



**Departamento de Estomatología  
Facultad de Odontología  
Universidad de Granada**

**Antimicrobianos sistémicos en la periodontitis agresiva generalizada**

**Adrián Guerrero Segura**

**Tesis doctoral**

**Granada, 19 de diciembre de 2015**

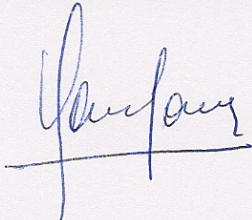
**Dirigida por: Prof. Dr. Maximino González-Jaranay Ruiz y  
Prof. Dr. Gerardo Moreu Burgos**

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales  
Autor: Adrián Guerrero Segura  
ISBN: 978-849125-630-4  
URI: <http://hdl.handle.net/10481/43329>

El doctorando D. Adrián Guerrero Segura y los directores de la tesis Profesor D. Maximino González-Jaranay Ruiz y Profesor D. Gerardo Moreu Burgos, garantizamos al firmar esta tesis doctoral, que el trabajo ha sido realizado por el doctorando bajo la dirección de los directores de la tesis y hasta donde nuestro conocimiento alcanza, en la realización del trabajo, se han respetado los derechos de otros autores a ser citados, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

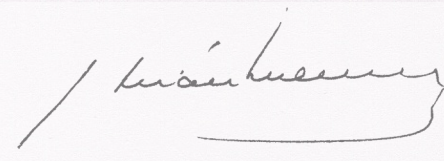
Granada 15 de Noviembre 2015.

Director/es de la Tesis

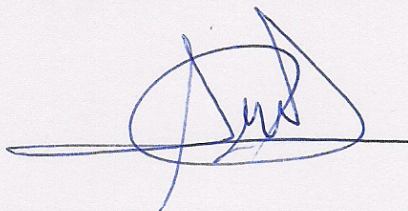


Fdo.: Maximino González-Jaranay Ruiz

Doctorando



Fdo.: Adrián Guerrero Segura



Fdo. Gerardo Moreu Burgos





*A Cristina, y a mis hijos Adrián, Nicolás y Antón.*



## **Agradecimientos**

Me gustaría expresar mis más sinceros agradecimientos a todo el equipo que ha estado involucrado en las diferentes fases de esta tesis doctoral sin cuya ayuda no se hubiera podido completar, aunque, especialmente, a mis dos directores: el Prof. Dr. Maximino Gonzalez-Jaranay y el Prof. Dr. Gerardo Moreu.

Así mismo, quiero expresar mi gratitud hacia mis mentores en Londres, el Prof. Dr. Maurizio Tonetti y el Prof. Dr. Gareth Griffiths. Además de a todo el grupo de investigación del Eastman: el Dr. Luigi Nibaili, la Dra. Jane Suvan, el Dr. David Moles, además de a todo el equipo auxiliar de la clínica que me ayudó a tratar a los pacientes de este estudio.

Al Prof. Dr. JJ Echeverría por ser mi mentor y mi mejor consejero en el mundo de la Periodoncia.

Al Prof. Dr. David Herrera por compartir conmigo su pasión por la investigación y por servirme de inspiración para completar esta tesis doctoral.

A mi querida mujer Cristina y a mis adorables 3 hijos, que han dejado de pasar muchas horas conmigo por mi dedicación a este proyecto.

Por último, a mi padre, Eloy, compañero de profesión y ejemplo de tenacidad, ilusión y pasión por la odontología, por su apoyo incondicional.





## **Índice de contenidos**

**I. Resumen.**

**II. Resumen en inglés.**

**III Introducción.**

**IV. Revisión de la literatura.**

**V. Justificación.**

**VI. Hipótesis.**

**VII. Objetivos.**

**VIII. Beneficio potencial del proyecto.**

**IX. Material y Métodos**

**X Resultados.**

**XI. Discusión.**

**XI. Conclusiones.**

**XII. Bibliografía.**

**XIII. Anexo**

Estudio 1. *Adjunctive benefits of systemic amoxicillin and metronidazole in non-surgical treatment of generalized aggressive periodontitis: a randomized placebo-controlled clinical trial.*

Estudio 2. *Amoxicillin and metronidazole as an adjunctive treatment in generalized aggressive periodontitis at initial therapy or re-treatment: a randomized controlled clinical trial*

Estudio 3. *Impact of baseline microbiological status on clinical outcomes in generalized aggressive periodontitis patients treated with or without adjunctive amoxicillin and metronidazole: an exploratory analysis from a randomized controlled clinical trial*



## **Antimicrobianos sistémicos en la periodontitis agresiva generalizada**

La presente tesis se basa en los siguientes estudios clínicos:

**Artículo original 1:** Guerrero A, Griffiths GS, Nibali L, Suvan J, Moles DR, Laurell L, Tonetti MS. Adjunctive benefits of systemic amoxicillin and metronidazole in non-surgical treatment of generalized aggressive periodontitis: a randomized placebo controlled clinical trial. *J Clin Periodontol* 2005; 32: 1096–1107.

**Artículo original 2:** Griffiths GS, Ayob R, Guerrero A, Nibali L, Suvan J, Moles DR, Tonetti MS. Amoxicillin and metronidazole as an adjunctive treatment in generalized aggressive periodontitis at initial therapy or re-treatment: a randomized controlled clinical trial. *J Clin Periodontol* 2011; 38:43-49.

**Artículo original 3:** Guerrero A, Nibali L, Lambertenghi R, Ready D, Suvan J, Griffiths GS, Wilson M, Tonetti MS. Impact of baseline microbiological status on clinical outcomes in generalized aggressive periodontitis patients treated with or without adjunctive amoxicillin and metronidazole: an exploratory analysis from a randomized controlled clinical trial. *J Clin Periodontol* 2014; 41: 1080–1089.





## I. Resumen

Los antimicrobianos sistémicos se han usado durante la fase no quirúrgica del tratamiento de la periodontitis agresiva generalizada con la intención de mejorar los resultados clínicos, sin embargo, hasta hace poco, no existía suficiente evidencia científica que demostrara sus beneficios clínicos reales.

Este proyecto fue diseñado con el objetivo de determinar el efecto clínico coadyuvante, de la administración sistémica de amoxicilina y metronidazol, durante el tratamiento no-quirúrgico, en pacientes con periodontitis agresiva generalizada. Para ello, 41 pacientes sin enfermedades sistémicas y con periodontitis agresiva generalizada fueron incluidos en un estudio clínico aleatorizado a doble ciego (**Estudio 1**) controlado mediante placebo y con un seguimiento de 6 meses, en el que se determinaron los beneficios clínicos adicionales del tratamiento antimicrobiano. Posteriormente, sobre la misma muestra de sujetos, en un segundo estudio (**Estudio 2**), se realizó un retratamiento no quirúrgico de las bolsas residuales junto con la administración de amoxicilina y metronidazol a los pacientes del grupo placebo del estudio 1, con el objetivo de realizar un seguimiento adicional de 2 meses (8 meses desde el inicio del estudio 1) y así determinar el momento de máximo beneficio de la administración de la medicación. Además se exploró qué efecto tenía tanto el perfil microbiológico inicial (**Estudio 3**) como la adherencia al régimen de antimicrobianos prescrito (**Estudio 4**) sobre los resultados clínicos.

Tras el análisis de los datos se demostró que:

- Un tratamiento antibiótico sistémico coadyuvante, de 7 días de duración, con metronidazol y amoxicilina, mejoraba, significativamente, los resultados clínicos a corto plazo (6 meses) del desbridamiento periodontal no-quirúrgico. (**Estudio 1**)
- Los pacientes que recibieron antimicrobianos al inicio del estudio demostraron beneficios estadísticamente significativos en comparación con los que recibieron el antibiótico como parte del retratamiento. (**Estudio 2**)
- Todos los pacientes del grupo test se beneficiaron del régimen antimicrobiano coadyuvante estudiado, aunque los sujetos que albergaron

*A. actinomycetemcomitans* al inicio del estudio podrían obtener mayores beneficios clínicos en comparación a los que no lo albergaron (**Estudio 3**)

- La adherencia incompleta a este tratamiento antimicrobiano estaba asociada a una disminución de los resultados clínicos. (**Estudio 4**)

## II. Abstract in english

Systemic antimicrobials have been used during the non-surgical phase of periodontal treatment of generalized aggressive periodontitis with the intention to improve the clinical outcomes of therapy, however, until recently, there was insufficient scientific evidence to determine their real clinical benefits.

This project was designed with the aim of determining the adjunctive clinical effect of systemic amoxicillin and metronidazole, during the non-surgical periodontal therapy of generalized aggressive periodontitis. Therefore, 41 otherwise healthy subjects diagnosed with generalized aggressive periodontitis were included in a randomized placebo-controlled clinical trial (Study 1) with a follow-up of 6 months. The additional clinical benefits of the antimicrobial therapy were then determined. Later, on the same sample of subjects, a non-surgical retreatment (study 2) with adjunctive amoxicillin and metronidazole was indicated in the placebo group of Study 1. This study 2 was conducted with the objective of performing additional monitoring of two months (8 months from the start of the study 1) and with the aim to determine the moment of maximum benefit of medication. Additionally, the effect of the initial microbiological profile (Study 3) on clinical outcomes was explored.

The data showed that:

- An adjunctive systemic antibiotic treatment of 7 days, with metronidazole and amoxicillin, improved, significantly, the clinical results in the short term (6 months) outcomes of non-surgical periodontal debridement. (Study 1)
- Patients receiving antimicrobial at baseline showed statistically significant benefits compared to those who received the antibiotic as part of the retreat. (Study 2)
- All patients in the test group benefited from adjunctive antimicrobial régime, although subjects who harbored *A. actinomycetemcomitans* at baseline may show greater clinical benefits compared to those who do not harbored it (Study 3)





### **III. Introducción.**

La periodontitis es una infección crónica que afecta a los tejidos de soporte del diente. Aunque el factor etiológico primario es el bacteriano (bacterias anaerobias gram negativas), se trata de una enfermedad multifactorial que se presenta en individuos susceptibles. Se manifiesta clínicamente mediante la destrucción de los diferentes componentes del periodonto (epitelio de unión, ligamento periodontal, cemento radicular y hueso alveolar) dando lugar a la llamada pérdida de inserción clínica. No todas las periodontitis son iguales y sus diferentes formas de presentación se han descrito en una reciente nueva clasificación. Una de ellas, las periodontitis agresivas, afectan a adultos jóvenes que experimentan un grado de severidad avanzada a una edad temprana. Actualmente se considera que el tratamiento periodontal mecánico (raspado y alisado radicular o cirugía periodontal) dirigido a controlar la infección, es menos eficaz en las periodontitis agresivas debido a que los patógenos periodontales principales involucrados en este tipo de periodontitis poseen una serie de características que dificultan su eliminación/reducción. Los estudios clínicos realizados en pacientes con periodontitis agresivas indican que el tratamiento periodontal mecánico consigue la resolución de un número limitado de lesiones periodontales y que muchas localizaciones no responden a este tratamiento en contraposición a estudios similares realizados en pacientes con otro tipo de periodontitis (periodontitis crónica). Asimismo, algunos estudios microbiológicos han demostrado que la persistencia de bolsas periodontales tras el tratamiento periodontal mecánico está relacionada con la presencia de determinadas bacterias resistentes a este tratamiento, y que la posterior eliminación de éstas, mediante agentes antimicrobianos, se acompañaba de un resultado clínico favorable. Por este motivo, el uso de antibióticos por vía sistémica se ha considerado como una terapia coadyuvante al tratamiento periodontal mecánico. Sin embargo, en el momento en el que se diseñó el primero de nuestros estudios (Guerrero et al. 2005), existían muy pocos estudios clínicos controlados. Ese hecho constituyó la principal motivación para iniciar la serie de estudios que se presentan en esta tesis. A lo largo de esta última década, el estudio mencionado, ha sido referenciado en

múltiples ensayos clínicos posteriores y en varias revisiones sistemáticas como una aportación muy significativa en la determinación del papel que juegan los antibióticos sistémicos en el manejo clínico de los pacientes con periodontitis agresivas generalizadas. A pesar de ello, todavía la información disponible es limitada en relación a los factores que influyen sobre la variabilidad de los resultados clínicos observados en pacientes con periodontitis.

Para adquirir una visión amplia sobre el objetivo de esta tesis, en las siguientes páginas se tratará de revisar la literatura relacionada con:

- la evolución histórica del concepto de periodontitis
- la clasificación de la periodontitis agresiva, así como su epidemiología y etiología.
- las distintas opciones de tratamiento de las periodontitis agresivas.

## **VI. Revisión de la literatura:**

### **Evolución histórica del tratamiento periodontal**

El padre de la periodoncia americana, Bunting, ya en 1828 (Alldritt 1969) dijo que “la piorrea era una enfermedad que podía prevenirse y, en la mayoría de los casos, controlarse de una forma simple y racional”. Aunque este autor preconizó el tratamiento periodontal mecánico (raspado y alisado radicular) como una parte fundamental para conseguir la salud periodontal, la comunidad profesional de aquella época no lo aceptó como un tratamiento suficientemente eficaz.

Al mismo tiempo, Waerhaug en 1950 (Gottsegen 1980), fue el primer europeo que intentó enfocar el tratamiento de la periodontitis desde un punto de vista científico tras observar que los procesos inflamatorios que acontecían tanto en el tejido blando como en el hueso de soporte del diente tenía su origen en la superficie del diente. Es decir, determinó que “la causa de la enfermedad periodontal estaba en la superficie radicular” y que por la tanto, si no había diente, tampoco podría haber enfermedad. En ese sentido, fue el primer autor que sugirió la existencia de la placa bacteriana y el cálculo dental como factores etiológicos primarios en las enfermedades periodontales.

Desde entonces, se desarrollaron una serie de estudios epidemiológicos y experimentales con el objetivo de esclarecer el papel de estos agentes etiológicos. De igual forma, también se diseñaron algunos estudios clínicos que consiguieron aplicar los conceptos desarrollados durante los estudios epidemiológicos y experimentales.

De estos primeros estudios, 2 de ellos se consideraron muy relevantes para la práctica clínica del momento.

En el estudio clínico de Harold Loe (1965) se indujo una gingivitis experimental en estudiantes de odontología que presentaban un periodonto compatible con la salud. Los participantes del estudio debían dejar de aplicar cualquier método de higiene oral durante un periodo observacional de 21 días. Tras la evaluación del día 21, el 100% de los sujetos desarrollaron una gingivitis. En ese punto, el estudio demostró que el acumulo de placa bacteriana en pacientes

periodontalmente sanos se tradujo en la aparición de inflamación gingival. Ahora bien, la segunda parte del estudio demostró que la eliminación profesional de placa bacteriana junto a la instauración de las medidas de higiene oral por parte de los sujetos devolvió, la salud periodontal a todos los participantes. Es decir, la segunda parte del estudio aclaró que la eliminación del agente etiológico estaba relacionada con la resolución de la inflamación. Los resultados fueron igualmente analizados desde el punto de vista microbiológico (Theilade et al. 1966) Curiosamente, este sencillo estudio es la base científica del tratamiento periodontal actual.

Sin embargo este estudio solo pudo valorar el efecto del acúmulo de placa durante 21 días. Debido a motivos éticos relacionados con la experimentación con humanos, no se ha podido diseñar un estudio similar para determinar el papel del acúmulo de placa bacteriana a largo plazo y su impacto en la pérdida de soporte más allá de la gingivitis, sin embargo, un modelo animal se podría considerar como una alternativa en estas situaciones. En ese sentido, el estudio experimental en animales de Lindhe et al (Lindhe et al. 1973) demostró que tras 48 meses del acúmulo de placa, en el grupo de perros que no recibieron medidas de higiene oral, hubo pérdida de inserción con formación de bolsas periodontales alrededor de los dientes, en contraposición al grupo donde se mantuvo una boca libre de placa bacteriana.

El resumen, estos 2 estudios nos indican que si la placa bacteriana se acumula durante 21 días se produce una gingivitis que, si no se trata a largo plazo, (48 meses) se puede convertir en una periodontitis.

### **Hipótesis de placa bacteriana no específica vs. hipótesis de la placa bacteriana específica**

A raíz de estos estudios Loe estableció la hipótesis de la placa no específica cuyo principio se basaba en que toda la placa bacteriana era igualmente nociva. Esta hipótesis se mantuvo vigente entre 1965 y 1975 (Loe 1993) en la comunidad

periodontal internacional. A raíz de este planteamiento, el tratamiento del paciente se basaba en la eliminación de la totalidad de la placa bacteriana.

Pero entre 1975 y 1985 surgió otra hipótesis relacionada con la presencia de una placa específica (Loesche 1992). Los estudios microbiológicos de Newman y Socransky (Socransky & Haffajee 1994) demostraron que la placa bacteriana estaba compuesta por distintas especies bacterianas, algunas de las cuales poseían potencial patógeno mientras que otras eran beneficiosas para los sujetos. En definitiva, se concluyó que había una placa beneficiosa y otra placa perjudicial. A raíz de esos hallazgos, se definieron los “complejos bacterianos” que agrupaban a las diferentes especies bacterianas en base a distintos colores (Socransky et al. 1998. JCP “Microbial complexes in subgingival plaque”). Las bacterias más representativas de la placa patógena fueron los *Aggregatibacter Actynomycetemcomitans*, las *Porphyromonas gingivalis* y las *Prevotella intermedium*. mientras que las especies *Actinomyces* eran las principales representantes de la placa beneficiosa compatible con la salud periodontal (Haffajee & Socransky 1994). A partir de aquí surgió un enfoque terapéutico diferente: el uso de los antibióticos tanto por vía sistémica (Slots & Van Winkelhoff 1993) como por vía local (Tonetti 2002) con el objetivo de suprimir, de forma selectiva, los agentes etiológicos principales.

Sin embargo, aunque el conocimiento de los procesos patológicos mejoró de forma significativa, no todos los pacientes, tratados con o sin antibióticos, respondían de forma satisfactoria al tratamiento realizado. Hoy en día se sabe que existen una serie de factores moduladores, independientemente de la calidad de la placa bacteriana, que influyen de una manera directa tanto en la aparición precoz de una periodontitis, en la velocidad de progresión de ésta como en la capacidad de respuesta al tratamiento periodontal. Estos factores moduladores son los llamados “factores de riesgo” (Machtei et al. 1997). Los principales factores de riesgo actualmente conocidos son: la predisposición genética, el hábito de fumar (Machtei et al. 1997), el stress (Grossi 2000) y las enfermedades sistémicas que influyen sobre los procesos inmunológicos, sobre todo la diabetes (Soskolne & Klinger 2001). Por eso, a finales de los años 90 se consideró a la periodontitis como una enfermedad oportunista (Hart & Kornman 1997; Kornman et al. 2000)

en la que no solamente era necesaria la presencia del agente etiológico primario (placa bacteriana) para que esta se desarrolle, sino que también debe existir un hospedador susceptible expuesto a un ambiente propenso para la enfermedad.

Tras lo expuesto con anterioridad, hoy en día se sabe que las bacterias presentes en la cavidad oral se encuentran organizadas en comunidades polimicrobianas en forma de biofilms (Costerton JW 1984) y que su interacción con el hospedador no solo se produce con el objetivo de ocupar un nicho ecológico, sino que también sirven de gran ayuda para la realización de una correcta función protectora y de desarrollo (Robertson & Darveau 2015 Perio 2000) llamada simbiosis. Por el contrario, la alteración de las comunidades polimicrobianas simbióticas darán lugar a una disbiosis o cambio bacteriano, que junto a cambios en el hospedador y la presencia de factores de riesgo, pueden desembocar en una periodontitis.

Las periodontitis agresivas, en comparación con las periodontitis crónicas (REF perio 2000, 2010), son procesos destructivos que ocurren de manera rápida en pacientes jóvenes con antecedentes familiares de la enfermedad. A continuación se presentarán las características clínicas de las periodontitis agresivas, así como

### **Periodontitis agresiva:**

#### **Clasificación.**

La clasificación internacional de 1999 ha introducido una nueva terminología para denominar a las diferentes formas clínicas de periodontitis. (Armitage 1999)

Al margen de las patologías gingivales, abscesos periodontales, periodontitis relacionadas con enfermedades sistémicas y las enfermedades periodontales necrotizantes, el principal hecho diferenciador de esta clasificación con relación a las anteriores, ha sido la definición dos únicos tipos de enfermedad periodontal: periodontitis crónica y periodontitis agresiva.

De acuerdo a la nueva clasificación la periodontitis crónica sustituye al antiguo término “periodontitis del adulto” (AAP 1989) y se trata de aquellos casos en los

que existen muchos factores locales específicos que facilitan el acumulo de placa bacteriana y donde la enfermedad suele desarrollarse mediante una progresión lenta a lo largo del tiempo. Por el contrario, las periodontitis agresivas, que sustituyen a las antiguamente llamadas “peridontitis de aparición precoz” (AAP 1989; Tonetti & Mombelli 1999) agrupan a aquellos casos que se caracterizan por una pérdida rápida de hueso de soporte e inserción periodontal, que han referido antecedentes familiares de periodontitis y que se trata de pacientes sistemicamente sanos excepto por la presencia de una periodontitis. Asimismo, una de las características secundarias de estos pacientes se sustenta sobre una base microbiológica: la presencia de proporciones elevadas de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*A.a*) y de *Porphyromonas gingivalis* (*P.g.*) en algunas poblaciones específicas.

Además las periodontitis agresivas se subdividen en 2 grupos en función del grado de extensión de éstas y otras características:

1. Forma Generalizada:

- Pérdida de inserción avanzada a nivel interproximal en 3 o más dientes al margen de los primeros molares e incisivos.
- Afectación de pacientes menores de 30 años aunque algunos de ellos podrían ser de mayor edad.
- Destrucción de hueso de soporte y pérdida de inserción de pronunciada naturaleza episódica.
- Pobre respuesta sérica de anticuerpos frente a la presencia de agentes infecciosos.

2. Forma localizada:

- Pérdida de inserción avanzada a nivel interproximal localizada en los primeros molares o incisivos y que no afecta a más de 2 dientes al margen de los primeros molares e incisivos.
- Aparición durante la pubertad
- Buena respuesta sérica de anticuerpos frente a la presencia de agentes infecciosos.

## **Epidemiología.**

La destrucción periodontal ocurre normalmente en pacientes adultos (periodontitis crónica). Algunos estudios epidemiológicos han demostrado que, en países desarrollados, hasta un 43% de la población adulta presenta una pérdida de inserción clínica  $\geq 4\text{mm}$  en 1 o varios dientes (Treasure et al. 2001). Esta pérdida de soporte representa aproximadamente un tercio del soporte periodontal de un diente y, en principio, podría comprometer la estabilidad de dicha pieza a lo largo del tiempo.

Ahora bien, la periodontitis agresiva existe en porcentajes mucho menores de la población, sin embargo, su presencia representa un mayor problema para los pacientes que la sufren debido a que puede llevar a la pérdida total de la dentición en un periodo de tiempo corto. La extensión total de este problema es desconocida, pero un estudio epidemiológico realizado en pacientes de entre 17 y 32 años de edad (Bial & Mellonig 1987) presentó una prevalencia de 0.4 %.

Por otro lado, un estudio observacional realizado por Loe et al. (1986) demostró que en una población de plantadores de tea en Sri Lanka que nunca realizaron medidas de higiene oral, un 12% de ellos perdió todas las piezas dentarias antes de los 40 años de edad, por lo que se podría asumir que, aparentemente, existe un grupo reducido de la población con gran predisposición a la enfermedad periodontal agresiva. Aunque también ha sido valorado el efecto de la raza sobre la prevalencia de la periodontitis agresiva y se ha demostrado que existe una marcada influencia del grupo étnico al que pertenece el paciente (Saxby 1987), en ese sentido, la raza negra muestra una mayor predilección en comparación al resto de las razas.

## **Etiología:**

Como ya se ha comentado con anterioridad, la periodontitis es considerada un enfermedad multifactorial aunque el agente etiológico primario es el bacteriano (Haffajee & Socransky 1994; Socransky & Haffajee 1994).



Diversos microorganismos se han detectado en las lesiones periodontales de estos pacientes. Sin embargo, los microorganismos más frecuentemente detectados en periodontitis agresivas generalizadas incluyen *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, y *Tannerella forsythensis* (Zambon 1996). Aunque, de estos 3 microorganismos citados con anterioridad, existe una relación clara y consistente del *Actinobacillus actinomicetemcomitans* como agente etiológico primario (Zambon 1985). Según Tonetti & Mombelli (1999), el *A. actinomycetemcomitans* se encuentra en proporciones elevadas en el 90% de lesiones de pacientes con periodontitis agresiva localizada, sin que se detecte en localizaciones adyacentes periodontalmente sanas. Asimismo un elevado porcentaje de estos pacientes presentan títulos elevados de anticuerpos a *A. actinomycetemcomitans*, sin que se detecten niveles altos en pacientes con otro tipo de enfermedad periodontal. Además, los *A. actinomicetemcomitans* son capaces de secretar una serie de factores virulentos responsables de las lesiones que se observan en estos pacientes, y se ha demostrado que la secreción de una leucotoxina responsable de la lisis de polimorfonucleares neutrófilos (Haraszthy et al. 2000), actúa como una potente endotoxina capaz de producir reabsorción ósea e inhibir el crecimiento y la proliferación de los fibroblastos (Slots et al. 1982)

Sin embargo, aunque existe una tendencia a presentar las 3 bacterias principales anteriormente comentadas, la microbiota periodontal no siempre es consistente entre los diferentes pacientes a pesar de que éstos estén clasificados dentro del mismo grupo de patologías y, entre otros factores, tanto el grupo étnico al que pertenece cada individuo (factores genéticos) como la exposición a determinados factores de riesgo (tabaco) tienen un impacto directo sobre la cantidad y el tipo de bacterias que se observan en las lesiones periodontales (Umeda et al. 1998).

