
ADMINISTRACIÓN SISTÉMICA ADJUNTA DE MOXIFLOXACINA VERSUS CIPROFLOXACINA MÁS METRONIDAZOL EN EL TRATAMIENTO DE PERIODONTITIS CRÓNICA CON PRESENCIA DE BACILOS ENTÉRICOS GRAM NEGATIVOS: I. EFECTOS CLÍNICOS Y MICROBIOLÓGICOS¹

ADJUNCTIVE SYSTEMIC ADMINISTRATION OF MOXIFLOXACIN VERSUS CIPROFLOXACIN PLUS METRONIDAZOLE IN THE TREATMENT OF CHRONIC PERIODONTITIS HARBORING GRAM-NEGATIVE ENTERIC RODS: I. MICROBIOLOGICAL AND CLINICAL EFFECTS¹

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

RESUMEN. Introducción: los hallazgos clínicos preliminares indican que las lesiones periodontales asociadas a bacilos entéricos Gram negativos no responden al tratamiento convencional. Los objetivos del presente estudio fueron evaluar y comparar los efectos clínicos y microbiológicos del raspaje y alisado radicular (RAR) combinado con la administración sistémica de moxifloxacina (MOX) o ciprofloxacina más metronidazol (CIPRO + MET), en el tratamiento de sujetos con periodontitis crónica. **Métodos:** en este ensayo clínico participaron 76 pacientes, divididos en dos grupos. Los sujetos se trataron con RAR más MOX (Grupo MOX; n = 38) o RAR más CIPRO + MET (Grupo CIPRO + MET; n = 38). Los datos clínicos y microbiológicos se registraron a nivel base, y a los 3 y 6 meses después del tratamiento. Los cambios significativos en los parámetros clínicos y microbiológicos, intra e inter grupos, se midieron utilizando las pruebas de Mann-Whitney y Wilcoxon, respectivamente. **Resultados:** después de seis meses, los dos grupos de tratamiento presentaron una reducción significativa en la profundidad de sondaje y en el sangrado al sondaje, además de una ganancia en la inserción clínica ($P < 0,05$). Se observó disminución estadísticamente significativa de la proporción de sitios > 6 mm. No se identificaron entéricos ni *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* en ninguno de los grupos, después de la terapia. **Conclusiones:** este estudio proporciona evidencia del beneficio adjunto de MOX o CIPRO-MET al RAR, en pacientes con periodontitis crónica que presentan entéricos. Sin embargo, MOX puede ser el antibiótico de elección en vista de los pocos efectos adversos ocasionados y debido a su dosificación solo una vez al día.

Palabras clave: antimicrobianos, microbiología, periodontitis, bacilos entéricos Gram negativos.

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: I. Efectos clínicos y microbiológicos. Rev Fac Odontol Univ Antioq 2011; 23(1): 92-110.

ABSTRACT. Introduction: preliminary clinical findings indicate that periodontal lesions associated with Gram-negative enteric rods do not respond to conventional treatment modalities. The aim of the present study was to evaluate and compare the clinical and microbiological effects of scaling and root planing (SRP) combined with systemic administration of moxifloxacin (MOX) or ciprofloxacin plus metronidazole (CIPRO + MET) in the treatment of chronic periodontitis. **Methods:** seventy-six patients participated in this randomized clinical trial, and they were divided into two groups. Subjects were treated with SRP plus adjunctive MOX (MOX group; n = 38) or SRP plus adjunctive CIPRO + MET (CIPRO + MET GROUP; n = 38). Clinical and microbiological data were recorded at baseline and at 3 and 6 months after treatment. The significant changes in clinical and microbiological parameters between and within the groups were measured using the Mann-Whitney test and Wilcoxon's rank test respectively. **Results:** after six months, both treatment groups showed a significant reduction in probing depth and bleeding on probing ($P < 0.05$) and better clinical attachment. A statistically significant reduction of the proportion of sites > 6 mm was also observed. Gram-negative enteric rods and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* were not identified in either

1 Parte de 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 de Salud Pública, Universidad de Antioquia, Colombia.

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

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

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

3 Ph.D. in Epidemiology, Titular Professor National Public Health School Universidad de Antioquia, Colombia.

4 Periodontist, Ph. D. Associate Professor School of Dentistry Universidad de Antioquia, Colombia. Director, Group of Biomedical Stomatology, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

group six months after baseline. **Conclusions:** this study provides evidence of the benefit of using MOX or CIPRO+MET as adjunct to SRP in patients with chronic periodontitis harboring Gram-negative enteric rods. However, MOX may be the antibiotic of choice in view of its few adverse effects and single dose treatment per day.

Key words: antimicrobial(s), microbiology, periodontitis; Gram-negative enteric rods.

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: I microbiological and clinical effects. Rev Fac Odontol Univ Antioq 2011; 23(1): 92-110.

INTRODUCCIÓN

Tradicionalmente se ha concluido que el raspaje y alisado radicular (RAR) es un enfoque de tratamiento efectivo, sin embargo, este procedimiento frecuentemente no conduce a los cambios microbiológicos necesarios para mantener a largo plazo la estabilidad de los beneficios clínicos logrados inicialmente.¹

La utilización adjunta de antibióticos administrados sistémicamente ha proporcionado un mejor resultado clínico, particularmente en términos de reducción de la profundidad de sondaje (PS) y ganancia del nivel de inserción clínica que el RAR en sujetos con periodontitis crónica.^{2,3} En periodontitis crónica, los patógenos periodontales tales como *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* y *Treponema denticola* se reducen más efectivamente empleando antibióticos sistémicos adjuntos.^{1,4-6} Adicionalmente, la terapia antimicrobiana adjunta con antibióticos sistémicos afecta los patógenos periodontales residentes en superficies mucosas no periodontales.⁷

Por otra parte, los bacilos entéricos Gram negativos (BEGN) son patógenos oportunistas en un amplio rango de infecciones humanas⁸ y pueden detectarse en ambientes subgingivales de sujetos con periodontitis.⁹⁻²⁰ Estos microorganismos producen factores de virulencia y tienen capacidad para invadir los tejidos humanos.¹¹ Los BEGN degradan la elastina y producen enzimas hidrolíticas en concurrencia con actividades proteolíticas expresadas por periodontopatógenos reconocidos, durante la destrucción de los tejidos de soporte de los dientes.¹¹ En los sitios periodontales el aislamiento de elastina degradada por cepas de *Klebsiella pneumonia*, un BEGN usual que puede causar neumonía, enfatiza que la cavidad oral es un reservorio de patógenos que facilita la diseminación, causando infecciones severas en el tracto respiratorio bajo.¹¹

INTRODUCTION

It has been commonly concluded that scaling and root planing (SRP) is an effective treatment approach; however, this procedure does not frequently lead to the microbiological changes necessary for maintaining the long-term stability of the clinical benefits initially achieved.¹

The adjunctive use of systemically administered antibiotics has been shown to provide a better clinical outcome, particularly in terms of probing depth (PD) reduction and attachment-level gain than SRP in subjects with chronic periodontitis.^{2,3} Periodontal pathogens such as *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* and *Treponema denticola* are more effectively reduced by the use of systemic antibiotics in chronic periodontitis.^{1,4-6} Furthermore, adjunctive antimicrobial therapy with systemic antibiotics affects periodontal pathogens residing in non-periodontal mucosal surfaces.⁷

On the other hand, Gram-negative enteric rods (GNER) are opportunistic pathogens in a wide range of human infections⁸ and they can be detected in the subgingival environment of periodontitis subjects.⁹⁻²⁰ These microorganisms are able to produce virulence factors and have shown the capacity to invade human tissue.¹¹ GNER are capable of degrading elastin and have been shown to produce hydrolytic enzymes that might accord with proteolytic activities expressed by recognized periodontopathogens, during destruction of tooth-supporting tissues.¹¹ The isolation from periodontal sites of elastin degrading *Klebsiella pneumonia* strain, a usual GNER that may cause pneumonia, emphasizes that the oral cavity is a reservoir of pathogens that may spread and cause severe infections in the lower respiratory tract.¹¹

