratamiento antimicrobiano estándar a nivel global entre diferentes países, siendo recomendable realizar diagnóstico microbiológico previo, e incluso, tests de susceptibilidades antimicrobianas, dentro del protocolo diagnóstico de los pacientes con periodontitis que precisen el uso de antimicrobianos sistémicos dentro de su plan de tratamiento periodontal.

Existen variaciones geográficas en las susceptibilidades y composición de la flora subgingival en pacientes con periodontitis crónica, que pueden ser debidos a factores geográficos y ambientales. Estos resultados, pueden influir en el tratamiento periodontal, principalmente en la elección del antibiótico sistémico a emplear en una determinada población.

El uso coadyvante de azitromicina puede ser recomendado en el tratamiento de pacientes con periodontitis asociada a *P. gingivalis*.

Implicaciones para investigaciones futuras

De acuerdo a los resultados obtenidos en estos tres estudios, las futuras investigaciones deberán tener en cuenta la presencia de diferentes perfiles microbiológicos en función de la zona geográfica donde se realice, así como la importancia de ajustar el tipo y la dosis de antimicrobiano a emplear en función de las resistencias bacterianas existentes en la zona, ya que ha quedado demostrado que las dosis empleadas en un país puede no ser efectiva en otro.

El uso empírico de antimicrobianos sistémicos debe de ser precedido de evaluaciones detalladas de la composición de la microbiota subgingival y sus susceptibilidades, en los entornos poblacionales en los que se planteen estos tratamientos. Idealmente, sin embargo, el tratamiento dirigido tras el análisis de la microbiota específica de un paciente, debe de ser la estrategia más adecuada para el uso de antimicrobianos sistémicos en el tratamiento de la periodontitis.

IV. CONCLUSIÓN

De manera general, los resultados de los estudios presentados avalan la importancia de *P. gingivalis* como patógeno asociado a periodontitis crónica: presenta una alta frecuencia de detección (superior al 60%) en pacientes de diferentes localizaciones geográficas; el uso de antimicrobianos dirigidos por la presencia de este patógeno mejora los resultados clínicos y microbiológicos; y, de momento, *P. gingivalis* es susceptible a los antimicrobianos más empleados, sin diferencias poblacionales.

De manera específica:

Los niveles de resistencia bacteriana de las bacterias periodontopatógenas aisladas en pacientes con periodontitis crónica en España son mayores que los encontrados en pacientes en Holanda. Se detectaron concentraciones mínimas inhibitorias significativamente superiores para penicilina G, amoxicilina, tetraciclina y azitromicina. *P. gingivalis* fue susceptible para todos los antibióticos estudiados en ambos grupos.

Se han detectado variaciones geográficas significativas en la composición de la flora subgingival en pacientes con periodontitis crónica. La frecuencia de detección de dos de los periodontopatógenos más importantes (*P. gingivalis* y *A. actinomycetemcomitans*) fue similar pero se encontraron diferencias en *P. intermedia/nigrecens*, *T. forsythia*, *P. micra* y bacterias entéricas. También se han detectado diferencias significativas en la proporción de *P. gingivalis*.

El uso, coadyuvante al raspado y alisado radicular, de azitromicina sistémica, en el tratamiento de pacientes con periodontitis moderada asociada a *P. gingivalis*, demostró mejores resultados clínicos y microbiológicos, frente al placebo.

X. BIBLIOGRAFÍA

AAP (2006) American Academy of Periodontology statement on local delivery of sustained or controlled release antimicrobials as adjunctive therapy in the treatment of periodontitis. *J Periodontol*;77(8):1458.

Abiko Y, Ogura N, Matsuda U, Yanagi K, Takiguchi H (1997). "A human monoclonal antibody which inhibits the coaggregation activity of *Porphyromonas gingivalis*." *Infect Immun* 65(9): 3966-3969.

Albandar JM (2014) Aggressive and acute periodontal diseases. *Periodontol 2000.* ;65(1):7-12.

Al-Joburi W, Quee TC, Lautar C, Lugovaz I, Bourgoun J, Delorme F, Chan EC (1989). "Effects of adjunctive treatment of periodontitis with tetracycline and spiramycin." *J Periodontol* 60(10): 533-539.

Ali R, Vecescu C, Jivanescu MC, Lofthus B, Skaug N (1996) "Prevalence of 6 putative periodontal pathogens in subgingival plaque samples from Romanian adult periodontitis patients." *J Clin Periodontol* 23(2): 133-139.

Amano A, Kuboniwa M, Nakawa I, Akiyama S, Morisaki I, Hamada S (2000) "Prevalence of specific genotypes of *Porphyromonas gingivalis* fimA and periodontal health status." *J Dent Res* 79(9): 1664-1668.

American Academy of periodontology statement on local delivery of sustained or controlled release antimicrobials as adjunctive therapy in the treatment of periodontitis. (2006) *J Periodontol*; 77:1458.

Apatzidou DA & Kinane DF (2004). "Quadrant root planing versus same-day full-mouth root planing." *J Clin Periodontol* 31(3): 152-159.

Apatzidou DA & Kinane DF (2004). "Quadrant root planing versus same-day full-mouth root planing. I. Clinical findings." *J Clin Periodontol* 31(2): 132-140.

Apatzidou DA, Riggio MP, Kinane DF (2004). "Quadrant root planing versus same-day full-mouth root planing. II. Microbiological findings." *J Clin Periodontol* 31(2): 141-148.

Ardila CM, Granada MI, Guzmán IC (2010). "Antibiotic resistance of subgingival species in chronic periodontitis patients." *J Periodontol Res* 45(4): 557-563.

Armitage, G.C (1999). "Development of a classification system for periodontal diseases and conditions." *Ann Periodontol* 4(1): 1-6.

Armitage GC & Cullinan MP (2010) Comparison of the clinical features of chronic and aggressive periodontitis. *Periodontol* 2000;53:12-27.

Avila-Campos MJ & Velasquez-Melendez G (2002). "Prevalence of putative periodontopathogens from periodontal patients and healthy subjects in Sao Paulo, SP, Brazil." *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 44(1): 1-5.

Axelsson P & Lindhe J (1981). "Effect of controlled oral hygiene procedures on caries and periodontal disease in adults. Results after 6 years." *J Clin Periodontol* 8(3): 239-248.

Axelsson P, Nyström B, Lindhe J (2004). "The long-term effect of a plaque control program on tooth mortality, caries and periodontal disease in adults. Results after 30 years of maintenance." *J Clin Periodontol* 31(9): 749-757.

Badersten A, Nilvéus R, Efelberg J (1981). "Effect of nonsurgical periodontal therapy. I. Moderately advanced periodontitis." *J Clin Periodontol* 8(1): 57-72.

Badersten A, Niveus R, Egelberg J (1987). "4-year observations of basic periodontal therapy." *J Clin Periodontol* 14(8): 438-444.

Bain CA, Beagrie GS, Bourgoin J, Delorme F, Holthuis A, Landry RG, Roy S, Schuller P, Singer D, Turnbull R (1994). "The effects of spiramycin and/or scaling on advanced periodontitis in humans." *J Can Dent Assoc* 60(3): 209, 212-207.

Baquero, F (1996). "Antibiotic resistance in Spain: what can be done? Task Force of the General Direction for Health Planning of the Spanish Ministry of Health." *Clin Infect Dis* 23(4): 819-823.

Beliveau D, Magnusson I, Bidwell JA, Zapert EF, Aukhil I, Wallet SM, Shaddox LM (2012). "Benefits of early systemic antibiotics in localized

aggressive periodontitis: a retrospective study." *J Clin Periodontol* 39(11): 1075-1081.