### **Revisión ferres nuevas técnicas de cultivo. Pag 132**

Determinados factores genéticos, como las alteraciones en la quimiotaxis de los polimorfonucleares, han demostrado su efecto a nivel de la modulación de la respuesta inmunológica ante la infección bacteriana. Recientemente se han descubierto determinados polimorfismos genéticos que distinguen a los pacientes con periodontitis agresiva de pacientes sanos o con periodontitis crónica (Quappe

et al. 2004). Estos hallazgos sugieren que estos pacientes presentan una alta susceptibilidad a la enfermedad periodontal como consecuencia de la existencia de una baja tolerancia a la presencia de bacterias.

En conclusion, tanto el inicio de la enfermedad periodontal como el progreso de ésta acontecen desde el momento en que los agentes etiológicos primarios (bacterias patógenas) expresan un grado de virulencia concreto que sobrepasa la capacidad inmunologica del sujeto (Darveau et al. 1997).

## **Tratamiento**

En estos últimos años se han aplicado dos conceptos de tratamiento periodontal con el objetivo de mejorar los resultados de éste: realizar el tratamiento en menos de 24 horas (la llamada “desinfección bucal total”) (Quirynen et al. 1995) y el uso de antibióticos por vía sistémica. Nosotros vamos a aplicar ambos conceptos en el tratamiento de los sujetos que participarán en nuestro ensayo clínico.

El tratamiento periodontal de las periodontitis agresivas pretende conseguir la eliminación de los 3 patógenos periodontales principales (Zambon 1996) *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, and *Tannerella forsythensis* (Sakamoto et al. 2002) hasta el punto en el que el grado de eliminación sea compatible con la salud periodontal.

Muchas de las situaciones clínicas, sobre todo las encontradas en dientes uniradiculares, son tratables mediante tratamiento no quirúrgico solamente (Cobb 1996), sin embargo otras de estas situaciones dan lugar a una respuesta desfavorable tras la realización del tratamiento periodontal convencional. La presencia de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (A.a.) en las bolsas periodontales profundas es considerada un gran condicionante de la cicatrización periodontal, en el sentido de que se ha demostrado que estas bacterias son resistentes al tratamiento mecánico, ya sea mediante tratamiento no-quirúrgico o mediante la cirugía periodontal (Renvert et al. 1990b; Renvert et al. 1990a). La falta de respuesta se ha intentado explicar debido a la habilidad que posee la

bacteria *A.a.* para invadir los tejidos gingivales profundos (Christersson et al. 1987) o incluso el tejido duro de la superficie radicular (túbulos dentinarios) (Adriaens et al. 1988).

Tal y como se ha comentado anteriormente, las periodontitis agresivas son enfermedades en las que se pueden encontrar altas proporciones de *A.a.* e incluso de *P.g.* en algunas poblaciones. Asimismo, la persistencia *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, and *Tanarella forsythensis* también se ha identificado como un factor de riesgo para seguir perdiendo soporte a lo largo del tiempo (Grossi et al. 1994). Por lo tanto, con el objetivo de reducir o eliminar estas bacterias de las lesiones periodontales profundas se han usado diferentes tipos de agentes antimicrobianos por vía sistémica como medicación coadyuvante al tratamiento periodontal (Van Winkelhoff & Winkel 1997;Christersson et al. 1985;Slots & Ting 2002). Sin embargo, debido a la complejidad de la microbiota periodontal subgingival de estos pacientes y a la posible existencia de resistencias antibióticas que podrían condicionar la eficacia clínica de un tratamiento antibiótico único, también se han considerado el uso de diferentes combinaciones de antibióticos (Herrera et al. 2002;Haffajee et al. 2003). El uso de la combinación de amoxicilina y metronidazol ha ido ganado popularidad por su amplio espectro de acción tras ser originalmente propuesta por Van Winkelhoff et al. (1989). En el este estudio pionero se trataron a 22 pacientes con problemas periodontales diagnosticados preoperatoriamente con infección subgingival por *A. actinomycetemcomitans*. Todos los pacientes fueron tratados mediante instrumentación subgingival junto al uso coadyuvante de amoxicilina y metronidazol. Tras el periodo de reevaluación (3 meses) solo 1 de los pacientes seguía siendo positivo a la presencia subgingival de *A. actinomycetemcomitans* y en el resto de los pacientes los parámetros clínicos (Profundidad de bolsa al sondaje y sangrado al sondaje) mejoraron de forma significativa.

Asímismo, la eficacia de esta combinación antibiótica fue evaluada *in vitro* (Pavicic et al. 1991;Pavicic et al. 1994b) para demostrar que existe un efecto sinérgico de la amoxicilina sobre el metronidazol y su hidroximetabolito en contra de la *A. actinomycetemcomitans*. Además, el mismo grupo de trabajo ha

demostrado que pacientes con periodontitis crónica y que presentaban *Porphyromonas gingivalis* subgingivales preoperatoriamente, se beneficiaban notablemente de la terapia antibiótica combinada coadyuvante al tratamiento periodontal no-quirúrgico. (Winkel et al. 2001). Por otro lado, otros autores han mostrado mejorías clínicas y microbiológicas en pacientes con periodontitis crónica tratados en el ámbito de un ensayo aleatorio controlado en el que se examinaba el beneficio adicional de la combinación de antibióticos. (Berglundh et al. 1998; Flemmig et al. 1998; Winkel et al. 2001; Rooney et al. 2002). A su vez, también se han presentado buenos resultados clínicos a largo plazo en pacientes con periodontitis agresiva generalizada (Winkel et al. 1998; Van Winkelhoff et al. 1992; Pavicic et al. 1994a; Buchmann et al. 2002) tratados mediante el mismo concepto de tratamiento (instrumentación mecánica y Amoxicilina más metronidazol) pero, desafortunadamente, la falta de un grupo control no nos permitía cuantificar el beneficio adicional real en el momento en el que concibió el estudio 1. Hasta el año 2005, año en el que se publicó el primer trabajo de esta tesis (Guerrero et al. 2005) no existía ningún ensayo clínico aleatorizado que evaluara su eficacia, por lo que esa fue la motivación principal para diseñar este estudio. A fecha de hoy, ya se han publicado otros estudios similares (Aimetti et al. 2012, Baltacioglu et al. 2011, Mestnik et al. 2010, Varela et al. 2011, Xajigeorgiou et al. 2006) así como varias revisiones sistemáticas (SGOLASTRA et al. 2012, Zandbergen et al., 2013, Ravelo et al. 2015) que han confirmado los beneficios clínicos adicionales de esta combinación antimicrobiana coadyuvante en comparación con el placebo en pacientes con PAG.

Algunos de estos estudios también informan sobre los beneficios de esta combinación de fármacos (Aimetti et al. 2012, Mestnik et al. 2010) en relación con la reducción de los niveles de referencia de los principales patógenos periodontales, mientras que otros no muestran un beneficio microbiológico coadyuvante significativo sobre el control grupo (Heller et al., 2011, Xajigeorgiou et al. 2006). Los estudios realizados en la década de 1980 sugirieron que la eliminación de *A. actinomycetemcomitans* fue clínicamente útil, pero difícil de

lograr por medios mecánicos solamente (Christersson et al. 1985, Renvert et al. 1990). Más adelante, como se mencionaba anteriormente, se demostró (Pavicic et al. 1994a) que la supresión de *A. actinomycetemcomitans* podría lograrse de manera predecible si la amoxicilina y el metronidazol sistémicos se prescribían durante el tratamiento periodontal no quirúrgico. En ese estudio el resultado microbiológico fue acompañado por mejoras clínicas hasta los 24 meses después del tratamiento. Aunque *A. actinomycetemcomitans* es más frecuente en pacientes con PAG (Armitage 1999), no todos los pacientes lo albergan (Tonetti y Mombelli 1999). Por lo tanto, parece razonable explorar la diferencia en los resultados clínicos de la terapia coadyuvante en la presencia o ausencia del principal patógeno diana. Existe evidencia conflictiva que ha informado de si la presencia o ausencia de *A. actinomycetemcomitans* al inicio del estudio afecta a las mejorías clínicas en casos de periodontitis crónica (Cionca et al. 2010). Pero hasta la fecha no hay datos disponibles en pacientes con PAG para establecer si los sujetos portadores de un patógeno específico antes del tratamiento se beneficiarán más de la terapia antimicrobiana coadyuvante en comparación con aquellos que no albergan la misma. Debido a esta falta de pruebas, la terapia antimicrobiana coadyuvante se ha utilizado empíricamente, es decir, sin una orientación específica basada en resultados microbiológicos (Guerrero et al. 2005, Mombelli 2005).

Por otro lado, el momento ideal de la administración de la medicación coadyuvante es un tema de debate actual. Se ha sugerido que la instrumentación debe preceder la ingesta del antibiótico con el objetivo de que el agente antimicrobiano actúe cuando se haya alterado la estructura del biofilm bacteriano. (Herrera et al. 2008). De manera que el tratamiento coadyuvante se debe administrar de manera simultánea o de manera diferida a la instrumentación mecánica. Ahora bien, la medicación se puede administrar como parte del tratamiento inicial o como parte del tratamiento posterior tras la fase de reevaluación periodontal. Hasta la fecha, solo un estudio clínico retrospectivo ha analizado esta cuestión (Kaner et al. 2007). Este estudio, con una metodología con

alto riesgo de sesgo, llegó a la conclusión de que la combinación antimicrobiana coadyuvante era mas beneficiosa para el paciente si se administraba al principio del tratamiento, de manera simultanea a la instrumentación mecánica, en comparación a la posible administración en la fase de retratamiento. En cualquier caso, esta pregunta debería investigarse mediante un diseño adecuado que permita una evaluación más rigurosa.

Al margen de lo expuesto con anterioridad, algunas investigaciones recientes realizadas en pacientes que presentaban una periodontitis crónica han indicado que la realización del raspado y alisado radicular de toda la boca en menos de 24 horas, da lugar a diferentes grados de beneficio clínico y microbiológico adicional al conseguido mediante la realización del tratamiento convencional (tratamiento por cuadrantes con 2 semanas de separación entre las citas) (Quirynen et al. 1995;Bollen et al. 1996), (Vandekerckhove et al. 1996;Mongardini et al. 1999;Apatzidou & Kinane 2004). Por lo tanto, los resultados tan prometedores que se presentaron en los estudios pioneros (Quirynen et al. 1995), no se han podido duplicar en otros estudios con el mismo grado de éxito. Y aunque los beneficios de este enfoque terapéutico tampoco han sido evaluados de forma sistemática en pacientes con periodontitis agresivas, los datos iniciales obtenidos en pacientes con periodontitis crónica indican que con el raspado y alisado en menos de 24 horas se obtienen, al menos, los mismos resultados que los que se pueden conseguir mediante el tratamiento por cuadrantes (Apatzidou & Kinane 2004). Es decir, que la elección de este sistema de tratamiento no se ha basado en intentar obtener mejores resultados clínicos sino en aprovechar las ventajas que nos proporciona esta opción terapéutica. En este sentido, la reducción en el número de citas y el mejor aprovechamiento del tiempo nos ayuda a mejorar la colaboración del paciente durante el día del tratamiento (Herrera et al 2008, Greenstein 2002). El beneficio adicional de esta opción terapéutica no se va a evaluar en este proyecto, sin embargo ha sido la alternativa de instrumentación mecánica utilizada por los motivos expuestos.

#### **IV. Justificación**

Tras la revisión de la literatura científica se ha evidenciado que aunque, hasta el año 2005, año en el que se publicó el primer estudio de esta tesis doctoral (Guerrero et al. 2005) se sugería el uso de antimicrobianos sistémicos como coadyuvante el tratamiento no quirúrgico de la periodontitis agresiva generalizada, se desconocía el beneficio clínico y microbiológico de su uso debido a la falta de ensayos clínicos aleatorizados y controlados bien diseñados. De manera adicional, y tras la revisión de la literatura más reciente, se ha detectado una falta de conocimiento de muchos elementos relacionados con la posible variabilidad del tratamiento coadyuvante con antimicrobianos sistémicos. De acuerdo a la evidencia científica disponible, es evidente que no se tiene suficiente conocimientos sobre:

1. Hasta el año 2005, el verdadero beneficio coadyuvante de la combinación de AMOX-MET en pacientes con periodontitis agresivas generalizadas y los efectos adversos del tratamiento con AMOX-MET
2. La fase del tratamiento periodontal en la que se debe prescribir la combinación de AMOX-MET para que los pacientes obtengan su máximo beneficio.
3. Los resultados microbiológicos del tratamiento con AMOX-MET.





## **V. Hipótesis**

Durante el tratamiento no quirúrgico de la periodontitis agresiva generalizada, el efecto coadyuvante de AMOX-MET de administración sistémica junto al raspado y alisado radicular de toda la boca realizado en menos de 24 horas (RAR24) aporta beneficios clínicos y microbiológicos adicionales a los obtenidos mediante RAR 24 junto a una medicación placebo.

## **VI. Objetivos**

### *Objetivo general*

Evaluar los beneficios adicionales de la administración sistémica de AMOX-MET durante el tratamiento periodontal de la periodontitis agresiva generalizada.

### *Objetivos secundarios*

- Determinar el efecto clínico coadyuvante de AMOX-MET junto al tratamiento periodontal realizado en menos de 24 horas (RAR24), incluyendo el análisis de los efectos adversos de la medicación y la colaboración de los sujetos con la ingesta de ésta (estudio 1)
- Determinar si el tratamiento antimicrobiano coadyuvante se debe indicar durante la fase inicial del tratamiento o como parte del retratamiento (estudio 2)
- Analizar los resultados microbiológicos del tratamiento antimicrobiano (estudio 3)
- Explorar si un perfil microbiológico inicial, en sujetos que reciben la medicación coadyuvante, estaba asociado a mayores beneficios clínicos. (estudio 3)



## VII. Material y Métodos

La descripción detallada del material y métodos así como de los resultados de este trabajo de investigación han sido publicados como artículos científicos originales en tres publicaciones independientes en la revista científica *Journal of Clinical Periodontology* (Impact Factor: 4.01; ISI Journal Citation Reports © Ranking: 2014: 2/88 (Dentistry Oral Surgery & Medicine) con las siguientes referencias presentes en el anexo de esta tesis:

1. Guerrero A, Griffiths GS, Nibali L, Suvan J, Moles DR, Laurell L, Tonetti MS. *Adjunctive benefits of systemic amoxicillin and metronidazole in non-surgical treatment of generalized aggressive periodontitis: a randomized placebo controlled clinical trial. J Clin Periodontol 2005; 32: 1096–1107.*
2. Guerrero A, Nibali L, Lambertenghi R, Ready D, Suvan J, Griffiths GS, Wilson M, Tonetti MS. *Impact of baseline microbiological status on clinical outcomes in generalized aggressive periodontitis patients treated with or without adjunctive amoxicillin and metronidazole: an exploratory analysis from a randomized controlled clinical trial. J Clin Periodontol 2014; 41: 1080–1089.*
3. Griffiths GS, Ayob R, Guerrero A, Nibali L, Suvan J, Moles DR, Tonetti MS. *Amoxicillin and metronidazole as an adjunctive treatment in generalized aggressive periodontitis at initial therapy or re-treatment: a randomized controlled clinical trial. J Clin Periodontol 2011; 38:43-49.*

Permission for reprinting the papers published in the journal *J Clin Periodontol* was given by John Wiley & Sons, Inc (copyright holder)



A continuación se presenta los aspectos del material y métodos más relevantes de las 3 publicaciones. La descripción completa se encuentra en el anexo de esta tesis.

### **Diseño experimental**

Se diseñó un estudio clínico aleatorizado, a doble ciego y controlado mediante placebo, con 2 grupos paralelos seguidos hasta 6 meses (estudio 1). A los 6 meses, se diseñó otro estudio clínico controlado (estudio 2) con la misma muestra de pacientes que fueron seguidos hasta los 8 meses del inicio del estudio. En este segundo estudio, los pacientes del grupo placebo inicial recibieron reinstrumentación y la medicación activa, mientras que el grupo test inicial solo recibió reinstrumentación. Además se realizó el análisis microbiológico de los sujetos del estudio 1, en una tercera publicación (estudio 3). La aprobación ética de cada fase del proyecto se obtuvo del comité de investigación y ética del “Instituto y Hospital Dental Eastman” de la Universidad de Londres. El estudio se llevó a cabo de acuerdo a los principios descritos en la declaración de Helsinki en relación a la experimentación con humanos.

### **Búsqueda de la población**

La población de pacientes referidos al “Instituto y Hospital Dental Eastman” de Londres se usó como fuente para la identificación de los sujetos potenciales de participar en el estudio. Se realizó un examen periodontal completo que incluyó una historia médica y dental. Asimismo, se hizo un examen intraoral y se recogieron todos los parámetros periodontales. Se llevó a cabo una exploración radiográfica mediante radiografías periapicales o una ortopantomografía. A partir de ese momento, se emitió el diagnóstico periodontal del caso. Aquellos pacientes que cumplieron los criterios de inclusión, fueron invitados a participar en el estudio tras haber leído una hoja de información detallada relacionada con el protocolo de éste.

### **Criterios de inclusión y exclusión**

El estudio incluyó pacientes con: a) Periodontitis agresiva generalizada de acuerdo con la clasificación internacional de 1999 (Armitage 1999); b) Al menos

20 dientes presentes; c) buena salud general; d) una edad comprendida entre 16 y 35 años cuando fueron diagnosticados por primera vez como pacientes con periodontitis agresiva. Los pacientes fueron excluidos del estudio si: a) fueron diagnosticados como pacientes que presentaban una periodontitis crónica de acuerdo con la clasificación internacional de 1999 (Armitage 1999); b) se trataba de mujeres embarazadas o lactantes; c) se trataba de mujeres en edad fértil que no usaban ningún método aceptable de control de natalidad; d) requerían premedicación antibiótica para la realización del examen o el tratamiento periodontal; e) sufrían algún tipo de enfermedad sistémica (diabetes, enfermedades cardiovasculares, renales, pulmonares o cerebrales); f) habían recibido tratamiento antibiótico en los 3 meses anteriores al inicio del estudio; g) estaban en tratamiento con fármacos anti-inflamatorios durante largo tiempo; h) habían recibido tratamiento periodontal en los 6 meses anteriores al inicio del estudio; i) eran alérgicos a penicilina o metronidazol; j) no fueron capaces de dar el consentimiento para participar en el estudio o no habían aceptado el plan de tratamiento propuesto. El consentimiento informado se obtuvo por parte de todos los pacientes que decidieron participar en el estudio.

### **Sesiones de preparación para el tratamiento**

Todos los pacientes fueron sometidos a sesiones de motivación durante las cuales se dieron instrucciones de higiene oral. Estas sesiones se incluyeron con el propósito de asegurar que todos los sujetos eran capaces de mantener un nivel apropiado de higiene oral antes del comienzo del tratamiento activo. Estas sesiones fueron repetidas hasta que los sujetos demostraron su habilidad para mantener un buen índice porcentual de placa, evidenciado mediante índices de placa preoperatorios <20%. Estas sesiones también sirvieron para presentar, a cada uno de los pacientes, las características específicas de su enfermedad, y para llevar a cabo una profilaxis supragingival.

### **Cálculo del tamaño de la muestra**

El cálculo del tamaño de la muestra determinó que se necesitaban 17 sujetos por tratamiento para que el estudio contara con un 80% de poder estadístico para

detectar una diferencia real de 1.0mm entre los grupos test y placebo. La reducción en la profundidad de bolsa al sondaje (PBS) en bolsas  $\geq 7$  mm se usó como la variable de resultado primaria asumiendo que la desviación estándar común era de 1.0mm. De igual forma, una muestra de 21 sujetos por grupo (42 en total) debían ser reclutados para compensar las posibles pérdidas de sujetos durante el periodo de estudio. Este cálculo de tamaño de muestra se hizo para el estudio primario (estudio 1). Los estudios 2 y 3 se realizaron con la misma muestra de pacientes, sin que existiera un cálculo de tamaño muestral diferente al del estudio 1.

### **Aleatorización y distribución a ciegas**

En el estudio 1, la numeración de los sujetos se asignó siguiendo un orden ascendente desde la visita de enrolamiento. Los sujetos fueron asignados a uno de los 2 tratamientos de forma aleatoria mediante una tabla generada por ordenador. Se aplicó un modelo de bloques balanceados, aleatorios y permutados (el tamaño del bloque fue de 4 unidades), para preparar las tablas aleatorias, con el objetivo de evitar un desequilibrio entre los 2 tratamientos. Se aplicó una técnica de aleatorización restrictiva (minimización), estratificando en función de los hábitos de fumar (sí o no) y del número de bolsas iniciales  $\geq 5$ mm ( $\leq 50$ , 50-80,  $\geq 80$ ).

Las tablas de aleatorización se mandaron a la farmacia de la Universidad de Londres (UCL) donde se preparó la medicación para 50 sujetos (25 test y 25 placebo). 50 bolsas de plástico que contenían 2 botes cada uno (amoxicilina, metronidazol o placebo) fueron devueltas al coordinador del estudio, que fue la única persona que tuvo acceso a ellas. Seguidamente, el coordinador del estudio completó la asignación del tratamiento y emparejó el código de la bolsa de plástico con el número de sujeto. La enfermera de investigación fue la encargada de entregar al sujeto la bolsa de plástico con la medicación. La aleatorización se mantuvo codificada hasta que se completaron tanto la recogida y como el análisis de todos los datos. Por lo tanto, los grupos de tratamiento fueron ocultados de cara al paciente, al examinador clínico, al terapeuta y al técnico estadístico. Los códigos de aleatorización se rompieron en el estudio 2 y el examinador perdió la ocultación del tratamiento.

### **Parámetros clínicos**

Los parámetros clínicos fueron evaluados por un solo examinador calibrado (LN), usando una sonda periodontal manual NCP-15, en 6 localizaciones/diente y excluyendo los 3º molares. El índice de placa general (IPG) se recogió mediante la asignación de una puntuación binaria para cada superficie (1 presencia de placa, 0 ausencia de placa) y calculando el porcentaje del total de las superficies dentarias que demostraron la presencia de placa bacteriana, detectada tras desplazar una sonda periodontal por la superficie analizada, siguiendo las modificaciones de Tonetti et al. (2002).

De igual forma, el índice de sangrado al sondaje general (ISG) se calculó tras la evaluación, de forma dicotómica, de la presencia de sangrado al sondaje proveniente del fondo de la bolsa, tras la introducción de la sonda periodontal con una fuerza de 0.3 N (Tonetti et al. 2002).

Al mismo tiempo, también se obtuvieron los valores de profundidad de bolsa al sondaje (PBS) y recesión del margen gingival (REC) midiendo los valores al milímetro más cercano. La REC se anotó como un valor positivo, si el margen gingival libre se encontraba en una posición apical en relación al límite amelocementario (LAC), por el contrario, se registró como un valor negativo, si se encontraba en una posición coronal en relación al LAC. En este último caso, el examinador reinsertó la sonda en la misma localización, con un ángulo de 45°, con el objetivo de detectar el LAC. Si el LAC no se pudo detectar debido a factores restauradores o anatómicos, el examinador adoptó referencias clínicas que fueron anotadas en el formulario de recogida de datos de cada paciente.

El nivel de inserción clínica (NIC) se calculó sumando la PBS más la REC.

### **Calibración del investigador**

Un total de 10 sujetos con periodontitis agresiva generalizada, que no tuvieron relación con este estudio, fueron reclutados y usados para el ejercicio de calibración. El único examinador designado midió la PBS y la REC en todos los dientes, en cada uno de los 10 sujetos. Durante el mismo día, con un mínimo de 15 minutos de separación, el examinador repitió la exploración. Una vez completadas todas las mediciones, se analizó la reproducibilidad intra-



examinador para las mediciones del NIC. El examinador se consideró reproducible tras superar el criterio de éxito predeterminado (el porcentaje de coincidencia en un rango  $\pm 2$  mm, debía ser, al menos, del 98% entre las mediciones repetidas). El examinador demostró un grado de reproducibilidad del 99.7%.

### **Muestras microbiológicas y procedimiento**

En resumen, las 4 localizaciones más profundas en cada cuadrante fueron seleccionadas para el muestreo (Mombelli et al. 1991). Las muestras fueron obtenidas por el examinador, en los mismos sitios seleccionados, con 4 curetas estériles (uno para cada sitio) al inicio del estudio, a los 2 meses y a los 6 meses después del tratamiento del estudio 1. El microbiólogo fue enmascarado a la asignación del tratamiento. Cada muestra se agrupó en un vial que contenía 1 ml de fluido de transporte reducido (Syed y Loesche 1972). Las muestras fueron procesadas de inmediato a la llegada en el Departamento de Microbiología. Cada muestra se acompañó de un formulario de solicitud de la bacteriología y fue claramente etiquetado. Todas las colonias se contaron y se subcultivaron para la identificación de *A. actinomycetemcomitans*. Asimismo, todas las colonias negro-pigmentadas se contaron y se subcultivaron para la identificación de *P. gingivalis*, y las colonias con la morfología apropiada se contaron y se subcultivaron para la identificación de *T. forsythia*.

Todo el ADN genómico de las cepas de presuntos *A. actinomycetemcomitans*, *T. forsythia* y *P. gingivalis* se extrajo usando el kit de aislamiento de ADN Puregene™, (Gentra Systems, Minneapolis, EE.UU.). A continuación, el ADN extraído se utilizó como modelo para la confirmación de las especies a través del sistema de bloques basado en PCR dirigido a regiones específicas dentro del gen 16S rRNA. Los resultados de la PCR se confirmaron por secuenciaciones de ADN seleccionadas al azar, esto se llevó a cabo utilizando un analizador genético ABI310 (PE Biosystems, Warrington, UK). Las secuencias fueron analizadas mediante el proyecto de base de datos ribosomal II (Maidak et al. 2000, Maidak et

al., 2001) y BLAST en el Centro Nacional de Información Biotecnológica (Altschul et al. 1997).

