
ADMINISTRACIÓN SISTÉMICA ADJUNTA DE MOXIFLOXACINA *VERSUS* CIPROFLOXACINA MÁS METRONIDAZOL EN EL TRATAMIENTO DE PERIODONTITIS CRÓNICA CON PRESENCIA DE BACILOS ENTÉRICOS GRAM NEGATIVOS: II. ANALISIS MULTINIVEL¹

ADJUNCTIVE SYSTEMIC ADMINISTRATION OF MOXIFLOXACIN *VERSUS* CIPROFLOXACIN PLUS METRONIDAZOLE IN THE TREATMENT OF CHRONIC PERIODONTITIS HARBORING GRAM-NEGATIVE ENTERIC RODS: II. A MULTILEVEL ANALYSIS¹

ISABEL CRISTINA GUZMÁN ZULUAGA², HUGO GRISALES ROMERO³, CARLOS MARTÍN ARDILA MEDINA⁴

RESUMEN. Introducción: los niveles sitio, diente e individuo están involucrados en el proceso inflamatorio periodontal. El propósito de este estudio fue comparar el efecto de los factores relacionados con el sitio, el diente y el paciente sobre el éxito del raspaje y alisado radicular combinado con la administración sistémica de moxifloxacina o ciprofloxacina más metronidazol, en el tratamiento de sujetos con periodontitis crónica que presentan bacilos entéricos Gram negativos. **Métodos:** en este ensayo clínico aleatorizado participaron 76 pacientes, divididos en dos grupos. Los sujetos se trataron con raspaje y alisado radicular más moxifloxacina (grupo moxifloxacina; n = 38) o raspaje y alisado radicular más ciprofloxacina metronidazol (grupo ciprofloxacina más metronidazol; n = 38). Los datos clínicos y microbiológicos se registraron a nivel base, y a los 3 y 6 meses después del tratamiento. La relativa contribución del paciente, el diente y los parámetros asociados con el sitio se evaluaron con un modelo jerárquico multinivel. **Resultados:** la mayoría de la varianza se atribuyó al nivel sitio (73%), seguido por el nivel diente (18,1%) y el nivel paciente (8,9%). El análisis multinivel asoció la reducción en la profundidad de sondaje con factores del sujeto (fumar y tratamiento), factores del diente (tipo de diente), y factores del sitio (ubicación mesial-distal). La reducción en la profundidad de sondaje fue significativamente menor en los fumadores. Los dos protocolos de tratamiento disminuyeron significativamente la profundidad de sondaje. Los dientes anteriores respondieron mejor que los posteriores. En el nivel sitio, se observaron mayores reducciones a nivel interproximal. La presencia de placa y sangrado al sondaje en el nivel sitio tuvieron impacto negativo significativo en el resultado de la periodontitis crónica con presencia de bacilos entéricos Gram negativos. **Conclusiones:** factores como el hábito de fumar, tipo de diente, ubicación mesial-distal, placa y sangrado en el nivel sitio, fueron significativos en la determinación del resultado clínico del raspaje y alisado radicular más antibiótico adjunto en el tratamiento de periodontitis crónica con presencia de bacilos entéricos Gram negativos.

Palabras clave: antimicrobianos, periodontitis, análisis multinivel.

Guzmán IC, Grisales H, Ardila CM. Administración sistémica adjunta de moxifloxacina *versus* ciprofloxacina más metronidazol en el tratamiento de periodontitis crónica con presencia de bacilos entéricos Gram negativos: II. Análisis multinivel. Rev Fac Odontol Univ Antioq 2012; 23(2): 207-224.

ABSTRACT. Introduction: the site, tooth, and patient levels are involved in the periodontal inflammatory process. The purpose of this study was to compare the effect of site, tooth, and patient-related factors on the success of scaling and root planing combined with systemic administration of moxifloxacin or ciprofloxacin plus metronidazole in the treatment of subjects with chronic periodontitis harboring Gram-negative enteric rods. **Methods:** seventy-six patients participated in this randomized clinical trial, divided into two groups. The subjects were treated with scaling and root planing plus adjunctive moxifloxacin (moxifloxacin group; n = 38) or scaling and root planing plus adjunctive ciprofloxacin plus metronidazole (ciprofloxacin plus metronidazole group; n = 38). Periodontal and microbiological data were recorded

1 Este estudio fue patrocinado por una beca de la Escuela Nacional de Salud Pública y el Grupo de Epidemiología de la Universidad de Antioquia. Los autores informan que no existe conflicto de interés relacionado con este estudio.

2 Periodoncista, profesora asistente, Facultad de Odontología, Universidad de Antioquia, Colombia.

3 Ph. D. en Epidemiología, profesor titular, Facultad Nacional de Salud Pública, Universidad de Antioquia, Colombia.

4 Periodoncista, Ph. D., profesor asociado, Facultad de Odontología, Universidad de Antioquia, Colombia. Director del Grupo de Estomatología Biomédica, Universidad de Antioquia, Colombia.

1 This study was sponsored by a grant from the National School of Public Health and the Epidemiology Group of Universidad de Antioquia, Colombia. The authors report no conflicts of interest related to this study.

2 Periodontist. Assistant Professor, School of Dentistry, Universidad de Antioquia, Colombia.

3 PhD in Epidemiology. Associate Professor, National School of Public Health, Universidad de Antioquia, Colombia.

4 Periodontist, PhD, Associate Professor, School of Dentistry, Universidad de Antioquia, Colombia. Head of the Biomedical Stomatology Group, Universidad de Antioquia, Colombia.

at baseline and at 3 and 6 months after treatment. The relative contribution of patient, tooth and site-associated parameters was evaluated with a hierarchical multilevel model. **Results:** most of the variance was attributed to site level (73%), followed by tooth level (18.1%) and patient level (8.9%). The multilevel analysis associated probing depth reductions with subject factors (smoking status and treatment), tooth factors (tooth type), and site factors (mesial-distal location). Probing depth reduction was significantly smaller in smokers. Both treatment protocols significantly reduced probing depth. Anterior teeth responded better than posterior teeth. At the site level, greater reductions were observed at interdental sites. The presence of plaque and bleeding on probing at the tooth site level had a significant negative impact on the outcome of chronic periodontitis harboring Gram-negative enteric rods. **Conclusions:** smoking habits, tooth type, mesial-distal location, plaque and bleeding on probing at site level were significant factors in determining the clinical outcome of scaling and root planing plus adjunctive antibiotic treatment in chronic periodontitis harboring Gram-negative enteric rods.

Key words: antimicrobial(s), periodontitis, multilevel analysis.

Guzmán IC, Grisales H, Ardila CM. Adjunctive systemic administration of moxifloxacin versus ciprofloxacin plus metronidazole in the treatment of chronic periodontitis harboring Gram-negative enteric rods: II. A multilevel analysis. *Rev Fac Odontol Univ Antioq* 2012; 23(2): 207-224.

INTRODUCCIÓN

Tradicionalmente se ha concluido que el raspaje y alisado radicular (RAR) es un enfoque de tratamiento efectivo; sin embargo, también es evidente que factores relacionados con el sujeto, el diente y el sitio del diente pueden comprometer la respuesta al tratamiento.¹⁻⁵

Revisiones sistemáticas recientes demostraron que el uso adjunto de antibióticos administrados sistémicamente proporciona mejor resultado clínico, particularmente en términos de reducción en la profundidad de sondaje (PS) y ganancia de nivel de inserción clínica (NIC) en sujetos con periodontitis crónica.^{6,7} Sin embargo, estas revisiones así como muchos otros estudios previos sobre el mismo tópico⁸⁻¹² usan valores promedio y no son capaces de reflejar el beneficio de una técnica específica en dientes con características particulares.

Los bacilos entéricos Gram negativos (BEGN) son patógenos oportunistas en un amplio rango de infecciones humanas¹³ y pueden detectarse en ambientes subgingivales de sujetos con periodontitis.¹⁴⁻²⁵ Estos microorganismos producen factores de virulencia y tienen capacidad para invadir los tejidos humanos.¹⁶ Los BEGN subgingivales persisten a menudo después de desbridamientos y cirugía, y se ha implicado como patógeno clave en casos de periodontitis refractaria.^{15, 17-20} Estos microorganismos se detectaron con alta frecuencia y elevadas proporciones en pacientes con fracasos de implantes.¹⁸ Adicionalmente, han mostrado baja susceptibilidad a la clorhexidina²¹ y el hecho de que estos microorganismos muestren resistencia *in vitro* a la mayoría de antibióticos adjuntos usados para tratar la periodontitis²²⁻²⁵

INTRODUCTION

It is generally accepted that scaling and root planing (SRP) is an effective periodontitis treatment approach; however, it is also evident that various subject-related and tooth site-related factors may compromise the healing response to treatment.¹⁻⁵

Recent systematic reviews have shown that adjunctive use of systemically administered antibiotics provided a better clinical outcome, particularly in terms of probing depth (PD) reduction and attachment-level gain than SRP in subjects with chronic periodontitis.^{6,7} However, these systematic reviews, like many other previous studies on this issue,⁸⁻¹² use mean values and are not able to reflect the benefit of a particular technique on teeth with certain characteristics.