La lecitinasa producida por los BEGN en sitios periodontales puede alterar las vías de transducción en las células endoteliales, plaquetas y neutrófilos, conduciendo a una producción descontrolada de mediadores intracelulares y moléculas de adhesión, alterando así el tráfico de granulocitos al tejido infectado.¹¹

Los BEGN subgingivales persisten a menudo después de desbridamientos y cirugía, y se ha implicado como patógeno clave en casos de periodontitis refractaria.^{10, 12-15} Estos microorganismos se detectaron en alta frecuencia y elevadas proporciones en pacientes con fracasos de implantes.¹³ Adicionalmente, han mostrado baja sensibilidad a la clorhexidina¹⁶ y el hecho que estos microorganismos muestren resistencia *in vitro* a la mayoría de antibióticos adjuntos usados para tratar la periodontitis,¹⁷⁻²⁰ indica que las lesiones periodontales asociadas con estos microorganismos, no responden a modalidades de tratamiento convencional.¹⁰ La terapia con ciprofloxacina tiene el potencial de erradicar los BEGN de las bolsas periodontales, pero tiene poca actividad contra los principales patógenos periodontales,^{10, 21} por lo tanto, debe combinarse con un agente antimicrobiano activo contra anaerobios como el metronidazol.^{9, 10} Por el contrario, en publicaciones previas, la moxifloxacina (MOX) ha demostrado actividad *in vitro* contra los BEGN,²⁰ e *in vitro*²² y eficacia *in vivo*⁴ contra periodontopatógenos. Estas publicaciones también han recomendado la realización de ensayos clínicos que investiguen el efecto de la MOX en el tratamiento de pacientes con periodontitis crónica que presentan BEGN en placa subgingival.

No se conocen estudios que hayan evaluado la eficacia *in vivo* y la aplicabilidad clínica de la MOX contra BEGN presentes en placa subgingival. Por lo tanto, el objetivo del presente artículo fue evaluar y comparar los efectos clínicos y microbiológicos del RAR combinado con aplicación sistémica de MOX o ciprofloxacina más metronidazol (CIPRO + MET) en el tratamiento de pacientes con periodontitis crónica.

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.

Lecithinase production by GNER strains from periodontal lesions may disrupt transduction pathways in endothelial cells, platelets and neutrophils leading to uncontrolled production of intracellular mediators and adhesion molecules, thus altering the traffic of granulocytes to the infected tissue.¹¹

Subgingival GNER often persist after periodontal debridement and surgery and have been implicated as key pathogens in cases of refractory periodontitis.^{10, 12-15} These microorganisms were detected at higher frequency and in higher proportions in patients with failing implants.¹³ Additionally, they show less susceptibility to chlorhexidine¹⁶ and the fact that these microorganisms exhibit *in vitro* resistance to the majority of adjunctive antibiotics used to treat periodontitis,¹⁷⁻²⁰ means that periodontal lesions associated with these organisms do not respond to conventional treatment modalities.¹⁰ Ciprofloxacin therapy has the potential to eradicate GNER from periodontal pockets but has little activity against the main putative periodontopathogens,^{10, 21} therefore, it should be combined with an antimicrobial agent active against anaerobes as metronidazole.^{9, 10} Conversely, in earlier papers, moxifloxacin (MOX) has shown *in vitro* activity against GNER,²⁰ and *in vitro*²² and *in vivo*⁴ efficacy against periodontopathogens. These articles 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.

To our knowledge no studies have assessed the *in vivo* efficacy and clinical applicability of MOX against GNER present in subgingival plaque. Therefore, the aim of the present study was to evaluate and compare the clinical and microbiological effects of SRP combined with systemic MOX or ciprofloxacin plus metronidazole (CIPRO + MET) in the treatment of subjects with chronic periodontitis.

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 20 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 1 g diario 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 post-terapia. Durante estas sesiones, se evaluó la higiene oral y se reenfaticó en los cuidados orales caseros. Todos los sujetos asistieron a las citas de revisión y recibieron evaluaciones de higiene oral.

The study design was approved by the Ethics Committee on Human Research of the University Investigation Department of the Universidad de Antioquia 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 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 parallel arm, 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 analyses. 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 CIPRO+MET at the dosage of 1g once daily plus 500 mg b.i.d. for 7 days (CIPRO + MET group). One-stage full-mouth SRP under local anesthesia was performed in approximately two hours and half 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. 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.

Las citas de revisión se hicieron cada dos semanas durante los seis meses después del tratamiento.

Cumplimiento

Un asistente dental llamó por teléfono a cada sujeto durante los siguientes 6 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

A cada paciente se le hizo una historia médica y se le practicaron exámenes clínicos y radiográficos. En cada visita de monitoreo se observó placa visible (0/1), sangrado al sondaje (SS) (0/1), profundidad de sondaje (PS) (en mm) y nivel de inserción clínica (NIC) (en mm) en seis sitios por diente (mesobucal, bucal, distobucal, distolingual, lingual y mesolingual) en todos los dientes, excluyendo el tercer molar. Las medidas PS y NIC se registraron al milímetro más cercano, utilizando una sonda periodontal calibrada (UNC-15, Hu-Friedy, Chicago, IL). Las mediciones de los pacientes en todas las visitas, se hicieron por el mismo clínico entrenado, cegado y calibrado. El periodoncista que efectuó los exámenes clínicos no hizo la terapia en los pacientes. La reproducibilidad intraexaminador se evaluó antes y durante el periodo experimental, de acuerdo con el método descrito por Araujo et al.²³ Se hicieron medidas repetidas en un total de 10 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).²⁴

The recall visits were made on a 2-week interval during the 6 months after treatment.

Compliance

A dental assistant called each subject during the next 6 days by telephone to remind him/her to take 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

Medical history was taken and clinical and radiographic examinations were conducted for each patient. At each monitoring visit, visible plaque (0/1), bleeding on probing (BOP) (0/1), probing depth (PD) (in mm) and clinical attachment level (CAL) (in mm) were measured at six sites per tooth (mesiobuccal, buccal, distobuccal, distolingual, lingual and mesiolingual) in all teeth excluding third molars. The PD and CAL measurements were recorded to the nearest millimeter by a calibrated standard probe (UNC-15, Hu-Friedy, Chicago, IL). Measurements at all visits for a given subject were made by the same blinded, trained and calibrated clinician. The clinician making the clinical measurements did not perform the therapy on the subjects. The intra-examiner reproducibility was assessed before and during the experimental period according to the method described by Araujo et al.²³ Repeated measurements were performed on a total of 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 groups of two patients with at least 2 h between each examination. The intra-class correlation coefficients for mean PD and CAL were 0.92 and 0.91, respectively. The examiner's reproducibility of measurements made before and during the study was similar. The diagnosis of chronic periodontitis was made based on criteria defined at the workshop sponsored by the American Academy of Periodontology (AAP).²⁴

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, Suiza) en cada bolsa periodontal durante 20 s. Las muestras de cada paciente se depositaron en 2 ml de medio de transporte (Viability Medium Göteborg Anaerobically III: VMGA III)²⁵ 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.²⁶ 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 tripticasa soya con suero, bacitracina y vancomicina en 10% de CO₂ en aire a 37 °C por 4 días. Se hizo identificación presuntiva de acuerdo con métodos descritos^{26, 27} 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.²⁵ Las muestras se mantuvieron a temperatura ambiente, transferidas al laboratorio y procesadas 4 h después del muestreo. 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.

Microbial sampling

Microbial sampling on periodontitis patients was performed on pockets ≥ 5 mm. The deepest six pockets were selected for sampling. After removing supragingival plaque with curets and isolating the area with cotton pellets, the 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.²⁵ The samples were analyzed using microbial culture techniques for the presence of periodontopathic bacteria according to Slots.²⁶ All 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. The 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^{26, 27} and using a commercial identification micromethod system (RapID ANA, Remel, Norcross, GA) for *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* and *T. forsythia*. Total viable counts (TVC) were 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 GNER by culture. After placement for 20 s, the paper points were pooled into a vial containing 2.0 ml of VMGA III transport medium.²⁵ The sample vials were maintained at room temperature, transferred to the laboratory and processed within 4 h after sampling. 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 speciated using a standardized biochemical test (BD, Sparks, MD). TVC were 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.