Se determinó la proporción de la microbiota oral total de resistencias bacterianas a la amoxicilina o el metronidazol. Con el fin de calcular la proporción de bacterias resistentes a los antibióticos, todas las diluciones de estas muestras se inocularon en placas de agar que contenían antibióticos, así como en otras libres de antibióticos. Los recuentos viables totales se determinaron utilizando las placas de agar que contenían los antibióticos y comparando éstos con los recuentos totales viables presentes en las placas de agar libres de antibióticos.

### **Tratamiento periodontal no-quirúrgico**

El tratamiento periodontal se inició en un periodo máximo de 1 mes tras la realización del examen inicial. Si por cualquier razón, el comienzo del tratamiento se pospuso más de 1 mes, se llevó a cabo un nuevo examen periodontal completo. En el estudio 1, un solo terapeuta experimentado (AG) realizó el tratamiento periodontal estándar, completando las instrucciones de higiene oral y la instrumentación mecánica supra y subgingival de todas las superficies radiculares (raspado y alisado radicular). La instrumentación mecánica se realizó usando tanto instrumentos piezo electrónicos (EMS, Lyon, Suiza) como instrumentos manuales (curetas de Gracey) en función de su necesidad. Ambos grupos de tratamiento recibieron esta terapia, en 2 citas largas, durante el mismo día. En una sesión matinal, se instrumentaron 2 cuadrantes, seguidos por los otros 2 cuadrantes durante la sesión de tarde. El tiempo asignado a cada una de estas sesiones fue de 2 horas. La anestesia local se usó en función de su necesidad. Los sujetos del grupo test recibieron un tratamiento coadyuvante con antibióticos sistémicos, con 500mgr de amoxicilina y en 500 mgr de metronidazol, 3 veces al día, durante 7 días, mientras que los pacientes del grupo control recibieron la medicación placebo. La primera dosis de la medicación se tomó antes de que la instrumentación mecánica hubiera comenzado, al inicio de la primera sesión de tratamiento. Todos los sujetos realizaron enjuagues bucales con Clorhexidina al 0.2 % (proporcionada por la dirección del estudio para mejorar la colaboración del participante), 2 veces al día durante las dos semanas posteriores a la conclusión

del tratamiento no-quirúrgico. Igualmente, se realizaron los métodos de higiene oral, tal y como se indicaron al comienzo del estudio.

En el estudio 2, la misma muestra de pacientes del estudio 1 recibió reinstrumentación, mientras que solo el grupo placebo inicial recibió el mismo régimen antimicrobiano que el recibido por el grupo test del estudio 1. En este caso, la instrumentación la realizó un operador diferente al del estudio 1 (RA), mientras que el examinador sí fue el mismo.

### **Controles post-operatorios**

Los objetivos de estos controles post-operatorios fueron tanto el controlar y reforzar los hábitos de higiene oral de los sujetos, como el monitorizar los eventos tempranos de cicatrización, así como el ser informados de cualquier efecto adverso experimentado por el sujeto o de cualquier ingesta adicional de medicamentos durante la fase post-operatoria. Estos controles se realizaron en las semanas 1, 5 después del tratamiento. Además, en el estudio 1, el control post-operatorio de la primera semana sirvió para controlar el grado de colaboración del sujeto con la toma de la medicación, de forma que, a todos los pacientes se les requirió que devolvieran cualquier medicación no tomada y/o los frascos vacíos. El número de pastillas no ingeridas por los pacientes fueron documentadas. El mismo procedimiento se repitió en el estudio 2, a los 2 meses de la reinstrumentación.

### **Exámenes de re-evaluación**

Las visitas de re-evaluación se llevaron a cabo a los 2, 6 (estudio 1) y 8 meses (estudio 2) tras completar el tratamiento inicial. Durante estas visitas el examinador anotó cualquier cambio en la historia médica y dental. Todos los parámetros clínicos periodontales, recopilados en la visita inicial, fueron repetidos de nuevo. Al final de la sesión, en caso de necesidad, se realizó un desbridamiento supragingival, evitando la re-instrumentación de las bolsas periodontales residuales.

### **Medidas de resultado primarias y secundarias**

La medida de resultado primaria, para los estudios 1 y 2 fue la reducción de la PBS en localizaciones con PBS inicial  $\geq 7\text{mm}$ . Las medidas de resultado secundarias incluyeron las diferencias entre los grupos en relación a: a) cambios de los valores medios de la PBS de toda la boca y cambios en la PBS y el NIC de las diferentes categorías de PBS inicial ( $\leq 3\text{mm}$ ,  $4-6\text{mm}$ ,  $\geq 7\text{mm}$ ); b) cambios en el IPG y en el ISG; c) porcentaje de localizaciones con reducciones de la PBS y ganancias en el NIC  $\geq 2\text{mm}$ ; d) porcentaje de localizaciones que demostraron una pérdida en el NIC  $\geq 2\text{mm}$  (progresión de la enfermedad); e) porcentaje de localizaciones con una PBS que cambió de  $\geq 5\text{mm}$  a  $\leq 4\text{mm}$  y porcentaje de localizaciones con una PBS que cambió de  $\geq 4$  a  $\leq 3\text{mm}$  (necesidad de re-tratamiento); f) descripción y frecuencia de los efectos adversos; g) colaboración del sujeto con la ingesta de la medicación sistémica.

Para el estudio 3, La medida de resultado principal fue la interacción del perfil microbiológico (presencia o ausencia de cualquiera de los tres principales patógenos periodontales al inicio del estudio) con el efecto del tratamiento (test o placebo) sobre la reducción de PPD en sitios con  $\geq 7\text{mm}$  inicial PPD (variable de resultado primario de los estudios 1 y 2). Los resultados exploratorios secundarios incluyeron: i) la interacción del perfil microbiológico efecto / tratamiento sobre los resultados clínicos en diferentes categorías iniciales PPD; ii) la modificación del efecto del tratamiento (test o placebo) sobre los resultados clínicos dentro de los subgrupos de sujetos (patógeno-positivo y patógeno-negativo); iii) El efecto del perfil microbiológico inicial sobre la reducción de PPD y el aumento de CAL en las bolsas moderadas y profundas dentro del subgrupo de sujetos del grupo test (los sujetos que tomaron la combinación antimicrobiana); iv) las diferencias entre grupos de tratamiento en el porcentaje de sujetos que albergaron *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* o *T. forsythia* al inicio del estudio, 2 meses y 6 meses, v) las diferencias entre los grupos test y placebo en la reducción de unidades formadoras de colonias de *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* y *T. forsythia* en muestras positivas al inicio del estudio; vi) las diferencias entre los grupos test y placebo en el porcentaje de la microbiota total

oral resistente a la amoxicilina y metronidazol al inicio del estudio, a los 2 meses y a los 6 meses.

### **Manejo de los datos y análisis estadístico**

Los datos se introdujeron en una base de datos de Excel (Microsoft office 2000) y fueron analizados para detectar errores tipográficos. La base de datos, posteriormente bloqueada, fue importada al programa SPSS para Windows (SPSS Inc. Version 11.0) donde se formateó y se analizó. Se realizó un análisis usando al paciente como unidad, calculando una variable a nivel del paciente (PBS de toda la boca o PBS en las diferentes categorías de PBS iniciales). Los datos numéricos fueron resumidos en términos de valores medios e intervalos de confianza del 95%, los datos categóricos fueron presentados en su frecuencia de distribución y las medidas basadas en porcentajes (Ej. IPG), fueron resumidas como la mediana del porcentaje y el rango intercuartil. La significación estadística de las diferencias entre los grupos test y placebo, para los datos numéricos, fue evaluada por medio de un análisis univariante mediante el test *t* de Student para muestras independientes. De igual forma, la significación de la diferencia intra-grupo, antes y después del tratamiento, fue evaluada mediante el test *t* de Student para muestras relacionadas. Los datos categóricos fueron analizados con el test de Chi-cuadrado. Las diferencias entre los grupos, en los datos basados en porcentajes, fueron examinadas con el test de Mann-Whitney, mientras que las diferencias dentro de cada grupo, fueron evaluadas con el test de Wilcoxon Signed Rank. La significación de la opción de tratamiento (test o placebo) en relación a las variables dependientes a) reducción de la PBS; b) ganancia en el NIC; y c) las diferentes categorías iniciales de PBS; fue estimada mediante un análisis de covarianza (ANCOVA). Los modelos fueron ajustados con los valores iniciales y fueron controlados por el hábito de fumar. El modelo final fue entonces seleccionado, incluyendo factores significativos solamente. La media ajustada y los intervalos de confianza del 95% se usaron como las estimaciones del modelo. Se aplicó un “análisis con intención de tratar” (Hollis & Campbell 1999). De este modo, en el caso de la pérdida de un paciente durante el seguimiento, los datos obtenidos en la última exploración disponible se utilizaron a lo largo del análisis



## **VIII. Resultados.**

Estudio 1. *Adjunctive benefits of systemic amoxicillin and metronidazole in non-surgical treatment of generalized aggressive periodontitis: a randomized placebo-controlled clinical trial.*

### **Contabilización de los participantes**

La figura 1 muestra lo que ocurrió con todos los sujetos potenciales a lo largo del estudio, desde el posible reclutamiento hasta la finalización. Se evaluaron 51 sujetos para determinar su idoneidad antes de comenzar el estudio. De estos 51 sujetos, 10 fueron excluidos del estudio debido a los siguientes motivos: 7 no cumplieron los criterios de inclusión y los otros 3 decidieron no participar en el estudio. Uno de los 3 sujetos que decidieron no participar en el estudio lo hizo tras la firma del consentimiento informado, aunque antes de que se hubiera producido la aleatorización. Por lo tanto, 41 sujetos formaron parte del proceso de aleatorización. Todos los sujetos recibieron el tratamiento asignado, y un solo paciente del grupo placebo se perdió durante el seguimiento, entre la visita de los 2 y los 6 meses, debido a razones ajenas al estudio. Asimismo, todos los sujetos fueron incluidos en el análisis estadístico.

### **Calendario del estudio**

El reclutamiento de sujetos se inició en enero de 2003 y se completó al final de diciembre del 2003. Todas las visitas de re-evaluación de los 6 meses se completaron en Julio del 2004. La introducción de los datos y el análisis estadístico se completaron al final de Septiembre de 2004.

### **Características de los sujetos al comienzo del estudio**

Las características de los 41 participantes, tratados mediante tratamiento no-quirúrgico junto al uso coadyuvante de la medicación activa o placebo, se presentan en la tabla 1. La edad media de los participantes fue de  $31.3 \pm 5.2$  para el grupo test y de  $31.7 \pm 5.1$  para el grupo placebo. El 80% del grupo test estaba

compuesto por mujeres, en comparación al 57% del grupo placebo. En el grupo test, el 25% de los participantes eran fumadores mientras que en el grupo placebo esta cifra fue del 19%. Los caucasianos constituyeron el grupo étnico mayoritario, con una presencia del 65% en el grupo test y un 47.6 % en el grupo placebo. Los asiáticos fueron representados por el 15% del grupo test y el 33% del grupo placebo, los afro-caribeños por el 10% del grupo test y el 14.3% del grupo placebo, y los negro-africanos por un 5% del grupo test y un 4.8% del grupo placebo. Ninguno de estos datos demográficos demostró diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de tratamiento.

### **Características clínicas**

El examen periodontal inicial reveló que los 2 grupos de tratamiento demostraron características clínicas similares en relación con el número de dientes presentes, con el porcentaje de localizaciones con PBS  $\geq 5$ mm, así como con los índices de placa y de sangrado, sin que existieran diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.

Los datos demuestran que los participantes mantenían la mayoría de las piezas dentarias aunque, aproximadamente, un tercio de las localizaciones presentaban bolsas periodontales con necesidad de tratamiento. Los índices de sangrado eran elevados, mientras que los índices de placa se mantenían reducidos (Figura 2).

### **Valores medios para los parámetros clínicos**

La media de los resultados clínicos de toda la boca y la de los resultados clínicos en bolsas poco profundas ( $< 3$ mm), moderadas (4-6 mm) y profundas ( $\geq 7$ mm) al inicio del estudio y a los 2 y 6 meses, junto a la diferencias entre ellas, están mostradas en la tabla 2. Al inicio del estudio, no existían diferencias estadísticamente significativas entre los grupos, en los valores medios de ninguno de los parámetros clínicos. Todos los parámetros estudiados, con la excepción de la media de ganancia de NIC en bolsas iniciales poco profundas, demostraron una diferencia estadísticamente significativa entre el inicio del estudio y los 2 meses. Este hecho también se evidenció entre el inicio del estudio y los 6 meses, excepto para la ganancia de NIC y la reducción de la PBS en bolsas iniciales poco



profundas. A los 2 meses, hubo una diferencia estadísticamente significativa ( $P<0.02$ ) entre los grupos test y placebo, en relación con la media de la PBS en bolsas moderadas (4-6mm) y con la media de la PBS en bolsas profundas (7mm). A los 6 meses, se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos test y placebo, en la media de la PBS en bolsas moderadas ( $P<0.02$ ), en la media de la PBS en bolsas profundas ( $P<0.001$ ) y en la media de NIC en bolsas profundas ( $P<0.05$ ).

La significación estadística del efecto del tratamiento entre los 2 grupos (diferencia entre los grupos test y placebo en la media de la reducción de la PBS y en la media de la ganancia en el NIC en las diferentes categorías de bolsas periodontales), a los 2 y 6 meses, está expuesta en la tabla 3. Se construyeron modelos multivariantes basados en análisis de regresión logística (ANCOVA) teniendo en cuenta fuentes potenciales de variabilidad, como el hábito de fumar y la PBS al inicio del estudio. Debido a que el ajuste de los valores del inicio del estudio pudo dar lugar a un problema relacionado con el emparejamiento matemático (Tu et al. 2004), se llevo a cabo el mismo análisis sin ajustar los valores del inicio del estudio, dando como resultado valores casi idénticos (datos no mostrados). Al considerar la media del NIC de toda la boca, no hubo diferencias estadísticamente significativas entre los grupos test y placebo. Asimismo, al examinar las bolsas  $\leq 3$ mm, no se observaron diferencias entre los grupos test y placebo ni para el NIC o la PBS. Para facilitar la presentación de los datos, estos análisis se han omitido en la tabla 3.

Hubo un efecto altamente significativo del grupo de tratamiento, favorable al grupo test, sobre la media de la reducción de la PBS de toda la boca, sobre la reducción de la PBS en bolsas de 4-6mm y sobre la reducción de la PBS en bolsas  $\geq 7$ mm a los 2 y 6. Las diferencias ajustadas, entre el tratamiento test y el tratamiento placebo, en la reducción de la PBS en bolsas de 4-6mm fueron de 0.5 a los 2 meses y de 0.4 a los 6 meses. En localizaciones profundas  $\geq 7$ mm, esta diferencia fue mucho mayor: 0.9mm a los 2 meses y 1.4mm a los 6 meses.

En localizaciones con una PBS inicial  $\geq 7$ mm, la ganancia en el NIC fue significativamente mejor en los sujetos del grupo test: se observó un beneficio coadyuvante de 0.6mm a los 2 meses y de 1.0 mm a los 6 meses. Mientras que no

hubo un beneficio estadísticamente significativo, en términos de ganancia en el NIC en las localizaciones con una PBS inicial 4-6mm ( $P=0.185$ ) a los 2 meses, sí se observó una gran diferencia significativa de 0.5 mm que favoreció al grupo test a los 6 meses ( $P=0.001$ )

Asimismo, el efecto del hábito de fumar, sobre la variable de resultado primaria (reducción de la PBS en localizaciones con una PBS inicial  $\geq 7$ mm), fue estadísticamente significativa ( $P=0.007$ ), y la diferencia entre un fumador y un no fumador, en la reducción de la PBS en bolsas profundas ( $\geq 7$ mm), fue de 0.9mm (95% intervalo de confianza [I.C.] 0.3, 1.5) a los 2 meses y de 1.0mm (0.3, 1.7) a los 6 meses. El valor correspondiente, en la comparación de fumadores y no fumadores, en localizaciones con PBS inicial de 4-6mm, fue de 0.4mm (0.001, 0.8), demostrando una significación límite ( $P=0.050$ ) a los 2 meses, y de 0.2mm (-0.1, 0.6) a los 6 meses ( $P=0.183$ ). Por otro lado, no hubo diferencias estadísticamente significativas para el NIC.

### **Porcentaje de localizaciones con bolsas periodontales**

El porcentaje de localizaciones (Mediana y amplitud intercuartil), con un umbral específico de PBS al inicio del estudio, y la reducción intra-grupo en el porcentaje de localizaciones con bolsas (diferencias entre el inicio del estudio-2 meses e inicio del estudio-6 meses), se presentan en la tabla 4. La significación de la reducción en el porcentaje de bolsas entre los 2 grupos, también se detalla en dicha tabla. Al comienzo del estudio no existían diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de tratamiento, en relación con ninguno de los porcentajes de localizaciones con un umbral de PBS específico.

El análisis intra-grupo (Wilcoxon signed rank) demostró que todos los umbrales de PBS exhibieron una diferencia estadística altamente significativa entre el inicio del estudio y la evaluación, tanto de los 2 meses como la de los 6 meses. Además, el análisis de las diferencias entre el grupo test y el grupo placebo, en el resultado del tratamiento (porcentaje inicial-porcentaje a los 2 meses), mostró una diferencia significativa entre los grupos ( $p<0.05$ ) en la reducción del porcentaje de localizaciones con PBS  $\geq 5$ mm,  $\geq 6$ mm y  $\geq 7$ mm. La significación estadística de la diferencia entre el inicio del estudio y los 6 meses fue de  $p<0.02$  para la

reducción en el porcentaje de bolsas  $\geq 5$ ,  $\geq 6$ mm y de  $p < 0.05$  para las bolsas  $\geq 4$  y  $\geq 7$ mm.

### **Higiene oral y sangrado al sondaje**

El índice de placa general (IPG) y el índice de sangrado general (ISG) al inicio del estudio y a los 2 meses, y la reducción intra-grupo (las diferencias entre inicio del estudio-2 meses e inicio del estudio-6 meses) se muestran en la tabla 5.

El IPG disminuyó, en ambos grupos de tratamiento, desde el inicio del estudio hasta la evaluación de los 2 meses, y esta disminución fue estadísticamente significativa tanto para el grupo placebo como para el grupo test. Sin embargo, a los 6 meses, los valores del IPG fueron iguales a los del inicio del estudio. El efecto de las 2 opciones de tratamiento tuvieron un alto impacto sobre el ISG mostrando cambios estadísticamente significativos a los 2 y 6 meses ( $p < 0.001$ ). Igualmente, hubo una diferencia estadísticamente significativa, entre los grupos test y placebo, en la mejora del porcentaje de localizaciones con sangrado al sondaje a los 2 y 6 meses ( $p < 0.02$ )

### **Porcentaje de localizaciones con cambios clínicamente relevantes**

Este análisis secundario se llevó a cabo para estudiar los cambios en algunos de los parámetros clínicamente relevantes a los 2 y 6 meses (tabla 6).

Todos los valores de medianas (amplitud intercuartil) demostraron una diferencia estadísticamente significativa, que favorecía al tratamiento test, en el porcentaje de localizaciones con ganancias en el NIC  $\geq 2$ mm a los 2 meses ( $p = 0.047$ ) y a los 6 meses ( $p = 0.028$ ), en el porcentaje de localizaciones con reducción de PBS  $\geq 2$ mm a los 2 meses ( $p = 0.029$ ) y a los 6 meses ( $p = 0.021$ ); y en el porcentaje de bolsas periodontales que se convirtieron de  $\geq 5$  mm al inicio del estudio a  $\leq 4$ mm a los 2 meses ( $p = 0.039$ ) y a los 6 meses ( $p = 0.008$ ). Por el contrario, el porcentaje de localizaciones que experimentaron una pérdida en el NIC  $\geq 2$ mm fue más pronunciado en el grupo placebo en comparación al grupo test a los 2 meses ( $p = 0.041$ ) y a los 6 meses ( $p = 0.072$ ). El porcentaje de bolsas que se convirtieron

de  $\geq 4$ mm al inicio del estudio a  $\leq 3$ mm a los 2 meses, no pudo demostrar una diferencia estadísticamente significativa ( $p=0.112$ ) mientras que, a los 6 meses, la diferencia entre los grupos demostró significación estadística ( $p=0.038$ ).

### **Efectos adversos, terapia antimicrobiana concomitante y colaboración con la ingesta de la medicación.**

En la visita de control de la primera semana, 11 sujetos del grupo test (55%) y 4 sujetos del grupo placebo (19%) refirieron algún efecto adverso. En la visita de control de la semana 5, solo 2 sujetos (10%) del grupo test y 1 sujeto (4.8%) del grupo placebo refirieron seguir experimentando efectos adversos. Los tipos de efectos adversos referidos por los sujetos en las visitas de control de las semanas 1 y 5 se describen en la tabla 7. A dos sujetos (1 del grupo test y otro del grupo placebo) se les practicó una extracción dental durante el periodo de estudio. Los valores al comienzo del estudio de estos 2 dientes fueron desplazados durante todo el análisis. Un sujeto del grupo test perdió 3 de sus dientes anteriores debido a un accidente, entre las visitas de los 2 y los 6 meses. Los valores obtenidos en la evaluación de los 2 meses de estos 3 dientes se usaron durante la valoración de los 6 meses.

El uso de terapia antimicrobiada adicional se anotó durante el periodo de estudio. Dos sujetos del grupo test recibieron tratamiento antibiótico con amoxicilina por motivos médicos, mientras que ningún sujeto del grupo placebo fue sometido al uso concomitante de agentes antimicrobianos.

La colaboración del sujeto con la ingesta de la medicación fue analizada mediante el requerimiento de la devolución de los frascos que contenían la medicación y la cuantificación del número de comprimidos no ingeridos por el sujeto.

El 100% de los sujetos devolvieron los frascos que contenían la medicación (test o placebo). 16 sujetos (80%) del grupo test and 19 sujetos del grupo placebo (90.5%) completaron el tratamiento prescrito con la medicación sistémica.

Las razones argumentadas por los 4 sujetos del grupo test que no colaboraron con la ingesta de la medicación fueron las siguientes: 2 sujetos refirieron cuadros de diarrea, 1 sujeto refirió vómitos y el último olvidó completar todo el tratamiento.

El porcentaje del número comprimidos totales no ingeridos por estos 4 sujetos fue de 38%, 45%, 52% y 9% respectivamente.

**Tabla 1.**  
Características de los sujetos al inicio del estudio

<b>Parametro</b>	<b>Grupo Test N=20</b>	<b>Grupo Placebo N=21</b>	<b>Valor p</b>
<b>Edad Media (95% I.C.)</b>	31.3 (28.8,33.7)	31.7 (29.4,34.1)	0.779 <i>t</i> -Student
<b>Mujeres Numero de sujetos (porcentaje)</b>	16 (80%)	12 (57%)	0.108 Chi-cuadrado
<b>Fumadores Numero de sujetos (porcentaje)</b>	5 (25%)	4 (19%)	0.719 Chi-cuadrado
<b>Caucasianos Numero de sujetos (porcentaje)</b>	13 (65%)	10 (47.6%)	0.530 Chi-cuadrado
<b>Numero de dientes presentes al inicio del estudio. Media(95% I.C)</b>	25.5 (24.5, 26.6)	26.0 (25.0, 27.0)	0.482 <i>t</i> -Student
<b>Numero de bolsas con PBS <math>\geq</math> 5 mm Media (95% I.C.)</b>	60.8 (46.3, 75.3)	58.4 (46.74, 70.20)	0.795 <i>t</i> -Student
<b>Porcentaje de bolsas con PBS <math>\geq</math> 5 mm al inicio del estudio. Mediana (A.I.)</b>	35.5 (26.6, 47.3)	31.5 (24.4, 48.1)	0.514 Mann-Whitney
<b>Indice de placa general Mediana (A.I.)</b>	25.5 (13.3, 36.8)	20.0 (10.0, 29.0)	0.155 Mann-Whitney
<b>Indice de sangrado general Mediana (A.I.)</b>	61.5 (50.8, 74.8)	55.0 (35.5, 66.5)	0.175 Mann-Whitney

**Tabla 2.** Medias de las variables de resultados clínicas al inicio del estudio y diferencias 0-2 meses y 0-6 meses.

Resultados Clínicos Media (95% I.C.)	Grupo	Inicio del estudio 0 meses	Diferencia entre 0-2 meses	Diferencia entre 0-6 meses	Valor p t de Student (muestras relacionadas)	
					Diferencia 0-2 meses	Diferencia 0-6 meses
Media PBS de toda la boca	Placebo	4.1 (3.6, 4.5)	0.8 (0.6, 1.1)	0.7 (0.4, 1.0)	<0.001	<0.001
	Test	4.1 (3.6, 4.5)	1.1 (0.9, 1.4)	1.2 (0.9, 1.4)	<0.001	<0.001
Media PBS en bolsas iniciales ≤ 3mm	Placebo	2.3 (2.2, 2.4)	0.2 (0.1, 0.3)	-0.1 (-0.2, 0.0)	0.003	0.052
	Test	2.3 (2.2, 2.3)	0.2 (0.2, 0.3)	0.0 (0.0, 0.0)	<0.001	0.931
Media PBS en bolsas iniciales 4-6 mm	Placebo	5.0 (4.9, 5.1)	1.2 (0.9, 1.5)	1.0 (0.8, 1.3)	<0.001	<0.001
	Test	5.02 (4.9, 5.1)	1.7 (1.6, 1.9)	1.5 (1.3, 1.7)	<0.001	<0.001
Media PBS En bolsas iniciales ≥ 7 mm	Placebo	7.7 (7.4, 8.1)	2.1 (1.6, 2.5)	1.8 (1.3, 2.3)	<0.001	<0.001
	Test	7.7 (7.5, 7.9)	3.0 (2.6, 3.3)	3.1 (2.7, 3.5)	<0.001	<0.001
Media NIC de toda la boca	Placebo	4.8 (4.1, 5.5)	0.5 (0.3, 0.6)	0.5 (0.2, 0.7)	<0.001	<0.001
	Test	4.7 (4.1, 5.2)	0.7 (0.5, 0.8)	0.8 (0.7, 0.9)	<0.001	<0.001
Media NIC en bolsas iniciales ≤ 3mm	Placebo	3.2 (2.7, 3.7)	0.0 (-0.1, 0.1)	0.0 (-0.2, 0.1)	0.683	0.704
	Test	2.9 (2.6, 3.1)	0.0 (-0.01, 0.1)	0.0 (-0.1, 0.1)	0.631	0.634
Media NIC en bolsas iniciales 4-6mm	Placebo	5.7 (5.2, 6.2)	0.8 (0.5, 1.0)	0.8 (0.5, 1.1)	<0.001	<0.001
	Test	5.7 (5.3, 6.1)	1.1 (1.0, 1.2)	1.3 (1.2, 1.4)	<0.001	<0.001
Media NIC en bolsas iniciales ≥ 7mm	Placebo	8.2 (7.5, 8.9)	1.3 (1.0, 1.6)	1.3 (1.0, 1.6)	<0.001	<0.001
	Test	8.1 (7.7, 8.4)	1.8 (1.6, 2.1)	2.3 (2.0, 2.5)	<0.001	<0.001

**Tabla 3**

Análisis de covarianza para la reducción en PBS y la ganancia en NIC a los 2 y 6 meses en las distintas categorías de bolsas.