Gram-negative enteric rods (GNER) are opportunistic pathogens in a wide range of human infections¹³ and they can be detected in the subgingival environment of periodontitis subjects.¹⁴⁻²⁵ These microorganisms are able to produce virulence factors and have shown the capacity to invade human tissue.¹⁶ Subgingival GNER often persist after periodontal debridement and surgery and have been implicated as key pathogens in cases of refractory periodontitis.^{15, 17-20} These microorganisms were detected at higher frequency and in higher proportions in patients with failing implants.¹⁸ Additionally, they show less susceptibility to chlorhexidine,²¹ and the fact that these microorganisms exhibit *in vitro* resistance to the majority of adjunctive antibiotics used to treat periodontitis²²⁻²⁵

indica que las lesiones periodontales asociadas con estos microorganismos no responden a modalidades de tratamiento convencional.¹⁵ La terapia con ciprofloxacina tiene el potencial de erradicar los BEGN de las bolsas periodontales, pero tiene poca actividad contra los principales patógenos periodontales,^{15, 26} por lo tanto, debe combinarse con un agente antimicrobiano activo contra anaerobios como el metronidazol.^{14, 15} Por el contrario, en publicaciones previas, la moxifloxacina (MOX) ha demostrado actividad *in vitro* contra los BEGN,²⁵ e *in vitro*²⁷ y eficacia *in vivo*⁸ contra periodontopatógenos. Estas publicaciones también han recomendado la ejecución de ensayos clínicos que investiguen el efecto de la MOX en el tratamiento de pacientes con periodontitis crónica que presentan BEGN en placa subgingival.

La aplicación del análisis multinivel, que tiene en cuenta el efecto de agrupación de los datos en la investigación periodontal, puede proporcionar una elucidación más precisa de la aceptada estructura jerárquica de los hallazgos clínicos de la periodontitis y la respuesta cicatrizante subsecuente al tratamiento periodontal.¹⁻⁵ Recientemente, diferentes investigaciones adoptaron tal enfoque en los análisis de los datos de ensayos periodontales.¹⁻⁵ Sin embargo, es importante anotar que hasta la fecha no se tiene conocimiento de investigaciones enfocadas en la relativa contribución de parámetros específicos del paciente, el diente y el sitio para establecer la variabilidad de los resultados del RAR combinado con antibióticos sistémicos.

Por lo tanto, el objetivo del presente estudio fue evaluar, usando un análisis multinivel, la relativa importancia de parámetros relacionados con el paciente, el diente y el sitio del diente en la determinación de los resultados clínicos del RAR combinado con aplicación sistémica de MOX o ciprofloxacina más metronidazol (CIPRO + MET) en el tratamiento de pacientes con periodontitis crónica con presencia de BEGN.

MATERIALES Y MÉTODOS

Sujetos

Se reclutaron 76 pacientes sistémicamente saludables (45 mujeres y 31 hombres), con edades entre los 27 y 66 años, que asistieron a las clínicas odontológicas de la Universidad de Antioquia, entre octubre de 2008 y marzo de 2009. Cada participante firmó un consentimiento.

means that periodontal lesions associated with these organisms do not respond to conventional treatment modalities.¹⁵ Ciprofloxacin therapy has the potential to eradicate GNER from periodontal pockets but it has little activity against the main periodontal pathogens,^{15, 26} therefore, it should be combined with an antimicrobial agent active against anaerobes, such as metronidazole.^{14, 15} Conversely, in previous articles, moxifloxacin (MOX) has shown *in vitro* activity against GNER,²⁵ and *in vitro*²⁷ and *in vivo*⁸ efficacy against periodontopathogens. These studies have also outlined a procedure for clinical trials to investigate the effects of MOX in the treatment of patients with chronic periodontitis harboring GNER in subgingival plaque.

Application of multilevel analysis, which takes the clustering effect of periodontal research data into consideration, may supply a more precise elucidation of the accepted hierarchical structure of the clinical findings of periodontitis and the healing responses subsequent to periodontal treatment.¹⁻⁵ Lately, several investigations have adopted such an approach in their periodontal trial data analysis.¹⁻⁵ However, it is also notable that to date no research has focused on the topic of relative contribution of patient, tooth, and site-specific parameters in establishing the reported variability of outcomes of SRP combined with systemic antibiotics.

Therefore, the purpose of this study was to evaluate, by means of a multilevel analysis, the relative importance of patient, tooth, and site-related factors in determining the clinical outcomes of SRP combined with systemic MOX or ciprofloxacin plus metronidazole (CIPRO + MET) in the treatment of subjects with chronic periodontitis harboring Gram-negative enteric rods.

MATERIALS AND METHODS

Subjects

Seventy-six systemically healthy subjects (45 women and 31 men), aged 27 to 66 years who attended the dental clinics of Universidad de Antioquia were recruited from October 2008 to March 2009. Informed and written consent was obtained from each participant.

El diseño del estudio fue aprobado por el Comité de Ética de la Sede de Investigación Universitaria de la Universidad de Antioquia de acuerdo con la declaración de Helsinki sobre experimentación en humanos. Se consideraron candidatos para este estudio, pacientes con diagnóstico de periodontitis crónica. Los pacientes fueron mayores de 26 años, con al menos veinte dientes naturales, incluyendo un molar en cada cuadrante y con por lo menos ocho sitios con $PS \geq 5$ mm. Los criterios de exclusión circunscribían pacientes diabéticos, enfermedades cardiovasculares, o cualquier enfermedad sistémica que pudiera alterar el curso de la periodontitis. También fueron criterios de exclusión mujeres embarazadas o lactantes, consumo de antimicrobianos o antiinflamatorios en los últimos seis meses, y terapia periodontal en el último semestre.

Diseño experimental y tratamiento

Este ensayo clínico controlado de brazos paralelos con enmascaramiento del examinador, clínico y estadístico, tuvo seis meses de seguimiento. Los sujetos se asignaron aleatoriamente para recibir uno de los tratamientos, mediante una tabla generada por computador. La asignación de los pacientes al grupo de tratamiento, se llevó a cabo por un coordinador de clínica independiente del grupo de investigación. El código de aleatorización se mantuvo oculto por este coordinador y no se rompió hasta después del análisis de los datos. Los dos grupos de tratamiento consistieron en RAR combinado con MOX aplicado sistémicamente en una dosis de 400 mg diarios por siete días (grupo MOX) o RAR combinado sistémicamente con CIPRO + MET en una dosis de 1g diarios más 500 mg dos veces al día por 7 días (grupo CIPRO + MET). Bajo anestesia local, un periodoncista experimentado hizo un RAR boca completa durante aproximadamente dos horas y media. El objetivo final del RAR fue una superficie radicular lisa al tacto. La ingestión de los antimicrobianos adjuntos se inició en la visita de RAR. Los sujetos del grupo MOX y CIPRO + MET se informaron extensamente acerca de la importancia de la ingestión de la medicación prescrita.

Los pacientes se monitorearon clínica y microbiológicamente en la línea de base (antes de la terapia) y a los 3 y 6 meses postterapia.

The study design was approved by the Ethics Committee on Human Research of Universidad de Antioquia's University Investigation Department, according to the Declaration of Helsinki on experimentation involving human subjects. Patients with a diagnosis of chronic periodontitis were considered candidates for the study. Subjects were > 26 years of age, had at least 20 natural teeth, including at least 1 molar tooth in each quadrant, and at least eight sites with $PD \geq 5$ mm. Exclusion criteria included allergy to antibiotics, diabetes, cardiovascular disease, or any other systemic disease that could alter the course of periodontal disease. Pregnant or nursing women, consumption of systemic antimicrobials or anti-inflammatory drugs in the last six months, and periodontal therapy during the last six months also served as exclusion criteria.

Experimental design and treatment

This was a randomized trial with masking of examiner, clinician performing treatment and statistician, with 6 months of follow-up. Subjects were randomly assigned by a computer-generated table to receive one of the two treatments. The assignment of subjects to the treatment groups was carried out by the clinic coordinator remote from the study. The randomization code was held centrally by the clinic coordinator and was not broken until completion of the data analysis. The two treatment groups consisted of SRP combined with systemically administered MOX at the dosage of 400 mg once daily for 7 days (MOX group) or SRP combined with systemically administered ciprofloxacin (at the dosage of 1g once daily) plus metronidazole (500 mg b.i.d. for 7 days) (Ciprofloxacin + Metronidazole group). One-stage full-mouth SRP under local anesthesia was performed in approximately two and half hours by the same experienced periodontist. The endpoint of SRP was a tactile smooth root surface. The adjunctive agents were started at the SRP visit. Subjects in the MOX and CIPRO + MET groups were extensively informed about the intake of the prescribed medication.

Subjects were clinically and microbiologically monitored at baseline (before therapy) and at 3 and 6 months post-therapy.

Durante estas sesiones, se evaluó la higiene oral y se reenfatizó en los cuidados orales caseros. Todos los sujetos asistieron a las citas de revisión y recibieron evaluaciones de la higiene oral. Las citas de revisión se hicieron cada dos semanas durante los seis meses después del tratamiento.