Benrachadi L, Bouziane A, Azziman Z, Bouziane-Ouatini F, Ennibi O (2012). "Screening for periodontopathogenic bacteria in severe chronic periodontitis in a Moroccan population." *Med Mal Infect* 42(12): 599-602.

Berglundh T, Krok L, Lijenberg B, Wetfelt E, Serino G, Lindhe J (1998). "The use of metronidazole and amoxicillin in the treatment of advanced periodontal disease. A prospective, controlled clinical trial." *J Clin Periodontol* 25(5): 354-362.

Bollen CM, Mongardini C, Papaioannou W, Van Steenberghe D, Quirynen M (1998). "The effect of a one-stage full-mouth disinfection on different intra-oral niches. Clinical and microbiological observations." *J Clin Periodontol* 25(1): 56-66.

Bollen CM, Vandekerckhove BN, Papaioannou W, Van Eldere J, Quirynen M (1996). "Full- versus partial-mouth disinfection in the treatment of periodontal infections. A pilot study: long-term microbiological observations." *J Clin Periodontol* 23(10): 960-970.

Bonito AJ, Lux L, Lohr KN (2005). "Impact of local adjuncts to scaling and root planing in periodontal disease therapy: a systematic review." *J Periodontol* 76(8): 1227-1236.

Botero JE, Contreras A, Lafaurie G, Jaramillo A, Betancourt M, Arce RM (2007). "Occurrence of periodontopathic and superinfecting bacteria in chronic and aggressive periodontitis subjects in a Colombian population." *J Periodontol* 78(4): 696-704.

Botero JE, Parra B, Jaramillo A, Contreras A (2007). "Subgingival human cytomegalovirus correlates with increased clinical periodontal parameters and bacterial coinfection in periodontitis." *J Periodontol* 78(12): 2303-2310.

Botero JE, Yepes FL, Ochoa SP, Hincapie JP, Roldan N, Ospina CA, Castrillon CA, Becerra MA (2013) Effects of periodontal non-surgical therapy plus azithromycin on glycemic control in patients with diabetes: a randomized clinical trial. *J Periodont Res*; 48: 706-712

Branschofsky M, Beikler T, Schäfer R, Flemmig TF, Lang H (2011). "Secondary trauma from occlusion and periodontitis." *Quintessence Int* 42(6): 515-522.

Bravo Pérez M, Casals-Peidró E, Cortés Martinicorena F, Llodra Calvo JC (2006). Encuesta de salud oral en España 2005. RCOE (11) (monográfico):409-456

Bronzwaer S, Lönnroth A, Haigh R (2004). "The European Community strategy against antimicrobial resistance." *Euro Surveill* 9(1): 30-34.

Brooun A, Liu S, Lewis K (2000). "A dose-response study of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms." *Antimicrob Agents Chemother* 44(3): 640-646.

Cars O, Mölsted S, Melander A (2001). "Variation in antibiotic use in the European Union." *Lancet* 357(9271): 1851-1853.

Caton JG, Cianco SG, Blieden TM, Bradshaw M, Crout RJ, Hefti AF, Massaro JM, Polson AM, Thomas J, Walker C (2000). "Treatment with subantimicrobial dose doxycycline improves the efficacy of scaling and root planing in patients with adult periodontitis." *J Periodontol* 71(4): 521-532.

Cionca N, Giannopoulou C, Ugolotti G, Mombrelli A (2009). "Amoxicillin and metronidazole as an adjunct to full-mouth scaling and root planing of chronic periodontitis." *J Periodontol* 80(3): 364-371.

Cionca N, Giannopoulou C, Ugolotti G, Mombrelli A (2010). "Microbiologic testing and outcomes of full-mouth scaling and root planing with or without amoxicillin/metronidazole in chronic periodontitis." *J Periodontol* 81(1): 15-23.

Citron DM, Ostovari MI, Karlsson A, Goldstein EJ (1991). "Evaluation of the E test for susceptibility testing of anaerobic bacteria." *J Clin Microbiol* 29(10): 2197-2203.

Cobb, C. M. (2002). "Clinical significance of non-surgical periodontal therapy: an evidence-based perspective of scaling and root planing." *J Clin Periodontol* 29 Suppl 2: 6-16.

Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP (1999). "Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections." *Science* 284(5418): 1318-1322.

Crotti T, Smith MD, Hirsch R, Soukoulis s, Weedon H, Capone M, Ahern MJ, Haynes D (2003). "Receptor activator NF kappaB ligand (RANKL) and osteoprotegerin (OPG) protein expression in periodontitis." *J Periodontal Res* 38(4): 380-387.

Chambrone I, Pannuti CM, Guglielmetti MR, Chambrone LA (2011). "Evidence grade associating periodontitis to preterm birth and/or low birth weight: I. A systematic review of prospective cohort studies." *J Clin Periodontol* 38(9): 795-808.

Dahlén G, Widar F, Teanpaisan R, Papapanou PN, Baelum V, Fejerskov O. (2002) *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in a rural adult population in southern Thailand. *Oral Microbiol Immunol* 17(3):137-42.

Darby IB, Hodge PJ, Riggio MP, Kinane DF (2000). "Microbial comparison of smoker and non-smoker adult and early-onset periodontitis patients by polymerase chain reaction." *J Clin Periodontol* 27(6): 417-424.

Darby IB, Hodge PJ, Riggio MP, Kinane DF (2005). "Clinical and microbiological effect of scaling and root planing in smoker and non-smoker chronic and aggressive periodontitis patients." *J Clin Periodontol* 32(2): 200-206.

Deng T, Wang L, Lv J, Pang J, Liu B, Du Y, Ke J (2011). "Association of three bacterial species and periodontal status in Chinese adults: an epidemiological approach." *J Clin Microbiol* 49(1): 184-188.

Dentino A, Lee S, Mailhot J, Hefti AF (2013). "Principles of periodontology." *Periodontol 2000* 61(1): 16-53.

Doungudomdacha S, Rawlinson A, Walsh TF, Douglas CW (2001). "Effect of non-surgical periodontal treatment on clinical parameters and the numbers of *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* at adult periodontitis sites." *J Clin Periodontol* 28(5): 437-445.

Durham J, Fraser HM, McCracken GI, Stone KM, John MT, Preshaw PM (2013). "Impact of periodontitis on oral health-related quality of life." *J Dent* 41(4): 370-376.

Ehmke B, Moter A, Beikler T, Milian E, Flemmig TF (2005). "Adjunctive antimicrobial therapy of periodontitis: long-term effects on disease progression and oral colonization." *J Periodontol* 76(5): 749-759.

Eke PI, Dye BA, Wei L, Thornton-Evans GO, Genco RJ (2012). "Prevalence of periodontitis in adults in the United States: 2009 and 2010." *J Dent Res* 91(10): 914-920.

Emingil G, Han B, Ozdemir G, Tervahartiala T, Vural C, Atilia G, Baylas H, Sorsa T (2012). "Effect of azithromycin, as an adjunct to nonsurgical periodontal treatment, on microbiological parameters and gingival crevicular fluid biomarkers in generalized aggressive periodontitis." *J Periodontal Res* 47(6): 729-739.

Engebretson, S. & T. Kocher (2013). "Evidence that periodontal treatment improves diabetes outcomes: a systematic review and meta-analysis." *J Periodontol* 84(4 Suppl): S153-169.