Modelos “ancova”	Parámetro	Diferencia 0-2 meses		Diferencia 0-6 meses	
		Estimación (95% I.C.)	Valor P	Estimación (95% I.C.)	Valor p
<b>Reducción media de la PBS de toda la boca</b>	Grupo de tratamiento (test-placebo)	0.3 (0.1, 0.5)	0.002	0.5 (0.2, 0.7)	0.001
	Tabaco (no-si)	0.4 (0.1, 0.7)	0.007	0.4 (0.1, 0.7)	0.040
<b>Reducción de la media de la PBS en bolsas 4-6mm</b>	Grupo de tratamiento (test-placebo)	0.5 (0.2, 0.8)	0.001	0.4 (0.1, 0.7)	0.005
	Tabaco (no-si)	0.4 (0.0, 0.8)	0.050	0.2 (-0.1, 0.6)	0.183
<b>Reducción de la media de la PBS en bolsas ≥7mm</b>	Grupo de tratamiento (test-placebo)	0.9 (0.4, 1.5)	0.001	1.4 (0.8, 2.0)	<0.001
	Tabaco (no-si)	0.9 (0.3, 1.5)	0.007	1.0 (0.3, 1.7)	0.007
<b>Ganancia de NIC media en sitios con PBS inicial ≥7mm</b>	Grupo de tratamiento (test-placebo)	0.6 (0.2, 0.9)	0.002	1.0 (0.7, 1.3)	<0.001
	Tabaco (no-si)	0.6 (0.2, 1.0)	0.005	0.7 (0.3, 1.1)	0.001
<b>Ganancia de NIC media en sitios con PBS inicial ≥7mm</b>	Grupo de tratamiento (test-placebo)	-0.2 (-0.4, 0.0)	0.650	0.5 (0.2, 0.8)	0.001
	Tabaco (no-si)	0.0 (-0.4, 0.2)	0.203	0.0 (-0.3, 0.4)	0.903



**Tabla 4** Porcentaje de bolsas al inicio del estudio y diferencias entre 0-2 meses y 0-6 meses

Mediana del porcentaje (A.I)	Grupo	Inicio Del estudio	Diferencia entre 0- 2 meses	Diferencia entre 0-6 meses	Valor P Test Wilcoxon signed-ranks	
					Diferencia 0-2 meses	Diferencia 0-6 meses
Porcentaje de bolsas $\geq 4$ mm	Placebo	45.8 (33.7, 60.0)	15.3 (9.4, 24.2)	14.9 (7.6, 24.8)	<0.001	<0.001
	Test	46.3 (37.6, 57.4)	19.6 (16.1, 28.5)	21.3 * (14.6, 32.0)	<0.001	<0.001
Porcentaje de bolsas $\geq 5$ mm	Placebo	31.5 (24.9, 48.1)	17.3 (10.9, 24.7)	17.3 (9.2, 23.1)	<0.001	<0.001
	Test	35.5 (26.6, 47.3)	22.1 * (19.5, 30.2)	24.1 ** (19.2, 32.8)	<0.001	<0.001
Porcentaje de bolsas $\geq 6$ mm	Placebo	18.0 (13.0, 31.0)	11.9 (7.0, 18.3)	11.9 (4.1, 16.3)	<0.001	<0.001
	Test	22.1 (13.2, 28.9)	16.4 * (11.5, 27.5)	18.2 ** (10.7, 27.7)	<0.001	<0.001
Porcentaje de bolsas $\geq 7$ mm	Placebo	9.0 (5.2, 17.3)	6.0 (1.0, 11.5)	5.3 (0.7, 10.5)	<0.001	0.001
	Test	12.0 (5.8 , 19.0)	10.5 * (5.7, 16.6)	10.8 * (5.6, 17.6)	<0.001	<0.001

\* Diferencia significativa entre los grupos favoreciendo el grupo test (P<0.05)

\*\*Diferencia significativa entre los grupos favoreciendo el grupo test (P<0.02)

**Tabla 5** Análisis del IPG y el ISG al inicio del estudio (tras las instrucciones de higiene oral) y de

las diferencias 0-2 meses y 0-6 meses.

Mediana (A.I)	Grupo	Inicio del estudio	Diferencia 0- 2 meses	Diferencia 0-6 meses	Valor p Test Wilcoxon signed-ranks	
					Diferencia 0-2 meses	Diferencia 0-6 meses
<b>Indice de placa general(%) (IPG)</b>	Placebo	20.0 (10.0, 29.0)	3.0 (-1.0, 7.0)	0.0 (-2.5, 8.0)	0.029	0.112
	Test	25.5 (13.3, 36.8)	6.0 (-3.8, 19.0)	1.0 (-5.0, 15.0)	0.038	0.170
<b>Indice de sangrado general(%) (ISG)</b>	Placebo	55.0 (35.5, 66.5)	17.0 (10.0, 32.5)	21.0 (9.5, 28.5)	<0.001	0.001
	Test	61.5 (50.8, 74.8)	34.5** (27.3, 34.5)	32.0** (26.0, 39.0)	<0.001	<0.001

\*\*Diferencias significativa entre los grupos favoreciendo al grupo test (P<0.02)

**Tabla 6.** Porcentaje de localizaciones con cambios clínicamente relevantes en los grupos test y placebo a los 2 y los 6 meses

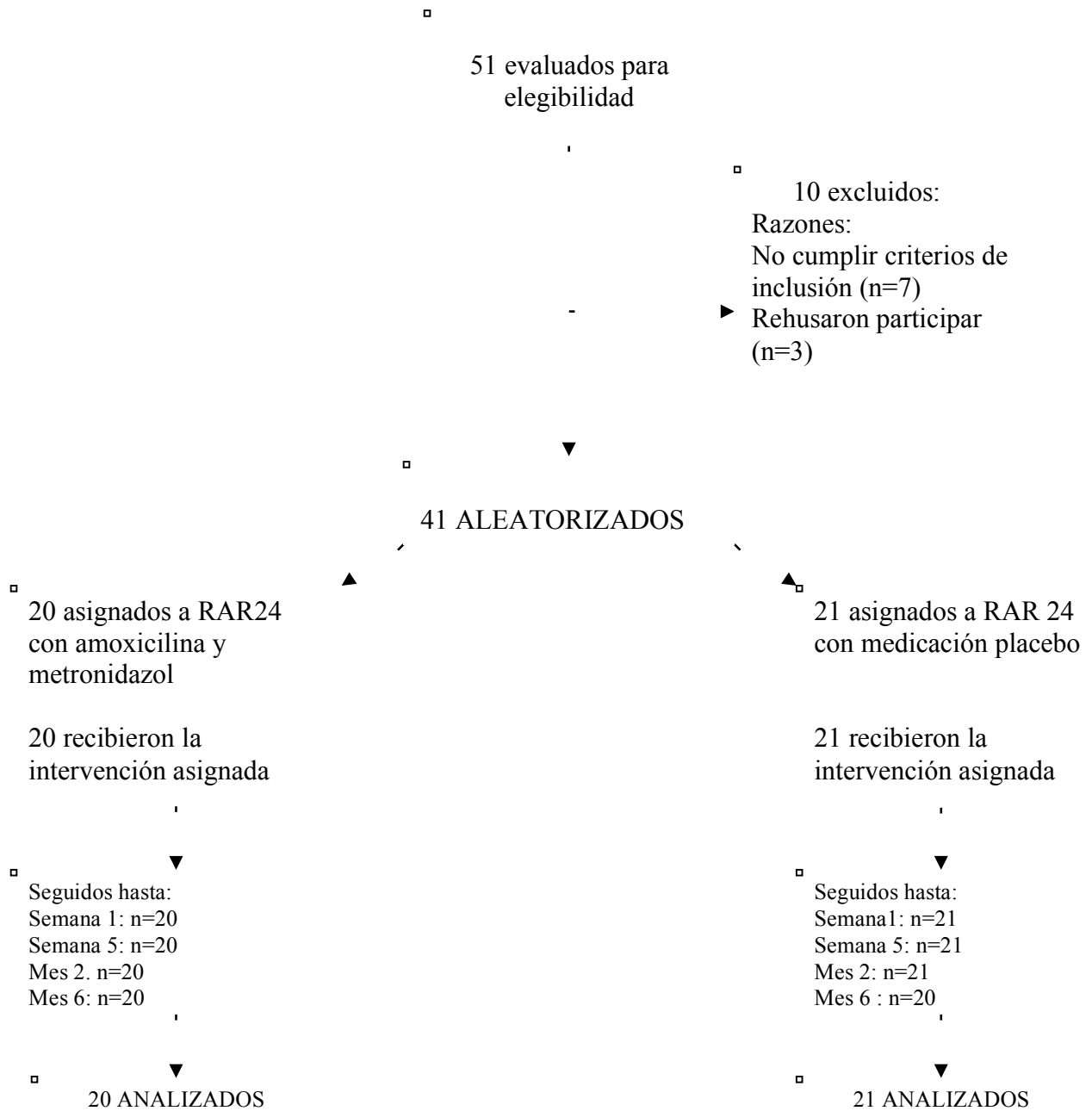
Mediana del porcentaje (A.I)	Datos 0-2 meses			Datos 0-6 meses		
	Grupo Test	Grupo Placebo	Valor p Test Mann-Whitney	Grupo Test	Grupo Placebo	Valor p Test Mann-Whitney
Porcentaje de localizaciones con Ganancia de NIC $\geq 2$ mm	19.6 (15.5, 26.2)	14.3 (8.6, 21.3)	0.047	25.4 (18.5, 34.1)	16.1 (8.8, 24.9)	0.028
Porcentaje de localizaciones con reduccion en PBS $\geq 2$ mm	29.4 (23.9, 43.8)	20.8 (10.5, 32.7)	0.029	30.2 (21.1, 46.6)	20.8 (8.6, 32.7)	0.021
Porcentaje de localizaciones con pérdida de NIC $\geq 2$ mm	1.3 (0.3, 3.5)	3.0 (1.8, 5.4)	0.041	1.5 (1.2, 2.3)	3.3 (1.5, 5.5)	0.072
Porcentaje de bolsas convertidas de $\geq 5$ mm al inicio a $\leq 4$ a los 2 meses	71.2 (63.3, 78.2)	56.6 (30.4, 72.7)	0.039	74.1 (63.7, 83.5)	54.2 (29.1, 75.7)	0.008
Porcentaje de localizaciones con Ganancia de NIC $\geq 2$ mm	49.0 (42.9, 60.6)	41.6 (21.1, 58.1)	0.112	55.2 (38.9, 65.2)	37.2 (18.0, 56.4)	0.038

**Tabla 7** Tipos de efectos adversos en las visitas de control de las semanas 1 y 5.

<b>Tipo de efecto adverso Numero (porcentaje) de sujetos</b>	<b>Visita de control</b>	<b>Grupo Test N=20</b>	<b>Grupo Placebo N=21</b>
<b>Alteraciones estomacales(nauseas y vomitos)</b>	1-semana	3(15%)	0
	5-semana	1(5%)	0
<b>Alteraciones gastro-intestinales (diarrea)</b>	1-semana	3(15%)	0
	5-semana	0	0
<b>Dolor de cabeza</b>	1-semana	1(5%)	0
	5-semana	0	0
<b>Absceso periodontal</b>	1-semana	0	2 (9.5%)
	5-semana	0	0
<b>Pérdida de dientes/extracción dental</b>	1-semana	0	0
	5-semana	1(5%)	1(4.8%)
<b>Sabor metálico</b>	1-semana	1(5%)	0
	5-semana	0	0
<b>Alteración tisular intraoral</b>	1-semana	0	2 (9.5%)
	5-semana	0	0
<b>Mal estar general (irritabilidad, etc.)</b>	1-semana	3 (15%)	0
	5-semana	0	0

## Figura 1

### Seguimiento de los sujetos del estudio



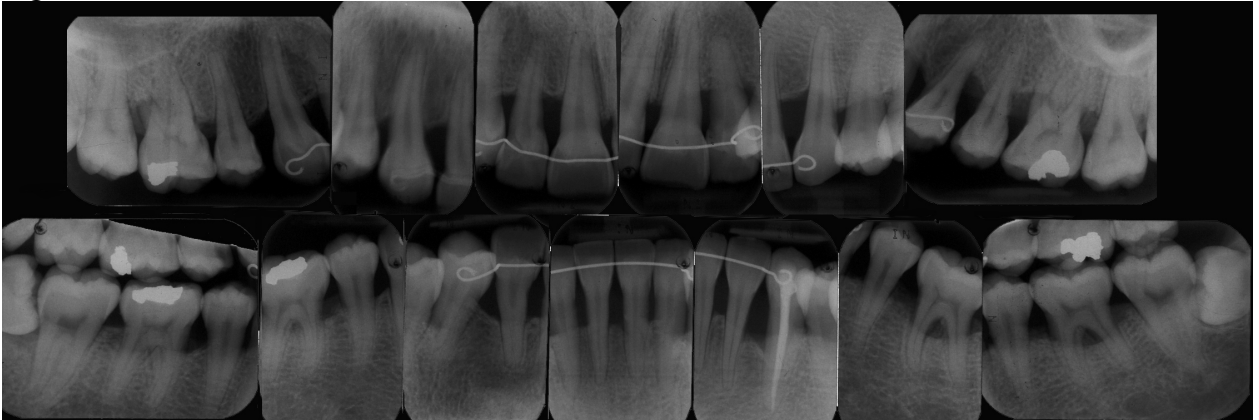
**Figura 2.**

Fotografía clínica (Figure 2.A) y serie periapical al inicio del estudio (Figure 2.B) de una paciente fumadora (8 cig./día) de 21 años de edad. Presentaba un índice de placa del 24%, un índice de sangrado de 68% y 70 localizaciones con bolsas de 5 mm o más.

Figura 2.A



Figura 2.B



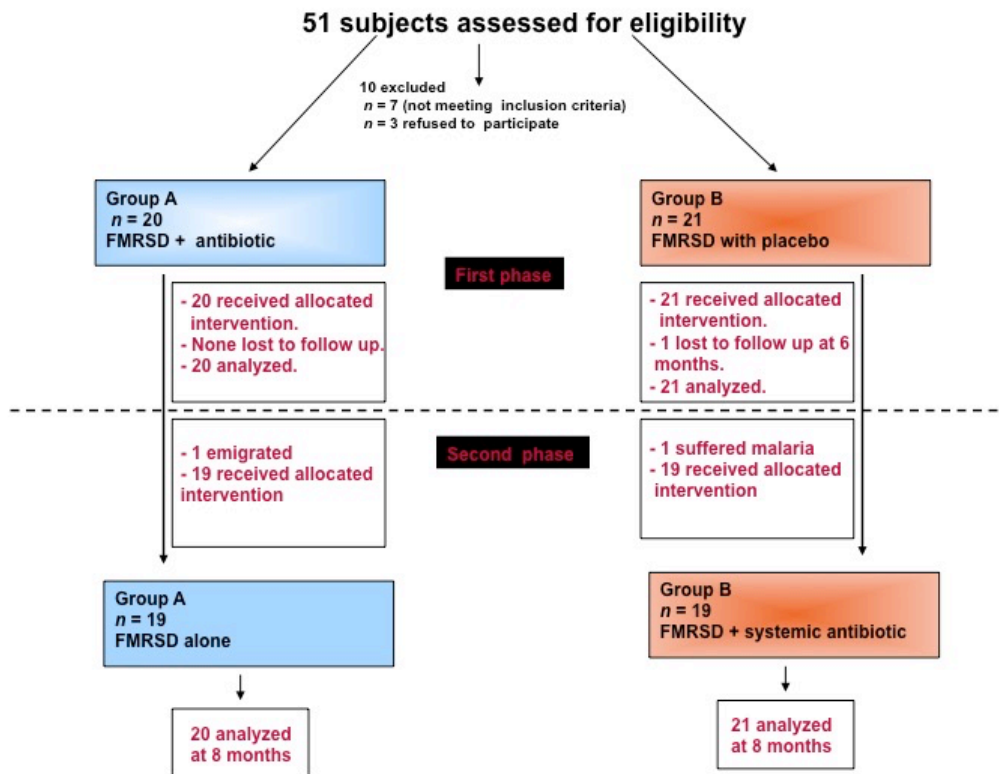
Estudio 2. *Amoxicillin and metronidazole as an adjunctive treatment in generalized aggressive periodontitis at initial therapy or re-treatment: a randomized controlled clinical trial.*

La figura 3 muestra la que aconteció desde el reclutamiento de los pacientes hasta la finalización del estudio 2.

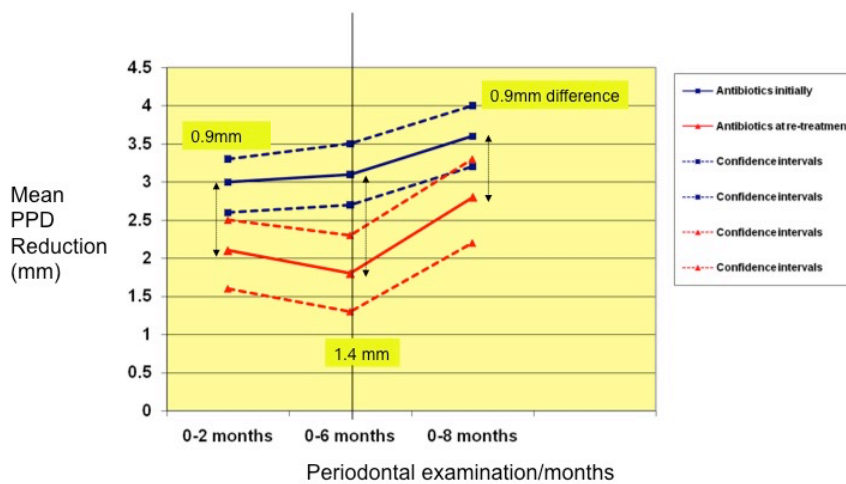
La figura 4 muestra las diferencias de medias en el cambio de PBS de 0 a 2 meses, de 0 a 6 meses y de 0 a 8 meses en las bolsas profundas ( $\geq 7$  mm). La línea roja sólida (antibióticos en la fase de retratamiento) muestra la instrumentación solo en la primera fase, que en el periodo 0-2 meses da una reducción media de PBS de 2,1 mm. La línea azul sólida (antibióticos en el tratamiento inicial) muestra que el uso complementario de los antimicrobianos dio una reducción adicional de 0,9 mm. En el periodo 0-6 meses la instrumentación solo (grupo placebo) muestra cierta recuperación, mientras que los antimicrobianos coadyuvantes muestran una mejora continua. Este hecho magnifica las diferencias entre los grupos de tratamiento, que en esta etapa fue de 1,4 mm. Estos datos fueron reportados previamente en forma de tabla en el estudio 1. En el periodo 0-8 meses hubo una gran mejora en la línea roja, ya que este grupo ya había recibido la instrumentación además de los antibióticos. Hubo una ligera mejora de la línea azul, ya que había sido objeto de más instrumentación. La línea azul todavía mostró una mejora de 0,9 mm en la media de reducción de PBS sobre la línea roja.

El resto de los resultados secundarios pueden encontrarse en el estudio 2 del anexo.

**Figura 3.** Diagrama de la transición del estudio 1 al 2



**Figura 4.** Resultados sobre la variable de resultado primaria (reducción en PBS en bolsas  $\geq 7$ mm a los 2, 6 y 8 meses).





Estudio 3. *Impact of baseline microbiological status on clinical outcomes in generalized aggressive periodontitis patients treated with or without adjunctive amoxicillin and metronidazole: an exploratory analysis from a randomized controlled clinical trial.*

VARIABLES CLÍNICAS Y ESTADO MICROBIOLÓGICO

*Interacción entre el estado microbiológico y el efecto del tratamiento (variable de resultado primaria)*

La Tabla 8 muestra los resultados de la interacción entre el estado microbiológico al inicio del estudio y el efecto del tratamiento (test o placebo) sobre la reducción de la PBS en las bolsas con profundidades iniciales  $\geq 7$  mm a los 6 meses, para cada una de las bacterias estudiadas en modelos ANCOVA separados, para determinar si el estado microbiológico modificó el efecto de la terapia antimicrobiana en toda la totalidad de la muestra estudiada. El término de interacción del efecto del tratamiento x estado microbiológico no resultó ser estadísticamente significativa para ninguno de los 3 principales patógenos periodontales ( $P = 0,136$ ,  $P = 0,238$ ,  $P = 0,751$ , respectivamente, para *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* y *T. forsythia*), mientras que el tabaquismo y el grupo de tratamiento (test o placebo) demostraron ser cofactores significativos en los 3 modelos.

*Modificación del efecto de tratamiento*

La Tabla 9 muestra las diferencias de medias entre los grupos test y placebo a los 6 meses para la reducción PBS y la GIC en los subgrupos de sujetos que albergaron o no albergaron *A. actinomycetemcomitans* al inicio del estudio (*Aa +* o *Aa-* respectivamente).

En sujetos *Aa+*, la diferencia entre el grupo de test y el grupo placebo en la reducción de PBS en las bolsas  $\geq 7$  mm a los 6 meses fue de 1,8 mm (95% intervalo de confianza [IC] del 0,9-2,8) a favor del grupo de test ( $P = 0,001$ ). Esto fue consistente en el subgrupo de sujetos *Aa-* ( $P = 0,045$ ), con una menor magnitud en la diferencia (1,0 mm; IC del 95%: 0,0 a 1,9). En las bolsas moderadas (4-6 mm), la diferencia entre los sujetos del grupo test y los del grupo placebo fue de 0,7 mm (95% IC 0,3-1,1) para la reducción del PPD que sólo fue significativa para los sujetos *Aa +* ( $p = 0,001$ ), mientras que en los sujetos *Aa-*, la diferencia fue de 0,1 mm (IC 95% -0,2 a 0,5) y no fue estadísticamente significativa ( $P = 0,512$ ). Para la GIC en las bolsas profundas y

moderadas, las diferencias entre los sujetos Aa + y Aa- fueron muy similares. Sin embargo, la GIC en bolsas moderadas mostró una diferencia estadísticamente significativa entre el grupo test y el grupo placebo en el subgrupo de sujetos Aa- ( $P = 0,002$ ) que no se repitió en los Aa + ( $P = 0,058$ ).

La tabla 10 muestra los porcentajes de los sitios con cambios clínicamente relevantes en el grupo test y el grupo placebo, analizados en subgrupos de sujetos Aa + y Aa-. En los sujetos Aa + el porcentaje de sitios de conversión de  $\geq 5$  mm al inicio del estudio a  $\leq 4$  mm a los 6 meses, y de  $\geq 4$  mm al inicio del estudio a  $\leq 3$  mm a los 6 meses, fue mayor en el grupo test ( $P = 0,025$  y  $P = 0,016$ , respectivamente). En sujetos Aa-, no se detectaron diferencias estadísticamente significativas.

*El análisis secundario de subgrupos de exploración dentro de cada uno de los grupos de tratamiento (de test o placebo).*

En el grupo de test (Tabla 11) se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre sujetos Aa + y Aa-, mientras que esta misma no se observó cuando se utiliza la presencia o ausencia de *P. gingivalis* o *T. forsythia* como el factor de agrupación (datos no mostrado). En bolsas 4-6 bolsas, una diferencia ajustada de 0,4 mm para la reducción de la PBS a los 6 meses favoreció a los sujetos Aa + (ANCOVA,  $P = 0,028$ ). En las bolsas  $\geq 7$  mm, esta diferencia fue de una magnitud más grande: 0,6 mm a los 6 meses (ANCOVA,  $P = 0,036$ ). Para la GIC en los sitios con una PBS  $\geq 7$  mm, los resultados fueron también significativamente mejor en sujetos Aa + ve (ANCOVA,  $P = 0,008$ ): se observó un beneficio adicional de 0,4 mm a los 6 meses. El tabaquismo resultó ser un cofactor importante para la PBS en bolsas moderadas y profundas así como para la GIC en bolsas profundas. No se encontraron más beneficios estadísticamente significativos para el resto de las variables de resultado clínicas exploradas a los 6 meses en el grupo de test o dentro del grupo placebo (datos no mostrados).