During the monitored sessions, oral hygiene was evaluated and home care instructions were re-emphasized. All subjects came for recall visits and received oral hygiene evaluations. The recall visits were made on a 2-week interval during the 6 months after treatment.

El diseño experimental se presenta en la figura 1.

The experimental design is presented in figure 1.

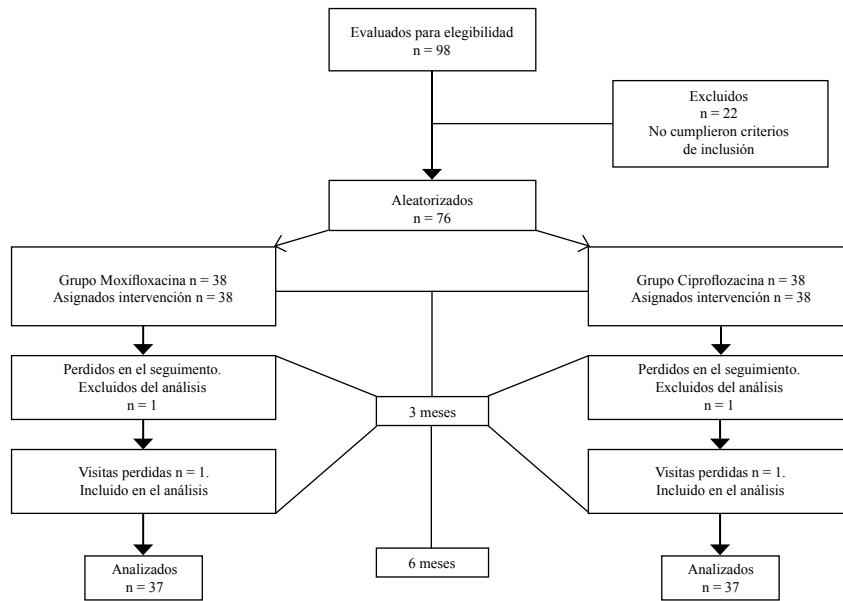


Figura 1. Diseño experimental

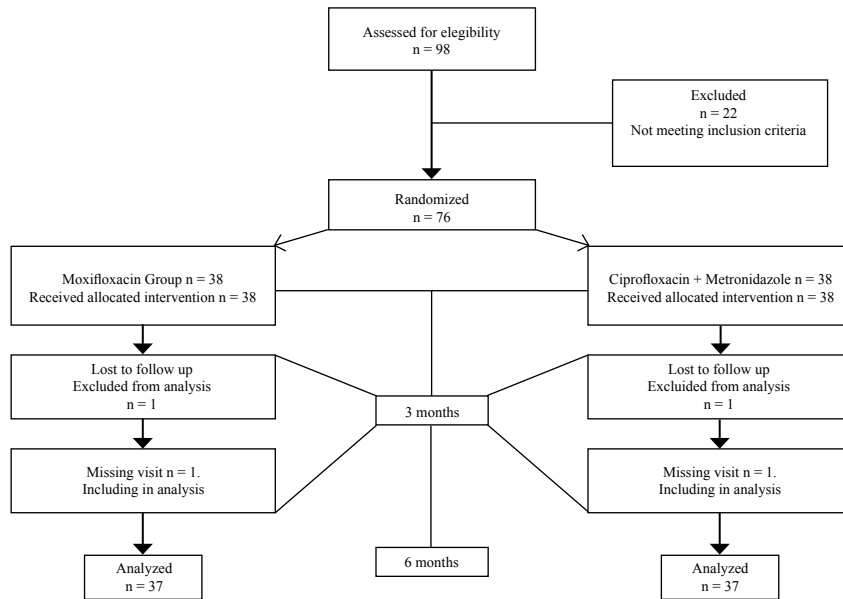


Figure 1. Experimental design

Cumplimiento

Un asistente dental llamó por teléfono a cada sujeto durante los próximos seis días para recordarle la ingestión de las dosis restantes. El mismo asistente dental, que no participó en el proceso de aleatorización, registró el cumplimiento de la ingesta de medicamentos y la aparición de eventos adversos. A los sujetos se les pidió devolver las cajas con los medicamentos la semana después de la visita de RAR con el fin de comprobar cualquier inexactitud en el consumo de los antibióticos.

Evaluación clínica

Parámetros del sitio: la profundidad de sondaje (PS) se midió con una sonda calibrada en seis sitios por diente (mesobucal, bucal, distobucal, distolingual, lingual y mesolingual) en todos los dientes, excluyendo el tercer molar. La PS se registró al milímetro más cercano, utilizando una sonda periodontal calibrada (UNC-15, Hu-Friedy, Chicago, IL). Las mediciones (PS, NIC, SS, placa) en los pacientes, en todas las visitas, se hicieron por el mismo clínico entrenado, cegado y calibrado (este examinador fue diferente al clínico que efectuó el tratamiento) en la línea de base, a los tres y seis meses después del tratamiento periodontal. En cada sitio del diente también se evaluó la presencia de placa y el sangrado al sondaje (SS). La reproducibilidad intraexaminador se evaluó antes y durante el periodo experimental, de acuerdo con el método descrito por Araujo y colaboradores.²⁸ Se hicieron medidas repetidas en un total de diez pacientes periodontales (no participantes en el estudio), cinco de los cuales se examinaron antes del ensayo clínico y los otros cinco durante la fase experimental. Se condujeron medidas por duplicado en cada paciente con al menos dos horas entre cada examen. El coeficiente de correlación intraclase para el promedio de PS y NIC fue 0,92 y 0,91, respectivamente. La reproducibilidad de los examinadores fue similar antes y durante el estudio. El diagnóstico de periodontitis crónica se basó en los criterios definidos por la Academia Americana de Periodoncia (AAP).²⁹

Parámetros del diente: el compromiso de furcación se evaluó con una sonda Nabers. En el análisis se incluyó la variable categórica tipo de diente (molar, premolar, incisivo).

Compliance

A dental assistant telephoned each subject during the next 6 days to remind them about taking the remaining doses. The same dental assistant, not involved in the randomization process, recorded compliance with medication intake and occurrence of adverse events. The subjects were asked to bring the boxes containing the medication the week after the SRP visit, when the pills were counted in order to check any inaccuracy in drug taking.

Clinical evaluation

Site parameters: by using a calibrated standard probe, PD was measured at six sites per tooth (mesiobuccal, buccal, distobuccal, distolingual, lingual and mesiolingual) in all the teeth except third molars. PD was obtained to the closest millimeter, by means of a calibrated standard probe (UNC-15, Hu-Friedy, Chicago, IL). In all the visits, the measurements (PD, CAL, BOP, plaque) were taken by the same blinded, trained, calibrated clinician (this examiner was different to the clinician performing treatments) at baseline and 3 and 6 months after periodontal treatment. Presence of plaque and bleeding on probing (BOP) were also assessed at each site. The clinician making the clinical measurements did not perform therapy on the subjects. Intra-examiner reproducibility was assessed before and during the experimental period, according to the method described by Araujo et al.²⁸ Repeated measurements were performed on 10 periodontal patients (who were not participating in this study), five of whom were examined immediately before the clinical trial, and the other five during the experimental period. Duplicate measurements were conducted in each patient with at least 2 h between one examination and the other. The intra-class correlation coefficients for mean PD and CAL were 0.92 and 0.91, respectively. The examiners' reproducibility of measurements was similar before and during the study. Diagnosis of chronic periodontitis was made based on the criteria defined by the American Academy of Periodontology (AAP).²⁹

Tooth parameters: furcation involvement was graded using a Nabers probe. A tooth type categorical variable was also included in the analysis (molars, premolars and incisors).

Parámetros del sujeto: en el análisis multinivel se incluyeron edad, sexo, hábito de fumar, tratamiento y presencia de BEGN, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa), *Porphyromona. Gingivalis* (Pg) y *Tanerella forsythia* (Tf).

Muestreo microbiológico

Se tomaron muestras microbiológicas de los pacientes con periodontitis en sitios con profundidad de sondaje ≥ 5 mm. Para la toma de muestras se seleccionaron las seis bolsas periodontales más profundas de cada paciente. Después de aislar la zona con algodón y eliminar la placa supragingival con cureta, se insertaron puntas de papel estéril (Maillefer, Ballaigues, Switzerland) en cada bolsa periodontal durante 20 segundos. Las muestras de cada paciente se depositaron en 2 ml de medio de transporte (Viability Medium Göteborg Anaerobically III: VMGA III)³⁰ y se llevaron al laboratorio de microbiología de la Facultad de Odontología de la Universidad de Antioquia para procesarlas dentro de las dos horas siguientes. Las muestras fueron analizadas utilizando técnicas de cultivo para la presencia de periodontopatógenos de acuerdo con Slots.³¹ Todas las muestras fueron procesadas antes de 24 horas a temperatura ambiente e incubadas inmediatamente en CO₂ y sistemas de cultivo anaeróbicos. Las cajas de agar Brucella se incubaron a 35 °C en anaerobiosis por siete días. Se incubó tripticosa soya con suero, bacitracina y vancomicina en 10% de CO₂ en aire a 37 °C por cuatro días. Se hizo identificación presuntiva de acuerdo con métodos descritos^{31, 32} y usando sistemas de identificación comercial (RapID ANA, Remel, Norcross, GA) para *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* y *T. forsythia*. El conteo viable total (CVT) se definió como el número total de unidades formadoras de colonias obtenidas sobre medios no selectivos. Se enumeraron las especies encontradas sobre medios selectivos y se calculó su porcentaje de CVT.