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. El sujeto fue la unidad de análisis. Para la descripción de los datos se utilizaron promedios \pm desviación estándar, y proporciones de sitios dentro de categorías. 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 los momentos de evaluación al interior de cada grupo se calcularon mediante pruebas de Mann-Whitney y Wilcoxon, respectivamente.

Se incluyeron en el análisis estadístico solamente los sitios con una PS \geq 4 mm, debido a que los sitios menos profundos no recibieron RAR, aun cuando se trataron con detartraje subgingival. En este estudio se estableció PS como resultado primario y NIC como secundario. Se registraron como variables explicativas el SS y la presencia de entéricos y de periodontopatógenos evaluados.

Se analizaron separadamente los datos relacionados con PS $>$ 6 mm, empleando el sitio como unidad observacional. Se calculó la proporción de sitios $>$ 6 mm en cada momento y para cada grupo y se compararon los cambios de estas proporciones desde la línea de base entre los grupos usando la prueba Mann-Whitney.

Los datos microbiológicos se calcularon teniendo en cuenta al sujeto como unidad de análisis. En todas las evaluaciones se estimó el número de sujetos positivos para las especies investigadas en cualquiera de los sitios muestreados. Se aplicó la prueba Mann-Whitney con el fin de identificar las diferencias específicas, mientras que las diferencias entre cada grupo se evaluó con la prueba Wilcoxon. Se determinó 0,05 como el nivel de significancia estadística para todas las pruebas. 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).

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. The subject was the unit for the basic statistical analysis. Mean values \pm SD and the proportions of sites within various categories of scoring units were calculated for data description. Normal distribution of continuous variables was verified with the Kolmogorov-Smirnov test. Categorical data were analysed with the χ^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's rank test, respectively.

Only sites with initial PD \geq 4 mm were included in the statistical analyses, as shallower sites did not receive SRP, although they were treated with subgingival scaling. PD was set as the primary outcome and CAL as secondary outcome of the present study. Explanatory variables that were recorded were BOP and presence of enteric rods and periodontopathogens tested.

Data concerning sites with PD $>$ 6 mm were analysed separately with the site as the observational unit. At each timepoint, for each group, the proportion of sites $>$ 6 mm was calculated and changes of these proportions from baseline between groups were compared using the Mann-Whitney test.

Microbiological data were analysed with the subject as the observational unit. The number of subjects positive for the investigated species at any of the sampled sites were estimated at all timepoints. In order to identify specific differences between pairs of groups at each timepoint the Mann-Whitney test was applied, while differences between timepoints within each group were tested with the Wilcoxon's test.

The significance level was set at 0.05 for all tests.

All data handling and statistical testing were performed with a software package (SPSS, Statistical Package for the Social Sciences, version 15, Chicago, IL).

Cálculo del tamaño de muestra

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 de muestra que asegurará un adecuado poder en este ensayo clínico, se consideraron diferencias de al menos 1 mm de NIC y desviación estándar de 1,1 mm entre los grupos en bolsas periodontales inicialmente profundas (> 6 mm).⁶ Según este cálculo, se determinó que una muestra ≥ 19 sujetos por grupo sería necesario para proporcionar el 80% de poder con un α de 0,05.

RESULTADOS

Retención de sujetos

98 sujetos se evaluaron para su elegibilidad antes de ingresar al estudio. De este grupo, 22 individuos fueron excluidos debido a que no cumplieron los criterios de inclusión. De los 76 pacientes reclutados, 72 completaron los datos para las tres visitas de monitoreo, mientras que dos sujetos no asistieron a una cita. En los dos sujetos con datos perdidos se hizo un análisis por intención de tratar, en los que la última observación se llevó hacia adelante, y quedaron en total 74 individuos con datos completos que fueron incluidos en el análisis. Los dos pacientes restantes (uno de cada grupo) tuvieron datos de base solamente y no fueron incluidos en el análisis. La participación de los individuos durante el estudio se ilustra en la figura 1.

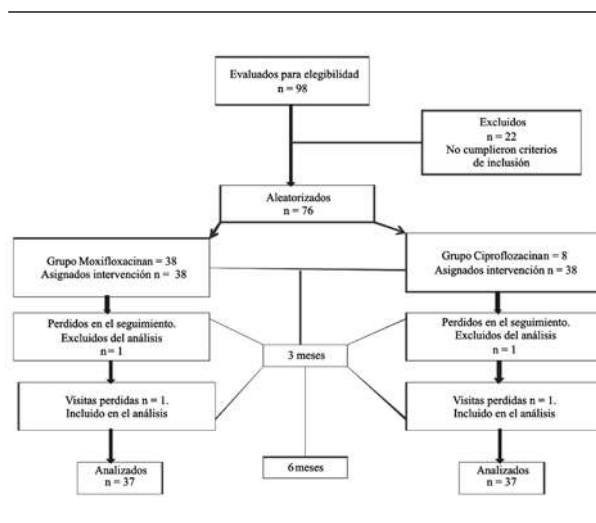


Figura 1. Diagrama de flujo de la participación en el estudio

Sample size calculation

Study sample size calculations were based on subject level analyses as the study randomized individuals. 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).⁶ Based on these calculations, it was determined that ≥ 19 subjects per group would be necessary to provide an 80% power with an α of 0.05.

RESULTS

Subject retention

Ninety-eight subjects were assessed for their eligibility before entering the study. Of these, 22 subjects were excluded because they did not meet the inclusion criteria. Of the 76 subjects recruited, 72 patients had complete data for all three monitoring visits, while two subjects had one missing visit. Intent-to-treat analyses were performed in the 2 subjects with missing data, whereby the last observation was carried forward, providing a total of 74 subjects with complete data that were included in the analyses. The remaining two subjects (one from each group) had baseline data only and their data were not included in the analyses. Participation of individuals during the study is illustrated in figure 1.

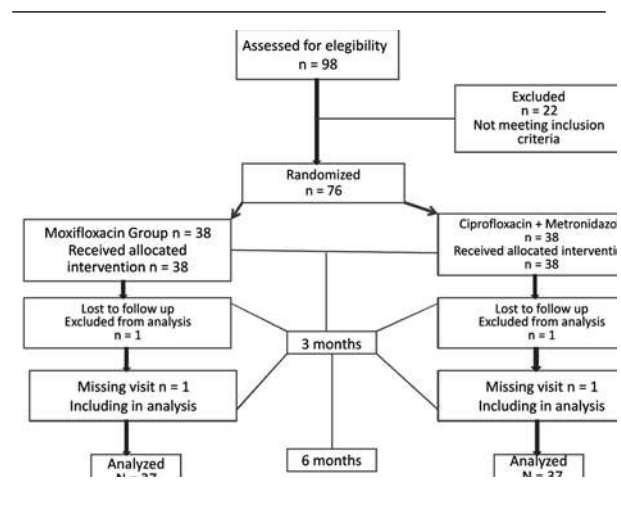


Figure 1. Flowchart of participation in the study

Eventos adversos

Todos los sujetos que terminaron el estudio informaron completa adherencia al esquema de antibióticos prescrito. Siete sujetos del grupo CIPRO + MET manifestaron eventos adversos durante el estudio, tales como diarrea y náuseas. Además, tres pacientes del mismo grupo reportaron mareo. La mayoría de pacientes del grupo MOX afirmaron que la medicación no ocasionó mayores disturbios en su rutina diaria.

Hallazgos clínicos

La tabla 1 presenta las características clínicas y demográficas de base de los 76 pacientes subdivididos en los dos grupos de tratamiento. Excepto por la edad, no se observaron diferencias estadísticas entre los grupos de tratamiento.

La tabla 2 muestra la estadística descriptiva y las comparaciones para ambos grupos relacionadas con SS, PS y NIC. No se observó diferencias significativas entre ellos durante ninguna evaluación. Cuando se hicieron comparaciones en cada grupo, ambos mostraron una reducción significativa en PS y SS comparado con la línea de base ($P < 0,001$), y esta diferencia se mantuvo en los 6 meses desde la línea de base en los dos grupos. No se observó ninguna diferencia en los grupos a los 3 y 6 meses. Cuando se hicieron comparaciones en cada grupo, los dos presentaron mejoría significativa en el NIC comparado con la línea de base ($P < 0,001$), y esta diferencia se mantuvo a los 6 meses en ambos. De la misma forma, no se observaron diferencias en los grupos a los 3 y 6 meses.