Fabrizi S, León R, Blanc V, Herrea D, Sanz M (2013). "Variability of the fimA gene in *Porphyromonas gingivalis* isolated from periodontitis and non-periodontitis patients." *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 18(1): e100-105.

Feng Z & Weinberg A(2006). "Role of bacteria in health and disease of periodontal tissues." *Periodontol* 2000 40: 50-76.

Fine DH, Kaplan JB, Kachlany SC, Schreiner HC (2006). "How we got attached to *Actinobacillus actinomycetemcomitans*: A model for infectious diseases." *Periodontol* 2000 42: 114-157.

Fives-Taylor PM, Meyer DH, Mintz ZP, Brissette C (1999). "Virulence factors of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*." *Periodontol* 2000 20: 136-167.

Flemmig TF, Milián E, Kopp C, Karch H, Klaiber B (1998). "Differential effects of systemic metronidazole and amoxicillin on *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in intraoral habitats." *J Clin Periodontol* 25(1): 1-10.

Foley I & Gilbert P (1996). "Antibiotic resistance of biofilms." *Biofouling* 10(4): 331-346.

Fujise O, Hamachi T, Inoue K, Miura M, Maeda K (2002). "Microbiological markers for prediction and assessment of treatment outcome following non-surgical periodontal therapy." *J Periodontol* 73(11): 1253-1259.

Gajardo M, Silva N, Gómez L, León R, Parra B, Contreras A, Gamonal J (2005). "Prevalence of periodontopathic bacteria in aggressive periodontitis patients in a Chilean population." *J Periodontol* 76(2): 289-294.

Gaunt F, Devine M, Pennington M, Vemazza C, Gwynnett E, Steen N, Heasman P (2008). "The cost-effectiveness of supportive periodontal care for patients with chronic periodontitis." *J Clin Periodontol* 35(8 Suppl): 67-82.

Gilbert P & Brown MRW. (1995) Mechanisms of the protection of bacterial biofilms from antimicrobial agents. In: Lappin-Scott HM, Costerton JW, (ed). *Microbial biofilms. Plant and microbial biotechnology research series.* Cambridge: Cambridge University Press:118-130).

Gjermeo P, Rösing CK, Susin C, Oppermann R (2002). "Periodontal diseases in Central and South America." *Periodontol* 2000 29: 70-78.

Golub LM, McNamara TF, Ryan ME, Kohut B, Blieden T, Payonk G, Sipos T, Baron HJ (2001). "Adjunctive treatment with subantimicrobial doses of doxycycline: effects on gingival fluid collagenase activity and attachment loss in adult periodontitis." *J Clin Periodontol* 28(2): 146-156.

Gomi K, Yashima A, Nagano T, Kanazashi M, Maeda N, Arai T (2007). "Effects of full-mouth scaling and root planing in conjunction with systemically administered azithromycin." *J Periodontol* 78(3): 422-429.

Goodson JM, Haffajee AD, Socransky SS, Kent R, Teles R, Hasturk H, Bogren A, Van Dyke T, Wennstrom J, Lindhe J (2012). "Control of periodontal infections: a randomized controlled trial I. The primary outcome attachment gain and pocket depth reduction at treated sites." *J Clin Periodontol* 39(6): 526-536.

Gregory RL, Kim DE, Kindle JC, Hobbs LC, Lloyd DR (1992). "Immunoglobulin-degrading enzymes in localized juvenile periodontitis." *J Periodontal Res* 27(3): 176-183.

Guerrero A, Griffiths GS, Nibali L, Suvan J, Moles DR, Laurell L, Tonetti MS (2005). "Adjunctive benefits of systemic amoxicillin and metronidazole in non-surgical treatment of generalized aggressive periodontitis: a randomized placebo-controlled clinical trial." *J Clin Periodontol* 32(10): 1096-1107.

Haas AN, de Castro GD, Moreno T, Susin C, Albandar JM, Oppermann RV, Rösing CK (2008). "Azithromycin as an adjunctive treatment of aggressive periodontitis: 12-months randomized clinical trial." *J Clin Periodontol* 35(8): 696-704.

Haas AN, Silva-Boghossian CM, Colombo AP, Susin C, Albandar JM, Oppermann RV, Rösing CK (2012). "Azithromycin as an adjunctive treatment of aggressive periodontitis: radiographic findings of a 12-month randomized clinical trial." *Am J Dent* 25(4): 215-219.

Haffajee AD, Bogren A, Hasturk H, Feres M, Lopez NJ, Socransky SS (2004). "Subgingival microbiota of chronic periodontitis subjects from different geographic locations." *J Clin Periodontol* 31(11): 996-1002.

Haffajee AD, Bogren A, Hasturk H, Feres M, Lopez NJ, Socransky SS (2004). "Subgingival microbiota of chronic periodontitis subjects from different geographic locations." *J Clin Periodontol* 31(11): 996-1002.

Haffajee AD, Japlit M, Bogren A, Kent RL Jr, Goodson JM, Socransky SS (2005). "Differences in the subgingival microbiota of Swedish and USA subjects who were periodontally healthy or exhibited minimal periodontal disease." *J Clin Periodontol* 32(1): 33-9.

Haffajee AD, Patel M, Socransky SS (2008). "Microbiological changes associated with four different periodontal therapies for the treatment of chronic periodontitis." *Oral Microbiol Immunol* 23(2): 148-157.

Haffajee AD & Socransky SS (1994). "Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases." *Periodontol* 2000 5: 78-111.

Haffajee AD, Socransky SS, Gunsolley JC (2003). "Systemic anti-infective periodontal therapy. A systematic review." *Ann Periodontol* 8(1): 115-181.

Haffajee AD, Teles RP, Socransky SS (2006). "The effect of periodontal therapy on the composition of the subgingival microbiota." *Periodontol* 2000 42: 219-258.

Hammond BF, Lillard SE, Stevens RH (1987). "A bacteriocin of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*." *Infect Immun* 55(3): 686-691.

Han B, Emingil G, özdemir G, Tervahartiala T, Vural C, Atilla G, Baylas H, Sorsa T (2012). "Azithromycin as an adjunctive treatment of generalized severe chronic periodontitis: clinical, microbiologic, and biochemical parameters." *J Periodontol* 83(12): 1480-1491.

HanesPJ & Purvis JP (2003). "Local anti-infective therapy: pharmacological agents. A systematic review." *Ann Periodontol* 8(1): 79-98.

Haubek D, Ennibi OK, Poulsen K, Vaeth M, Poulsen S, Kilian M (2008) Risk of aggressive periodontitis in adolescent carriers of the JP2 clone of *Aggregatibacter (Actinobacillus) actinomycetemcomitans* in Morocco: a prospective longitudinal cohort study. *Lancet*. Jan 19;371:237-42

Heller D, Varela VM, Silva-Senem MX, Torres MC, Feres-Filho EJ, Colombo AP (2011) Impact of systemic antimicrobials combined with anti-infective mechanical debridement on the microbiota of generalized aggressive periodontitis: a 6-month RCT. *J Clin Periodontol*;38(4):355-64

Herrera D, Alonso B, León R, Roldán S, Sanz M (2008). "Antimicrobial therapy in periodontitis: the use of systemic antimicrobials against the subgingival biofilm." *J Clin Periodontol* 35(8 Suppl): 45-66.

Herrera D, Contreras A, Gamonal J, Oteo A, Jaramillo A, Silva N, Sanz M, Botero JE, León R (2008). "Subgingival microbial profiles in chronic periodontitis patients from Chile, Colombia and Spain." *J Clin Periodontol* 35(2): 106-113.