Aislamiento de BEGN por cultivo. Después de 20 s, las puntas de papel se almacenaron en 2,0 ml de VMGA III.³⁰ Las muestras se mantuvieron a temperatura ambiente, transferidas al laboratorio y procesadas 4 h después del muestreo.

Subject parameters: age, sex, smoking status, treatment, and presence of GNER, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa), *Porphyromonas gingivalis* (Pg) and *Tanerella forsythia* (Tf) were included in the multilevel analysis.

Microbial sampling

Microbial sampling on periodontitis patients was performed on pockets ≥ 5 mm. The deepest six pockets of each patient were selected for sampling. After removing supragingival plaque (after periodontal examination) with curettes and isolating the area with cotton rolls, sterile paper points (Maillefer, Ballaigues, Switzerland) were inserted into each periodontal pocket for 20 seconds. The paper points were transferred to a tube with Viability Medium Göteborg Anaerobically (VGMA) III medium.³⁰ The samples were analyzed by using microbial culture techniques for the presence of periodontopathic bacteria according to Slots.³¹ All the samples were processed in ≤ 24 hours at room temperature and immediately incubated in CO₂ and anaerobic culture systems. Brucella blood agar medium was incubated at 35°C in an anaerobic jar for 7 days. Trypticase-soy with serum, bacitracin, and vancomycin medium was incubated in 10% CO₂ in air at 37°C for 4 days. Presumptive identification was performed according to the methods described^{31, 32} and using commercial identification micromethod systems (RapID ANA, Remel, Norcross, GA) for *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* and *T. forsythia*. Total viable count (TVC) was defined as the total number of colony-forming units obtained on non-selective media plates. Species found on selective media were enumerated and their percentage of TVC was calculated.

Isolation of Gram-negative enteric rods by culture. After placement for 20 seconds, the paper points were pooled into a vial containing 2.0 ml of VMGA III transport medium.³⁰ The sample vials were maintained at room temperature, transferred to the laboratory and processed within 4 h after sampling.

Después de colocar los viales en una incubadora por 30 min a 37 °C, la placa bacteriana se dispersó mecánicamente con un tubo mezclador en ajuste máximo por 60 s. Se prepararon 10 diluciones en serie en agua pepton, y las alícuotas se colocaron en agar MacConkey. Las placas se incubaron aeróbicamente a 37 °C por 24 h. Cada aislamiento se caracterizó de acuerdo con la colonia y morfología celular y características de pigmentación Gram. Los BEGN se clasificaron usando una prueba bioquímica estándar (BD, Sparks, MD). CVT se definió como el número total de unidades formadoras de colonias obtenidas sobre medios no selectivos. Se enumeraron las especies encontradas sobre medios selectivos y se calculó su porcentaje de CVT.

Cada paciente proporcionó una muestra de placa subgingival. Se utilizó igual número de aislamientos de cada paciente.

Análisis estadístico

Los datos se introdujeron en una base de datos Excel (Microsoft Office 2007) y se verificaron errores de digitación. Se utilizó la prueba Kolmogorov-Smirnov para verificar la distribución normal de las variables continuas. Los datos categóricos se analizaron con pruebas de Chi cuadrado, y las comparaciones entre los dos grupos se hicieron con la prueba Mann-Whitney. Las diferencias entre los grupos y entre diferentes puntos del tiempo dentro de los grupos se evaluaron mediante pruebas de Mann-Whitney y Wilcoxon, respectivamente. Para todas las pruebas estadísticas se estableció un nivel de significancia de 0,05.

Con un análisis de regresión multinivel se investigó la influencia de los factores sobre el resultado. Se construyó un modelo de regresión con intercepto aleatorio a tres niveles: sitio del diente en el nivel 1, diente en el nivel 2 y sujeto en el nivel 3. Esta técnica permite la identificación de los efectos del diente mientras se tiene en consideración al paciente como una unidad estadística y la dependencia de los sitios en el paciente.

Se construyó un modelo con componentes de la varianza (modelo nulo) midiendo los cambios en PS, entre la línea de base y los seis meses como variable dependiente (Δ PD), pero sin incluir variables explicativas.

After the vials were placed in an incubator for 30 min at 37 °C, bacterial plaque was mechanically dispersed with a test tube mixer at the maximal setting for 60 s. Serial 10-fold dilutions were prepared in pepton water, and aliquots were plated on MacConkey agar. The plates were incubated aerobically at 37 °C for 24 h. Each isolate was characterized according to colonial and cellular morphology and Gram-stain characteristics. GNER were classified using a standardized biochemical test (BD, Sparks, MD). TVC was defined as the total number of colony-forming units obtained on non-selective media plates. Species found on selective media were enumerated and their percentage of TVC was calculated.

Each patient provided a pooled subgingival plaque sample. Equal numbers of isolates were used from each subject.

Statistical analysis

Data were entered into an Excel (Microsoft Office 2007) database and were proofed for entry errors. Normal distribution of continuous variables was verified with the Kolmogorov-Smirnov test with Lilliefors correction. Categorical data were analysed with the X^2 test, and the percentage data between the two groups were compared with the Mann-Whitney test. Differences between groups and between different timepoints within groups were tested by the Mann-Whitney test and the Wilcoxon signed rank test, respectively. A significance level of 0.0005 was set for all the tests.

The influence of different factors on the outcome was examined with multilevel regression analyses. A three-level random intercept regression model was constructed: tooth site at level 1, tooth at level 2 and subject at level 3. This technique allows identification of single-tooth effects or parameters while still considering the individual patient as a statistical unit and the dependencies of site data within a patient.

A variance components model (null model) was constructed using changes in PD between baseline and six months as the dependent variable (Δ PD) but without inserting explanatory variables.

Se utilizó el modelo nulo para estimar la variabilidad total de Δ PD y así atribuirla a los niveles paciente, diente y sitio. Se verificaron los supuestos de normalidad de Δ PD y se revisó la multicolinealidad. Posteriormente, se introdujeron al modelo las variables explicativas (modelo covariado). Este paso posterior permitió la evaluación de la relación entre cada covariable y la variable dependiente. Se calculó el cambio del ajuste de cada modelo (-2log likelihood) incluyendo/excluyendo las variables explicativas; la significancia se evaluó utilizando una prueba de Chi cuadrado.

Para el manejo de todas las pruebas estadísticas se utilizó el mismo paquete estadístico (SPSS, Statistical Package for the Social Sciences, versión 15, Chicago, IL). Para estudiar la influencia del sujeto, el diente y el sitio sobre las covariables, se utilizó un paquete estadístico diseñado específicamente para análisis multinivel (Multilevel Models Project Institute of Education, MLwiN, version 2.16, London, U. K.).

Cálculo del tamaño de muestra

Inicialmente, el cálculo del tamaño de muestra se basó en el sujeto como unidad de análisis para estudios aleatorizados. Con el fin de calcular el tamaño ideal que asegurara un adecuado poder en este ensayo clínico, se consideraron diferencias de al menos 1 mm en el nivel de inserción clínica, y una desviación estándar de 1,1 mm entre los grupos, en bolsas periodontales inicialmente profundas (> 6 mm).¹² Según este cálculo, se determinó que una muestra ≥ 19 sujetos por grupo sería necesario para proporcionar el 80% de poder con α de 0,05. Teniendo en cuenta la evaluación de medidas múltiples y el análisis por intención de tratar, en el marco de un análisis multinivel, la estimación de tamaño de muestra con base en un nivel sujeto se considera anticipadamente conservadora. De esta forma, se aplicó un factor de corrección que usado en el cálculo de tamaño de muestra en estudios multinivel,³³ arrojando de esta forma 38 pacientes por grupo.

RESULTADOS

En una publicación previa se informó acerca del seguimiento de los sujetos, su cumplimiento y los eventos adversos.³⁴

The null model was used to estimate the overall variability of Δ PD and to attribute it to the patient, tooth and site levels. The normality assumption of Δ PD was verified and multi-collinearity was performed. Subsequently, a series of explanatory variables were entered into the model (covariate model). This further step allowed examination of the relationship between each covariate and the dependent variable. The fit change of each model (-2log likelihood) including /excluding explanatory variables was calculated and the significance was tested by chi-square analysis.

All data handling and statistical testing were performed with the same software package (SPSS, Statistical Package for the Social Sciences, version 15, Chicago, IL). A statistical package specifically designed for multilevel modeling (Multilevel Models Project Institute of Education, MLwiN, version 2.16, London, U.K) was used to determine the influence of subject, tooth and site-related covariates on the outcome variables.

Sample size calculation

Initially, sample size calculations were based on subjects, as the analysis unit for randomized studies. The ideal sample size to assure adequate power to this clinical trial was calculated considering differences of at least 1 mm for CAL and a standard deviation of 1.1 mm between groups in initially deep periodontal pockets (> 6 mm).¹² Based on these calculations, it was determined that at least 19 subjects per group would be necessary to provide an 80% power with an α of 0.05. With multiple follow-up measures and the intention-to-analyze sites within a multilevel framework, study-size estimates based on subject-level t-tests were anticipated to be overly conservative. Thus, a correction factor was applied that can be used to calculate the required sample size in multilevel studies.³³ Based on this correction factor, it can be calculated that 38 patients per group are needed.