Adverse events

All the subjects who completed the study reported full adherence to the prescribed course of antibiotics. Seven subjects from the CIPRO + MET group reported adverse events during the study, such as diarrhea and nausea. Moreover, three subjects from the CIPRO + MET group reported dizziness. Most subjects from the MOX group affirmed that the medications did not cause any major disturbance in their daily routine.

Clinical findings

Table 1 presents the baseline clinical and demographic characteristics of the 76 patients subdivided into the two treatment groups. There were no statistically significant differences among treatment groups for any of the parameters except for age.

Table 2 displays descriptive statistics and comparisons for both groups concerning BOP, PD and CAL. No differences were observed between the groups at any timepoint. When comparisons were made within each group, both groups resulted in significant reduction of PD and BOP compared with baseline ($P < 0.001$), and this difference was maintained at 6 months from baseline in both groups. No differences were observed within the groups between 3 months and 6 months after baseline. When comparisons were made within each group, both groups exhibited significant improvement in CAL compared with baseline ($P < 0.001$), and this difference was maintained at 6 months from baseline in both groups. In the same way, no differences were observed within the groups between 3 months and 6 months after baseline.

Tabla 1. Características clínicas y demográficas de los sujetos con los datos de los dos grupos de tratamiento al inicio del estudio

Parámetro	grupo MOX N = 38	grupo CIPRO + MET N = 38	p-valor
Edad (promedio ± DE)	45 ± 7,3	47 ± 8,6	0,01 Mann Whitney
Sexo, mujeres	22 (58%)	23 (60%)	0,1 Chi cuadrado
Fumadores	8 (21%)	9 (24%)	0,7 Chi cuadrado
Placa (% ± DE)	58 ± 30	59 ± 30	0,5 Mann Whitney

DE = desviación estándar.

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

Parameter	MOX group N = 38	CIPRO+MET group N = 38	p-value
Age mean ± SD	45 ± 7.3	47 ± 8.6	0.01 Mann Whitney
Gender, Females	22 (58%)	23 (60%)	0.1 χ^2
Smokers, current	8 (21%)	9 (24%)	0.7 χ^2
Plaque (% ± SD)	58 ± 30	59 ± 30	0.5 Mann Whitney

SD = standard deviation.

Tabla 2. *Parámetros clínicos de los dos grupos durante el periodo experimental*

Parámetro	GRUPO MOX	GRUPO		GRUPO CIPRO + MET	GRUPO	
	Línea de base	3 meses	6 meses	Línea de base	3 meses	6 meses
SS	72 ± 28	15 ± 4	13 ± 4	74 ± 27	16 ± 5	14 ± 4
PS	5,15 ± 0,6	3,13 ± 0,4	3,12 ± 0,3	5,14 ± 0,5	3,12 ± 0,3	3,12 ± 0,3
NIC	5,25 ± 0,6	3,84 ± 0,7	3,71 ± 0,7	5,23 ± 0,6	3,82 ± 0,7	3,7 ± 0,7

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

Se observaron diferencias al interior de los grupos entre la línea de base y los 3 meses, y entre la línea de base y los 6 meses (Wilcoxon $p < 0,05$)

No se observaron diferencias entre los grupos (Wilcoxon $p < 0,05$)

Table 2. *Clinical parameters of the two groups during the experimental period*

Parameter	MOX	Group		CIPRO+MET	Group	
	Baseline	3 months	6 months	Baseline	3 months	6 months
BOP	72 ± 28	15 ± 4	13 ± 4	74 ± 27	16 ± 5	14 ± 4
PD	5.15 ± 0.6	3.13 ± 0.4	3.12 ± 0.3	5.14 ± 0.5	3.12 ± 0.3	3.12 ± 0.3
CAL	5.25 ± 0.6	3.84 ± 0.7	3.71 ± 0.7	5.23 ± 0.6	3.82 ± 0.7	3.70 ± 0.7

SD = standard deviation.

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

Differences were observed within groups between baseline and 3 months, and between baseline and 6 months (Wilcoxon's test $p < 0.05$).

No differences were observed within the groups between 3 months and 6 months after baseline (Wilcoxon's test $p < 0.05$).

Se buscaron diferencias adicionales analizando bolsas con PS > 6 mm (tabla 3) y utilizando el sitio en vez del sujeto como unidad observacional, considerando el efecto de los tratamientos sobre el resultado primario. De acuerdo con los hallazgos, a los seis meses los sujetos en los dos grupos, mostraron la mayor reducción desde la línea de base en proporciones de sitios con PS > 6 mm ($P < 0,001$). Ninguna diferencia se observó entre los individuos que recibieron MOX o CIPRO + MET.

Hallazgos microbiológicos

En la tabla 4 se presenta el número de sujetos positivos a las especies investigadas. No se observaron diferencias significativas entre los grupos en la línea de base. Igualmente, no se observó ninguna diferencia entre los grupos en ningún momento. En los sujetos, la administración de los antimicrobianos condujo a la eliminación y reducción de la mayoría de las bacterias, tres meses después del inicio del estudio. Tres meses después de la línea de base no se identificaron BEGN ni *A. actinomycetemcomitans* en ambos grupos, y también se redujeron significativamente *P. gingivalis* y *T. forsythia* ($P < 0,05$). A los seis meses, se observó recolonización de las especies investigadas, excepto para los BEGN y *A. actinomycetemcomitans*. Sin embargo, *P. gingivalis* y *T. forsythia* se disminuyeron significativamente desde la línea de base ($P < 0,05$).

Additional differences concerning the effect of different treatments on the primary outcome were sought with the site instead of the subject as the observational unit, analyzing the subset of pockets with PD > 6 mm (table 3). According to the findings, subjects in both groups at 6 months displayed the greatest reduction from baseline in proportions of sites with PD > 6 mm ($P < 0.001$). No differences were observed between the subjects who received adjunctive MOX or CIPRO + MET.

Microbiological findings

The number of subjects positive for investigated species is presented in table 4. At baseline no differences were observed between both groups. Likewise, no differences were observed between groups at any timepoint. Administration of antimicrobials resulted in elimination and reduction of most bacteria, at the subject level, 3 months after baseline. GNER and *A. actinomycetemcomitans* were not identified in both groups 3 months after baseline, and *P. gingivalis* and *T. forsythia* were significantly reduced in both groups 3 months after baseline ($P < 0.05$). Six months from baseline, a recolonization of investigated species was observed, except for GNER and *A. actinomycetemcomitans*. However, *P. gingivalis* and *T. forsythia* were reduced significantly from baseline ($P < 0.05$).

Tabla 3. Cambio de proporciones de los sitios con profundidad de sondaje > 6 mm en los dos grupos durante el periodo experimental

Observación	Grupo N (sitios)	MOX Cambio desde línea base (%)	Grupo N (sitios)	CIPRO + METRO Cambio desde línea base (%)
Línea de base	261	-----	264	-----
3 meses	24	90,1	27	89,7
6 meses	21	91,9	24	90,9

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

Table 3. Change of proportions of sites with probing depth > 6 mm of the two groups during the experimental period

Observation	MOX n (sites)	Group Change from Baseline (%)	CIPRO+METRO n (sites)	Group Change from Baseline (%)
Baseline	261	-----	264	-----
3 months	24	90.1	27	89.7
6 months	21	91.9	24	90.9

No differences were observed between two groups at any time (Mann-Whitney $p > 0.05$).
Differences were observed within groups between baseline and 3 months, and between baseline and 6 months (Wilcoxon's test $p < 0.05$).