#### Detección microbiológica

El número y el porcentaje de sujetos que dieron positivo a niveles detectables de los 3 principales patógenos periodontales al inicio del estudio, 2 meses y 6 meses se muestran en la Tabla 12. Se observó una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos en la detección de *P. gingivalis* en 2 y 6 meses ( $p = 0,009$  y  $p = 0,043$ , respectivamente) y en la detección de *T. forsythia* a los 6 meses ( $p = 0,043$ ), que favoreció al grupo test

en ambos casos. La diferencia en la detección de *A. actinomycetemcomitans* a los 2 y 6 meses, aunque menos marcada en los sujetos del grupo test, no fue estadísticamente significativa en relación a los sujetos tratados con placebo. Por otro lado, el Log10 de unidades de *A. actinomycetemcomitans* formadoras de colonias, *P. gingivalis* y *T. forsythia* no mostró diferencias entre los grupos en cualquier punto de tiempo (datos no mostrados), mientras que un análisis de subgrupos realizado en sujetos que dieron positivo a esas bacterias al inicio del estudio (Tabla 13), mostraron diferencias estadísticamente significativas, intragrupo y algunas entre grupos, al inicio del estudio, los 2 meses y los 6 meses de visitas.

#### *Resistencia a los antibióticos a la amoxicilina y metronidazol*

La mediana del porcentaje y el rango intercuartil de la microbiota anaerobia total, que era resistente a la amoxicilina en los grupos de test y placebo al inicio del estudio, a los 2 meses y a los 6 meses se representa en la Tabla 13. Las comparaciones intragrupo entre los diferentes puntos de examen mostraron un aumento estadísticamente significativo en la resistencia dentro del grupo de test entre el inicio del estudio y la evaluación de los 2 meses (Test de Wilcoxon Rank,  $p = 0,009$ ), así como una disminución significativa entre las evaluaciones de los 2 meses y los 6 meses ( $P = 0,008$ ). No existieron más diferencias significativas en el grupo placebo o entre ambos grupos (test de Mann-Whitney). La mediana del porcentaje de la microbiota anaerobia total, que era resistente a metronidazol en los grupos de test y placebo mostró un perfil similar en ambos grupos de tratamiento en todos exámenes (datos no mostrados).

**Table 8.** Analysis of covariance for PPD reduction in pockets with initial PPD $\geq$ 7 mm at 6 months testing the interaction between the treatment group and the baseline status of each of the 3 main periodontal pathogens **in the whole subject sample** (PPD baseline values, microbiological baseline status, treatment group, smoking, age and ethnicity as covariates. Only significant covariates shown).

Multivariate "ANCOVA" Models	Parameter	Difference 0-6 months	
		Estimate (95% C.I.)	P. value
<b>Model 1</b>  PPD reduction in pockets with initial PPD $\geq$ 7 mm	<b>Interaction term: <i>A.a.</i> +ve at baseline x treatment group</b>	0.6 (-0.2, 1.5)	0.136
	<b>Smoking (no-yes)</b>	1.2 (0.5, 1.9)	0.002
	<b>Treatment group (test-placebo)</b>	1.1 (0.4, 1.8)	0.002
<b>Model 2</b>  PPD reduction in pockets with initial PPD $\geq$ 7 mm	<b>Interaction term: <i>P.g.</i> +ve at baseline x treatment group</b>	0.5 (-0.3, 1.3)	0.238
	<b>Smoking (no-yes)</b>	1.1 (0.3, 1.8)	0.003
	<b>Treatment group (test-placebo)</b>	1.2 (0.5, 1.8)	0.001
<b>Model 3</b>  PPD reduction in pockets with initial PPD $\geq$ 7 mm	<b>Interaction term: <i>T.f.</i> +ve at baseline x treatment group</b>	0.1 (-0.8, 1.1)	0.751
	<b>Smoking (no-yes)</b>	1.0 (-0.3, 1.7)	0.006
	<b>Treatment group (test-placebo)</b>	1.3 (0.3, 2.2)	0.009

PPD, probing pocket depth.

*A.a.* +ve, detection of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

*P.g.* +ve, detection of *Porphyromonas gingivalis*

*T.f.* +ve, detection of *Tannerella forsythia*

**Table 9.** Mean differences between test and placebo groups, at 6 months, for PPD reduction and gain in attachment in subgroups of subjects harbouring (*A.a.+ve*) or not harbouring (*A.a.-ve*) *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* at baseline.

Multivariate “ANCOVA” models for study subgroups	Clinical parameter	Mean difference Test-placebo (0-6 months)* (95% C.I.)	P value	Covariates
<i>A.a.+ve</i> at baseline (N=20)	PPD reduction in pockets $\geq$ 7 mm	1.8 (0.9, 2.8)	0.001	Baseline status, smoking
	PPD reduction in pockets 4-6 mm	0.7 (0.3, 1.1)	0.001	-
	gain in attachment at sites with initial PPD $\geq$ 7 mm	1.2 (0.7, 1.8)	<0.001	Smoking
	gain in attachment at sites with initial PPD 4-6 mm	0.5 (0.0, 1.0)	0.058	Baseline status
<i>A.a.-ve</i> at baseline (N=21)	PPD reduction in pockets $\geq$ 7 mm	1.0 (0.0, 1.9)	0.045	-
	PPD reduction in pockets 4-6 mm	0.1 (-0.2, 0.5)	0.512	-
	gain in attachment at sites with initial PPD $\geq$ 7 mm	0.9 (0.4, 1.4)	0.001	-
	gain in attachment at sites with initial PPD 4-6 mm	0.4 (0.1, 0.7)	0.002	-

\* Difference favoring the test group.  
PPD, probing pocket depth.

**Table 10.** Percentage of sites with clinically relevant changes in test and placebo groups, at 6 months, in subgroups of subjects harboring (*A.a.* +ve) or not harboring (*A.a.* -ve) *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* at baseline.

Parameter	<i>A.a.</i> +ve at baseline			<i>A.a.</i> -ve at baseline		
	Test group (N=9)	Placebo group (N=11)	P value	Test group (N=11)	Placebo group (N=10)	P value
Percentage (IQ) of sites converting from $\geq 5$ mm at baseline to $\leq 4$ mm after treatment	80.9 (61.1, 92,0)	52.6 (22.2, 74,0)	0.025	71.1 (64.1, 74.1)	60.9 (35.0, 77,4)	0.223
Percentage (IQ) of sites converting from $\geq 4$ mm at baseline to $\leq 3$ mm after treatment	60.0 (46.0, 71.2)	35.1 (17.0, 51.1)	0.016	44.4 (38.9, 57.3)	46.0 (28.3, 60.0)	0.705
Percentage (IQ) of sites with $\geq 2$ mm gain in attachment	29.3 (18.5, 34,3)	17.5 (8.9, 33,3)	0.175	24.7 (16.1, 31.3)	14.7 (8.6, 22.6)	0.072
Percentage (IQ) of sites with $\geq 2$ mm PPD reduction	31.5 (26.8, 46,1)	18.3 (8.3, 38,2)	0.067	24.7 (14.6, 42.7)	21.2 (11.3, 30.9)	0.197

PPD, probing pocket depth  
IQ, Interquartile range

**Table 11.** Analysis of covariance for PPD reduction and gain in attachment at 6 months in moderate and deep pockets in the test group (Baseline detectable levels of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* and *Tannerella forsythia*, PPD baseline values, smoking, age and ethnicity as covariates. Only significant covariates shown)

Multivariate "ANCOVA" analysis Models	Parameter	Difference 0-6 months TEST GRUOP	
		Estimate (95% C.I.)	P. value
Mean PPD reduction in pockets $\geq 7$ mm	<i>A.a.</i> +ve at baseline (yes-no)	0.6 (0.0, 1.2)	0.036
	Smoking (no-yes)	1.2 (0.6, 1.9)	0.010
Mean PPD reduction in pockets 4-6 mm	<i>A.a.</i> +ve at baseline (yes-no)	0.4 (0.0, 0.7)	0.028
Mean gain in attachment at sites with initial PPD $\geq 7$ mm	<i>A.a.</i> +ve at baseline (yes-no)	0.4 (0.1, 0.7)	0.008
	Smoking (no-yes)	1.1 (0.7, 1.4)	0.001
Mean gain in attachment at sites with initial PPD 4-6mm	<i>A.a.</i> +ve at baseline (yes-no)	0.2 (-0.0, 0.4)	0.155

PPD, Probing pocket depth

*A.a.* +ve, detection of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

**Table 12.** Number (percentage) of subjects that showed the presence of the 3 main periodontal pathogens above detectable levels at baseline, 2 months and 6 months.

Number (%)	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>			<i>Porphyromonas gingivalis</i>			<i>Tannerella forsythia</i>		
	Baseline	2-months	6-months	Baseline	2-months	6-months	Baseline	2-months	6-months
<b>Test group N=20</b>	9 (45%)	1 (5%)	2 (10%)	8 (40%)	0 (0%)	3 (15%)	15 (75%)	3 (15%)	3 (15%)
<b>Placebo Group N=21</b>	11 (52.4%)	6 (28.6%)	5 (23.8%)	13 (61.9%)	7 (17.1%)	10 (47.6%)	14 (66.7%)	5 (23.8%)	10 (47.6%)
<b>P-value X<sup>2</sup> test Test vs. placebo</b>	0.758	0.093	0.410	0.217	0.009	0.043	0.734	0.697	0.043



**Table 13.** Geometric mean of colony forming units (95% C.I) of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*A.a.*), *Porphyromonas gingivalis* (*P.g.*) and *Tannerella forsythia* (*T.f.*) in positive samples at baseline and differences between 0-2 and 0-6 months.

Mean (95% C.I.)	Treatment group	Baseline Log <sub>10</sub> CFU/mL	Difference Between 0-2 months Log <sub>10</sub> CFU/mL	Difference Between 0-6 months Log <sub>10</sub> CFU/mL	P value Paired samples t-test	
					Difference 0-2 months	Difference 0-6 months
<b><i>A.a.</i></b>	Test N=9	4.3 (3.4, 5.2)	3.1 (2.0, 4.1)	3.3* <sup>b</sup> (2.5, 4.2)	0.001	<0.001
	Placebo N=11	4.5 (3.7, 5.4)	2.1 (1.1, 3.2)	2.1 (0.6, 3.7)	0.006	0.012
<b><i>P.g.</i></b>	Test N=8	6.1 (5.4, 6.9)	5.2* (4.5, 6.0)	4.1 (1.9, 6.3)	<0.001	0.003
	Placebo N=13	6.2 (5.8, 6.7)	3.1 (1.6, 4.5)	1.9 (0.3, 3.4)	0.001	0.020
<b><i>T.f.</i></b>	Test N=15	6.3 (6.0, 6.5)	4.7 (3.7, 5.6)	5.0* (4.4, 5.6)	<0.001	0.023
	Placebo N=14	6.2 (5.9, 6.4)	4.3 (3.2, 5.3)	3.1 (1.5, 4.7)	<0.001	0.004

\*Significant differences between groups favoring test treatment (p<0.03, ANCOVA adjusting for smoking, baseline values, age and ethnicity)

<sup>b</sup>Baseline values as a significant cofactor.

**Table 14.** Median percentage (IQ) of the total anaerobic microbiota resistant to amoxicillin in the test and placebo groups at baseline, 2 months and 6 months.

<b>% of total anaerobic microbiota resistant to amoxicillin (median IQ)</b>	<b>Baseline</b>	<b>2 months</b>	<b>6 months</b>
<b>Test*</b>	5.5 (1.0, 13.7)	28.3 (10.1, 64.6)	4.9 (0.9, 12.2)
<b>Placebo</b>	7.0 (1.5, 34.3)	11.9 (5.9, 43.3)	4.1 (0.9, 22.4)

\* Intragroup significant differences within the test group between baseline and 2 months (P=0.009, Wilcoxon Sign Rank Test) and between 2 months and 6 months (P=0.008). No intergroup significant differences were found (Mann-Whitney Test) for any of the time points  
 IQ, Interquartile range

## IX. Discusión

El presente trabajo ha evaluado, mediante una serie de estudios clínicos, el efecto coadyuvante de la combinación antimicrobiana sistémica de amoxicilina y metronidazol, originalmente propuesta por Van Winkelhoff et al. (1989), para el tratamiento de la periodontitis agresiva generalizada (PAG)

El primer estudio (Guerrero et al 2005), en el contexto de un ensayo clínico aleatorizado y controlado (ECAC), ha evaluado los beneficios clínicos adicionales de la combinación de AMOX-MET sistémica en un grupo de pacientes con periodontitis agresiva generalizada, mediante la valoración de un examinador calibrado y enmascarado, y usando la reducción en la PBS en bolsas  $\geq 7$  mm como variable de resultado primario. Además se han analizado una serie de variables de resultado secundarias, así como la incidencia de efectos adversos de la medicación y la adherencia de los sujetos al régimen de antimicrobianos.

El segundo estudio (Griffiths et al 2011), como continuación del ECAC (Guerrero et al 2011), ha evaluado si el beneficio clínico adicional de la combinación de AMOX-MET es mayor como parte del tratamiento inicial, o como parte del re tratamiento de las lesiones residuales registradas a los 6 meses. Para ello a los pacientes que previamente recibieron medicación placebo en el estudio 1 (AB2) se les prescribió la misma combinación antimicrobiana (AMOX-MET) a los 6 meses de manera coadyuvante a la re instrumentación de las bolsas  $\geq 5$  mm, mientras que los pacientes del grupo test del estudio 1 (AB1) solo recibieron re instrumentación de las bolsas  $\geq 5$  mm. Estos pacientes completaron un seguimiento adicional de 2 meses (8 meses desde el inicio del estudio 1). Las variables de resultados usadas fueron las mismas que las evaluadas en el estudio 1, y fueron obtenidas por el mismo examinador calibrado del estudio 1

El tercer estudio (Guerrero et al. 2014), a través de un análisis secundario del estudio 1, ha evaluado si el efecto adicional de AMOX-MET fue más beneficioso para aquellos pacientes que albergaban *A. Actinomycetemcomitans*, u otras especies bacterianas, en comparación con aquellos pacientes que no albergaban estas especies al inicio del estudio. El análisis primario se ha realizado sobre toda la muestra de pacientes, incluyendo la presencia de estas especies al inicio del estudio como un factor co

variante en un modelo multivariante. Posteriormente, se realizaron análisis por subgrupos de pacientes, analizando el efecto de la presencia de estas especies al inicio del estudio sobre los resultados clínicos de los pacientes del grupo test.

Estudio 1. *Adjunctive benefits of systemic amoxicillin and metronidazole in non-surgical treatment of generalized aggressive periodontitis: a randomized placebo-controlled clinical trial.*

Este trabajo ha sido el primer estudio clínico, aleatorizado y controlado que fue diseñado para evaluar el efecto coadyuvante de la combinación antibiótica de amoxicilina y metronidazol, originalmente propuesta por Van Winkelhoff et al. (1989), para el tratamiento de la periodontitis agresiva generalizada (PAG). Los datos han indicado que la terapia experimental ha resultado en mejoras, clínicamente significativas, a corto plazo, en los parámetros clínicos evaluados. Estos resultados han sido replicados por varios grupos de investigación y se han resumido en varias revisiones sistemáticas (Sgolastra et al. 2012, Zandbergen et al. 2013, Ravelo et al. 2015).

Como todos los sujetos fueron sometidos a sesiones de preparación antes del tratamiento, con el objetivo de instruir medidas de higiene oral y con la intención de reforzar éstas según la necesidad individual, los índices de placa fueron muy bajos desde el principio del estudio. Hubo muy poco beneficio adicional en la reducción de placa bacteriana desde el inicio del tratamiento hasta los 2 y los 6 meses, sin que existieran diferencias entre los 2 regímenes de tratamiento. Estas sesiones de pre-tratamiento, dirigidas hacia la obtención de índices de placa <20%, se incluyeron con la intención de reducir el posible impacto de un control de placa inadecuado sobre el resultado del tratamiento no-quirúrgico (Magnusson et al. 1984). Se trata de un factor de gran relevancia, teniendo en cuenta que la instrumentación de toda la boca se realizó en tan solo 2 visitas y, por este motivo, el terapeuta tuvo pocas oportunidades de proveer instrucciones de higiene oral, así como de revisar o reforzar su evolución según la necesidad de cada sujeto.

Nuestra población experimental estuvo compuesta por sujetos que presentaban las características clínicas de la PAG, de acuerdo con los criterios establecidos en la clasificación internacional de 1999 (Armitage 1999). Debido a las dificultades recientemente presentadas en relación con esta clasificación (Mombelli et al. 2002; Meyer et al. 2004), se prestó especial atención a la selección de “casos modelo”. Nuestros pacientes eran, principalmente, caucásicos, con una edad media de 31 años, que presentaban la mayoría de los dientes, aunque con una enfermedad periodontal severamente extendida (una media de 33% de localizaciones con una PBS  $\geq$ 5mm tras sondear 6 localizaciones alrededor de cada diente). Sin embargo, los sujetos no fueron seleccionados en base a un diagnóstico microbiológico. La falta de un criterio de inclusión microbiológico tuvo implicaciones en la selección del régimen antibiótico e indica que nuestros resultados son aplicables a sujetos en los que el antibiótico se va a usar de forma empírica, es decir, en aquellos casos en los que no existe una diana específica basada en un análisis microbiológico. Los resultados referentes a esta discusión se comentan más adelante a raíz de los resultados del estudio 3. No obstante, los resultados microbiológicos del tratamiento serán presentados en otro artículo.

En este estudio, hemos prescrito 500 mgrs de amoxicilina combinados con 500 mgrs de Metronidazol, 3 veces al día, durante 7 días. Esta dosis no ha sido previamente presentada en estudios clínicos. Su objetivo es, proporcionar un amplio espectro de acción y, a su vez, conseguir y mantener las concentraciones séricas por encima de la concentración mínima efectiva. El fundamento científico que apoya el concepto de la amplitud de espectro ha sido previamente debatido, y se basa en la alta prevalencia de *Actinobacillus Actinomycetemcomitans* y de patógenos anaerobios en pacientes con PAG (Sasaki et al. 1989; Kamma et al. 1994; Listgarten et al. 1995; Lopez et al. 1995; Tonetti & Mombelli 1999; Ishikawa et al. 2002; Lee et al. 2003; Takeuchi et al. 2003).

La selección de la dosis ha derivado del análisis de estudios previos realizados en pacientes con periodontitis crónica, en los que el uso de dosis marginales del antibiótico, dio lugar a la falta de beneficios coadyuvantes significativos (Van Winkelhoff et al. 1992; Winkel et al. 1997; Palmer et al. 1999). Recientemente, se ha prestado especial atención al hecho de que la cantidad de Metronidazol necesaria para que exista una concentración efectiva en los fluidos corporales se aproxima a los 20-25 mgr/kg de peso, asumiendo que una concentración insuficiente del antibiótico se podría traducir en una falta de efecto, tanto clínico como microbiológico (Van Winkelhoff et

al. 1999). Esto significa que, en un individuo adulto de 70 kgr. de peso, se necesitan de 1400 a 1750mgr de la medicación (Winkel et al. 1997). Por lo tanto, en pacientes que presentan una PAG, con una alta prevaencia de patógenos periodontales anaerobios, una dosis moderada de amoxicilina (375-500 mgr) tendrá efectos sinérgicos, en favor del metronidazol y su hidroximetabolito, frente a la bacteria *Actinobacillus Actinomycetemcomitans* (Pavicic et al. 1992), mientras que una alta dosis de metronidazol (500 mgr) tendrá como objetivo diana la microflora anaerobia.

Otros estudios clínicos han notificado, claramente, que la media de la PBS de toda la boca y los valores medios en el NIC no son los mejores métodos para describir los resultados de un estudio. En este sentido, las localizaciones poco profundas, en las cuales no se espera un cambio como resultado del tratamiento, pueden diluir, de forma significativa, los cambios observados en localizaciones más profundas que, por otro lado, son las que nos interesan desde el punto de vista terapéutico. Por lo tanto, la variable de resultado primaria seleccionada, en este caso, fue la diferencia entre los grupos de tratamiento observada en la reducción de la PBS, en localizaciones con bolsas periodontales profundas ( $\geq 7$ mm). La reducción media de la PBS a los 6 meses fue de 1.8mm (intervalo de confianza del 95% 1.3, 2.3) en el grupo placebo y 3.1 mm (2.7, 3.5) en el grupo test. Un modelo multivariante (tabla 3) determinó que el beneficio adicional en los sujetos del grupo test, tras haber tenido en cuenta fuentes potenciales de variabilidad, fue de 1.4 mm (0.8, 2.0). Debe ser tenido en cuenta que los resultados obtenidos en el grupo placebo se encontraron dentro del rango esperado tras el tratamiento periodontal no-quirúrgico en pacientes con periodontitis crónica. Cobb (1996) revisó los estudios clínicos más relevantes, relacionados con la reducción de la PBS tras el tratamiento no-quirúrgico, y observó que, en bolsas profundas (PBS  $\geq 7$ mm), la reducción media de la PBS fue de 2.2 mm. Este dato se encuentra en excelente consonancia con los obtenidos por nuestro grupo placebo, que demostró una media en la reducción de la PBS 2.1 de mm a los 2 meses y de 1.8 mm a los 6 meses. Los resultados también son comparables con aquellos del grupo control de un estudio similar, en el que se trataron a sujetos con periodontitis agresiva, con el uso coadyuvante de 3 regímenes diferentes de un solo antibiótico (Sigusch et al. 2001). Los autores de este estudio observaron una reducción de la PBS de 2.3mm en bolsas  $>6$ mm 6 meses tras el tratamiento. La similitud entre el resultado de la instrumentación subgingival en bolsas profundas, en pacientes con periodontitis crónica o con periodontitis agresiva está de

acuerdo con los informes que indican que los pacientes con periodontitis agresiva, pueden responder a la instrumentación mecánica solamente (Wennstrom et al. 1986). Por el contrario, los beneficios adicionales son más difíciles de comparar con otros estudios debido a la falta de estudios clínicos aleatorizados en pacientes con periodontitis agresiva generalizada. Herrera et al. (2002) y Haffajee et al. (2003) han publicado, recientemente, unos metaanálisis que han sugerido que el beneficio coadyuvante esperado tras el uso del antibiótico debe ser mayor en pacientes con periodontitis agresiva. Una ganancia adicional en el NIC de 0.7mm, fue observada en 7 estudios que incluyeron 231 sujetos que recibieron el antibiótico de forma coadyuvante a la instrumentación radicular por medios quirúrgicos o no quirúrgicos. En el presente estudio, el uso coadyuvante de agentes antimicrobianos resultó en un beneficio adicional de 0.5mm en la ganancia en el NIC en bolsas moderadas (4-6mm), mientras que se observó un beneficio de 1.0 mm, en bolsas profundas ( $\geq 7$ mm), en comparación con el desbridamiento radicular no-quirúrgico solamente. Nuestros sujetos del grupo test demostraron una reducción media de la PBS de 3.1mm en bolsas  $\geq 7$ mm a los 6 meses del tratamiento. Estos resultados son ligeramente inferiores, pero comparables, a los resultados obtenidos por Sigusch et al. (2001) con el uso coadyuvante de metronidazol o clindamicina, a los 6 meses. En términos de reducción de la PBS a los 6 meses, el beneficio adicional que nosotros hemos observado, en bolsas moderadas (4-6 mm), fue de 0.4mm, y el valor correspondiente, para bolsas profundas ( $\geq 7$ mm), fue de 1.4mm. Este grado de efectividad es consistente con la noción de que el beneficio del antibiótico es particularmente evidente en bolsas profundas, donde la instrumentación mecánica es menos eficaz.

El análisis multivariante identificó al hábito de fumar como un factor significativo ( $P=0.007$ ): en un paciente no fumador, las bolsas profundas se redujeron alrededor de 0.9mm más que en un paciente fumador, independientemente del grupo de tratamiento al que perteneciera. Este resultado está de acuerdo con estudios previos realizados en pacientes con periodontitis crónica, que demostraron una menor reducción de la PBS y una menor ganancia en el NIC en sujetos fumadores, al compararlos con sujetos no fumadores ( Preber and Berstromm 1986, Jin et al. 2000) o incluso en sujetos exfumadores (Grossi et al. 1997).

Para la mayoría de los profesionales clínicos, los resultados presentados como valores medios de toda la boca ofrecen una visión reducida dentro de la relevancia clínica de los

resultados. Para ilustrar los beneficios clínicos tangibles, después del análisis de la variable primaria de resultado (reducción de la PBS en bolsas  $\geq 7\text{mm}$ ), y en los otros parámetros basados en medias o medianas de toda la boca, se llevaron a cabo otros análisis secundarios. En este sentido, el tratamiento test redujo de forma significativa el porcentaje de bolsas que se mantuvieron por encima de un umbral específico, a los 2 y a los 6 meses, tras el desbridamiento subgingival (Tabla 6). Como en estudios previos (Berglundh et al. 1998), el porcentaje de todas las localizaciones que ganaron  $\geq 2\text{mm}$  en el NIC así como el porcentaje de todas las que experimentaron una reducción de la PBS  $\geq 2\text{mm}$ , fue significativamente mejor, desde el punto de vista estadístico, a los 2 y los 6 meses, en el grupo test. Además, el porcentaje de localizaciones que experimentaron progresión de la enfermedad (pérdida en el NIC  $\geq 2\text{mm}$  a lo largo de un periodo de observación de 6 meses) fue reducido, significativamente, por la combinación de antibióticos. Sin embargo, en la re-evaluación que se realiza de 3 a 6 meses tras la conclusión del tratamiento no-quirúrgico, surge una pregunta crítica relacionada con el qué hacer con las bolsas residuales y con la necesidad de indicar algún tratamiento más allá del cuidado de mantenimiento. Una revisión sistemática reciente, relacionada con los parámetros clínicos usados durante la re-evaluación (bolsas residuales, sangrado al sondaje, presencia de defectos de furcación) para predecir futuras pérdidas de inserción (Renvert & Persson 2002), concluyó que la presencia de bolsas residuales profundas estaba asociada con una futura progresión de la enfermedad y, por lo tanto, una disminuida capacidad de mantenimiento. Esta conclusión puede ser usada como la justificación para proporcionar más tratamiento a nuestros pacientes (cirugía periodontal para la reducción de bolsas). Tal y como se ha informado en otros estudios (Loesche et al 1992, Smith et al. 2002), nosotros hemos comparado la reducción de la frecuencia de localizaciones, tanto en el grupo test como en el grupo placebo, que requerían tratamiento periodontal quirúrgico para reducir la PBS a los 2 y a los 6 meses, usando los 5mm como el valor discriminante. A los 2 meses después del tratamiento, encontramos que los sujetos que recibieron el tratamiento test obtuvieron un 71% de reducción en el número de localizaciones que requerían tratamiento quirúrgico, mientras que los sujetos del grupo placebo experimentaron una reducción del 57% ( $P=0.039$ ), y estos valores fueron mantenidos hasta los 6 meses. Incluso, usando un valor discriminante más estricto (4mm), a los 6 meses, el 55% de las localizaciones test que presentaban bolsas  $\geq 4\text{mm}$  al inicio del estudio, demostraron PBS mantenibles ( $\leq 3\text{mm}$ ) en comparación con el 37% de las localizaciones control ( $P=0.038$ ).