RESULTS

Subject retention, patient compliance and adverse events were discussed in a previous paper.³⁴

En la tabla 1 se describe el nivel al que pertenece cada variable. Con excepción de la edad, no se observaron diferencias significativas entre los grupos de tratamiento en ninguno de los parámetros.

Tabla 1. Características clínicas y demográficas de los grupos de tratamiento en la línea de base

Parámetro	grupo MOX	grupo CIPRO + MET
Pacientes (N = 76)	38	38
Edad (promedio ± DE)	45 ± 7,3	47 ± 8,6
Sexo, mujeres	22 (58%)	23 (60%)
Fumadores, actuales	8 (21%)	9 (24%)
BEGN presencia	11	9
Aa presencia	9	9
Pg presencia	25	26
Tf presencia	21	22
Diente (N = 1,870)	919	951
Compromiso furcación (%)	29	30
Sitio (N = 11,220)	5,514	5,706
PS (promedio ± DE)	5,15 ± 0,6	5,14 ± 0,5
NIC (promedio ± DE)	5,25 ± 0,6	5,23 ± 0,6
SS (%)	73	74
Placa (%)	59	60

DE = desviación estándar.

Las dos terapias utilizadas en el presente estudio mejoraron los parámetros clínicos evaluados. RAR combinado con MOX o CIPRO + MET fueron igualmente efectivos en la mejoría de PS (tabla 2).

Tabla 2. Cambio en profundidad sondeable (PS) en los dos grupos durante el periodo experimental

Parámetro	MOX		CIPRO + MET	
	Línea base	6 meses	Línea base	6 meses
PS	5,15 ± 0,6	3,12 ± 0,3	5,14 ± 0,5	3,12 ± 0,3

DE = desviación estándar.

No se observaron diferencias entre los grupos (Mann-Whitney test $p > 0,05$).

Se observaron diferencias dentro de los grupos entre la línea de base y los 6 meses (Wilcoxon's test $p < 0,05$).

En el análisis multinivel se incluyeron 1.870 dientes y 11.220 sitios. En la tabla 3 se presentan los resultados de la varianza del modelo multinivel con ΔPD como variable dependiente, incluyendo las covariables explicativas estadísticamente significativas. En el modelo nulo, adicionando todos los estimadores, se obtuvo la variabilidad de cada nivel individual como el porcentaje de la variabilidad total calculada.

A summary of each level variable is described in table 1. There were no statistically significant differences between the treatment groups for any of the parameters, except age.

Table 1. Clinical and demographic features of subjects with data for the two treatment groups at baseline

Parameter	MOX group	CIPRO + MET group
Patients (N = 76)	38	38
Age (mean ± SD)	45 ± 7.300	47 ± 8.600
Gender, females	22 (58%)	23 (60%)
Smokers, current	8 (21%)	9 (24%)
GNER presence	11	9
Aa presence	9	9
Pg presence	25	26
Tf presence	21	22
Tooth (N = 1.870)	919	951
Furcation involvement (%)	29	30
Site (N = 11.220)	5.514	5.706
PD (mean ± SD)	5.15 ± 0.600	5.14 ± 0.500
CAL (mean ± SD)	5.25 ± 0.600	5.23 ± 0.600
BOP (%)	73	74
Plaque (%)	59	60

SD = standard deviation.

The two therapies used in the present study improved the clinical parameters evaluated. SRP combined with either MOX or with CIPRO + MET was equally effective in improving PD (table 2).

Table 2. Change in probing depth (PD) in the two groups during the experimental period

Parameter	MOX		CIPRO + MET	
	Baseline	6 months	Baseline	6 months
PD	5.15 ± 0.6	3.12 ± 0.3	5.14 ± 0.5	3.12 ± 0.3

SD = standard deviation.

No differences were observed between the groups (Mann-Whitney test $p > 0.05$).

Differences within the groups were observed between baseline and 6 months (Wilcoxon's test $p < 0.05$).

A total of 1,870 teeth and 11,220 sites were included in the multilevel analysis. Results from the variance component multilevel model with ΔPD as the dependent variable, with significant explanatory covariates included, are presented in table 3. In the null model, variability at each individual level was obtained as a percentage of the total variability calculated, by adding all the estimates together.

El mayor porcentaje de la varianza se atribuyó al nivel sitio del diente (73%), seguido por el nivel diente (18,1%) y el nivel paciente (8,9%). Cuando se agregaron las variables evaluadas, el modelo explicó en promedio el 57% de la varianza en todos los niveles. Introduciendo todas las variables clínicas en todos los niveles se obtuvo significativamente el mejor ajuste.

Tabla 3. Regresión lineal multinivel estimando la relativa contribución del sujeto, el diente y el sitio en la variabilidad de la reducción del sondaje (PS)

Intercepto	ΔPD línea base - 6 meses Modelo nulo β ± SE	Variabes clínicas incluidas β ± SE
	1,543 ± 0,041	0,028 ± 0,01
Varianza		
Sujeto (nivel 3)	0,108 ± 0,020	0,064 ± 0,01
Diente (nivel 2)	0,218 ± 0,013	0,066 ± 0,004
Sitio (nivel 1)	0,876 ± 0,130	0,318 ± 0,005
Varianza total	1,202	0,448
% varianza total		
Sujeto (nivel 3)	8,9‡	14 (-41%)†
Diente (nivel 2)	18,1‡	15 (-69,7%)†
Sitio (nivel 1)	73‡	71 (-60,3%)†
-2 LL	30.948,316	18.381,941*

‡ Porcentaje de varianza en la variable dependiente ΔPD atribuida por el modelo multinivel en el nivel paciente, diente y sitio.

† Diferencia en el porcentaje de varianza en la variable dependiente ΔPD en el nivel paciente, diente y sitio cuando se incluyeron las variables explicativas en el modelo.

* 2 LL cambio significativo ($P < 0,00001$) χ^2 .

Se ejecutaron también los estimadores de la regresión y las pruebas de significancia para todas las variables clínicas. La tabla 4 presenta los estimadores de la regresión para las covariables. El modelo confirmó que la administración sistémica adjunta de los dos protocolos de antibióticos mostró una respuesta significativamente favorable en términos de cambios en la PS ($P = 0,01$). Los fumadores presentaron una respuesta significativamente menos favorable a la terapia periodontal en términos de cambios en la PS ($P < 0,00001$). Se utilizaron pruebas múltiples estándar con corrección de Bonferroni para comparar los cambios en la PS entre los grupos. Este análisis presentó una diferencia significativa entre fumadores y no fumadores en términos de cambios en PS (0,42 mm ± 0,04, grupo MOX; 0,40 mm ± 0,04, grupo CIPRO + MET). No se observaron diferencias entre los grupos. Las únicas variables significativas a nivel sujeto fueron la presencia de los periodontopatógenos evaluados y la presencia de BEGN.

The greater variance percentage was attributed to site level (73%), followed by tooth level (18.1%) and patient level (8.9%). On average, adding the tested variables to the model explained 57% of variability at all the levels. Significantly, better fit was obtained by entering all the clinical covariates at all the levels.

Table 3. Multilevel linear regression model estimating the relative contribution of subject, tooth and site parameters to variability in probing depth (PD) reduction

Intercept	ΔPD Baseline-6months Null model B ± SE	Clinical variables included B ± SE
	1.543 ± 0.041	0.028 ± 0.010
Variance		
Subject (level 3)	0.108 ± 0.020	0.064 ± 0.010
Tooth (level 2)	0.218 ± 0.013	0.066 ± 0.004
Site (level 1)	0.876 ± 0.013	0.318 ± 0.005
Total variance	1.202	0.448
% total variance		
Subject (level 3)	8.9‡	14 (-41%)†
Tooth (level 2)	18.1‡	15 (-69.7%)†
Site (level 1)	73‡	71 (-60.3%)†
-2 LL	30.948.316	18.381.941*

‡ Percentage of variance in the dependent variable ΔPD attributed by the multilevel model at the patient, tooth, and site level.

† Difference in percentage of variance in the dependent variable ΔPD at the patient, tooth, and site level when explanatory variables were included in the model.

* 2 LL significant change ($P < 0.00001$) tested by χ^2 .

Regression estimates and significance testing for all the clinical covariates were also performed. Table 4 shows the regression estimates for covariates. The model confirmed that adjunctive systemic administration of both antibiotic protocols showed a significantly favorable response to periodontal therapy in terms of probing depth changes ($P = 0.01$). Current smokers ($P < 0.00001$) showed a significantly less favorable response to periodontal therapy in terms of PD changes. In order to compare PD changes between the groups, a standard multiple testing approach with a Bonferroni correction was used. This analysis yielded a significant difference between smokers and non-smokers in terms of PD changes (0.42 mm ± 0.04, MOX group; 0.40 mm ± 0.04, CIPRO + MET group). No differences were observed between the groups. The only significant variables at the subject level were the presence of GNER and the presence of the periodontopathogens.