Tabla 4. Número de sujetos positivos para bacilos entéricos Gram negativos (*Enteric*), *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*A. a.*), *Porphyromonas gingivalis* (*P. g.*) y *Tanerella forsythia* (*T. f.*) durante el periodo experimental

Grupos	Enteric		a		P. g		T. f	
	MOX	CIPRO + MET	MOX	CIPRO + MET	MOX	CIPRO + MET	MOX	CIPRO + MET
Línea de base	11	9	9	9	25	26	21	22
3 meses	0	0	0	0	9	10	8	9
6 meses	0	0	0	0	11	13	10	11

No se observaron diferencias entre los grupos (Mann-Whitney $p > 0,05$).
No se observaron diferencias entre los grupos (Mann-Whitney $p > 0,05$).
P. g and *T. f* se redujeron significativamente en los dos grupos después de 3 y 6 meses (Wilcoxon $p < 0,05$).

Table 4. Number of subjects positive for Gram negative enteric rods (*Enteric*), *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*A. a.*), *Porphyromonas gingivalis* (*P. g.*) and *Tanerella forsythia* (*T. f.*) during the experimental period

Groups	Enteric		A. a		P. g.		T. f.	
	MOX	CIPRO+MET	MOX	CIPRO+MET	MOX	CIPRO+MET	MOX	CIPRO+MET
Baseline	11	9	9	9	25	26	21	22
3 months	0	0	0	0	9	10	8	9
6 months	0	0	0	0	11	13	10	11

No differences were observed between both groups at baseline (Mann-Whitney test $p > 0.05$).
No differences were observed between groups at any time point (Mann-Whitney test $p > 0.05$).
P. g. and *T.f.* were significantly reduced in both groups 3 months and 6 months after baseline (Wilcoxon's signed ranks test $p < 0.05$).

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. Estas bacterias se observan con frecuencia en la microbiota subgingival de pacientes considerados clínicamente refractarios a la terapia periodontal convencional mecánica y antibiótica.¹²⁻¹⁵ El alto potencial patogénico de los BEGN,¹⁰ junto con las altas proporciones de lesiones refractarias,^{10, 12-15} los involucra en la patogénesis de algunas formas de periodontitis.¹⁷

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. These bacteria are often recovered from the subgingival microbiota of patients considered being clinically refractory to mechanical and conventional antibiotic periodontal therapies.¹²⁻¹⁵ The high pathogenic potential of GNER¹⁰ together with the high proportions in refractory lesions^{10, 12-15} implicate them in the pathogenesis of various forms of periodontitis.¹⁷

Esto sugiere la necesidad de una antibioterapia apropiada para el tratamiento de infecciones periodontales que incluyen BEGN.^{10, 12-15} Además, los BEGN pueden ser patógenos claves en infecciones severas del tracto urinario, piel, hueso y articulaciones, y varios sitios del cuerpo^{8, 11, 28} elaborando un número de potentes enzimas y toxinas de posible relevancia para la destrucción de los tejidos periodontales.¹¹

Se seleccionó la utilización adjunta de MOX o ciprofloxacina con base en resultados preliminares *in vitro*^{7, 17-21} e *in vivo*^{4, 10} que sugirieron beneficios clínicos y microbiológicos en el tratamiento de periodontitis asociadas a BEGN. Para nuestro conocimiento, el presente estudio es el primer ensayo clínico que compara MOX y CIPRO + MET como terapia adjunta al RAR.

Datos clínicos

Las dos terapias usadas en el presente estudio mejoraron los parámetros clínicos evaluados. El RAR combinado con MOX o CIPRO + MET fue igualmente efectivo en mejorar PS y NIC. El mismo patrón se observó para el parámetro SS y no se observaron diferencias significativas en los sujetos entre los grupos en ningún momento. Para nuestro conocimiento, hasta la fecha solamente dos estudios han investigado independientemente la eficacia de la moxifloxacina adjunta⁴ y de la ciprofloxacina¹⁰ en periodontitis. De acuerdo con esto, nuestros resultados concuerdan con los de Guentsch y colaboradores,⁴ mostrando cuando MOX se combinó con RAR en el tratamiento de periodontitis crónica presentó mejor respuesta clínica. Por otra parte, es importante notar que los pacientes incluidos en el estudio con ciprofloxacina¹⁰ tuvieron historia de periodontitis refractaria asociada a BEGN. Este hallazgo es especialmente interesante debido a que la terapia mecánica sola fue incapaz de suprimir completamente estos organismos en lesiones con periodontitis.¹⁰ En ese estudio y similar a la presente investigación, la terapia con ciprofloxacina sistémica adjunta demostró mejoría en SS, PS y NIC. Los resultados de la presente investigación concuerdan con estudios que sugieren que el metronidazol sistémico solo o combinado mejora significativamente los resultados clínicos del desbridamiento periodontal no quirúrgico.^{1-3, 6} Es interesante mencionar que Cionca y colaboradores,¹ demostraron recientemente que la adición de agentes antimicrobianos al tratamiento mecánico puede reducir la necesidad de terapia posterior.

This suggests the need for appropriate antibiotherapy in treating periodontal infections involving GNER.^{10, 12-15} Moreover, GNER can be key pathogens in severe infections of the lower respiratory tract, skin, bone and joints, urinary tract, and various body sites^{8, 11, 28} and they elaborate a number of potent enzymes and toxins of possible importance for destruction of periodontal tissues.¹¹

The adjunctive use of MOX or ciprofloxacin was selected based on earlier *in vitro*^{7, 17-21} and *in vivo*^{4, 10} studies that suggested the clinical and microbiological benefits of these antibiotics in the treatment of periodontitis associated with GNER. To the best of our knowledge, the present study is the first clinical study comparing MOX and CIPRO + MET as an adjunct to SRP.

Clinical data

Both 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 and CAL. The same pattern was observed for the BOP parameter and no differences were observed between groups at any time on the subject level. To our knowledge, only two studies to date have independently investigated the efficacy of adjunctive moxifloxacin⁴ and ciprofloxacin alone¹⁰ in periodontitis. With this in mind, our results are in agreement with Guentsch et al⁴ who showed an enhanced clinical response when MOX was combined with SRP on the treatment of chronic periodontitis. On the other hand, it is important to note that patients included in the study with ciprofloxacin¹⁰ had a history of refractory periodontitis associated with GNER. This finding is especially interesting because thorough mechanical treatment was unable to completely suppress these organisms in infected periodontitis lesions.¹⁰ Similar to the current investigation, adjunctive systemic ciprofloxacin therapy demonstrated improvements in BOP, PD and CAL. The results of the current investigation are in accord with studies in the literature that suggest that systemic metronidazole alone or combined significantly improved clinical outcomes of non-surgical periodontal debridement.^{1-3, 6} Interestingly, Cionca et al¹ recently showed that the addition of antimicrobial agents to thorough mechanical treatment may reduce the need for further treatment.

Cuando se analizan los datos en el sitio, y en particular la proporción de sitios con PS > 6 mm, se observó entre los grupos patrón similar. El grupo MOX y el grupo CIPRO + MET exhibieron reducción significativa de los porcentajes de sitios > 6 mm. Este hallazgo indica un efecto benéfico de estos antimicrobianos en bolsas profundas. Las conclusiones del presente estudio concuerdan con un ensayo clínico recientemente publicado por Guentsch y colaboradores.⁴ Estos autores también demostraron que la terapia sistémica ajunta de MOX por 7 días produce reducción adicional de la PS en bolsas profundas (> 6 mm) a los 6 meses en periodontitis crónica. Otro estudio demostró resultados similares con ciprofloxacina, después de 12 meses, en pacientes con periodontitis refractaria y BEGN.¹⁰ Dos revisiones sistemáticas que evaluaron el efecto de antibióticos administrados sistémicamente sugieren que los antimicrobianos proporcionan mayor beneficio en sujetos con más enfermedad periodontal y en sitios periodontales más profundos.^{2,3}

Datos microbiológicos

Este es el primer ensayo clínico que hasta la fecha ha evaluado los cambios microbiológicos que ocurren con el uso de CIPRO + MET y el segundo que evalúa MOX en el tratamiento de la enfermedad periodontal, y el primero que compara estos dos protocolos de tratamiento. Nos enfocamos en la evaluación de BEGN y tres periodontopatógenos (*A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* y *T. forsythia*). Las razones para estudiar BEGN se explicaron previamente. Por otra parte, se ha demostrado que una disminución en el recuento de los periodontopatógenos estudiados en esta investigación se asoció con mejoría clínica; estos microorganismos además son predictores de los resultados terapéuticos.⁵