Dos sujetos del grupo placebo y 4 sujetos del grupo control no demostraron una completa colaboración con la ingesta de la medicación. El hecho de que el 20% de los sujetos test no completaran el ciclo completo de los antibióticos, puede habernos llevado a una infra-estimación del efecto coadyuvante en nuestro “análisis con intención de tratar”. Por otro lado, este hecho le concede al estudio una mayor validez externa, teniendo en cuenta que, la falta de colaboración con la ingesta de la medicación es una realidad en la práctica clínica (Grob 1992). Además, asumiendo que algunos de los casos observados, en los que hubo una colaboración incompleta, podrían ser atribuidos a la aparición de efectos secundarios significativos, los clínicos que prescriban este régimen terapéutico deben esperar una colaboración poco favorable.

*Estudio 2. Amoxicillin and metronidazole as an adjunctive treatment in generalized aggressive periodontitis at initial therapy or re-treatment: a randomized controlled clinical trial.*

En este estudio los pacientes que previamente recibieron placebo en el primer estudio como parte del ensayo clínico aleatorizado controlado con placebo (Guerrero et al. 2005) recibieron los antibióticos seis meses después del desbridamiento radicular de toda la boca inicial (RAR24H). La segunda fase del estudio se diseñó cuando los primeros pacientes completaron la evaluación de 6 meses, tras el primer estudio, aunque antes de que se rompiera el enmascaramiento. En ese momento se debía tomar una decisión en relación a un posible retratamiento de las bolsas periodontales y surgió una nueva pregunta de investigación: "Si hacemos una instrumentación adicional y damos antimicrobianos coadyuvantes al grupo que había recibido la medicación placebo anteriormente, terminarían los dos grupos con resultados similares?" Este representa uno de los dilemas en el uso actual de los antibióticos. Es decir, ¿se deben prescribir antibióticos como parte del tratamiento inicial, o sólo en pacientes que no han sido tratados con éxito con la limpieza mecánica solamente?

En ambas fases se implementó un tratamiento noquirúrgico realizado en 24 horas, para reducir la carga de patógenos periodontales en un corto período de tiempo (Herrera et al. 2008) y así prevenir la contaminación cruzada de los sitios tratados (Quirynen et al. 2001). Cada tratamiento fue completado con enjuagues con clorhexidina (0,2%) durante

dos semanas por su actividad anti-placa, mientras que la limpieza por parte del paciente podría verse comprometida durante los primeros días tras el tratamiento.

En este tercer estudio, se incluyeron 41 pacientes - 3 de los cuales se perdieron durante el seguimiento en diferentes momentos durante el estudio - con una edad media de 31 años (Tabla 1) y con características claras de PAG de acuerdo con los criterios de la Clasificación Internacional de 1999 ( Armitage 1999). Hubo un buen cumplimiento y una aceptable retención de los pacientes al final de la evaluación de los 8 meses, lo cual habilita este estudio para tener suficiente poder estadístico para detectar una verdadera diferencia de 1,0 mm entre los grupos, utilizando nuestra variable de resultado primaria.

En ambos tratamientos hubo mejoría en la media de reducción en la PBS y la GIC que continuó aumentando hasta a los 8 meses. Las bolsas con PPD inicial > 7 mm y 4-6 mm fueron seleccionadas como las medidas de resultado primarias y secundarias, respectivamente. El resultado primario, en la diferencia de medias en la reducción de PBS en los bolsas profundos (> 7 mm), demostró una diferencia estadísticamente significativa que favoreció al grupo que recibió los antibióticos inicialmente en comparación al grupo que recibió los antibióticos en la fase de retratamiento, y esta diferencia fue lo suficientemente grande como para tener relevancia clínica ( Figura 4 y Tabla 9), con una diferencia de 0,9 mm ( $P < 0,001$ ) entre los grupos a los 2 meses, 1,4 mm ( $p < 0,001$ ) a los 6 meses y 0,9 mm ( $p = 0,003$ ) a los 8 meses. Un patrón similar se detectó para la reducción en la PBS en sitios con PBS inicial de 4-6 mm y para la GIC en los bolsas moderadas y profundas, pero con una menor magnitud de cambio en comparación con la observada en PBS iniciales > 7 mm. Es importante señalar que los resultados para RAR24H solo estaban de acuerdo con las recientes revisiones sistemáticas (Cobb 1996, Cobb 2002, Suvan 2005). Por lo tanto, las diferencias observadas en la Figura 9 con el uso coadyuvante de los antimicrobianos, que alcanzaron su máximo a los 6 meses, son aditivos a los resultados normales para RAR24H. Aunque el mejor resultado se observó a los 8 meses, se produjo el cambio más grande de entre 0-2 meses, independientemente del tratamiento previsto. Esto corrobora las observaciones de los estudios citados en el efecto de la terapia mecánica no quirúrgico, que sugieren que los mayores cambios se producen tras el primer y tercer mes después del tratamiento inicial (Cobb 1996, Adriaens y Adriaens 2004).

Las observaciones de este estudio deben hacerse con cierta cautela, ya que el terapeuta del primer estudio no fue el mismo que el que realizó los tratamientos en el estudio 2. Sin embargo, éstos resultados están de acuerdo con los hallazgos de un estudio retrospectivo de Kaner et al. (2007), quien informó que la administración de amoxicilina / metronidazol en RAR24H inicial, puede proporcionar más beneficios clínicos que la administración durante un retratamiento. Kaner y colaboradores sugirieron que las diferencias en la farmacocinética podría estar relacionada con la distinta magnitud del efecto de los antibióticos prescritos durante la terapia inicial o en el retratamiento. En particular, la perfusión y la permeabilidad de los capilares podrían aumentar en los casos con inflamación avanzada (como en la presentación inicial), aumentando así la absorción local y efecto de los antibióticos cuando la inflamación local es mayor (Kaner et al. 2007). Esta especulación, si se confirma por en nuevas investigaciones, podría tener repercusiones clínicas.

*Estudio 3. Impact of baseline microbiological status on clinical outcomes in generalized aggressive periodontitis patients treated with or without adjunctive amoxicillin and metronidazole: an exploratory analysis from a randomized controlled clinical trial.*

Aunque en su conjunto, los datos indicaron que en PAG el régimen antibiótico sistémico coadyuvante proporcionó un beneficio clínico significativo, se plantearon preguntas acerca de si el beneficio global se debió al gran beneficio obtenido por un subgrupo más pequeño de la población. Se ha especulado sobre la posibilidad de que un subconjunto de características microbianas específicas, pueden dar lugar a mejores o peores resultados. Esta cuestión es clínicamente relevante, ya que nos plantea que podríamos evitar eventos adversos de este régimen antibiótico sistémico empírica si el tratamiento se indica en un subgrupo de pacientes en base basado a un diagnóstico microbiológico. Los resultados de nuestro análisis primario (Tabla 8) muestran que los beneficios de este régimen de antibióticos sobre el desbridamiento mecánico solo fueron influenciados por el consumo de tabaco, pero no por la presencia de cada una de las bacterias estudiadas, si el efecto del tratamiento se incluye en el análisis y por lo tanto toda la población se incluye. Dentro de los límites obvios de este estudio, este resultado está de acuerdo con un análisis secundario de un estudio aleatorizado reciente en el pacientes clasificados como *A. actinomycetemcomitans* positivo o negativo y que

recibieron la misma combinación de antibióticos -pero a una dosis diferente a la utilizada en nuestro estudio- o placebo (Mombelli et al. 2013). Ese estudio concluyó que los sujetos *A. actinomycetemcomitans* positivos no se benefician más de la combinación de antibióticos que aquellos pacientes que no lo presentaban.

Aunque, por otro lado, fue sorprendente observar, en un análisis secundario, que los sujetos del grupo test que albergaban *A. actinomycetemcomitans* al inicio del estudio (*Aa +*) (Tabla 9) contribuyeron mucho más a la mejora en PBS en bolsas profundas (1,8 mm; p-valor 0,001) en comparación con los sujetos que no albergaban el patógeno al inicio del estudio (*Aa -*) (1,0 mm; valor p 0,045). Esta misma tendencia se observó para la reducción de PBS en bolsas moderadas. Estas diferencias entre los subgrupos no fueron observadas para la GIC (Tabla 10), o cuando se aplicó el mismo análisis para los subgrupos de sujetos clasificados por la presencia o ausencia al inicio del estudio de *P. gingivalis* o *T. forsythia*. (versión online de la publicación del estudio 3). Por lo tanto, se podría especular que en el grupo test, los sujetos que dieron positivo para *A. actinomycetemcomitans* podrían haber contribuido más a la respuesta positiva en general. Por el contrario, el análisis de subgrupos, en el grupo placebo, confirmó que hallazgos de estudios anteriores: si *A. actinomycetemcomitans* está presente al inicio del estudio, los resultados clínicos del raspado y alisado radicular son menos favorables en comparación a cuando no se detecta la especie antes del tratamiento (Renvert et al. 1990) (datos no mostrados).

También se llevaron a cabo otros análisis exploratorios de variables "clínicamente significativas" (Greenstein y Lamster 2000). Por ejemplo, si nuestro objetivo terapéutico era convertir las bolsas periodontales de  $\geq 5$  mm al inicio a  $\leq 4$  a los 6 meses, o un incluso un objetivo más estricto, de  $\geq 4$  mm al inicio a  $\leq 3$  a los 6 meses, las diferencias entre el grupo test y el grupo placebo sólo fueron significativas en sujetos *Aa +* pero no en sujetos *Aa -* (Tabla 11). Estos resultados sugieren, desde el punto de vista clínico, un mayor impacto del régimen antimicrobiano coadyuvante si *A. actinomycetemcomitans* estuvo presente al inicio del estudio. Esta tendencia fue confirmada por otro análisis exploratorio secundario realizado sólo entre los sujetos del grupo test (Tabla 12). Este análisis mostró que la presencia de *A. actinomycetemcomitans* al inicio del estudio fue un covariante significativo que dio lugar a más beneficios clínicos en bolsas moderadas (reducción PBS) y en bolsas

profundas (reducción PBS y GIC). Por el contrario, estos beneficios clínicos no se observaron en los sujetos que albergaban *P. gingivalis* o *T. forsythia* (versión online del estudio 3) al inicio del estudio, en comparación con los que no albergan estos patógenos. Estos resultados están de acuerdo con el estudio de Flemmig et al. (1998) sobre pacientes con periodontitis crónica en el que los sujetos que albergaban *A. actinomycetemcomitans* al inicio del estudio se beneficiaron de la terapia antimicrobiana coadyuvante combinada en comparación con su grupo de control, pero lo mismo no se produjo para los sujetos que albergaron *P. gingivalis*. Todos los hallazgos mencionados anteriormente deben ser interpretados con cautela debido a las limitaciones de este diseño del estudio, sin embargo, también parece razonable mencionar que a pesar de no tener criterios microbiológicos aplicables durante la estratificación al inicio del estudio, se observó una distribución bacteriana similar entre los grupos por azar (tabla 13), lo que representaría un escenario apropiado para las comparaciones estadísticas con el objetivo de explorar el efecto del estado microbiológico y su impacto sobre los resultados clínicos. Además, se excluyó la posible influencia de otros factores modificadores, tales como las diferencias entre el subgrupo principal de los sujetos (Aa + ve vs. Aa - ve) en sus variables clínicas al inicio del estudio (apéndice S6) o en sus índices de placa antes y después tratamiento (versión online del estudio 3).

Los resultados secundarios sobre la prevalencia de las tres principales patógenos en diferentes puntos temporales y las comparaciones estadísticas entre los grupos de tratamiento para *P. gingivalis* y *T. forsythia* mostraron una diferencia significativa entre los grupos de tratamiento a los 6 meses, que favorecieron al grupo test. En contraste, *A. actinomycetemcomitans* se detectó a los 6 meses en sólo 2 sujetos (10%) del grupo de test en comparación con los 5 sujetos (23,8%) del grupo placebo, y esta diferencia no fue estadísticamente significativa ( $p = 0,410$ ). Esto puede ser debido a la mayor 'tasa de erradicación' obtenida en el presente estudio en los sujetos del grupo placebo, más marcada de lo esperado en comparación con otros estudios clásicos (Renvert et al. 1990). Por otro lado, la reducción en la detección de *A. actinomycetemcomitans* entre los sujetos de test (81,1%) a los 6 meses, está cerca de la obtenida en una de las primeras publicaciones que evalúa esta combinación de antibióticos (Van Winkelhoff et al. 1992) en la que el 96,6% de los pacientes no tuvieron *A. actinomycetemcomitans* detectables después del tratamiento activo.

La amoxicilina se degrada por betalactamasas bacterianas que se producen con bastante frecuencia. De hecho, un estudio clínico reciente (Rams et al. 2012) realizado en 564 sujetos con periodontitis crónica encontró que el 52,1% albergaba bacterias subgingivales productoras de  $\beta$ -lactamasa, dentro de las cuales el 98.9% fueron sensibles al metronidazol. Nuestros datos muestran que en el grupo de test hubo un aumento estadísticamente significativo en el porcentaje de resistencia a los antibióticos a la amoxicilina a los 2 meses, que volvió a los valores basales a los 6 meses, mientras que sólo hubo cambios modestos que no fueron estadísticamente significativa en el grupo placebo (Tabla 14). Este aumento podría ser el resultado de un aumento en bacterias intrínsecamente resistentes o un aumento en las bacterias después de la adquisición de la resistencia a la amoxicilina. La razón por la que se añade amoxicilina a la prescripción de este régimen farmacológico combinado se basa en una sinérgia del efecto de la amoxicilina sobre el metronidazol y su hidroximetabolito contra *A. actinomycetemcomitans* (Pavicic et al., 1991, Pavicic et al., 1994b). En base a esto, sólo el 45% de los sujetos del grupo test, grupo que albergaba *A. actinomycetemcomitans* al inicio del estudio, se habría beneficiado de esta acción. Además, un estudio muy reciente en el que el metronidazol, solo o combinado con amoxicilina, se evaluó como un complemento a la terapia no quirúrgica en sujetos con periodontitis crónica, mostró que los beneficios clínicos y microbiológicos de ambas opciones de tratamiento fueron muy similares (Feres et al. 2012). Estos autores, por su parte, también han sugerido que la indicación de la combinación de amoxicilina y metronidazol puede ir más allá de la mera supresión de *A. actinomycetemcomitans*, ya que se ha demostrado un aumento en las proporciones de los especies de *Actinomyces* compatibles con la salud del huésped hasta 1 año en sujetos que recibieron esta combinación antimicrobiana coadyuvante en comparación con los que recibieron metronidazol solo.

Por lo tanto, la prescripción generalizada de la combinación de fármacos en pacientes con periodontitis crónica avanzada o periodontitis agresiva generalizada está abierta a debate, y los médicos deben equilibrar la relación riesgo / beneficio de la prescripción de un solo (metronidazol) o doble (metronidazol y amoxicilina) como régimen antimicrobiano complementario del que podrían beneficiarse tras un muestreo microbiológico específico. Otros elementos como el costo o la adherencia a la medicación (Guerrero et al. 2007) también deben ser parte de la decisión. No obstante,

los médicos deben ser conscientes de que la hora de prescribir antibióticos sistémicos, antibióticos, especialmente  $\beta$ -lactámicos, se corre el riesgo de aumentar la resistencia a los antibióticos en la población (Herrera et al. 2000, Van Winkelhoff et al. 2005) y, aunque en algunos países se ha demostrado que los antimicrobianos coadyuvantes no son usados en exceso (Choudhury et al. 2001), lo mismo no puede decirse en otros países donde la política de uso de antibióticos es más flexible (Herrera et al. 2000). Se ha sugerido, por el contrario, que el uso de combinaciones de antimicrobianos evita la aparición de cepas bacterianas de resistencia (D'Agata et al. 2008).

La amoxicilina y el metronidazol en sujetos con PAG se prescriben, normalmente, de manera empírica y sin orientación específica sobre la información microbiológica de partida (Guerrero et al. 2005, Mombelli 2005, Mombelli et al. 2013). Datos obtenidos en este estudio exploratorio han mostrado que hay una tendencia hacia un efecto antimicrobiano más beneficioso si *A. actinomycetemcomitans* se detecta al inicio del estudio. Sin embargo, todos los sujetos que recibieron la medicación coadyuvante mostraron un mejor resultado clínico en comparación con los que recibieron placebo. Por lo tanto, no se deben extraer conclusiones definitivas de este tercer estudio porque i) no fue diseñado principalmente para probar esta pregunta de investigación, ii) el tamaño muestral se calculó en base a parámetros clínicos, por lo tanto, es probable que el poder estadístico no sea suficiente para explorar el efecto modificador del estado microbiológico y iii) porque se han utilizado técnicas de muestreo microbiológico que tienen ciertas limitaciones (Sanz et al., 2004).





## **X. Conclusiones**

Tras el análisis de los resultados del presente estudio se ha podido demostrar de que:

1°. En pacientes con periodontitis agresiva generalizada, el uso coadyuvante de amoxicilina y metronidazol durante el tratamiento periodontal no-quirúrgico realizado en menos de 24 horas (TP24) (raspado y alisado radicular) ha mostrado mejoras adicionales estadísticamente significativas a las obtenidas con el TP24 sin la administración de antibióticos.

2°. Teniendo en cuenta que este estudio se engloba dentro de la fase inicial del tratamiento periodontal, el tratamiento test (Raspado y alisado radicular más el uso de agentes antimicrobianos) redujo de forma significativa la necesidad de tratamiento adicional (tratamiento quirúrgico), suponiendo un beneficio clínico evidente en el paciente con periodontitis agresiva generalizada.

3. La administración de la medicación fue más beneficiosa para el paciente cuando se produjo durante la fase inicial del tratamiento en comparación a cuando se administró durante el retratamiento.

4. La medicación produjo cambios microbiológicos significativos favorables al grupo test.

5. La medicación coadyuvante benefició a todos los pacientes del grupo test, aunque aquellos que presentaban *A.a* al inicio del estudio demostraron mejorías clínicas adicionales en comparación a los que no presentaban esa especie al inicio del estudio.



## **XI. Bibliografia**

- Adriaens, P. A., De Boever, J. A. & Loesche, W. J. (1988) Bacterial invasion in root cementum and radicular dentin of periodontally diseased teeth in humans. A reservoir of periodontopathic bacteria. *J.Periodontol.*, **59**, 222-230.
- Aimetti, M., Romano, F., Guzzi, N. & Carnevale, G. (2012) Full-mouth disinfection and systemic antimicrobial therapy in generalized aggressive periodontitis: a randomized, placebo-controlled trial. *Journal of Clinical Periodontology* **39**, 284-294.
- Alldritt, W. A. (1969) From pyorrhoea to periodontics. *Dent.Pract.Dent.Rec.*, **19**, 171-174.
- Apatzidou, D. A. & Kinane, D. F. (2004) Quadrant root planing versus same-day full-mouth root planing. I. Clinical findings. *J.Clin.Periodontol.*, **31**, 132-140.
- Armitage, G. C. (1999) Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann.Periodontol.*, **4**, 1-6.
- Baltacioglu, E., Aslan, M., Sarac, O., Saybak, A. & Yuva, P. (2011) Analysis of clinical results of systemic antimicrobials combined with nonsurgical periodontal treatment for generalized aggressive periodontitis: a pilot study. *Journal of the Canadian Dental Association* **77**, b97.
- Berglundh, T., Krok, L., Liljenberg, B., Westfelt, E., Serino, G. & Lindhe, J. (1998) The use of metronidazole and amoxicillin in the treatment of advanced periodontal disease. A prospective, controlled clinical trial. *J.Clin.Periodontol.*, **25**, 354-362.
- Bial, J. J. & Mellonig, J. T. (1987) Radiographic evaluation of juvenile periodontitis (periodontosis). *J.Periodontol.*, **58**, 321-326.
- Bollen, C. M., Vandekerckhove, B. N., Papaioannou, W., van Eldere, J. & Quirynen, M. (1996) Full- versus partial-mouth disinfection in the treatment of periodontal infections. A pilot study: long-term microbiological observations. *J.Clin.Periodontol.*, **23**, 960-970.

- Buchmann, R., Nunn, M. E., Van Dyke, T. E. & Lange, D. E. (2002) Aggressive periodontitis: 5-year follow-up of treatment. *J.Periodontol.*, **73**, 675-683.
- Caton, J. G., Ciancio, S. G., Blieden, T. M., Bradshaw, M., Crout, R. J., Hefti, A. F., Massaro, J. M., Polson, A. M., Thomas, J. & Walker, C. (2000) Treatment with subantimicrobial dose doxycycline improves the efficacy of scaling and root planing in patients with adult periodontitis. *Journal of Periodontology*, **71**, 521-532.
- Cionca, N., Giannopoulou, C., Ugolotti, G. & Mombelli, A. (2010) Microbiologic testing and outcomes of full-mouth scaling and root planing with or without amoxicillin/metronidazole in chronic periodontitis. *Journal of Periodontology* **81**, 15-23.
- Christersson, L. A., Albini, B., Zambon, J. J., Wikesjo, U. M. & Genco, R. J. (1987) Tissue localization of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontitis. I. Light, immunofluorescence and electron microscopic studies. *J.Periodontol.*, **58**, 529-539.
- Christersson, L. A., Slots, J., Rosling, B. G. & Genco, R. J. (1985) Microbiological and clinical effects of surgical treatment of localized juvenile periodontitis. *J.Clin.Periodontol.*, **12**, 465-476.
- Cobb, C. M. (1996) Non-surgical pocket therapy: mechanical. *Ann.Periodontol.*, **1**, 443-490.
- D'Agata, E.M., Dupont-Rouzeyrol, M., Magal, P., Olivier, D. & Ruan S. (2008) The impact of different antibiotic regimens on the emergence of antimicrobial-resistant bacteria. *PLoS One* **3**, e4036.
- Darveau, R. P., Tanner, A. & Page, R. C. (1997) The microbial challenge in periodontitis. *Periodontol.2000.*, **14**, 12-32.
- Everett, F. G., Waerhaug, J. & Widman, A. (1971) Leonard Widman: surgical treatment of pyorrhea alveolaris. *J.Periodontol.*, **42**, 571-579.

- Flemmig, T. F., Milian, E., Karch, H. & Klaiber, B. (1998) Differential clinical treatment outcome after systemic metronidazole and amoxicillin in patients harboring *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and/or *Porphyromonas gingivalis*. *J.Clin.Periodontol.*, **25**, 380-387.
- Feres, M., Soares, G.M., Mendes, J.A., Silva, M.P., Faveri, M., Teles, R., Socransky, S.S. & Figueiredo, L.C. (2012) Metronidazole alone or with amoxicillin as adjuncts to non-surgical treatment of chronic periodontitis: a 1-year double-blinded, placebo-controlled, randomized clinical trial. *Journal of Clinical Periodontology* **39**, 1149-1158.
- Gold, S. I. (1982) Robert Neumann: a pioneer in periodontal flap surgery. *J.Periodontol.*, **53**, 456-459.
- Gold, S. I. (1985) Periodontics. The past. Part (II). The development of modern periodontics. *J.Clin.Periodontol.*, **12**, 171-189.
- Gottsegen, R. (1980) Periodontics 1950-1980. *N.Y.J.Dent.*, **50**, 132-133.
- Greenstein, G. (2002) Full-mouth therapy versus individual quadrant root planning: a critical commentary. *J.Periodontol.*, **73**, 797-812.
- Griffiths, G.S., Ayob, R., Guerrero, A., Nibali, L., Suvan, J., Moles, D.R. & Tonetti, M.S. (2011) Amoxicillin and metronidazole as an adjunctive treatment in generalized aggressive periodontitis at initial therapy or re-treatment: a randomized controlled clinical trial. *Journal of Clinical Periodontology* **38**, 43-49.
- Grob, P. R. (1992) Antibiotic prescribing practices and patient compliance in the community. *Scand.J.Infect.Dis.Suppl*, **83**, 7-14.
- Grossi, S. (2000) Smoking and stress: common denominators for periodontal disease, heart disease, and diabetes mellitus. *Compendium of Continuing Education in Dentistry*, **Supplement.**, 31-39.