Tabla 4. Regresión lineal multinivel evaluando la significancia del sujeto, el diente y el sitio explicando la variabilidad en la reducción de la profundidad de sondaje

Parámetros	ΔPD línea base-6meses (β ± SE)	P valor
Nivel sujeto		
Fumar	-0,740 ± 0,089	< 0,00001
Tratamiento antibiótico adjunto	-0,291 ± 0,034	0,01000
Edad, sexo		NS
Nivel diente		
Posición diente (posterior <i>versus</i> anterior)	-0,019 ± 0,004	< 0,00001
Compromiso furcación	-----	NS
Nivel sitio		
Placa	-0,33 ± 0,012	0,00200
SS	-0,28 ± 0,01	0,00400
Superficie (mesiodistal)	-0,055 ± 0,018	0,00100

En el nivel diente el modelo demostró que los dientes anteriores presentaban disminución más significativa en la PS cuando se comparaba con los dientes posteriores ($P < 0,00001$). Los dientes anteriores presentaron mayores cambios significativos en PS después de la terapia con antibiótico adjunto comparado con los dientes posteriores (grupo MOX diferencia promedio $0,14 \pm 0,04$ mm $P < 0,001$ comparación post Hoc; Grupo CIPRO + MET diferencia promedio $0,13 \pm 0,04$ mm, $P < 0,001$ comparación post Hoc). No se observaron diferencias entre los sujetos independientemente de la terapia adjunta administrada. El compromiso de furcación no tuvo impacto significativo sobre la reducción de PS.

En el nivel sitio el modelo mostró que los sitios proximales fueron las áreas donde se presentaron mayores cambios comparado con los sitios bucales/linguales ($P = 0,001$). Los sitios mesiales y distales mostraron significativamente mayores cambios en la PS después de MOX o CIPRO + MET que las superficies bucales o linguales (diferencia promedio $1,43 \pm 0,4$ mm; $P < 0,001$ comparación post Hoc). El grupo CIPRO + MET mostró resultados similares (diferencia promedio $1,41 \pm 0,4$ mm; $P < 0,001$ comparación post Hoc).

Además, en el nivel sitio, al inicio del estudio la presencia de placa ($P = 0,002$) y SS ($P = 0,004$) fueron significativas en el modelo.

Table 4. Multilevel linear regression model assessing the significance of patient, tooth and site parameters and explaining the variability in probing depth (PD) reductions

Parameters	ΔPD Baseline-6months (β ± SE)	P value
Subject level		
Smoking	-0.740 ± 0.089	< 0.00001
Adjunctive antibiotic treatment	-0.291 ± 0.034	0.01
Age, gender	-----	NS
Tooth level		
Tooth position (posterior versus anterior)	-0.019 ± 0.004	< 0.00001
Furcation involvement	-----	NS
Site level		
Plaque	-0.33 ± 0.012	0.00200
BOP	-0.28 ± 0.010	0.00400
Surface (mesio-distal)	-0.055 ± 0.018	0.00100

At the tooth level, the model demonstrated that anterior teeth showed the most significant PD decreases when compared to posterior teeth ($P < 0.00001$). Anterior teeth showed significantly greater changes in probing depths after adjunctive MOX or CIPRO + MET than posterior teeth (mean difference 0.14 ± 0.04 mm; $P < 0.001$ post Hoc comparisons). The CIPRO + MET group showed similar results (mean difference 0.13 ± 0.4 mm; $P < 0.001$ post Hoc comparisons). No differences were observed between the subjects who received adjunctive MOX compared with subjects who received adjunctive CIPRO + MET. Furcation involvement did not have a significant impact on PD reduction.

At the site level, the model revealed that the mesial and distal sites were the areas with greater PD changes in comparison to the buccal/lingual sites ($P = 0.001$). The mesial and distal sites showed significantly greater changes in probing depths after adjunctive MOX or CIPRO + MET than buccal or lingual surfaces (mean difference 1.43 ± 0.4 mm; $P < 0.001$ post Hoc comparisons). The CIPRO + MET group showed similar results (mean difference 1.41 ± 0.4 mm; $P < 0.001$ post Hoc comparisons).

Moreover, at the site level, the presence of plaque ($P = 0.002$) and BOP ($P = 0.004$) at baseline were significant in the model.

DISCUSIÓN

Este ensayo clínico aleatorizado evaluó los efectos clínicos y microbiológicos del RAR en combinación con antibióticos adjuntos (MOX *versus* CIPRO + MET) en el tratamiento de sujetos con periodontitis crónica asociada a BEGN.

Teniendo presente la naturaleza jerárquica de los datos en periodontitis, este estudio utilizó un modelo de regresión múltiple para analizar la reducción en la PS comparando el nivel base con un seguimiento a seis meses después de RAR combinado con MOXI o CIPRO + MET sistémico en el tratamiento de sujetos con periodontitis crónica. El mayor porcentaje de la varianza se atribuyó al nivel sitio del diente (73%), seguido por el nivel diente (18,1%) y el nivel paciente (8,9%). Esto implica que la mayor parte de la variabilidad en los resultados de la terapia periodontal resulta de factores que actúan a nivel sitio. Este hallazgo concuerda con resultados de estudios previos que evaluaron la relativa contribución de la variación multinivel en los resultados de la terapia periodontal en ensayos clínicos.¹⁻⁵ Al adicionar las variables evaluadas, el modelo explicó el 57% de la variabilidad en todos los niveles. Estos resultados son muy similares a los descritos recientemente por Tomasi y colaboradores,³ en un ensayo clínico con análisis multinivel. Cuando se introdujeron en el modelo las variables explicativas, el 71% de la varianza se atribuyó a la variabilidad entre sitios. Nuevamente, resultados similares fueron informados en ensayos clínicos con modelos multinivel.^{2, 3} Los resultados del presente estudio asociaron la disminución de PS con factores del sujeto (hábito de fumar, tratamiento), factores del diente (tipo de diente) y factores del sitio (posición mesiodistal, placa y SS), confirmando la evidencia acerca de cómo los resultados del tratamiento en diferentes sitios y dientes del mismo paciente no son independientes.¹⁻⁵ Los resultados de este estudio indican que los antibióticos sistémicos son herramientas útiles en el tratamiento de pacientes fumadores con periodontitis crónica, confirmando observaciones previas.^{11, 35} Sin embargo, los pacientes no fumadores que recibieron antibióticos adjuntos mostraron los mejores resultados clínicos, corroborando resultados previos.^{11, 35} Es importante anotar que el estatus de fumador fue considerado como una variable dicotómica en el nivel sujeto.

DISCUSSION

This randomized, clinical trial evaluated the clinical and microbiological effects of SRP in combination with adjunctive antibiotics (MOX *versus* CIPRO + MET) in the treatment of subjects with chronic periodontitis associated with GNER.

Taking into account the natural hierarchical configuration of data in periodontitis, the present study adopted a multiple regression model to analyze PD reductions by comparing baseline with a 6 month follow-up after SRP combined with systemic MOX or CIPRO + MET in the treatment of subjects with chronic periodontitis. Most of the variance was attributed to site level (73%), followed by tooth level (18.1%) and patient level (8.9%). This implies that most of the variations in periodontal therapy outcomes result from factors acting at the site level. This agrees with previous studies that also assessed the relative contribution of multilevel variation for the outcome of periodontal therapy in clinical trials,¹⁻⁵ which found out that site-level factors had a much greater impact than subject-level factors. Interestingly, adding the tested variables to the model explained 57% of the variability at all the levels. These results are very similar to those described in a recent publication by Tomasi et al.³ about a clinical trial with multilevel analysis. When explanatory variables were entered into the model, 71% of the variance was attributed to variation between sites. Once again, similar results were reported in clinical trials using multilevel models.^{2, 3} The results of the present study associated PD decrease with subject factors (such as smoking habits, or treatment), tooth factors (tooth type) and site factors (mesio-distal position, plaque and BOP), thus confirming the evidence that treatment outcomes at different sites and teeth within the same patient are not independent.¹⁻⁵ The results of this study also indicate that systemic antibiotics are useful tools in the treatment of smokers with chronic periodontitis, thus confirming previous observations.^{11, 35} However, non-smoking patients who received adjunctive antibiotics showed the best clinical outcomes, corroborating previous results.^{11, 35} It is important to note that the smoking status was considered as a dichotomous variable at the subject level.

Futuros estudios podrían incluir mediciones cuantitativas como número de paquetes por año e investigar el efecto residual de la dosis de cigarrillo sobre la salud periodontal. Otro factor significativo asociado al paciente fue el RAR combinado con antibióticos sistémicos. Estos resultados revelan mejoría clínica con cualquiera de los dos enfoques terapéuticos, corroborando otros hallazgos que indican mayor beneficio de antibióticos adjuntos en pacientes con más enfermedad periodontal y en sitios periodontales más profundos.^{6, 7} Por otra parte, investigadores que usaron análisis multinivel en evaluaciones de resultados terapéuticos, mostraron resultados pobres para la terapia no quirúrgica.^{2, 4} Como fue anotado por D'Aiuto y colaboradores,² puede ser que al estudiar pacientes con condiciones sistémicas, pueda ocurrir mayor variabilidad.