Nuestra publicación previa²⁰ reportó cuatro especies de BEGN en placa subgingival en 20 (26.31%) de 76 pacientes: *K. pneumoniae* ocurrió en 12 pacientes, *Pseudomonas aeruginosa* en cuatro sujetos y se identificaron otras tres especies con baja prevalencia. En Latinoamérica su ocurrencia varía ampliamente dentro de la población estudiada, alcanzando una prevalencia de 17,6% en Chile²⁹ y 67% en Santo Domingo.³⁰ Entre brasileños¹⁸ y colombianos^{19,29} se reportaron frecuencias similares a las encontradas en nuestro estudio.²⁰

Igualmente, en esta investigación, la presencia de periodontopatógenos observada fue similar a la encontrada por investigaciones previas.^{19,29}

When analyzing data at a site level, and in particular, the proportion of sites with PD >6 mm, a similar pattern was observed between groups. MOX group and CIPRO + MET group exhibited a significant reduction of the percentages of sites > 6 mm. This finding indicates a beneficial effect of these antimicrobials on deep pockets. Conclusions of the present study agree with a recently published randomized clinical trial by Guentsch et al.⁴ These authors have shown that a 7-day adjunctive course of systemic MOX resulted in an additional reduction of PD in deep pockets (> 6 mm) at 6 months also in chronic periodontitis. Similar results at 12 months were shown for ciprofloxacin in patients with refractory periodontitis harboring GNER.¹⁰ Both systematic reviews evaluating the effects of systemically administered antibiotics suggested that antibiotics provided greater benefit in subjects with more periodontal disease and at deeper periodontal sites.^{2,3}

Microbiological data

This is the first clinical study to date that has evaluated the microbiological changes that occur with the use of CIPRO+MET and the second one that has evaluated MOX in the treatment of periodontal disease, and the first one that has directly compared these two treatment protocols. We focused on determination of GNER rods and three periodontopathogens (*A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* and *T. forsythia*). The reasons for studying GNER were explained previously. On the other hand, it has been shown that a decrease in the counts of periodontopathogens studied in this investigation is associated with clinical improvements and these microorganisms are predictors for therapy results.⁵

Our previous paper²⁰ reported four species of GNER in subgingival plaque in 20 (26.31%) of 76 patients: *K. pneumoniae* occurred in 12 patients, *Pseudomonas aeruginosa* in four patients and three other species were recovered with lower prevalence. In Latin America their occurrence varies amply within studied populations, reaching a prevalence of 17.6% in Chile²⁹ and 67% in Santo Domingo.³⁰ Similar frequencies to those encountered in our study²⁰ were reported among Brazilians¹⁸ and Colombians.^{19,29}

Likewise, the occurrence of periodontopathogens observed in this study was similar to previous investigations.^{19,29}

Es importante notar que las colonias de BEGN son de mayor tamaño¹⁹ y que estos organismos pueden colonizar las bolsas periodontales en altas proporciones. Por otra parte la reacción en cadena de la polimerasa (RCP) no tiene en consideración si la muestra es viable, favoreciendo la mayor frecuencia.¹⁹ D'Ercole y colaboradores³¹ compararon recientemente métodos de cultivo convencional y multiplex RCP para la detección de periodontopatógenos, y encontraron que para los dos métodos hubo un buen acuerdo de exactitud para la determinación de *A. actinomycetemcomitans* y *P. gingivalis*. Resultados similares se obtuvieron para *T. forsythia*.³² Las técnicas de cultivo y RCP introducen muchos problemas metodológicos cuando se aplican en microbiología oral; sin embargo, no se ha desarrollado aún la técnica ideal para la detección de patógenos en muestras de placa subgingival.³¹ Al igual que Botero y colaboradores,¹⁹ el presente estudio reporta la frecuencia de estos microorganismos basados en técnicas de cultivo debido a que permite trabajar posteriormente con los mismos. Se requieren posteriores estudios que clarifiquen el papel de los BEGN sobre los parámetros clínicos y la respuesta al tratamiento periodontal.

De acuerdo con los resultados clínicos, los dos grupos presentaron cambios favorables en el perfil microbiológico subgingival después del tratamiento. Esta observación es consistente con diferentes estudios,^{1, 4, 6} en los que se asoció significativamente una disminución de la ocurrencia de las especies evaluadas con mejoría en el NIC y disminución en la PS. La mayor disminución de la prevalencia se presentó entre la línea de base y el muestreo a los tres meses. Estos resultados están de acuerdo con otros estudios que también demostraron el efecto adjunto de estos antibióticos para reducir las especies del complejo rojo^{1, 4-6} y los BEGN.¹⁰ Es de interés aportar que en el presente estudio, ambos protocolos de tratamiento redujeron significativamente los BEGN y el *A. actinomycetemcomitans* a niveles indetectables, después de tres y seis meses. Esta observación es consistente con los hallazgos descritos por Slots y colaboradores,¹⁰ y Guentsch y colaboradores,⁴ quienes encontraron que los BEGN y el *A. actinomycetemcomitans* se redujeron a niveles indetectables después de usar ciprofloxacina adjunta y MOX respectivamente. Como se observó en estudios previos,^{1, 4-6} para *P. gingivalis* y *T. forsythia* se detectó un leve incremento después de tres meses.

It is important to note that colonies of GNER are bigger in size¹⁹ indicating that these organisms could colonize the periodontal pockets in high proportions. On the other hand, polymerase chain reaction (PCR) detection does not take into consideration whether the sample is viable, and thus may yield a higher frequency.¹⁹ D'Ercole et al³¹ recently compared conventional culture methods and multiplex PCR for the detection of periodontopathogenic bacteria and observed that for both methods, there was a good degree of accuracy in the determination of *A. actinomycetemcomitans* and *P. gingivalis*. Similar results were obtained for *T. forsythia*.³² Both culture and PCR techniques introduced many methodological problems when applied in oral microbiology, but the ideal technique for accurate detection of pathogens in subgingival plaque samples has yet to be developed.³¹ As with Botero et al,¹⁹ the present study reports on the occurrence of the microorganisms detected based on culture techniques because it allows us later to work with the cultured microorganisms. Further studies are required in order to clarify the effect of GNER on clinical parameters and response to periodontal treatment.

In agreement with the clinical results, the two groups presented favorable changes in the subgingival microbial profile after treatment. This observation was consistent with several studies,^{1, 4, 6} where a diminution in occurrence of the test species was significantly associated with an improvement in CAL and a decrease in PD. The most marked decrease in prevalence occurred between the baseline visit and the three months sampling. These results are in agreement with other studies that also demonstrated the adjunctive effects of these antibiotics, in reducing red complex species^{1, 4-6} and GNER.¹⁰ Interestingly, in the current study, both adjunctive antibiotic protocols reduced subgingival GNER and *A. actinomycetemcomitans* to undetectable levels, after three and six months. This observation is consistent with the findings described by Slots et al¹⁰ and Guentsch et al,⁴ who found out that GNER and *A. actinomycetemcomitans* were reduced to undetectable levels after adjunctive ciprofloxacin and MOX respectively. As it was observed in previous studies,^{1, 4-6} for *P. gingivalis* and *T. forsythia* a slight rebound was detected after three months.

Los sujetos tratados en la presente investigación mostraron buena respuesta clínica, sugiriendo que la disminución en el recuento de periodontopatógenos y BEGN puede ser crucial para una terapia periodontal exitosa y estabilidad a largo plazo.^{5, 10} El seguimiento longitudinal de estos sujetos ayudará a clarificar esta hipótesis.