Herrera D, Roldán S, González I, Sanz M (2000). "The periodontal abscess (II). Short-term clinical and microbiological efficacy of 2 systemic antibiotic regimens." *J Clin Periodontol* 27(6): 395-404.

Herrera D, Roldán S, Sanz M (2000). "The periodontal abscess: a review." *J Clin Periodontol* 27(6): 377-386.

Herrera D, Sanz M, Jepsen S, Needleman I, Roldán S (2002). "A systematic review on the effect of systemic antimicrobials as an adjunct to scaling and root planing in periodontitis patients." *J Clin Periodontol* 29 Suppl 3: 136-159; discussion 160-132.

Hill RW, Ramfjord SP, Morrisin EC, Appleberry EA, Caffesse RG, Kerry GJ, Nissle RR (1981). "Four types of periodontal treatment compared over two years." *J Periodontol* 52(11): 655-662.

Hincapié JP, Castrillón CA, Yepes FL, Roldan N, Becerra MA, Moreno SM, Consuegra J, Contreras A, Botero JE (2014) Microbiological effects of periodontal therapy plus azithromycin in patients with diabetes: results from a randomized clinical trial. *Acta Odontol Latinoam*;27(2):89-95

Holt SC & Ebersole JL (2005). "Porphyromonas gingivalis, Treponema denticola, and Tannerella forsythia: the "red complex", a prototype polybacterial pathogenic consortium in periodontitis." *Periodontol* 2000 38: 72-122.

Holt SC, Kesacalu L, Walker S, Genco CA (1999). "Virulence factors of Porphyromonas gingivalis." *Periodontol* 2000 20: 168-238.

Holtfreter b, Kocher T, Hoffmann T, Desvarieux M, Micheelis W (2010). "Prevalence of periodontal disease and treatment demands based on a German dental survey (DMS IV)." *J Clin Periodontol* 37(3): 211-219.

Holtfreter B, Albandar JM, Dietrich T, Dye BA, Eaton KA, Eke PI, Papapanou PN, Kocher T; Joint EU/USA Periodontal Epidemiology Working Group. (2015) Standards for reporting chronic periodontitis prevalence and severity in epidemiologic studies: Proposed standards from the Joint EU/USA Periodontal Epidemiology Working Group. *J Clin Periodontol*;42(5):407-12.

Isidor F & Karring T (1986). "Long-term effect of surgical and non-surgical periodontal treatment. A 5-year clinical study." *J Periodontal Res* 21(5): 462-472.

Iniesta M, Herrera D, Serrano J, Sanz M. (2008) Análisis de los factores de virulencia de los patógenos de asociación fuerte con la periodontitis:

Aggregatibacter actinomycetemcomitans, Porphyromonas gingivalis y Tannerella forsythia. Periodoncia y osteontigración;18(2):109-115

Joyston-Bechal S, Smales FC, Duckworth R (1984). "Effect of metronidazole on chronic periodontal disease in subjects using a topically applied chlorhexidine gel." J Clin Periodontol 11(1): 53-62.

Kato S, Muro M, Akifusa S, Hanada N, Semba I, Fujii T, Kowashi Y, Nishihara T (1995). "Evidence for apoptosis of murine macrophages by Actinobacillus actinomycetemcomitans infection." Infect Immun 63(10): 3914-3919.

Kelk P, Claesson R, hånström L, Lerner UH, Kalfas S, Johansson A(2005). "Abundant secretion of bioactive interleukin-1beta by human macrophages induced by Actinobacillus actinomycetemcomitans leukotoxin." Infect Immun 73(1): 453-458.

Kelk P, Johansson A, Claesson R, Hänström L, Kalfas S (2003). "Caspase 1 involvement in human monocyte lysis induced by Actinobacillus actinomycetemcomitans leukotoxin." Infect Immun 71(8): 4448-4455.

Kerr, N. W. (1981). "Treatment of chronic periodontitis. 45% failure rate after 5 years." Br Dent J 150(8): 222-224.

Kimizuka R, Miura T, Okuda K (1996). "Characterization of Actinobacillus actinomycetemcomitans hemolysin." Microbiol Immunol 40(10): 717-723.

Kinane D, Berglundh T, Lindhe J (2008) Pathogenesis of periodontitis. En Clinical periodontology and implant dentistry. En: Lindhe J, Lang NP, Karring T (eds) fifth Edition. Copenhagen: Blackwell Munksgaard: 288-299.

Kinniment SL, Wimpenny JW, Adams D, Marsh PD (1996). "The effect of chlorhexidine on defined, mixed culture oral biofilms grown in a novel model system." J Appl Bacteriol 81(2): 120-125.

Knowles JW, Burgett FG, Nissle RR, Shick RA, Morrison EC, Ramfjord SP (1979). "Results of periodontal treatment related to pocket depth and attachment level. Eight years." J Periodontol 50(5): 225-233.

Kolodrubetz D, Spitznagel J Jr, Wang B, Phillips LH, Jacobs C, Kraig E (1996). "cis Elements and trans factors are both important in strain-specific

regulation of the leukotoxin gene in *Actinobacillus actinomycetemcomitans*." *Infect Immun* 64(9): 3451-3460.

Konig J, Holtfreter B, Kocher T (2010). "Periodontal health in Europe: future trends based on treatment needs and the provision of periodontal services--position paper 1." *Eur J Dent Educ* 14 Suppl 1: 4-24.

Korostoff J, Wang JF, Kieba I, Miller M, Shenker BJ, Lally ET (1998). "Actinobacillus actinomycetemcomitans leukotoxin induces apoptosis in HL-60 cells." *Infect Immun* 66(9): 4474-4483.

Kuboniwa, M. & R. J. Lamont (2010). "Subgingival biofilm formation." *Periodontol* 2000 52(1): 38-52.

Kulkarni GV, Lee WK, Aitken S, Birek P, McCulloch CA (1991). "A randomized, placebo-controlled trial of doxycycline: effect on the microflora of recurrent periodontitis lesions in high risk patients." *J Periodontol* 62(3): 197-202.

Lafaurie GI, Contreras A, Barón A, Botero J, Mayrga-Fayad I, Jaramillo A, Giraldo A, González F, Mantilla S, Botero A, Archila LH, Díaz A, Chacón T, Castillo DM, Betancourt M, del Rosario Aya M, Arce R (2007). "Demographic, clinical, and microbial aspects of chronic and aggressive periodontitis in Colombia: a multicenter study." *J Periodontol* 78(4): 629-639.

Lang NP, Tan WC, Krähenmann MA, Zwahlen M (2008). "A systematic review of the effects of full-mouth debridement with and without antiseptics in patients with chronic periodontitis." *J Clin Periodontol* 35(8 Suppl): 8-21.

Lang, N. P. & M. S. Tonetti (2003). "Periodontal risk assessment (PRA) for patients in supportive periodontal therapy (SPT)." *Oral Health Prev Dent* 1(1): 7-16.

Larsen, T. (2002). "Susceptibility of *Porphyromonas gingivalis* in biofilms to amoxicillin, doxycycline and metronidazole." *Oral Microbiol Immunol* 17(5): 267-271.

Lau L, Sanz m, Herrera D, Morillo JM, Martín c, Silva A (2004). "Quantitative real-time polymerase chain reaction versus culture: a comparison between two methods for the detection and quantification of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* and *Tannerella*

forsythisis in subgingival plaque samples." J Clin Periodontol 31(12): 1061-1069.

Lindhe J, Liljenberg B, Adielsson B (1983). "Effect of long-term tetracycline therapy on human periodontal disease." J Clin Periodontol 10(6): 590-601.