- Grossi, S. G., Zambon, J., Machtei, E. E., Schifferle, R., Andreana, S., Genco, R. J., Cummins, D. & Harrap, G. (1997) Effects of smoking and smoking cessation on healing after mechanical periodontal therapy. *J.Am.Dent.Assoc.*, **128**, 599-607.
- Grossi, S. G., Zambon, J. J., Ho, A. W., Koch, G., Dunford, R. G., Machtei, E. E., Norderyd, O. M. & Genco, R. J. (1994) Assessment of risk for periodontal disease. I. Risk indicators for attachment loss. *J.Periodontol.*, **65**, 260-267.
- Guerrero, A., Echeverria, J.J. & Tonetti, M.S. (2007) Incomplete adherence to an adjunctive systemic antibiotic regimen decreases clinical outcomes in generalized aggressive periodontitis patients: a pilot retrospective study. *Journal of Clinical Periodontology* **34**, 897-902.
- Guerrero, A., Griffiths, G.S., Nibali, L., Suvan, J., Moles, D.R., Laurell, L. & Tonetti, M.S. (2005) Adjunctive benefits of systemic amoxicillin and metronidazole in non-surgical treatment of generalized aggressive periodontitis: a randomized placebo-controlled clinical trial. *Journal of Clinical Periodontology* **32**, 1096-1107.
- Guerrero A, Nibali L, Lambertenghi R, Ready D, Suvan J, Griffiths GS, Wilson M, Tonetti MS (2014) Impact of baseline microbiological status on clinical outcomes in generalized aggressive periodontitis patients treated with or without adjunctive amoxicillin and metronidazole: an exploratory analysis from a randomized controlled clinical trial. *Journal of Clinical Periodontology* , 41:1080-9.
- Haffajee, A. D. & Socransky, S. S. (1994) Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. *Periodontol.2000.*, **5**, 78-111.
- Haffajee, A. D., Socransky, S. S. & Gunsolley, J. C. (2003) Systemic anti-infective periodontal therapy. A systematic review. *Ann.Periodontol.*, **8**, 115-181.
- Haraszthy, V. I., Hariharan, G., Tinoco, E. M., Cortelli, J. R., Lally, E. T., Davis, E. & Zambon, J. J. (2000) Evidence for the role of highly leukotoxic *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in the pathogenesis of localized juvenile and other forms of early-onset periodontitis. *J.Periodontol.*, **71**, 912-922.

- Hart, T. C. & Kornman, K. S. (1997) Genetic factors in the pathogenesis of periodontitis. *Periodontol.2000.*, **14**, 202-215.
- Heller, D., Varela, V.M., Silva-Senem, M.X., Torres, M.C., Feres-Filho, E.J. & Colombo, A.P. (2011) Impact of systemic antimicrobials combined with anti-infective mechanical debridement on the microbiota of generalized aggressive periodontitis: a 6-month RCT. *Journal of Clinical Periodontology* **38**, 355-364.
- Herrera, D., Sanz, M., Jepsen, S., Needleman, I. & Roldan, S. (2002) A systematic review on the effect of systemic antimicrobials as an adjunct to scaling and root planing in periodontitis patients. *J.Clin.Periodontol.*, **29 Suppl 3**, 136-159.
- Hollis, S. & Campbell, F. (1999) What is meant by intention to treat analysis? Survey of published randomised controlled trials. *BMJ*, **319**, 670-674.
- Ishikawa, I., Kawashima, Y., Oda, S., Iwata, T. & Arakawa, S. (2002) Three case reports of aggressive periodontitis associated with *Porphyromonas gingivalis* in younger patients. *J.Periodontal Res.*, **37**, 324-332.
- Jin, L., Wong, K. Y., Leung, W. K. & Corbet, E. F. (2000) Comparison of treatment response patterns following scaling and root planing in smokers and non-smokers with untreated adult periodontitis. *J.Clin.Dent.*, **11**, 35-41.
- Kamma, J. J., Nakou, M. & Manti, F. A. (1994) Microbiota of rapidly progressive periodontitis lesions in association with clinical parameters. *J.Periodontol.*, **65**, 1073-1078.
- Kaner, D., Christan, C., Dietrich, T., Bernimoulin, J.P., Kleber, B.M. & Friedman, A. (2007) Timing affects the clinical outcome of adjunctive systemic antibiotic therapy for generalized aggressive periodontitis. *Journal of Periodontology* **78**: 1201-1208.
- Kornman, K. S. (1999) Host modulation as a therapeutic strategy in the treatment of periodontal disease. *Clin.Infect.Dis.*, **28**, 520-526.
- Kornman, K. S., Knobelman, C. & Wang, H. Y. (2000) Is periodontitis genetic? The answer may be Yes! *J.Mass Dent.Soc.*, **49**, 26-30.

- Lee, J. W., Choi, B. K., Yoo, Y. J., Choi, S. H., Cho, K. S., Chai, J. K. & Kim, C. K. (2003) Distribution of periodontal pathogens in Korean aggressive periodontitis. *J. Periodontol.*, **74**, 1329-1335.
- Lindhe, J., Hamp, S. E. & Loe, H. (1973) Experimental periodontitis in the beagle dog. *Int.Dent.J.*, **23**, 432-437.
- Listgarten, M. A., Wong, M. Y. & Lai, C. H. (1995) Detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, and *Bacteroides forsythus* in an *A. actinomycetemcomitans*-positive patient population. *J Periodontol.*, **66**, 158-164.
- Loe, H. (1993) Periodontal diseases: a brief historical perspective. *Periodontol.2000.*, **2**, 7-12.
- Loe, H., Theilade, H. & Jensen, S.B. (1965) Experimental gingivitis in man. *J.Periodontol.*, **36**, 177-187.
- Loe, H., Anerud, A., Boysen, H. & Morrison, E. (1986) Natural history of periodontal disease in man. Rapid, moderate and no loss of attachment in Sri Lankan laborers 14 to 46 years of age. *J.Clin.Periodontol.*, **13**, 431-445.
- Loesche, W. J. (1992) The specific plaque hypothesis and the antimicrobial treatment of periodontal disease. *Dent.Update.*, **19**, 68, 70-2, 74.
- Loesche, W. J., Giordano, J. R., Hujoel, P., Schwarcz, J. & Smith, B. A. (1992) Metronidazole in periodontitis: reduced need for surgery. *J.Clin.Periodontol.*, **19**, 103-112.
- Lopez, N. J., Mellado, J. C., Giglio, M. S. & Leighton, G. X. (1995) Occurrence of certain bacterial species and morphotypes in juvenile periodontitis in Chile. *J.Periodontol.*, **66**, 559-567.
- Machtei, E. E., Dunford, R., Hausmann, E., Grossi, S. G., Powell, J., Cummins, D., Zambon, J. J. & Genco, R. J. (1997) Longitudinal study of prognostic factors in established periodontitis patients. *J.Clin.Periodontol.*, **24**, 102-109.



- Magnusson, I., Lindhe, J., Yoneyama, T. & Liljenberg, B. (1984) Recolonization of a subgingival microbiota following scaling in deep pockets. *J.Clin.Periodontol.*, **11**, 193-207.
- Markley, M. R. (1990) The advent of surgical periodontal treatment. *J.Am.Dent.Assoc.*, **121**, 452.
- Mestnik, M.J., Feres, M., Figueiredo, L.C., Soares, G., Teles, R.P., Fermiano, D., Duarte, P.M. & Faveri, M. (2012). The effects of adjunctive metronidazole plus amoxicillin in the treatment of generalized aggressive periodontitis: a 1-year double-blinded, placebo-controlled, randomized clinical trial. *Journal of Clinical Periodontology* **39**, 955-961.
- Meyer, J., Lallam-Laroye, C. & Dridi, M. (2004) Aggressive periodontitis - what exactly is it? *J.Clin.Periodontol.*, **31**, 586-587.
- Mombelli, A., Casagni, F. & Madianos, P. N. (2002) Can presence or absence of periodontal pathogens distinguish between subjects with chronic and aggressive periodontitis? A systematic review. . *J.Clin.Periodontol*, **29 Suppl 3**, 10-21.
- Mombelli, A., Cionca, N., Almaghlouth, A., Decaillet, F., Courvoisier, D.S. & Giannopoulou, C. (2013) Are there specific benefits of amoxicillin plus metronidazole in *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*-associated periodontitis? Double-masked, randomized clinical trial of efficacy and safety. *Journal of Periodontology* **84**, 715-724.
- Mongardini, C., van Steenberghe, D., Dekeyser, C. & Quirynen, M. (1999) One stage full- versus partial-mouth disinfection in the treatment of chronic adult or generalized early-onset periodontitis. I. Long-term clinical observations. *J.Periodontol.*, **70**, 632-645.
- Palmer, R. M., Matthews, J. P. & Wilson, R. F. (1999) Non-surgical periodontal treatment with and without adjunctive metronidazole in smokers and non-smokers. *J.Clin.Periodontol.*, **26**, 158-163.
- Pavicic, M. J., Van Winkelhoff, A. J. & de Graaff, J. (1991) Synergistic effects between amoxicillin, metronidazole, and the hydroxymetabolite of metronidazole against

- Actinobacillus actinomycetemcomitans. *Antimicrob.Agents Chemother.*, **35**, 961-966.
- Pavicic, M. J., Van Winkelhoff, A. J. & de Graaff, J. (1992) In vitro susceptibilities of Actinobacillus actinomycetemcomitans to a number of antimicrobial combinations. *Antimicrob.Agents Chemother.*, **36**, 2634-2638.
- Pavicic, M. J., Van Winkelhoff, A. J., Douque, N. H., Steures, R. W. & de Graaff, J. (1994a) Microbiological and clinical effects of metronidazole and amoxicillin in Actinobacillus actinomycetemcomitans-associated periodontitis. A 2-year evaluation. *J.Clin.Periodontol.*, **21**, 107-112.
- Pavicic, M. J., Van Winkelhoff, A. J., Pavicic-Temming, Y. A. & de Graaff, J. (1994b) Amoxycillin causes an enhanced uptake of metronidazole in Actinobacillus actinomycetemcomitans: a mechanism of synergy. *J.Antimicrob.Chemother.*, **34**, 1047-1050.
- Preber, H. & Bergstrom, J. (1986) The effect of non-surgical treatment on periodontal pockets in smokers and non-smokers. *J.Clin.Periodontol.*, **13**, 319-323.
- Quappe, L., Jara, L. & Lopez, N. J. (2004) Association of interleukin-1 polymorphisms with aggressive periodontitis. *J.Periodontol.*, **75**, 1509-1515.
- Quirynen, M., Bollen, C. M., Vandekerckhove, B. N., Dekeyser, C., Papaioannou, W. & Eyssen, H. (1995) Full- vs. partial-mouth disinfection in the treatment of periodontal infections: short-term clinical and microbiological observations. *J.Dent.Res.*, **74**, 1459-1467.
- Rabelo CC, Feres M, Gonçalves C, Figueiredo LC, Faveri M, Tu YK, Chambrone L. Systemic antibiotics in the treatment of aggressive periodontitis. A systematic review and a Bayesian Network meta-analysis. *J Clin Periodontol.* 2015 Jul;42(7):647-57
- Rams, T.E., Degener, J.E. & van Winkelhoff, A.J. (2013) Prevalence of beta-lactamase-producing bacteria in human periodontitis. *Journal of Periodontal Research* **48**, 493-496.

- Renvert, S. & Persson, G. R. (2002) A systematic review on the use of residual probing depth, bleeding on probing and furcation status following initial periodontal therapy to predict further attachment and tooth loss. *J.Clin.Periodontol.*, **29** Suppl 3, 82-89.
- Renvert, S., Wikstrom, M., Dahlen, G., Slots, J. & Egelberg, J. (1990a) Effect of root debridement on the elimination of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Bacteroides gingivalis* from periodontal pockets. *J.Clin.Periodontol.*, **17**, 345-350.
- Renvert, S., Wikstrom, M., Dahlen, G., Slots, J. & Egelberg, J. (1990b) On the inability of root debridement and periodontal surgery to eliminate *Actinobacillus actinomycetemcomitans* from periodontal pockets. *J.Clin.Periodontol.*, **17**, 351-355.
- Rooney, J., Wade, W. G., Sprague, S. V., Newcombe, R. G. & Addy, M. (2002) Adjunctive effects to non-surgical periodontal therapy of systemic metronidazole and amoxicillin alone and combined. A placebo controlled study. *J.Clin.Periodontol.*, **29**, 342-350.
- Sanz, M., Lau, L., Herrera, D., Morillo, J.M. & Silva, A. (2004) Methods of detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* and *Tannerella forsythensis* in periodontal microbiology, with special emphasis on advanced molecular techniques: a review. *Journal of Clinical Periodontology* **31**, 1034-1047.
- Sasaki, N., Nakagawa, T., Seida, K., Ishihara, K. & Okuda, K. (1989) Clinical, microbiological and immunological studies of post-juvenile periodontitis. *Bulletin of Tokyo Dental College*, **30**, 205-211.
- Saxby, M. S. (1987) Juvenile periodontitis: an epidemiological study in the west Midlands of the United Kingdom. *J.Clin.Periodontol.*, **14**, 594-598.
- Sigusch, B., Beier, M., Klinger, G., Pfister, W. & Glockmann, E. (2001) A 2-step non-surgical procedure and systemic antibiotics in the treatment of rapidly progressive periodontitis. *J.Periodontol.*, **72**, 275-283.

- Sgolastra, F., Petrucci, A., Gatto, R. & Monaco, A. (2012) Effectiveness of systemic amoxicillin/metronidazole as an adjunctive therapy to full-mouth scaling and root planing in the treatment of aggressive periodontitis: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Periodontology* **83**, 731-743.
- Slots, J. & Ting, M. (2002) Systemic antibiotics in the treatment of periodontal disease. *Periodontol.2000.*, **28**, 106-176.
- Slots, J. & Van Winkelhoff, A. J. (1993) Antimicrobial therapy in periodontics. *J.Calif.Dent.Assoc.*, **21**, 51-56.
- Slots, J., Zambon, J. J., Rosling, B. G., Reynolds, H. S., Christersson, L. A. & Genco, R. J. (1982) Actinobacillus actinomycetemcomitans in human periodontal disease. Association, serology, leukotoxicity, and treatment. *J.Periodontal Res.*, **17**, 447-448.
- Smith, S. R., Foyle, D. M., Daniels, J., Joyston-Bechal, S., Smales, F. C., Sefton, A. & Williams, J. (2002) A double-blind placebo-controlled trial of azithromycin as an adjunct to non-surgical treatment of periodontitis in adults: clinical results. *J.Clin.Periodontol.*, **29**, 54-61.
- Soares, G.M.S, Mendes, J.A.V, Silva, M.P., Favari, M., Teles, R., Socransky, S.S., Wang, X., Figueiredo, L.C. & Feres, M. (2014) Metronidazole alone or with amoxicillin as adjuncts to nonsurgical treatment of Chronic Periodontitis: a secondary analysis of microbiological results from a randomized clinical trial. . *Journal of Clinical Periodontology* Accepted article. 10.1111/jcpe.12217
- Socransky, S. S. & Haffajee, A. D. (1994) Evidence of bacterial etiology: a historical perspective. *Periodontol.2000.*, **5**, 7-25.
- Soskolne, W. A. & Klinger, A. (2001) The relationship between periodontal diseases and diabetes: an overview. *Annals of Periodontology*, **6**, 91-98.
- Takeuchi, Y., Umeda, M., Ishizuka, M., Huang, Y. & Ishikawa, I. (2003) Prevalence of periodontopathic bacteria in aggressive periodontitis patients in a Japanese population. *Journal of Periodontology*, **74**, 1460-1469.

- Theilade, E., Wright, W. H., Jensen, S. B. & Loe, H. (1966) Experimental gingivitis in man. II. A longitudinal clinical and bacteriological investigation. *J.Periodontol Res.*, **1**, 1-13.
- The American Academy of Periodontology (1989). *Proceedings of the World Workshop in Clinical Periodontology*. Chicago. 1/23-1/24.
- Tonetti, M. S. (2000) Advances in periodontology. *Prim.Dent.Care*, **7**, 149-152.
- Tonetti, M. S. (2002) The future of periodontology: new treatments for a new era. *Journal of the International Academy of Periodontology*, **4**, 110-114.
- Tonetti, M. S., Lang, N. P., Cortellini, P., Suvan, J. E., Adriaens, P., Dubravec, D., Fonzar, A., Fourmoussis, I., Mayfield, L., Rossi, R., Silvestri, M., Tiedemann, C., Topoll, H., Vangsted, T. & Wallkamm, B. (2002) Enamel matrix proteins in the regenerative therapy of deep intrabony defects. *J.Clin.Periodontol.*, **29**, 317-325.
- Tonetti, M. S. & Mombelli, A. (1999) Early-onset periodontitis. *Ann.Periodontol.*, **4**, 39-53.
- Treasure, E., Kelly, M., Nuttall, N., Nunn, J., Bradnock, G. & White, D. (2001) Factors associated with oral health: a multivariate analysis of results from the 1998 Adult Dental Health survey. *Br.Dent.J.*, **190**, 60-68.
- Tu, Y. K., Maddick, I. H., Griffiths, G. S. & Gilthorpe, M. S. (2004) Mathematical coupling can undermine the statistical assessment of clinical research: illustration from the treatment of guided tissue regeneration. *J.Dent.*, **32**, 133-142.
- Umeda, M., Chen, C., Bakker, I., Contreras, A., Morrison, J. L. & Slots, J. (1998) Risk indicators for harboring periodontal pathogens. *J.Periodontol.*, **69**, 1111-1118.
- Van Winkelhoff, A. J., Rodenburg, J. P., Goene, R. J., Abbas, F., Winkel, E. G. & de Graaff, J. (1989) Metronidazole plus amoxycillin in the treatment of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* associated periodontitis. *J.Clin.Periodontol.*, **16**, 128-131.

- Van Winkelhoff, A. J., Tjihof, C. J. & de Graaff, J. (1992) Microbiological and clinical results of metronidazole plus amoxicillin therapy in *Actinobacillus actinomycetemcomitans*-associated periodontitis. *J.Periodontol.*, **63**, 52-57.
- Van Winkelhoff, A. J. & Winkel, E. G. (1997) Systemic antibiotic therapy in severe periodontitis. *Curr.Opin.Periodontol.*, **4**, 35-40.
- Van Winkelhoff, A. J., Winkel, E. G. & Vandenbroucke-Grauls, C. M. (1999) On the dosage of antibiotics in clinical trials. *J.Clin.Periodontol.*, **26**, 764-766.
- Vandekerckhove, B. N., Bollen, C. M., Dekeyser, C., Darius, P. & Quirynen, M. (1996) Full- versus partial-mouth disinfection in the treatment of periodontal infections. Long-term clinical observations of a pilot study. *J.Periodontol.*, **67**, 1251-1259.
- Varela, V.M., Heller, D., Silva-Senem, M.X., Torres, M.C., Colombo, A.P. & Feres-Filho, E.J. (2011) Systemic antimicrobials adjunctive to a repeated mechanical and antiseptic therapy for aggressive periodontitis: a 6-month randomized controlled trial. *Journal of Periodontology* **82**, 1121-1130.
- Wennstrom, A., Wennstrom, J. & Lindhe, J. (1986) Healing following surgical and non-surgical treatment of juvenile periodontitis. A 5-year longitudinal study. *J.Clin.Periodontol.*, **13**, 869-882.
- Williams, R. C. (1999) Non-steroidal anti-inflammatory drugs for altering periodontal bone loss. *J.Dent.Res.*, **78**, 638-642.
- Williams, R. C., Jeffcoat, M. K., Howell, T. H., Reddy, M. S., Johnson, H. G., Hall, C. M. & Goldhaber, P. (1988) Ibuprofen: an inhibitor of alveolar bone resorption in beagles. *J.Periodontal Res.*, **23**, 225-229.
- Winkel, E. G., Van Winkelhoff, A. J., Timmerman, M. F., Van, d., V & Van der Weijden, G. A. (2001) Amoxicillin plus metronidazole in the treatment of adult periodontitis patients. A double-blind placebo-controlled study. *J.Clin.Periodontol.*, **28**, 296-305.

- Winkel, E. G., Van Winkelhoff, A. J., Timmerman, M. F., Vangsted, T. & Van, d., V (1997) Effects of metronidazole in patients with "refractory" periodontitis associated with *Bacteroides forsythus*. *J.Clin.Periodontol.*, **24**, 573-579.
- Winkel, E. G., Van Winkelhoff, A. J. & Van, d., V (1998) Additional clinical and microbiological effects of amoxicillin and metronidazole after initial periodontal therapy. *J.Clin.Periodontol.*, **25**, 857-864.
- Xajigeorgiou, C., Sakellari, D., Slini, T., Baka, A. & Konstantinidis, A. (2006) Clinical and microbiological effects of different antimicrobials on generalized aggressive periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology* **33**, 254-264.
- Zambon, J. J. (1985) *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease. *J.Clin.Periodontol.*, **12**, 1-20.
- Zambon, J. J. (1996) Periodontal diseases: microbial factors. *Ann.Periodontol.*, **1**, 879-925.
- Zandbergen, D., Slot, D.E., Cobb, C.M. & Van der Weijden, F.A. (2013) The clinical effect of scaling and root planing and the concomitant administration of systemic amoxicillin and metronidazole: a systematic review. *Journal of Periodontology* **84**, 332-351.





# Anexo



I







1. Guerrero A, Griffiths GS, Nibali L, Suvan J, Moles DR, Laurell L, TAdjunctive benefits of systemic amoxicillin and metronidazole in non-surgical treatment of generalized aggressive periodontitis: a randomized placebo controlled clinical trial. *J Clin Periodontol* 2005; 32: 1096–1107.

### **Resumen**

**Introducción:** Este estudio fue diseñado con el objetivo de determinar el efecto clínico coadyuvante, de la administración de amoxicilina y metronidazol, durante el tratamiento no-quirúrgico, en pacientes con periodontitis agresiva generalizada.

**Métodos:** 41 pacientes sin enfermedades sistémicas y con periodontitis agresiva generalizada fueron incluidos en este estudio clínico aleatorizado a doble ciego, controlado mediante placebo y con un seguimiento de 6 meses. Los pacientes recibieron el tratamiento periodontal no-quirúrgico, realizado en un periodo inferior a 24 horas, mediante instrumentación mecánica y manual. Los sujetos del grupo test recibieron un tratamiento coadyuvante de antibióticos sistémicos con 500 mgrs de amoxicilina 3 veces al día durante 7 días y 500 mgrs de Metronidazol 3 veces día durante 7 días. Los parámetros clínicos se obtuvieron al inicio del estudio y a los 2 y 6 meses tras el tratamiento.

**Resultados:** Todos los parámetros clínicos mejoraron, tanto en el grupo test como en el grupo placebo, a los 2 y 6 meses. En bolsas profundas ( $\geq 7$  mm), el tratamiento test consiguió una reducción adicional de la profundidad de bolsa al sondaje (PBS) de 1.4 mm (95% CI 0.8, 2.0 mm) y una ganancia adicional en el nivel de inserción clínica (NIC) de 1 mm (0.7, 1.3 mm) a los 6 meses. En bolsas moderadas (4-6 mm), el beneficio coadyuvante fue menor en magnitud: La reducción en la PBS fue de 0.4 mm (0.1, 0.7 mm) y la ganancia en el NIC fue de 0.5 mm (0.2, 0.8 mm). Además, los datos de los 6 meses demostraron ganancias en el NIC  $\geq 2$  mm en el 25% de las localizaciones en los pacientes del grupo test en comparación al 16% en los pacientes del grupo placebo (P=0.028). Igualmente, se observaron reducciones en la PBS de 2 mm o más en el 30% de las localizaciones en el grupo test y en el 21% de las localizaciones en el grupo placebo. En el grupo test, el 74% de las bolsas con PBS  $\geq 5$  mm al inicio del estudio se convirtieron a 4 mm o menos a los 6 meses, mientras que esto ocurrió

en el 54% de las bolsas en el grupo placebo ( $P=0.008$ ). Se pudo detectar la presencia de progresión de la enfermedad periodontal, a los 6 meses, en un 1.5% y un 3.3% de las localizaciones, en los grupos test y placebo respectivamente ( $P= 0.072$ ).

Conclusiones: Estos datos indican que un tratamiento antibiótico sistémico coadyuvante, de 7 días de duración, con metronidazol y amoxicilina, mejora, significativamente, los resultados clínicos a corto plazo del desbridamiento periodontal no-quirúrgico en pacientes con periodontitis agresiva generalizada.

A fecha de noviembre de 2015 esta referencia ha sido citada en 97 publicaciones científicas (Wiley Online library).



# Adjunctive benefits of systemic amoxicillin and metronidazole in non-surgical treatment of generalized aggressive periodontitis: a randomized placebo-controlled clinical trial

Adrian Guerrero<sup>1,2</sup>, Gareth S. Griffiths<sup>1</sup>, Luigi Nibali<sup>1</sup>, Jean Suvan<sup>1</sup>, David R. Moles<sup>1</sup>, Lars Laurell<sup>1</sup> and Maurizio S. Tonetti<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Periodontology and Eastman Clinical Investigation Centre, Eastman Dental Institute and Hospital, University College London, London, UK; <sup>2</sup>Private Periodontal Practice, Malaga, Spain

Guerrero A, Griffiths GS, Nibali L, Suvan J, Moles DR, Laurell L, Tonetti MS. Adjunctive benefits of systemic amoxicillin and metronidazole in non-surgical treatment of generalized aggressive periodontitis: a randomized placebo controlled clinical trial. *J Clin Periodontol* 2005; 32: 1096–1107. doi: 10.1111/j.1600-051X.2005.00814.x. © Blackwell Munksgaard 2005.

## Abstract

**Background:** The objective of this study was to assess the adjunctive clinical effect of the administration of systemic amoxicillin and metronidazole in the non-surgical treatment of generalized aggressive periodontitis (GAP).

**Methods:** Forty-one systemically healthy subjects with GAP were included in this 6-month double-blind, placebo-controlled, randomized clinical trial. Patients received a course of full-mouth non-surgical periodontal treatment delivered over a 24 h period using machine-driven and hand instruments. Test subjects received an adjunctive course of systemic antibiotic consisting of 500 mg amoxicillin and 500 mg metronidazole three times a day for 7 days. Clinical parameters were collected at baseline, and at 2 and 6 months post-treatment.