Los BEGN y periodontopatógenos investigados fueron altamente sensibles a las fluoro-quinolonas ciprofloxacina y moxifloxacina.^{20, 22} Las concentraciones de ciprofloxacina observadas en el fluido crevicular son aproximadamente de 2,5 µg/ml y son varias veces más elevadas que los niveles encontrados normalmente en el plasma.³³ Esto puede deberse al incremento de las quinolonas en los granulocitos polimorfonucleares.³³ En dosis terapéuticas, el medicamento aparece en la saliva a los mismos niveles logrados en el suero.³³ Su baja actividad contra anaerobios Gram negativos limita frecuentemente su uso en periodoncia a combinaciones con metronidazol.¹⁰ En contraste, la nueva 8-methoxy quinolona moxifloxacina tiene efectiva acción antimicrobiana contra anaerobios Gram negativos y Gram positivos.^{20, 22} Müller y colaboradores.³⁴ demostraron que todas las cepas de *A. actinomycetemcomitans* fueron sensibles a moxifloxacina a 0,032 µg/ml. Las concentraciones en saliva y plasma reflejan estrechamente las concentraciones equivalentes en el plasma venoso, sin embargo sobrepasan los niveles plasmáticos.³³ Las quinolonas son reconocidas por su modulación en la respuesta inmune, permitiendo la exterminación del *A. actinomycetemcomitans* por parte de los leucocitos polimorfonucleares.³⁵

Eventos adversos

Diez sujetos (26,3%) del grupo CIPRO + MET reportaron eventos adversos durante el estudio. Estos resultados están de acuerdo con una revisión sistemática² que evaluó los efectos de los antibióticos administrados sistémicamente, sugiriendo que el 39% de los sujetos en el grupo experimental presentaron diarrea cuando se indicaba metronidazol solo o combinado. Además, la ciprofloxacina se ha asociado con raros pero importantes eventos adversos clínicos en pacientes con daño en la función renal³⁶ y en los Estados Unidos se han reportado varios casos de "Torsades de Pointes".³⁷ Por el contrario, los sujetos del grupo MOX no reportaron eventos adversos durante esta investigación, corroborando los resultados de Guentsch y colaboradores.⁴

The treated subjects in the current study exhibited a good clinical response, suggesting that a rapid decrease in subgingival counts of periodontopathogens and GNER may be crucial for successful periodontal therapy and long-term periodontal stability.^{5, 10} The longitudinal follow-up of these subjects will help to clarify this hypothesis.

The present GNER and periodontopathogens investigated were highly susceptible to the fluoro-quinolones ciprofloxacin and moxifloxacin.^{20, 22} Observed concentrations of ciprofloxacin in gingival crevicular fluid of about 2.5 µg/mL are many times more elevated than levels normally obtained in plasma.³³ This may be due to improvement of quinolones in polymorphonuclear granulocytes.³³ In therapeutic doses, the drug appears in saliva at or lower than levels achieved in serum.³³ Its low activity against Gram-negative anaerobes usually limits its use in periodontics to combinations with metronidazole.¹⁰ In contrast, the novel 8-methoxy quinolone moxifloxacin has effective antimicrobial action against both Gram-negative and Gram-positive anaerobes.^{20, 22} Müller et al³⁴ showed that all tested strains of *A. actinomycetemcomitans* were susceptible to moxifloxacin at 0.032 µg/mL. Concentrations in saliva and capillary plasma narrowly reflect equivalent concentrations in venous plasma, but primarily surpass plasma levels.³³ Quinolones are recognized for their modulation of the immune reaction, permitting the *in vitro* extermination of *A. actinomycetemcomitans* by polymorphonuclear leukocytes.³⁵

Adverse events

Ten subjects (26.3%) from the CIPRO+MET group reported adverse events during the study. These results are in agreement with a systematic review² evaluating the effects of systemically administered antibiotics which suggested that 39% of subjects in the test group exhibited diarrhea when provided with metronidazole alone or combined. Moreover, ciprofloxacin has been associated with rare but clinically important adverse events in patients with impaired renal function³⁶ and various cases of "Torsades de Pointes" have been reported in the United States.³⁷ Conversely, subjects from the MOX group did not report adverse events during this investigation, corroborating the results of Guentsch et al.⁴

Además de las actividades antimicrobianas, también se han estudiado las propiedades de la moxifloxacina, que tiene excelente biocompatibilidad, larga vida media y buena penetración tisular.³⁸ Igualmente, tiene excelente tolerancia.⁴ Sus propiedades farmacocinéticas permiten una sola dosis diaria. Esto reduce los costos y aumenta la adherencia del paciente.³⁹ Este es un factor importante, debido a que una incompleta adherencia a una prescripción antibiótica sistémica por 7 días se asoció con la disminución de los resultados clínicos en pacientes con periodontitis.⁴⁰

El presente estudio tuvo limitaciones. Fue un estudio aleatorizado, pero no controlado con placebo. Se consideró suministrar un placebo pero los diversos regímenes de dosis y la variedad de presentación de los antibióticos hacían muy complejo obtener un placebo estándar. Por lo tanto se decidió no usar placebo. Sin embargo, el examinador no fue consciente del grupo de tratamiento al cual se asignaron los sujetos. Situaciones similares se les presentaron a Haffajee y colaboradores⁶ y Guentsch y colaboradores⁴ en dos ensayos clínicos recientemente publicados. En el presente estudio no se utilizó otro grupo que incluyera solamente tratamiento mecánico. Distinguidos investigadores han recomendado la administración sistémica de antibióticos en pacientes con periodontitis crónica que presentan BEGN.^{10, 12-15} Además, dos revisiones sistemáticas han demostrado que el uso adjunto de antibióticos administrados sistémicamente proporcionan mejor resultado clínico, particularmente en términos de reducción de PS y ganancia de nivel de inserción clínica, que el RAR, no solamente en formas agresivas de periodontitis si no también en pacientes con periodontitis crónica.^{2,3} Finalmente, se reportó recientemente que la adición de agentes antimicrobianos a la terapia mecánica puede reducir la necesidad de un tratamiento posterior.¹ Por lo tanto, en el presente protocolo no se utilizó un grupo de solo tratamiento mecánico. A pesar de sus limitaciones, la decisión de incorporar MOX o CIPRO-MET adjunto al tratamiento mecánico se confirma por los resultados de la presente investigación.

Los actuales protocolos para el tratamiento antibiótico periodontal se basan en estudios microbiológicos hechos fuera de Latinoamérica.

In addition to antimicrobial activity studies, the properties of moxifloxacin have been studied, showing excellent bioavailability, long half-life and good tissue penetration of this drug.³⁸ Furthermore, it has an excellent tolerability.⁴ The pharmacokinetic properties allow a single dose treatment per day. This reduces costs and enhances the patient's compliance.³⁹ This is an important fact, because incomplete adherence to a 7-day adjunctive course of systemic antibiotics is associated with decreased clinical outcomes in subjects with periodontitis.⁴⁰

The current study did have limitations. It was a randomized study, but it was not placebo controlled. Supplying placebo tablets was considered, but with the diverse dosing regimes and the dissimilar variety of tablets/capsules implicated, composing a standard placebo offered some complexity. It was therefore decided not to use placebos. However, the examining clinician was unaware of the treatment group to which subjects were assigned. Similar situations were presented by Haffajee et al⁶ and Guentsch et al.⁴ in two recent clinical trials. Another group including only mechanical treatment was not included in the present study. The authors believe it is clear that the administration of systemic antibiotics during mechanical periodontal treatment is widely reported and accepted by distinguished researches during the treatment of patients with chronic periodontitis harboring GNER.^{10,12-15} Moreover, two systematic reviews showed that adjunctive use of systemically administered antibiotics provided a better clinical outcome, particularly in terms of PD reduction and attachment-level gain, than SRP, not only in aggressive forms of periodontitis but also in subjects with chronic periodontitis.^{2,3} Finally, it was recently reported that the addition of antimicrobial agents to thorough mechanical treatment may reduce the need for further treatment.¹ Therefore, a mechanical-treatment-only group was not used in the present protocol. Despite its limitations, a prospective decision to incorporate adjunctive MOX or CIPRO-MET as a treatment option is confirmed by the outcomes of the present study.

The current protocols for antibiotic treatment in periodontal therapy are based on microbiological studies conducted outside Latin American countries.

Consecuentemente la prevalencia de diferencias considerables en la composición de la flora subgingival en diversas poblaciones puede incrementar la posibilidad de desarrollar resistencia antibiótica o promover un sobrecrecimiento de organismos superinfectantes.⁴¹ La moxifloxacina ofrece diferentes ventajas sobre las fluoroquinolonas previamente disponibles incluyendo reducida posibilidad para promover el desarrollo de resistencia.¹¹ Aun cuando los datos publicados y la experiencia clínica con estos agentes es limitada, dado su reciente ingreso a nuestro mercado, esta perspectiva intenta proporcionar un entendimiento del papel potencial de la moxifloxacina en el tratamiento de pacientes con periodontitis crónica que presentan bacilos entéricos en placa subgingival.