El análisis de los datos reveló que los dientes anteriores respondieron mejor que los posteriores. Otros investigadores usando estudios multinivel informaron resultados similares después de RAR combinado con terapia antibiótica.¹ Los dientes anteriores probablemente cicatrizan con más recesión y más reducción de la bolsa que los dientes posteriores.^{2, 3} En el actual estudio, el compromiso de furcación no tuvo un impacto significativo sobre la reducción de PS como fue presentado por dos ensayos clínicos recientes con modelo multinivel.^{1, 5}

Como ocurrió en una investigación previa,² el resultado divergente se debió probablemente a que en el presente estudio el compromiso de furcación se incluyó como variable del nivel diente. En contraste con los estudios aquí referidos, la movilidad dentaria no se incluyó en el presente análisis debido a resultados divergentes en la modelación multinivel.²

En el nivel sitio, la mayor reducción en la PS se observó en los sitios interdentes comparado con los sitios bucales/linguales. Estos resultados corroboran los de un estudio previo¹¹ y son consistentes con el hallazgo frecuente de bolsas profundas interproximales.² Adicionalmente, la presencia de placa y SS a nivel sitio presentó un impacto significativamente negativo en el resultado. Estos datos confirman las observaciones de estudios recientes¹⁻⁵ basados en análisis multinivel de factores asociados con el resultado del tratamiento después de RAR combinado con antibióticos.

Future studies could include quantitative measurements, such as number of cigarette packs a year, or analysis of the residual effect of cigarette doses on periodontal health. Another significant patient-related factor was SRP combined with systemic antibiotics. These results revealed improvement of clinical outcomes with the two approaches, thus supporting other studies that indicate that systemically administered antibiotics provide greater benefit in subjects with more periodontal disease and at deeper periodontal sites.^{6, 7} Similarly, other authors who used multilevel analysis in evaluations of treatment outcomes demonstrated poorer results of non-surgical therapy.^{2, 4} As pointed out by D'Aiuto et al.,² it may be expected that by studying patients with significant systemic conditions, more variability may occur.

The data analysis revealed that anterior teeth responded better than posterior teeth. Other multilevel studies have reported similar results after SRP combined with antibiotics.¹ Anterior teeth probably heal with more recession and more pocket reduction than posterior teeth.^{2, 3} In the present study, furcation involvement did not have a significant impact on PD reduction, as shown by two recent clinical trials using multilevel models.^{1, 5}

As occurred in a previous study,² the divergent outcome is probably due to the fact that in the present study furcation involvement was considered as a tooth-level variable. In contrast to the aforementioned studies, tooth mobility was not included in the current analysis because it yielded divergent results in multilevel modelling.²

At the site level, higher probing depths reductions were observed at the interdental sites, compared to the buccal and lingual sites. These results agree with a previous study¹¹ and are consistent with the frequent finding of deeper pockets in the interproximal areas.² Furthermore, the presence of plaque and BOP at the tooth site level had a significant negative impact on the outcome. These findings corroborate the observations of recent studies¹⁻⁵ based on the multilevel analysis of factors associated with the treatment outcome after SRP combined with antibiotics.

Estos hallazgos enfatizan la importancia de tener presente los factores relacionados con los sitios periodontales en las decisiones atañidas con la terapia adecuada, en aquellos sitios con respuesta disminuida a la PS.

El modelo experimental usado en esta investigación empleó citas de mantenimiento cada dos semanas; sin embargo, es importante anotar que tradicionalmente las citas de mantenimiento son hechas cada tres a seis meses y este aspecto podría influir en los resultados.

El primer paso esencial para el tratamiento de la periodontitis está relacionado con el establecimiento de un diagnóstico basado con el tipo de enfermedad, extensión, localización y severidad. Los parámetros del nivel sitio incluyen persistentemente bolsas profundas, pérdida de inserción clínica, flora periodontal específica, compromisos de furcación, supuración, placa, sangrado al sondaje y otros factores tales como surcos radiculares, proyecciones del esmalte y restauraciones deficientes que pueden ayudar a los clínicos a predecir el resultado de la terapia periodontal. Es importante destacar que el progreso de la enfermedad periodontal puede diferir de un sitio a otro dentro del mismo individuo y entre sujetos. Estos factores del nivel sitio del diente deben utilizarse en la formulación del pronóstico junto a características del nivel sujeto incluyendo hábito de fumar, predisposición genética, edad, género, raza y condiciones médicas particulares. El valor relativo de los factores a nivel sitio se vuelven muy importantes considerando que los indicadores en este nivel han demostrado la fuerte asociación con futura pérdida de inserción.³⁶ De la misma forma el cigarrillo es un factor pronóstico importante en el nivel sujeto que influye enormemente en la respuesta al tratamiento, relacionada directamente a la alta proporción de sitios que no responden a la terapia periodontal.³⁷ El monitoreo de estos factores de riesgo es fundamental en el tratamiento de la periodontitis.

La información del riesgo, obtenida en una manera jerárquica, teniendo presente el nivel sitio, diente y sujeto, facilita la evaluación inmediata del estado periodontal de un individuo y su potencial riesgo de infección y progreso de la enfermedad, permitiendo una intervención terapéutica de los sitios de alto riesgo y la selección de diferentes formas de intervención terapéutica.

They also emphasize the importance of considering factors related to the individual periodontal site when making decisions about the appropriate therapy for those sites with lower response to PD.

The experimental model used in this study required recall visits every two weeks; however, it is important to note that recall appointments are usually assigned every three to six months, and this aspect could have influenced the results.

The first essential step for the treatment of periodontitis is related to the establishment of a diagnosis based on the type of disease, extent, location, and severity. Site level parameters very often include deep pockets, clinical attachment loss, specific periodontal flora, furcation involvement, suppuration, plaque, bleeding on probing, and other factors, such as root ridges, enamel projections, root fractures and deficient restorations that may help clinicians predict the outcome of periodontal therapy. It is also important to note that the progress of periodontal disease may differ from one site to another within the same individual and between individuals. These tooth site-level factors must be used in formulating the prognosis, along with individual-level factors such as smoking, genetic predisposition, age, gender, race, and particular medical conditions. The relative value of site-level factors becomes very important since indicators at this level have demonstrated strong associations with future periodontal attachment loss.³⁶ Similarly, smoking is an important prognostic factor at the subject level, which greatly influences the response to treatment, directly related to a higher proportion of sites that do not respond to periodontal therapy.³⁷ Monitoring these risk factors is critical in the treatment of periodontitis.

Risk information, obtained in a hierarchical manner, bearing in mind the site, tooth and subject levels, facilitates immediate assessment of the periodontal status of an individual and his potential risk of infection and disease progression, and allows therapeutic intervention of the sites under higher risk, as well as the selection of different forms of therapeutic intervention.

Tal enfoque está relacionado con las recomendaciones del Consenso sobre epidemiología y diagnóstico³⁸ que establece que las pruebas necesarias para la evaluación de la enfermedad periodontal deberán dirigirse a las necesidades del paciente de manera jerárquica.

Como se indicó en una publicación previa, el presente estudio tuvo limitaciones, una de ellas fue el sesgo de información debido al no cegamiento de los pacientes; sin embargo, se incrementó el rigor metodológico de otros componentes del estudio con el fin de compensarlo. A pesar de estas condiciones, la decisión de incluir MOX o CIPRO + MET como opción de tratamiento, se confirma con los resultados de la presente investigación. Además, los costos de las quinolonas proporcionan una opción de antibióticos económicos para tratar periodontitis con presencia de bacilos entéricos Gram negativos. Igualmente, se debe considerar el costo beneficio.

CONCLUSIONES

La administración sistémica de moxifloxacina o ciprofloxacina más metronidazol como terapia antimicrobiana adjunta al tratamiento mecánico puede ser una alternativa para el tratamiento de pacientes con periodontitis crónica que presentan bacilos entéricos Gram negativos. Las dos estrategias de tratamiento consiguieron ganancia significativa del nivel de inserción clínica y disminución de la profundidad de sondaje periodontal. La modelación multinivel es una gran promesa como modelo analítico en ensayos clínicos periodontales y debe considerarse como una estrategia en el diseño de los ensayos por su contribución en el análisis de los datos. Sobre la base de esta investigación, se deben hacer futuros estudios que traten de corroborar nuestros resultados.

AGRADECIMIENTOS

Agradecimientos especiales al Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Odontología de la Universidad de Antioquia por su apoyo.

CORRESPONDENCIA

Carlos M. Ardila
Calle 64 N.º 52-59
Medellín, Colombia.
Tel: (57-4) 219 67 60
Correo electrónico: martinardila@gmail.com

This approach is in line with the recommendations by the Consensus Report on epidemiology and diagnosis,³⁸ which states that screening tests for periodontal disease will need to be targeted to the needs of the patients in a hierarchical manner.

As described in a previous paper, the current study did have limitations, one of them was the information bias due to non-blinding patients; however, by increasing the methodological rigor of other components of the study, the authors attempted to compensate it. Despite these conditions, the decision of incorporating adjunctive MOX or CIPRO + MET as a treatment option is confirmed by the findings of the present study. Additionally, taking into account the cost of quinolones, they appear as an option of inexpensive antibiotics to treat chronic periodontitis harboring Gram-negative enteric rods. Similarly, cost-benefit should be considered.