Lindhe J & Nyman S (1975). "The effect of plaque control and surgical pocket elimination on the establishment and maintenance of periodontal health. A longitudinal study of periodontal therapy in cases of advanced disease." J Clin Periodontol 2(2): 67-79.

Lindhe J, Wetfelt E, Nyman S, Socransky SS, Heijl L, Bratthall G (1982). "Healing following surgical/non-surgical treatment of periodontal disease. A clinical study." J Clin Periodontol 9(2): 115-128.

Listgarten MA, Lindhe J, Hellden L (1978). "Effect of tetracycline and/or scaling on human periodontal disease. Clinical, microbiological, and histological observations." J Clin Periodontol 5(4): 246-271.

Liu D, Xu JK, Fifiomeni L, Huang L, Pavlos NJ, Rogers M, Tan A, Price P, Zheng MH (2003). "Expression of RANKL and OPG mRNA in periodontal disease: possible involvement in bone destruction." Int J Mol Med 11(1): 17-21.

Llodra Calvo JC (2010). Encuesta de salud oral en España. RCOE 2012;17(1):13-46

Loe, H. (1994). "Periodontal disease as we approach the year 2000." J Periodontol 65(5 Suppl): 464-467.

Loesche WJ, Grossman N, Giordano J (1993). "Metronidazole in periodontitis (IV). The effect of patient compliance on treatment parameters." J Clin Periodontol 20(2): 96-104.

Loesche WJ, Grossman NS, Earnest R, Corpron R (1984). "Metronidazole in periodontitis. I. Clinical and bacteriological results after 15 to 30 weeks." J Periodontol 55(6): 325-335.

Lopez, N. J. (2000). "Occurrence of Actinobacillus actinomycetemcomitans, Porphyromonas gingivalis, and Prevotella intermedia in progressive adult periodontitis." J Periodontol 71(6): 948-954.

Lopez NJ, Socransky SS, Da Silva I, Japlit MR, Haffajee AD (2004). "Subgingival microbiota of Chilean patients with chronic periodontitis." *J Periodontol* 75(5): 717-725.

López NJ, Mellado JC, Leighton GX (1996). Occurrence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* and *Prevotella intermedia* in juvenile periodontitis. *J Clin Periodontol*. Feb;23(2):101-5.

Lu, B. & B. C. McBride (1994). "Stress response of *Porphyromonas gingivalis*." *Oral Microbiol Immunol* 9(3): 166-173.

Llodra Calvo JC. Encuesta de salud oral en España 2010. *RCOE* 2012;17:13-46

Machka K, Balg H, Braveny I (1988). "Distribution and resistance patterns of *Haemophilus influenzae*: a European cooperative study." *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 7(1): 14-24.

Magnusson I, Low SB, McArthur WP, Marks RG, Walker CB, Maruniak J, Taylor M Padgett P, Jung J, Clark WB (1994) Treatment of subjects with refractory periodontal disease. *J Clin Periodontol*;21:628-37

Mangan DF, Taichman NS, Lally ET, Wahl SM (1991). "Lethal effects of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin on human T lymphocytes." *Infect Immun* 59(9): 3267-3272.

Marsh PD, Moter A, Devine DA (2011). "Dental plaque biofilms: communities, conflict and control." *Periodontol* 2000 55(1): 16-35.

Mascarenhas P, Gapski R, Al-Shammari K, Hill R, Soehren S, Fenno JC, Giannobile WV, Wang HL (2005). "Clinical response of azithromycin as an adjunct to non-surgical periodontal therapy in smokers." *J Periodontol* 76(3): 426-436.

Matesanz-Perez P, García-Gargallo M, Figuero E, Bascones-Martínez A, Sanz M, Herrera D (2013). "A systematic review on the effects of local antimicrobials as adjuncts to subgingival debridement, compared with subgingival debridement alone, in the treatment of chronic periodontitis." *J Clin Periodontol* 40(3): 227-241.

Matuliene G, Pjetursson BE, Salvi GE, Schmidlin K, Brägger U, Zwahlen M, Lang NP (2008). "Influence of residual pockets on progression of

periodontitis and tooth loss: results after 11 years of maintenance." *J Clin Periodontol* 35(8): 685-695.

Matuliene G, Studer R, Lang NP, Schmidlin K, Pjetursson BE, Salvi GE, Brägger U, Zwahlen M (2010). "Significance of Periodontal Risk Assessment in the recurrence of periodontitis and tooth loss." *J Clin Periodontol* 37(2): 191-199.

McClellan DL, Griffen AL, Leys EJ (1996). "Age and prevalence of *Porphyromonas gingivalis* in children." *J Clin Microbiol* 34(8): 2017-2019.

McCulloch CA, Birek P, Overall C, Aitken S, Lee W, Kulkarni G (1990). "Randomized controlled trial of doxycycline in prevention of recurrent periodontitis in high-risk patients: antimicrobial activity and collagenase inhibition." *J Clin Periodontol* 17(9): 616-622.

Mestnik MJ, Feres M, Figueriredo LC, Duarte PM, Lira EZ, Favari M (2010). "Short-term benefits of the adjunctive use of metronidazole plus amoxicillin in the microbial profile and in the clinical parameters of subjects with generalized aggressive periodontitis." *J Clin Periodontol* 37(4): 353-365.

Mongardini C, van Steenberghe D, Dekeyser C, Quirynen M (1999). "One stage full- versus partial-mouth disinfection in the treatment of chronic adult or generalized early-onset periodontitis. I. Long-term clinical observations." *J Periodontol* 70(6): 632-645.

Muller HP, Holderrieth S, Burkhardt U, Höfler U (2002). "In vitro antimicrobial susceptibility of oral strains of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* to seven antibiotics." *J Clin Periodontol* 29(8): 736-742.

Nachnani S, Scuteri A, Newman MG, Avanesian AB, Lomeli SL (1992). "E-test: a new technique for antimicrobial susceptibility testing for periodontal microorganisms." *J Periodontol* 63(7): 576-583.

Ng, V. W. & N. F. Bissada (1998). "Clinical evaluation of systemic doxycycline and ibuprofen administration as an adjunctive treatment for adult periodontitis." *J Periodontol* 69(7): 772-776.

Nichols WW. Biofilm permeability to antibacterial agents. In: Wimpenny J, Nichols WW, Stickler D, Lappin-Scott H (1993) *Ed Bacterial biofilms and their control in medicine and industry*. Cardiff: Bioline:141-149.

Nozaki T, Kusumoto Y, Kitamura M, Hirano H, Koyama A, Hayakawa M, Takiguchi H, Abiko Y, Murakami S, Okada H (2001). "A sensitive method for detecting Porphyromonas gingivalis by polymerase chain reaction and its possible clinical application." J Periodontol 72(9): 1228-1235.

Nyman S, Lindhe J, Rosling B (1977). "Periodontal surgery in plaque-infected dentitions." J Clin Periodontol 4(4): 240-249.

Magnusson I, Low SB, McArthur WP, Marks RG, Walker CB, Maruniak J, Taylor M Padgett P, Jung J, Clark WB (1994) Treatment of subjects with refractory periodontal disease. J Clin Periodontol;21:628-37

Oteo A, Herrera D, Figuera E, O'Connor A, González I, Sanz M (2010). "Azithromycin as an adjunct to scaling and root planing in the treatment of Porphyromonas gingivalis-associated periodontitis: a pilot study." J Clin Periodontol 37(11): 1005-1015.