CONCLUSIONES

Entre las limitaciones de este estudio, los resultados indican que los pacientes con periodontitis crónica que presentan bacilos entéricos Gram negativos en placa subgingival pueden beneficiarse de la administración sistémica de la moxifloxacina o ciprofloxacina más metronidazol como terapia antimicrobiana adjunta al tratamiento mecánico. Las dos estrategias resultaron en ganancia significativa del nivel de inserción clínica y disminución de la profundidad de sondaje periodontal. Este mismo patrón se observó para el SS. Se demostró la supresión de BEGN por debajo de niveles detectables por al menos 6 meses. Consecuentemente, el uso sistémico de moxifloxacina o ciprofloxacina más metronidazol adjunto a la terapia convencional puede ser una alternativa para el tratamiento de pacientes con periodontitis crónica. La selección del método de tratamiento se debe basar en la adherencia y la ausencia de efectos adversos potenciales.

CORRESPONDENCIA

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

Consequently, the prevalence of considerable differences in the composition of the subgingival flora in diverse geographical populations may increase the possibility of developing antibiotic resistance or promoting a subgingival overgrowth of superinfecting organisms.⁴¹ Moxifloxacin offers several advantages over the previously available fluoroquinolones including reduced propensity to promote the development of resistance.¹¹ Although the published data and clinical experience with these agents is limited, given their relatively recent entry into our market, this perspective attempts to provide an understanding of the potential role of moxifloxacin in the treatment of patients with chronic periodontitis harboring enteric rods in subgingival plaque.

CONCLUSIONS

Within the limitations of this study, the results indicate that patients with chronic periodontitis harboring subgingival Gram-negative enteric rods may benefit from systemic administration of moxifloxacin or ciprofloxacin plus metronidazole as an adjunctive antimicrobial therapy to periodontal mechanical treatment. Both treatment strategies resulted in significant gain of clinical attachment level and decrease in periodontal probing depth. The same pattern was observed for BOP. Suppression of GNER below detectable levels for at least 6 months was also demonstrated. Consequently, systemic use of moxifloxacin or ciprofloxacin plus metronidazole as an adjunct to conventional therapy may be an alternative for the treatment of patients with chronic periodontitis. The treatment method should be based on compliance and potential adverse effects.

CORRESPONDING AUTOR

Carlos M. Ardila
Calle 64 N.º 52-59 Medellín, Colombia.
Fax 057-4-2196760
e-mail: martinardila@gmail.com.

REFERENCIAS / REFERENCES

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

3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. 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.
7. Müller HP, Heinecke A, Borneff M, Kiencke C, Knopf A, Pohl S. Eradication of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* from the oral cavity in adult periodontitis. *J Periodontal Res* 1998; 33: 49-58.
8. Gupta A. Hospital-acquired infections in the neonatal intensive care unit-*Klebsiella pneumoniae*. *Semin Perinatol* 2002; 26: 340-345.
9. Slots J, Feik D, Rams TE. Age and sex relationships of superinfecting microorganisms in periodontitis patients. *Oral Microbiol Immunol* 1990; 5: 305-308.
10. Slots J, Feik D, Rams TE. Prevalence and antimicrobial susceptibility of Enterobacteriaceae, Pseudomonadaceae and Acinetobacter in human periodontitis. *Oral Microbiol Immunol* 1990; 5: 49-154.
11. 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.
12. 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.
13. Listgarten MA, Lai CH. Comparative microbiological characteristics of failing implants and periodontally diseased teeth. *J Periodontol* 1999; 70: 431-437.
14. 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.
15. Slots J, Rams TE, Listgarten MA. Yeasts, enteric rods and pseudomonads in the subgingival flora of severe adults periodontitis. *Oral Microbiol Immunol* 1988; 3:47-52.
16. 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.
17. of enteric rods and pseudomonads from advanced adult periodontitis. *Oral Microbiol Immunol* 1990; 5: 298-301.
18. 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.
19. 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.
20. 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.
21. 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.
22. Ardila CM, Granada MI, Guzmán IC. Antibiotic resistance of subgingival species in chronic periodontitis patients. *J Periodontal Res* 2010; 45: 557-563.
23. Araujo MW, Hovey KM, Benedek JR, 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.
24. Armitage GC. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol* 1999; 4: 1-6.
25. Möller AJ. Microbiological examination of root canals and periapical tissues of human teeth. *Methodological studies. Odontol Tidskr* 1966; 74 Supl: 1-380.
26. Slots J. Rapid identification of important periodontal microorganisms by cultivation. *Oral Microbiol Immunol* 1986; 1: 48-57.
27. Slots J, Reynolds HS. Long-wave UV light fluorescence for identification of black-pigmented *Bacteroides* spp. *J Clin Microbiol* 1982; 16: 1148-1151.
28. Al-Anazi KA, Al-Jasser AM, Al-Zahrani HA, Chaudhri N, Al-Mohareb FI. *Klebsiella oxytoca* bacteremia causing septic shock in recipients of hematopoietic stem cell transplant: Two case reports. *Cases J* 2008; 18: 160-163.
29. Herrera D, Contreras A, Gamonal J, Oteo A, Jaramillo A, Silva N, et al. Subgingival microbial profiles in chronic periodontitis patients from Chile, Colombia and Spain. *J Clin Periodontol* 2008; 35: 106-113.
30. Slots J, Rams TE, Feik D, Taveras HD, Gillespie GM. Subgingival microflora of advanced periodontitis in the Dominican Republic. *J Periodontol* 1991; 62: 543-547.
31. D'Ercole S, Catamo G, Tripodi D, Piccolomini R. Comparison of culture methods and multiplex PCR for the detection of periodontopathogenic bacteria in biofilm associated with severe forms of periodontitis. *New Microbiol* 2008; 31: 383-391.

32. Boutaga K, van Winkelhoff AJ, Vandenbroucke-Grauls CM, Savelkoul PH. Periodontal pathogens: a quantitative comparison of anaerobic culture and real-time PCR. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2005; 45: 191-199.
33. Conway TB, Beck FM, Walters JD. Gingival fluid ciprofloxacin levels at healthy and inflamed human periodontal sites. *J Periodontol* 2000; 71: 1448-1152.
34. Müller HP, Holderrieth S, Burkhardt U, Höffler U. *In vitro* antimicrobial susceptibility of oral strains of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* to seven antibiotics. *J Clin Periodontol* 2002; 29: 736-742.
35. Dalhoff A. Immunomodulatory activities of fluoroquinolones. *Infection* 2005; 33(Suppl. 2): 55-70.
36. Iannini PB. The safety profile of moxifloxacin and other fluoroquinolones in special patient populations. *Curr Med Res Opin* 2007; 23: 1403-1413.
37. Frothingham R. Rates of torsades de pointes associated with ciprofloxacin, ofloxacin, levofloxacin, gatifloxacin, and moxifloxacin. *Pharmacotherapy* 2001; 21: 1468-1472.
38. Cachovan G, Nergiz I, Thuss U et al. Penetration of moxifloxacin into rat mandibular bone and soft tissue. *Acta Odontol Scand* 2009; 67: 182-186.
39. Krasemann C, Meyer J, Tillotson G. Evaluation of the clinical microbiology profile of moxifloxacin. *Clin Infect Dis* 2001; 32 Supl 1: S51-63.
40. Guerrero A, Echeverría JJ, Tonetti MS. Incomplete adherence to an adjunctive systemic antibiotic regimen decreases clinical outcomes in generalized aggressive periodontitis patients: a pilot retrospective study. *J Clin Periodontol* 2007; 34: 897-902.
41. Pinheiro ET, Gomes BP, Drucker DB, Zaia AA, Ferraz CC, Souza-Filho FJ. Antimicrobial susceptibility of *Enterococcus faecalis* isolated from canals of root filled teeth with periapical lesions. *Int Endod J* 2004; 37: 756-763.