CONCLUSIONS

Systemic use of moxifloxacin or ciprofloxacin plus metronidazole as an adjunct to antimicrobial therapy may be an alternative for the treatment of patients with chronic periodontitis harboring Gram-negative enteric rods. Both treatment strategies resulted in significant decrease of periodontal probing depth. Multilevel modeling has a great potential as an analytical model for periodontal clinical trials and should be considered in a variety of trial designs due to its contribution to data analysis. On the basis of this investigation, future studies that try to explain our results, in order to verify them, must be performed.

ACKNOWLEDGMENTS

Special thanks to the microbiology laboratory of the school of Dentistry of Universidad de Antioquia for its support.

CORRESPONDING AUTHOR

Carlos M. Ardila
Calle 64 N.º 52-59.
Medellín, Colombia.
Phone number 057-4-219 67 60
e-mail: martinardila@gmail.com

REFERENCIAS / REFERENCES

1. Tomasi C, Koutouzis T, Wennström JL. Locally delivered doxycycline as an adjunct to mechanical debridement at retreatment of periodontal pockets. *J Periodontol* 2008; 79: 431-439.
2. D'Aiuto F, Ready D, Parkar M, Tonetti MS. Relative contribution of patient, tooth, and site-associated variability on the clinical outcomes of subgingival debridement. I. Probing depths. *J Periodontol* 2005; 76: 398-405.
3. Tomasi C, Leyland AH, Wennström JL. Factors influencing the outcome of non-surgical periodontal treatment: a multilevel approach. *J Clin Periodontol* 2007; 34: 682-690.
4. Axtelius B, Soéderfeldt B, Attström R. A multilevel analysis of factors affecting pocket probing depth in patients responding differently to periodontal treatment. *J Clin Periodontol* 1999; 26: 67-76.
5. Dannewitz B, Lippert K, Lang NP, Tonetti MS, Eickholz P. Supportive periodontal therapy of furcation sites: non-surgical instrumentation with or without topical doxycycline. *J Clin Periodontol* 2009; 36: 514-522.
6. Haffajee AD, Socransky SS, Gunsolley JC. Systemic anti-infective periodontal therapy. A systematic review. *Ann Periodontol* 2003; 8: 115-181.
7. Herrera D, Sanz M, Jepsen S, Needleman I, Roldán S. A systematic review on the effect of systemic antimicrobials as an adjunct to scaling and root planing in periodontitis patients. *J Clin Periodontol* 2002; 29 Supl 3: 136-159.
8. Guentsch A, Jentsch H, Pfister W, Hoffmann T, Eick S. Moxifloxacin as an adjunctive antibiotic in the treatment of severe chronic periodontitis. *J Periodontol* 2008; 79: 1894-1903.
9. Cionca N, Giannopoulou C, Ugolotti G, Mombelli A. Amoxicillin and metronidazole as an adjunct to full mouth scaling and root planing of chronic periodontitis. *J Periodontol* 2009; 80: 364-371.
10. Haffajee AD, Patel M, Socransky SS. Microbiological changes associated with four different periodontal therapies for the treatment of chronic periodontitis. *Oral Microbiol Immunol* 2008; 23: 148-157.
11. Haffajee AD, Torresyap G, Socransky SS. Clinical changes following four different periodontal therapies for the treatment of chronic periodontitis: 1 year results. *J Clin Periodontol* 2007; 34: 243-253.
12. Müller HP, Heinecke A, Borneff M, Kiencke C, Knopf A, Pohl S. Eradication of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* from the oral cavity in adult periodontitis. *J Periodontol Res* 1998; 33: 49-58.
13. Gupta A. Hospital-acquired infections in the neonatal intensive care unit-Klebsiella pneumoniae. *Semin Perinatol* 2002; 26: 340-345.
14. Slots J, Feik D, Rams TE. Age and sex relationships of superinfecting microorganisms in periodontitis patients. *Oral Microbiol Immunol* 1990; 5: 305-308.
15. Slots J, Feik D, Rams TE. Prevalence and antimicrobial susceptibility of Enterobacteriaceae, Pseudomonadaceae and Acinetobacter in human periodontitis. *Oral Microbiol Immunol* 1990; 5: 149-154.
16. Gonçalves MO, Coutinho-Filho WP, Pimenta FP, et al. Periodontal disease as reservoir for multi-resistant and hydrolytic enterobacterial species. *Lett Appl Microbiol* 2007; 44: 488-494.
17. Listgarten MA, Lai CH, Young V. Microbial composition and pattern of antibiotic resistance in subgingival microbial samples from patients with refractory periodontitis. *J Periodontol* 1993; 64: 155-161.
18. Listgarten MA, Lai CH. Comparative microbiological characteristics of failing implants and periodontally diseased teeth. *J Periodontol* 1999; 70: 431-437.
19. Edwardsson S, Bing M, Axtelius B, Lindberg B, Söderfeldt B, Attström R. The microbiota of periodontal pockets with different depths in therapy-resistant periodontitis. *J Clin Periodontol* 1999; 26: 143-152.
20. Slots J, Rams TE, Listgarten MA. Yeasts, enteric rods and pseudomonads in the subgingival flora of severe adult periodontitis. *Oral Microbiol Immunol* 1988; 3: 47-52.
21. Slots J, Rams TE, Schonfeld SE. In vitro activity of chlorhexidine against enteric rods, pseudomonads and acinetobacter from human periodontitis. *Oral Microbiol Immunol* 1991; 6: 62-64.
22. Slots J, Feik D, Rams TE. In vitro antimicrobial sensitivity of enteric rods and pseudomonads from advanced adult periodontitis. *Oral Microbiol Immunol* 1990; 5: 298-301.
23. Barbosa FC, Mayer MP, Saba-Chujfi E, Cai S. Subgingival occurrence and antimicrobial susceptibility of enteric rods and pseudomonads from Brazilian periodontitis patients. *Oral Microbiol Immunol* 2001; 16: 306-310.
24. Botero JE, Contreras A, Lafaurie G, Jaramillo A, Betancourt M, Arce RM. Occurrence of periodontopathic and superinfecting bacteria in chronic and aggressive periodontitis subjects in a Colombian population. *J Periodontol* 2007; 78: 696-704.
25. Ardila CM, Fernández N, Guzmán IC. Antimicrobial susceptibility of moxifloxacin against gram-negative enteric rods from Colombian patients with chronic periodontitis. *J Periodontol* 2010; 81: 292-299.

26. Watt B, Brown FV. The in vitro activity of ciprofloxacin in combination with other agents against anaerobes of clinical interest. *J Antimicrob Chemother* 1986; 17: 679-680.
27. Ardila CM, López MA, Guzmán IC. High resistance against clindamycin, metronidazole and amoxicillin in *Porphyromonas gingivalis* and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* isolates of periodontal disease. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2010; 15(6):e947-e951.
28. Araujo MW, Hovey KM, Benedek JR, Grossi S, Dorn J, Wactawski-Wende J et al. Reproducibility of probing depth measurement using a constant-force electronic probe: analysis of inter- and intraexaminer variability. *J Periodontol* 2003; 74: 1736-1740.
29. Armitage GC. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol* 1999; 4: 1-6.
30. Möller AJ. Microbiological examination of root canals and periapical tissues of human teeth. *Methodological studies. Odontol Tidskr* 1966; 74(5) Supl: 1-380.
31. Slots J. Rapid identification of important periodontal microorganisms by cultivation. *Oral Microbiol Immunol* 1986; 1: 48-57.
32. Slots J, Reynolds HS. Long-wave UV light fluorescence for identification of black-pigmented *Bacteroides* spp. *J Clin Microbiol* 1982; 16: 1148-1151.
33. Twisk JWR. *Applied multilevel analysis: a practical guide.* Cambridge: Cambridge University Press; 2006. p. 196.
34. Guzmán IC, Grisales H, Ardila CM. Administración sistémica adjunta de moxifloxacin *versus* ciprofloxacin más metronidazol en el tratamiento de periodontitis crónica con presencia de bacilos entéricos Gram negativos: I. Efectos clínicos y microbiológicos. *Rev Fac Odontol Univ Antioq* 2011; 23(1): 92-110.
35. Pahkla ER, Koppel T, Naaber P, Saag M, Loivukene K. The efficacy of non-surgical and systemic antibiotic treatment on smoking and non-smoking periodontitis patients. *Stomatologija* 2006; 8: 116-121.
36. Joss A, Adler R, Lang NP. Bleeding on probing. A parameter for monitoring periodontal conditions in clinical practice. *J Clin Periodontol* 1994; 21: 402-408.
37. Darby IB, Hodge PJ, Riggio MP, Kinane DF. Clinical and microbiological effect of scaling and root planing in smoker and non-smoker chronic and aggressive periodontitis patients. *J Clin Periodontol* 2005; 32: 200-206.
38. Armitage GC, Offenbacher S. Consensus report on periodontal diseases: epidemiology and diagnosis. *Ann Periodontol* 1996; 1: 216-222.