O'Brien-simpson NM, Veith PD, Dashper SG, Reynolds EC (2004) Antigens of bacteria associated with periodontitis. Periodontology 2000; 35(2):101-134.

Page RC & Eke PI (2007). "Case definitions for use in population-based surveillance of periodontitis." J Periodontol 78(7 Suppl): 1387-1399.

Paju S & Scannapieco FA (2007). "Oral biofilms, periodontitis, and pulmonary infections." Oral Dis 13(6): 508-512.

Pajukanta R, Asikainen S, Forsblom B, Saarela M, Jousimies-Somer H (1993). "beta-Lactamase production and in vitro antimicrobial susceptibility of Porphyromonas gingivalis." FEMS Immunol Med Microbiol 6(2-3): 241-244.

Palmer RM, Matthews JP, Wilson RF (1999). "Non-surgical periodontal treatment with and without adjunctive metronidazole in smokers and non-smokers." J Clin Periodontol 26(3): 158-163.

Papapanou PN, Baelum V, Luan WM, Madianos PN, Chen X, Fejerskov O, Dahlén G (1997) Subgingival microbiota in adult Chinese: prevalence and relation to periodontal disease progression. J Periodontol; 68(7):651-66

Paster BJ, Olsen I, Asa JA, Dewhirst FE (2006). "The breadth of bacterial diversity in the human periodontal pocket and other oral sites." *Periodontol* 2000 42: 80-87.

Pihlstrom BL, McHugh RB, Oliphant RH, Ortiz-Campos C (1983). "Comparison of surgical and nonsurgical treatment of periodontal disease. A review of current studies and additional results after 6 1/2 years." *J Clin Periodontol* 10(5): 524-541.

Pradeep AR, Sagar SV, Daisy H (2008). "Clinical and microbiologic effects of subgingivally delivered 0.5% azithromycin in the treatment of chronic periodontitis." *J Periodontol* 79(11): 2125-2135.

Pradier C, Dunais B, Carsenti-Etesse H, Dellamonica P (1997). "Pneumococcal resistance patterns in Europe." *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 16(9): 644-647.

Pratten J & Wilson (1999). "Antimicrobial susceptibility and composition of microcosm dental plaques supplemented with sucrose." *Antimicrob Agents Chemother* 43(7): 1595-1599.

Preus HR, Genleiksrud TM, Sandvik L, Gjermo P, Baelum V (2013). "A randomized, double-masked clinical trial comparing four periodontitis treatment strategies: 1-year clinical results." *J Periodontol* 84(8): 1075-1086.

Preus H & Aamdal A. (2014) Letters to the editor:
Re: The Clinical Effect of Scaling and Root Planing and the Concomitant Administration of Systemic Amoxicillin and Metronidazole: A Systematic Review. Zandbergen D, Slot DE, Cobb CM, Van der Weijden FA. (*J Periodontol* 2013;84:332-351.)
Re: Effectiveness of Systemic Amoxicillin/Metronidazole as Adjunctive Therapy to Scaling and Root Planing in the Treatment of Chronic Periodontitis: A Systematic Review and Meta-Analysis. Sgolastra F, Gatto R, Petrucci A, Monaco A. (*J Periodontol* 2012;83:1257-1269.)
Re: Effectiveness of Systemic Amoxicillin/Metronidazole as an Adjunctive Therapy to Full-Mouth Scaling and Root Planing in the Treatment of Aggressive Periodontitis: A Systematic Review and Meta-Analysis. Sgolastra F, Petrucci A, Gatto R, Monaco A. (*J Periodontol* 2012;83:731-743.)
J Periodontol;85:374-384.

Puig-Silla M, Daí-Fernández F, Montiel-Company JM, Almerich-Silla JM (2012). "Prevalence of fimA genotypes of Porphyromonas gingivalis and other periodontal bacteria in a Spanish population with chronic periodontitis." *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 17(6): e1047-1053.

Quirynten M, Bollen CM, Vandekerckhove BN, Dekeyser C, Papaioannou W, Eysen H (1995). "Full- vs. partial-mouth disinfection in the treatment of periodontal infections: short-term clinical and microbiological observations." *J Dent Res* 74(8): 1459-1467.

Quirynten M, De Soete M, Dierickx K, van Steenberghe D (2001). "The intra-oral translocation of periodontopathogens jeopardises the outcome of periodontal therapy. A review of the literature." *J Clin Periodontol* 28(6): 499-507.

Quirynten M, Mongardini C, de Soete M, Pauwels M, Coucke W, van Eldere J, van Steenberghe D (2000). "The role of chlorhexidine in the one-stage full-mouth disinfection treatment of patients with advanced adult periodontitis. Long-term clinical and microbiological observations." *J Clin Periodontol* 27(8): 578-589.

Quirynten M, Mongardini C, Pauwels M, Bollen CM, van Eldere J, van Steenberghe D (1999). "One stage full- versus partial-mouth disinfection in the treatment of chronic adult or generalized early-onset periodontitis. II. Long-term impact on microbial load." *J Periodontol* 70(6): 646-656.

Rabie G, Lally ET, Shenker BJ (1988). "Immunosuppressive properties of Actinobacillus actinomycetemcomitans leukotoxin." *Infect Immun* 56(1): 122-127.

Ramberg P, Rosling B, Serino G, Hellström MK, Socransky SS, Lindhe J (2001). "The long-term effect of systemic tetracycline used as an adjunct to non-surgical treatment of advanced periodontitis." *J Clin Periodontol* 28(5): 446-452.

Ramfjord SP, Knowles JW, Nissle RR, Burgett FG, Shick RA (1975). "Results following three modalities of periodontal therapy." *J Periodontol* 46(9): 522-526.

Rams TE, Degener JE, van Winkelhoff AJ (2013). "Prevalence of beta-lactamase-producing bacteria in human periodontitis." *J Periodontol* 48(4): 493-499.

Rams TE, Degener JE, van Winkelhoff AJ (2014). "Antibiotic resistance in human chronic periodontitis microbiota." *J Periodontol* 85(1): 160-169.

Renvert S & Persson GR (2002). "A systematic review on the use of residual probing depth, bleeding on probing and furcation status following initial periodontal therapy to predict further attachment and tooth loss." *J Clin Periodontol* 29 Suppl 3: 82-89; discussion 90-81.

Renvert S, Wikström M, Dahlén G, Slots J, Egelberg J (1990). "Effect of root debridement on the elimination of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Bacteroides gingivalis* from periodontal pockets." *J Clin Periodontol* 17(6): 345-350.

Renvert S, Wikström M, Dahlén G, Slots J, Egelberg J (1990). "On the inability of root debridement and periodontal surgery to eliminate *Actinobacillus actinomycetemcomitans* from periodontal pockets." *J Clin Periodontol* 17(6): 351-355.

Retsema J, Girard A, Schelkly W, Manousos M, Anderson M, Bright G, Borovoy R, Brennan L, Mason R (1987). "Spectrum and mode of action of azithromycin (CP-62,993), a new 15-membered-ring macrolide with improved potency against gram-negative organisms." *Antimicrob Agents Chemother* 31(12): 1939-1947.

Reyes L, Herrera D, Kozarov E, Roldán S, Progulske-fox A (2013). "Periodontal bacterial invasion and infection: contribution to atherosclerotic pathology." *J Periodontol* 84(4 Suppl): S30-50.

Robertson PB, Lantz M, Marucha PT, Kornman KS, Levy BM (1982). "Collagenolytic activity associated with *Bacteroides* species and *Actinobacillus actinomycetemcomitans*." *J Periodontol Res* 17(3): 275-283.

Rooney J, Wade WG, Sprague SV, Newcombe RG, Addy M (2002). "Adjunctive effects to non-surgical periodontal therapy of systemic metronidazole and amoxicillin alone and combined. A placebo controlled study." *J Clin Periodontol* 29(4): 342-350.

Rosen G, Nisimov I, Helcer M, Sela MN (2003). "*Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotype b lipopolysaccharide mediates coaggregation with *Fusobacterium nucleatum*." *Infect Immun* 71(6): 3652-3656.

Rosling B, Nyman S, Lindhe J (1976). "The effect of systematic plaque control on bone regeneration in infrabony pockets." *J Clin Periodontol* 3(1): 38-53.

Rylev M1 & Kilian M (2008) Prevalence and distribution of principal periodontal pathogens worldwide. *J Clin Periodontol*.35(8 Suppl):346-61.

Sabet M, Lee SW, Nauman RK, Sims T, Um HS (2003). "The surface (S-) layer is a virulence factor of *Bacteroides forsythus*." *Microbiology* 149(Pt 12): 3617-3627.

Sampaio E, Rocha M, Figueiredo LC, Faveri M, Duarte PM, Gomes Lira EA, Feres M (2011). "Clinical and microbiological effects of azithromycin in the treatment of generalized chronic periodontitis: a randomized placebo-controlled clinical trial." *J Clin Periodontol* 38(9): 838-846.

Sanz I, Alonso B, Carasol M, Herrera D, Sanz M (2012). "Nonsurgical treatment of periodontitis." *J Evid Based Dent Pract* 12(3 Suppl): 76-86.

Sanz M & Teughels W (2008). "Innovations in non-surgical periodontal therapy: Consensus Report of the Sixth European Workshop on Periodontology." *J Clin Periodontol* 35(8 Suppl): 3-7.

Sanz M, van Winkelhoff AJ, Herrera D, DelleMijn-Kippuw N, Simón R, Winkel E (2000). "Differences in the composition of the subgingival microbiota of two periodontitis populations of different geographical origin. A comparison between Spain and The Netherlands." *Eur J Oral Sci* 108(5): 383-392.

Saxen L & Asikainen S. (1993) Metronidazole in the treatment of localized juvenile periodontitis. *J Clin Periodontol* 20,(3) 166-171.

Sbordone L, Ramaglia L, Gulletta E, Iacono V (1990). "Recolonization of the subgingival microflora after scaling and root planing in human periodontitis." *J Periodontol* 61(9): 579-584.

Sefton AM, Maskell JP, Beighton D, Whaley A, Shain H, Foyle D, Smith SR, Smales FC, Williams JD (1996). "Azithromycin in the treatment of periodontal disease. Effect on microbial flora." *J Clin Periodontol* 23(11): 998-1003.

Shani S, Friedman M, Steinberg D (2000). "The anticariogenic effect of amine fluorides on *Streptococcus sobrinus* and glucosyltransferase in biofilms." *Caries Res* 34(3): 260-267.

Sharma V, Sharma A, Kumar V, Aggarwal S (2009). "Disulfiram-like reaction with ornidazole." *J Postgrad Med* 55(4): 292-293.

Shiloah J & Patters MR (1994). "DNA probe analyses of the survival of selected periodontal pathogens following scaling, root planing, and intra-pocket irrigation." *J Periodontol* 65(6): 568-575.

Sigusch B, Beier M, Klinger G, Pfster W, Glockmann E (2001). "A 2-step non-surgical procedure and systemic antibiotics in the treatment of rapidly progressive periodontitis." *J Periodontol* 72(3): 275-283.

Silva-Senem MX, Heller D, Varela VM, Torres MC, Feres-Filho EJ, Colombo AP (2013). "Clinical and microbiological effects of systemic antimicrobials combined to an anti-infective mechanical debridement for the management of aggressive periodontitis: a 12-month randomized controlled trial." *J Clin Periodontol* 40(3): 242-251.

Slots J & Ting M (1999) *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in human periodontal disease: occurrence and treatment. *Periodontol* 2000;20:82-121.

Smith SR, Foyle DM, Daniels J, Joyston-Bechal S, Smales FC, Sefton A, Williams J. (2002). "A double-blind placebo-controlled trial of azithromycin as an adjunct to non-surgical treatment of periodontitis in adults: clinical results." *J Clin Periodontol* 29(1): 54-61.

Soares GM, Figueiredo LC, Faveri M, Cortelli SC, Duarte PM, Feres M (2012). "Mechanisms of action of systemic antibiotics used in periodontal treatment and mechanisms of bacterial resistance to these drugs." *J Appl Oral Sci* 20(3): 295-309.

Socransky S S & Gibbons RJ (1965). "REQUIRED ROLE OF BACTEROIDES MELANINOGENICUS IN MIXED ANAEROBIC INFECTIONS." *J Infect Dis* 115: 247-253.

Socransky & Haffajee (1996) AAP Consensus report. Periodontal diseases: epidemiology and diagnosis. *Ann Periodontol* (5)216-222

Socransky SS & Haffajee AD (1994) Evidence of bacterial etiology: a historical perspective. *Periodontol* 2000; jun5:7-25

Socransky SS & Haffajee AD (2002). "Dental biofilms: difficult therapeutic targets." *Periodontol* 2000 28: 12-55.

Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL Jr (1998). "Microbial complexes in subgingival plaque." *J Clin Periodontol* 25(2): 134-144.

Soder B, Nedlich U, Jin LJ (1999). "Longitudinal effect of non-surgical treatment and systemic metronidazole for 1 week in smokers and non-smokers with refractory periodontitis: a 5-year study." *J Periodontol* 70(7): 761-771.

Suzuki N, Nakano Y, Kiyoura Y (2006). "Characterizing the specific coaggregation between *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotype c strains and *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277." *Oral Microbiol Immunol* 21(6): 385-391.

Taichman NS, Iwase M, Kirchak H, Berthold P, Lally ET (1991). "Membranolytic activity of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin." *J Periodontal Res* 26(3 Pt 2): 258-260.

Takahashi N, Ishihara K, Kato T, Okuda K (2007). "Susceptibility of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* to six antibiotics decreases as biofilm matures." *J Antimicrob Chemother* 59(1): 59-65.

Taylor JJ, Preshaw PM, Lalla E (2013). "A review of the evidence for pathogenic mechanisms that may link periodontitis and diabetes." *J Clin Periodontol* 40 Suppl 14: S113-134.

Teeuw WJ, Gerdes VE, loos BG (2010). "Effect of periodontal treatment on glyceamic control of diabetic patients: a systematic review and meta-analysis." *Diabetes Care* 33(2): 421-427.

Teles RP, Haffajee AD, Socransky SS (2006). "Microbiological goals of periodontal therapy." *Periodontol* 2000 42: 180-218.

Tomita S, Komiyaa-Ito A, Imamura K, Kita D, Ota K, Takayama S, Makino-Oi A, Kinumatsu T, Ota M, Saito A (2013). "Prevalence of *Aggregatibacter*

actinomycetemcomitans, Porphyromonas gingivalis and Tannerella forsythia in Japanese patients with generalized chronic and aggressive periodontitis." Microb Pathog 61-62: 11-15.

Tonetti, M. S. (2009). "Periodontitis and risk for atherosclerosis: an update on intervention trials." J Clin Periodontol 36 Suppl 10: 15-19.

Tuite-McDonnell M, Griffen AL, Moeschberger ML, Dalton RE, Fuerst PA, Leys EJ (1997). "Concordance of Porphyromonas gingivalis colonization in families." J Clin Microbiol 35(2): 455-461.

Tunkel J, Heinecke A, Flemmig TF "A systematic review of efficacy of machine-driven and manual subgingival debridement in the treatment of chronic periodontitis." J Clin Periodontol 29 Suppl 3: 72-81; discussion 90-71.

Umeda M, Contreras A, Chen C, Bakker I, Slots J (1998). "The utility of whole saliva to detect the oral presence of periodontopathic bacteria." J Periodontol 69(7): 828-833.

Umeda M, Chen C, Bakker I, Contreras A, Morrison JL, Slots J (1998) Risk indicators for harboring periodontal pathogens. J Periodontol;69(10):1111-8.

Van der Velden u, Varufaki A, Hutter JW, Xu L, Timmerman MF, Van Winkelhoff AJ, Loos BG (2003). "Effect of smoking and periodontal treatment on the subgingival microflora." J Clin Periodontol 30(7): 603-610. Van Dyke TE, Bartholomew E, Genco RJ, Slots J, Levine MJ (1982). Inhibition of neutrophil chemotaxis by soluble bacterial products. J Periodontol;53(3):502-508.

Van Dyke TE, Bartholomew E, Genco RJ, Slots J, Levine MJ.(1982) Inhibition of neutrophil chemotaxis by soluble bacterial products. J Periodontol;53:502-508.

van Winkelhoff AJ, Herrera D, Oteo A, Sanz M (2005). "Antimicrobial profiles of periodontal pathogens isolated from periodontitis patients in The Netherlands and Spain." J Clin Periodontol 32(8): 893-898.

van Winkelhoff AJ, Herrera Gonzales D, Winkel EG, DelleMijn-Kippuw N, Vandenbroucke-Grauls CM, Sanz M (2000). "Antimicrobial resistance in the

subgingival microflora in patients with adult periodontitis. A comparison between The Netherlands and Spain." *J Clin Periodontol* 27(2): 79-86.

Van Winkelhoff AJ, Kippuw N, De Graaff J (1987). "Cross-inhibition between black-pigmented *Bacteroides* species." *J Dent Res* 66(11): 1663-1667.

van Winkelhoff AJ, Rodenburg JP, Goené RJ, Abbas F, Winkel EG, de Graaff J (1989). "Metronidazole plus amoxycillin in the treatment of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* associated periodontitis." *J Clin Periodontol* 16(2): 128-131.

van Winkelhoff AJ, Tjihof CJ, de Graaff J (1992). "Microbiological and clinical results of metronidazole plus amoxicillin therapy in *Actinobacillus actinomycetemcomitans*-associated periodontitis." *J Periodontol* 63(1): 52-57.

van Winkelhoff AJ & Winkel EG (2009). "Antibiotics in periodontics: right or wrong?" *J Periodontol* 80(10): 1555-1558.

van Winkelhoff AJ, Winkel EG, Barendregt D, Dellelijn-Kippuw N, Stijne A, van der Velden U (1997). "beta-Lactamase producing bacteria in adult periodontitis." *J Clin Periodontol* 24(8): 538-543.

Vandekerckhove BN, Bollen CM, Dekeyser C, Darius P, Quirynen M (1996). "Full- versus partial-mouth disinfection in the treatment of periodontal infections. Long-term clinical observations of a pilot study." *J Periodontol* 67(12): 1251-1259.

Varela VM, Heller D, Silva-Senem MX, Torres MC, Colombo AP, Feres-Filho EJ (2011). "Systemic antimicrobials adjunctive to a repeated mechanical and antiseptic therapy for aggressive periodontitis: a 6-month randomized controlled trial." *J Periodontol* 82(8): 1121-1130.

Walmsley AD, Lea SC, Landini G, Moses AJ. (2008) Advances in power driven pocket/root instrumentation. *J Clin Periodontol*;35(8suppl):22-38.

Walker CB, Gordon JM, Magnusson I, Clark WB (1993) A role for antibiotics in the treatment of refractory periodontitis. *J Periodontol*;64(8 Suppl):772-81.

Westfelt E, Bragd L, Socransky SS, Haffajee AD, Nyman S, Lindhe J (1985). "Improved periodontal conditions following therapy." *J Clin Periodontol* 12(4): 283-293.

Westfelt E, Nyman S, Lindhe J, Socransky S (1983). "Significance of frequency of professional tooth cleaning for healing following periodontal surgery." *J Clin Periodontol* 10(2): 148-156.

Williams JD, Maskell JP, Shain H, Chrysos G, Sefton AM, Fraser HY, Hardie JM (1992) "Comparative in-vitro activity of azithromycin, macrolides (erythromycin, clarithromycin and spiramycin) and streptogramin RP 59500 against oral organisms." *J Antimicrob Chemother* 30(1): 27-37.

Winkel EG, van Winkelhoff AJ, Barendregt DS, van der Weijden GA, Timmerman MF, van der Velden U (1999). "Clinical and microbiological effects of initial periodontal therapy in conjunction with amoxicillin and clavulanic acid in patients with adult periodontitis. A randomised double-blind, placebo-controlled study." *J Clin Periodontol* 26(7): 461-468.

Winkel EG, Van Winkelhoff AJ, Timmerman MF, Van der Velden U, Van der Weijden GA (2001). "Amoxicillin plus metronidazole in the treatment of adult periodontitis patients. A double-blind placebo-controlled study." *J Clin Periodontol* 28(4): 296-305.

Winkel EG, Van Winkelhoff AJ, Timmerman MF, Vangsted T, Van der Velden U (1997). "Effects of metronidazole in patients with "refractory" periodontitis associated with *Bacteroides forsythus*." *J Clin Periodontol* 24(8): 573-579.

Xajigeorgiou C, Sakekkari D, Sini T, Baka A, Konstantidnidis A (2006). "Clinical and microbiological effects of different antimicrobials on generalized aggressive periodontitis." *J Clin Periodontol* 33(4): 254-264.

Ximenez-Fyvie LA, Almaguer-Flores A, Jacobo-Soto V, Lara-Cordoba M, Sanchez-Vargas LO, Alcantara-Maruri E(2006). "Description of the subgingival microbiota of periodontally untreated Mexican subjects: chronic periodontitis and periodontal health." *J Periodontol* 77(3): 460-471.

Xu KD, McFeters GA, Stewart PS (2000). "Biofilm resistance to antimicrobial agents." *Microbiology* 146 (Pt 3): 547-549.

Yashima A, Gomi K, Maeda n, Arai T (2009). "One-stage full-mouth versus partial-mouth scaling and root planing during the effective half-life of systemically administered azithromycin." *J Periodontol* 80(9): 1406-1413.

Yek EC, Cintran S, Topcuoglu N, Kulekci G, Issever H, Kantarci A (2010). "Efficacy of amoxicillin and metronidazole combination for the management of generalized aggressive periodontitis." *J Periodontol* 81(7): 964-974.

Zijngel V, Meijer HF, Lie MA, Tromp JA, Degener JE, Harmsen HJ, Abbas F (2010). "The recolonization hypothesis in a full-mouth or multiple-session treatment protocol: a blinded, randomized clinical trial." *J Clin Periodontol* 37(6): 518-525.

Zinn CS, Westh H, Tosdahl VT, Sarisa VT; SARISA Study Group (2004). "An international multicenter study of antimicrobial resistance and typing of hospital *Staphylococcus aureus* isolates from 21 laboratories in 19 countries or states." *Microb Drug Resist* 10(2): 160-168.