**Results:** In both the test and the placebo groups, all clinical parameters improved at 2 and 6 months. In deep pockets ( $\geq 7$  mm), the test treatment resulted in an additional 1.4 mm (95% confidence interval 0.8, 2.0 mm) in full-mouth probing pocket depth (PPD) reduction and 1 mm (0.7, 1.3 mm) of life cumulative attachment loss (LCAL) gain at 6 months. In moderate pockets (4–6 mm), the adjunctive benefit was smaller in magnitude: PPD reduction was 0.4 mm (0.1, 0.7 mm) and LCAL gain was 0.5 mm (0.2, 0.8 mm). In addition, the 6-month data showed LCAL gains  $\geq 2$  mm at 25% of sites in test patients compared with 16% in placebo ( $p = 0.028$ ). Similarly, PPD reductions of 2 mm or more were observed in 30% of sites in test and 21% of sites in placebo patients. Seventy-four percent of pockets with PPD  $\geq 5$  mm at baseline were 4 mm or shallower at 6 months in the test group. This compared with 54% in the placebo group ( $p = 0.008$ ). Disease progression at 6 months was observed at 1.5% of test and 3.3% of sites in test and placebo, respectively ( $p = 0.072$ ).

**Conclusions:** These data indicate that a 7-day adjunctive course of systemic metronidazole and amoxicillin significantly improved the short-term clinical outcomes of full-mouth non-surgical periodontal debridement in subjects with GAP.

Key words: antibiotics; generalized aggressive periodontitis; human; randomized-controlled clinical trial; treatment

Accepted for publication 1 June 2005

Generalized aggressive periodontitis (GAP) affects a minority of periodontal patients but is highly significant because it is characterized by severe destruction of the supporting apparatus of the teeth, which may lead to edentulism early in life. Because of its relatively rare occurrence, few studies have evaluated how to treat this condition. The current notion is that, as with most forms of periodontitis, the first step in the treatment of GAP is a cause-related treatment phase aimed at the reduction and/or elimination of the pathogenic microflora.

In recent years, two approaches have been introduced to improve the clinical outcomes of cause-related periodontal therapy in chronic periodontitis patients: the use of adjunctive antibiotics, and performing debridement within a 24 h period, the so-called "full-mouth disinfection" approach (Quirynen et al. 1995).

The adjunctive use of systemic antibiotics is supported by evidence published in systematic reviews of trials assessing the benefit of systemic antibiotics in cases with advanced periodontitis (Herrera et al. 2002, Haffajee et al. 2003). Among the possible regimens, the combination of amoxicillin and metronidazole has gained increasing popularity because of its wide spectrum of activity and effectiveness in terms of suppression of *Actinobacillus actinomycesetemcomitans* (Van Winkelhoff et al. 1989), possibly because of a synergistic effect of the combination of amoxicillin and metronidazole against *A. actinomycesetemcomitans* that has been demonstrated in vitro (Pavicic et al. 1991, 1994a,b). In addition, chronic periodontitis patients harbouring subgingival *Porphyromonas gingivalis* benefit significantly from the combined therapy (Winkel et al. 2001). Randomized-controlled clinical trials have reported clinical and microbiological improvements in chronic periodontitis patients treated with these two antibiotics (Berglundh et al. 1998, Flemmig et al. 1998, Winkel et al. 2001, Rooney et al. 2002). Furthermore, some clinical studies have reported good long-term clinical outcomes in patients with "severe disease which was associated with *A. actinomycesetemcomitans*" (Van Winkelhoff et al. 1992, Pavicic et al. 1994a, Winkel et al. 1998) and in aggressive periodontitis (Buchmann et al. 2002) patients when periodontal treatment was completed with adjunctive use of amoxicillin and metronidazole. However, because of the lack of a control group in these studies,

the benefits achieved could not be confirmed as attributable to the adjunctive antibiotic.

Recent investigations, performed in chronic periodontitis patients, have indicated that full-mouth scaling and root planing within 24 h (FSR) results in different degrees of clinical and microbiological additional benefits (Quirynen et al. 1995, Bollen et al. 1996, Vandekerckhove et al. 1996, Mongardini et al. 1999, Apatzidou & Kinane 2004). The benefits of this approach have not been systematically evaluated in aggressive periodontitis patients but initial data in chronic periodontitis patients suggest that the full-mouth scaling within 24 h may perform as well as the conventional treatment (Apatzidou & Kinane 2004, Kinane 2005, Koshy et al. 2005, Wennstrom et al. 2005). In addition, some potential benefits, such as the application of a better understanding of the infectious process, a reduced number of treatment sessions for patients, a more efficient use of treatment time and a reduced cost of therapy, may all be in favour of the FSR (Greenstein 2002).

The aim of this double-blind randomized placebo-controlled study was to test the null hypothesis of "no difference in treatment effect of adjunctive use of systemic amoxicillin plus metronidazole during full-mouth non-surgical cause-related periodontal treatment (FSR) performed within 24 h compared with FSR alone, in patients with GAP patients at 2 and 6 months after the completion of active treatment.

## Material and Methods

### Experimental design

This study was a randomized placebo-controlled, parallel-design, double-blind clinical trial with 6-month follow-up. Ethical approval was obtained from the Eastman Dental Institute University College London Hospitals joint Research and Ethics Committee, and the study was conducted according to the principles outlined in the Declaration of Helsinki on experimentation involving human subjects.

### Population screening

Potential subjects eligible for the study were identified from the population referred to the periodontal clinic of the Eastman Dental Hospital, London. A complete periodontal examination was

performed including a full medical and dental history, an intra-oral examination and a full-mouth periodontal probing. A radiographic examination was undertaken using either periapicals or a pantomogram. A periodontal diagnosis was made, and subjects who fulfilled the study inclusion/exclusion criteria were provided with a written information sheet, related to the study protocol, and they were invited to participate in the study.

The study included subjects with (i) GAP (according to the criteria of the 1999 international classification (Armitage 1999)); (ii) at least 20 teeth present; (iii) good general health and (iv) age between 16 and 35 when first diagnosed with aggressive periodontal disease. Subjects were excluded from the study if they: (i) were considered to have a diagnosis of chronic periodontitis (according to the criteria of the 1999 international classification (Armitage 1999)); (ii) were pregnant or lactating females; (iii) were females of child-bearing age not using a standard accepted method of birth control; (iv) required antibiotic pre-medication for the performance of periodontal examination and treatment; (v) suffered from any other systemic diseases (cardiovascular, pulmonary, liver, cerebral, diseases or diabetes); (vi) had received antibiotic treatment in the previous 3 months; (vii) were taking long-term anti-inflammatory drugs; (viii) had received a course of periodontal treatment within the last 6 months; (ix) were allergic to penicillin or metronidazole; and (x) were not able to provide consent to participate in the study, or they did not accept the proposed treatment plan. Informed consent was obtained from all the subjects to be entered in the study.

### Pre-treatment

All the subjects went through motivation sessions during which oral hygiene instructions were given. The purpose of these sessions was to ensure that the subjects could maintain a proper level of oral hygiene before starting active treatment, and this was repeated until subjects showed the ability to maintain good plaque control as evidenced by pre-treatment plaque scores <20%. During these sessions, a case presentation was given to the subject related to the specific features of his/her disease, and a supragingival debridement was performed.

### Sample size calculation

The sample size calculation determined that 17 subjects per treatment arm would provide 80% power to detect a true difference of 1.0 mm between test and placebo using probing pocket depth (PPD) reduction in pockets  $\geq 7$  mm as the primary outcome variable, assuming that the common standard deviation is 1.0 mm. Accordingly, a sample of 21 subjects per arm (42 in total) were to be recruited to compensate for possible drop-out during the study period.

### Randomization and allocation concealment

Subject numbers were assigned in ascending order at the enrolment visit. Subjects were randomly assigned by a computer-generated table to receive one of the two treatments. A balanced random permuted block approach (4-unit block size) was used to prepare the randomization tables in order to avoid unequal balance between the two treatments. Restricted randomization (minimization) took place, stratifying for smoking habits (yes or no) and number of initial pockets  $\geq 5$  mm ( $< 50$ ,  $50-80$ ,  $> 80$ ).

The randomization table was sent to the University College London (UCL) pharmacy, which prepared the medication for 50 subjects (25 tests and 25 controls). Fifty plastic bags containing two bottles each (amoxicillin, metronidazole or placebo tablets) were sent back to the study coordinator, who was the only person who had access to them. Consequently, the study coordinator completed the treatment assignment and matched the code of the plastic bag with the subject number. The research nurse provided the subject with the plastic bag containing the two bottles. The randomization code was not broken until all data had been collected and analysed. Thus, the treatment group was concealed to the patient, the clinical examiner, the therapist and the statistician.

### Clinical parameters

Clinical parameters were assessed using a UNC-15 periodontal probe by the calibrated examiner at six sites/tooth excluding third molars. Full-mouth plaque score (FMPS) was recorded by assigning a binary score to each surface (1 for plaque present, 0 for absent) and calculating the percentage of total tooth surfaces that revealed the presence of

plaque detected by the use of a periodontal probe as modified by Tonetti et al. (2002). Similarly, a full-mouth percentage bleeding score (FMBS) was calculated after assessing dichotomously the presence of bleeding on probing from the bottom of the pocket when probing with a manual probe with a force of 0.3 N (Tonetti et al. 2002). Full-mouth PPD and recession of the gingival margin (REC) were recorded at the same time, with measurements rounded to the nearest millimetre. REC was recorded as a positive value if the free gingival margin (FGM) occurred apical to the cemento-enamel junction (CEJ), whereas it was recorded as a negative value if it was coronal to the CEJ. In the latter case, the examiner re-inserted the probe angled  $45^\circ$  into the site in order to detect the CEJ. If the CEJ was not detectable for anatomical or restorative reasons, the examiner adopted clinical landmarks that were noted in the case report forms. Lifetime cumulative attachment loss (LCAL) was calculated as PPD plus REC.

### Investigator calibration

A total of 10 non-study subjects with aggressive periodontitis were recruited and used for the calibration exercise. The single designated examiner (L. N.) measured full-mouth PPD and REC of the gingival margin for all 10 subjects. On the same day (with a minimum of 15 min separation), the examiner repeated the examination. Upon completion of all measurements, the intra-examiner repeatability for LCAL measurement was assessed. The examiner was judged to be reproducible after fulfilling the pre-determined success criteria (the percentage of agreement within  $\pm 2$  mm between repeated measurements had to be at least 98%). The examiner showed 99.7% reproducibility.

### Non-surgical periodontal therapy

Periodontal therapy was initiated within 1 month of the baseline screening examination. If for any reason, the initiation of the therapy was delayed, a new full-mouth periodontal examination was performed.

A standard cycle of periodontal therapy consisting of oral hygiene instructions, supra- and sub-gingival mechanical instrumentation of the root surface (scaling and root planing) was performed by a single experienced therapist

(A. G.) using a piezoelectric instrument with fine tips (EMS, Nyon, Switzerland) and hand instruments, as appropriate. Both groups received this treatment in two long appointments during the same day. Two quadrants were instrumented in a morning session, followed by the other two quadrants in an afternoon session. A 2 h session for each appointment was planned. Local anaesthesia was used as necessary. Test subjects received an adjunctive course of systemic antibiotics consisting of 500 mg of amoxicillin and 500 mg of metronidazole three times a day for 7 days, while control subjects received placebo. Subjects were asked to take the first dose of the medication before mechanical instrumentation had started at the first treatment session. All subjects used a 0.2% chlorhexidine rinse (supplied to improve compliance) twice a day for 2 weeks post-treatment, and relied on standard oral hygiene methods as instructed at the commencement of the study.

### Post-treatment controls

The objectives of the post-treatment appointments were to control and reinforce the oral hygiene habits of the subject, to monitor the early healing events, report on any adverse events or additional medications taken. In addition, the 1-week post-treatment visit served as a compliance control, as subjects were asked to return any medication not taken and/or the empty bottles. The number of pills not taken by the subject was documented.

### Re-assessment examinations

Re-assessment visits occurred at 2 and 6 months after the completion of the treatment. During these appointments, the examiner recorded any medical history changes, and the clinical periodontal parameters recorded at the baseline visit were repeated. At the end of the appointment, a session of supragingival debridement was performed as necessary. No attempt was made to re-instrument residual periodontal pockets.

### Primary and secondary outcome measures

The primary outcome measure of the study was PPD reduction in sites with initial PPD  $\geq 7$  mm. Secondary outcomes included differences between

groups for the (i) changes in mean full-mouth PPD and the changes in PPD and LCAL at different initial PPD categories; (ii) changes in FMPS and FMBS; (iii) percentage of sites with PPD reduction or LCAL gain of  $\geq 2$  mm; (iv) percentage of sites that showed LCAL loss  $\geq 2$  mm (disease progression); (v) percentage of sites with PPD changing from  $\geq 5$  to  $\leq 4$  mm and the percentage of sites with PPD changing from  $\geq 4$  to  $\leq 3$  mm (need for re-treatment); (vi) description and frequency of adverse events; and (vii) compliance with the systemic medication.

**Data management and statistical analysis**

Data were entered into an Excel (Microsoft office 2000) database and were proofed for entry errors. The database was subsequently locked, imported into SPSS for Windows (SPSS Inc. version 11.0) formatted and analysed. A subject-level analysis was performed by computing a subject-level variable (full-mouth or at different PPD categories) for each of the parameters. Numerical data were summarized as means and 95% confidence intervals (CIs), categorical data were summarized as frequency distribution and the percentage-based measures (e.g. FMPS) were summarized as the median of the percentage and inter-quartile range. The significance of differences between test and placebo groups in terms of numerical data was evaluated via univariate analysis using the independent samples *t*-test. Likewise, the significance of the difference within each group before and after treatment was evaluated with the paired samples *t*-test. Categorical data were analysed with the  $\chi^2$  test, and the percentage data between the two groups were compared with the Mann-Whitney test, while the within-group percentage changes were evaluated with the Wilcoxon's sign-rank test. The significance of the treatment option (test or placebo) on the dependent variables PPD reduction and LCAL gain at different initial PPD categories was estimated by analysis of covariance (ANCOVA). The models were adjusted for baseline values and controlled for smoking. The final model was then selected by including significant factors only. Model estimates included adjusted means and 95% CIs. An intention-to-treat, last observation carried forward analysis was performed (Hollis & Campbell 1999).

**Results**

**Subject accountability**

Figure 1 shows what happened to all potential subjects throughout the study from possible recruitment to completion. Fifty-one subjects were assessed for their eligibility before entering the study. Of these, 10 subjects were excluded; seven because they did not meet the inclusion criteria, while the other three refused to participate. One of the three who refused to participate did so after signing the consent form, but before treatment assignment had taken place. Thus, 41 subjects were randomly allocated to participate in the study. All participants received the allocated intervention and one patient from the placebo group was lost to follow-up between the 2-month visit and the 6-month visit because of reasons unrelated to the study. All participants were included in the analysis.

**Study Schedule**

Subject recruitment started in January 2003 and was completed by the end of December 2003. All the 6-month follow-up visits were completed by July

2004. Data entry of all information and statistical analysis were performed by the end of September 2004.

**Subject characteristics at baseline**

The baseline characteristics of the 41 participants who were treated non-surgically with the adjunctive use of the test or the placebo medication are displayed in Table 1. The mean age of the participants was  $31.3 \pm 5.2$  years (SD) for the test group and  $31.7 \pm 5.1$  years for the placebo group. Females accounted for 80% of the test group and 57% of the placebo group. In the test group 25% of the participants were smokers whereas 19% smoked in the placebo group. Caucasians constituted the major ethnic group in the study, accounting for 65% of the test group and 47.6% of the placebo group. None of these demographic parameters showed a statistically significant difference between groups.

**Clinical characteristics**

The baseline examination revealed that the two study groups showed similar

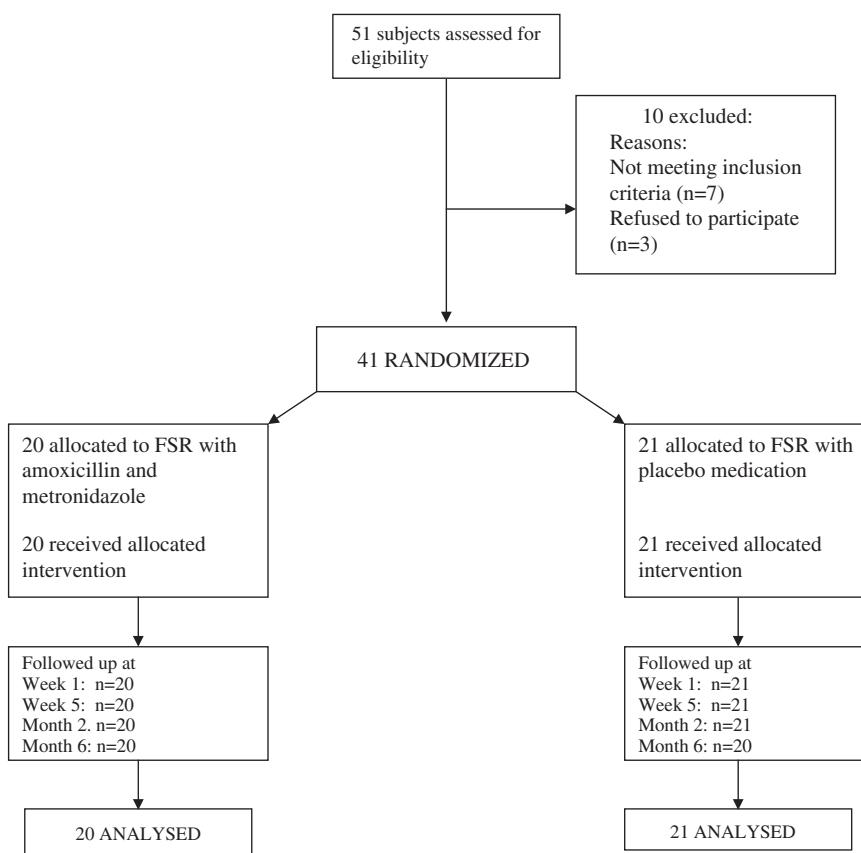


Fig. 1. Flow chart for study patients.

Table 1. Subject and clinical characteristics at baseline

Parameter	Test group (N = 20)	Placebo group (N = 21)	p-value
Age	31.3	31.7	0.779
Mean (95% CI)	(28.8, 33.7)	(29.4, 34.1)	t-test
Females (percentage)	16 (80%)	12 (57%)	0.108 $\chi^2$
Smokers (percentage)	5 (25%)	4 (19%)	0.719 $\chi^2$
Caucasians (percentage)	13 (65%)	10 (47.6%)	0.530 $\chi^2$
Teeth at baseline	25.5	26.0	0.482
Mean (95% CI)	(24.5, 26.6)	(25.0, 27.0)	t-test
Number of pockets $\geq 5$ mm	60.8	58.4	0.795
Mean (95% CI)	(46.3, 75.3)	(46.74, 70.20)	t-test
Percentage of pockets $\geq 5$ mm	35.5	31.5	0.514
Median (IQ)	(26.6, 47.3)	(24.4, 48.1)	Mann-Whitney
Full-mouth plaque score	25.5	20.0	0.155
Median (IQ)	(13.3, 36.8)	(10.0, 29.0)	Mann-Whitney
Full-mouth bleeding score	61.5	55.0	0.175
Median (IQ)	(50.8, 74.8)	(35.5, 66.5)	Mann-Whitney

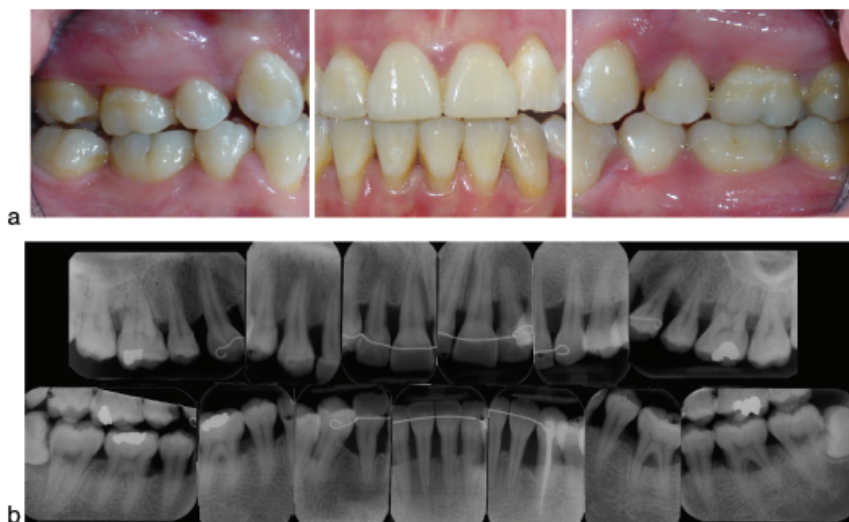


Fig. 2. Baseline clinical (a) and radiographic (b) appearance of a 21-year-old, smoking female (eight cigarettes per day). She presented with a plaque score of 24%, a bleeding score of 68% and 70 sites with pockets 5 mm or deeper.

characteristics for number of teeth present, percentage of pockets  $\geq 5$  mm, plaque and bleeding levels, with no significant differences between the groups. The data show that the subjects had retained most of their teeth, but had approximately a third of sites exhibiting pockets requiring treatment and high levels of bleeding, but low levels of plaque (Fig. 2).

#### Mean values for clinical parameters

Mean full-mouth clinical outcomes and mean clinical outcomes at shallow

( $\leq 3$  mm), moderate (4–6 mm) and deep ( $\geq 7$  mm) pocket categories for baseline, and the differences between baseline – 2 months and baseline – 6 months are displayed in Table 2. At baseline, there were no significant differences between test and placebo. All parameters, with the exception of the mean LCAL gain at the initial shallow pockets, showed a statistically significant difference between baseline and 2 months. This was also true between baseline and 6 months except for LCAL gain and PPD reduction at shallow pockets. At 2 months, there were statis-

tically significant differences ( $p < 0.02$ ) between test and placebo in the mean PPD at moderate pockets (4–6 mm) and mean PPD at deep pockets ( $\geq 7$  mm). At 6 months, statistically significant differences were detected between test and placebo groups in the mean PPD at moderate pockets ( $p < 0.02$ ), mean PPD at deep pockets ( $p < 0.001$ ) and LCAL at deep pockets ( $p < 0.05$ ).

The significance of this treatment effect between the groups at 2 and 6 months (difference between the test group and the placebo group in the mean PPD reduction and the mean LCAL gain at different pocket categories) is displayed in Table 3. Multivariate models based on linear regression ANCOVA were constructed taking into account the potential sources of variability such as smoking status and baseline pocket depth. As the adjustment for baseline PPD value could constitute a problem related to mathematical coupling (Tu et al. 2004), the same analyses were undertaken with a model that did not include an adjustment for baseline values. This resulted in almost identical results (data not shown). When considering full-mouth mean LCAL, there were no statistically significant differences between test and placebo. Similarly when examining pockets  $\leq 3$  mm, no differences were observed between test and placebo for either LCAL or PPD. For ease of presentation, these analyses have been omitted from Table 3.

There were highly significant treatment effects for full-mouth PPD reduction, PPD reduction at 4–6 mm pockets and PPD reduction at  $\geq 7$  mm pockets at 2 and 6 months, with the outcomes favouring the test treatment. For PPD reduction in 4–6 mm pockets, the adjusted differences between test and placebo treatment were 0.5 mm at 2 months and 0.4 mm at 6 months. In the deeper pockets  $\geq 7$  mm this difference was much larger: 0.9 mm at 2 months and 1.4 mm at 6 months.

For sites with initial PPD  $\geq 7$ , LCAL gain was also significantly better in test subjects: an adjunctive benefit of 0.6 mm at 2 months and 1.0 mm at 6 months was observed. While there was no statistically significant benefit in terms of 2-month LCAL gain ( $p = 0.650$ ) at sites with initial PPD 4–6 mm, a highly significant difference of 0.50 mm in favour of the test group was observed at 6 months ( $p = 0.001$ ).

In addition, the effect of smoking on the primary outcome variable (PPD

Table 2. Mean clinical outcome variables at baseline and differences between 0–2 and 0–6 months

Clinical outcomes mean (95% CI)	Group	Baseline 0 months	Difference between 0 and 2 months	Difference between 0 and 6 months	<i>p</i> -value paired <i>t</i> -test	
					difference 0–2 months	difference 0–6 months
Full-mouth mean PPD	Placebo	4.1 (3.6, 4.5)	0.8 (0.6, 1.1)	0.7 (0.4, 1.0)	<0.001	<0.001
	Test	4.1 (3.6, 4.5)	1.1 (0.9, 1.4)	1.2 (0.9, 1.4)	<0.001	<0.001
Mean PPD at pockets ≤3 mm	Placebo	2.3 (2.2, 2.4)	0.2 (0.1, 0.3)	-0.1 (-0.2, 0.0)	0.003	0.052
	Test	2.3 (2.2, 2.3)	0.2 (0.2, 0.3)	0.0 (0.0, 0.0)	<0.001	0.931
Mean PPD at pockets 4–6 mm	Placebo	5.0 (4.9, 5.1)	1.2 (0.9, 1.5)	1.0 (0.8, 1.3)	<0.001	<0.001
	Test	5.02 (4.9, 5.1)	1.7 (1.6, 1.9)	1.5 (1.3, 1.7)	<0.001	<0.001
Mean PPD at pockets ≥7 mm	Placebo	7.7 (7.4, 8.1)	2.1 (1.6, 2.5)	1.8 (1.3, 2.3)	<0.001	<0.001
	Test	7.7 (7.5, 7.9)	3.0 (2.6, 3.3)	3.1 (2.7, 3.5)	<0.001	<0.001
Full-mouth mean LCAL	Placebo	4.8 (4.1, 5.5)	0.5 (0.3, 0.6)	0.5 (0.2, 0.7)	<0.001	<0.001
	Test	4.7 (4.1, 5.2)	0.7 (0.5, 0.8)	0.8 (0.7, 0.9)	<0.001	<0.001
Mean LCAL at sites with initial pockets ≤3 mm	Placebo	3.2 (2.7, 3.7)	0.0 (-0.1, 0.1)	0.0 (-0.2, 0.1)	0.683	0.704
	Test	2.9 (2.6, 3.1)	0.0 (-0.01, 0.1)	0.0 (-0.1, 0.1)	0.631	0.634
Mean LCAL at sites with initial pockets 4–6 mm	Placebo	5.7 (5.2, 6.2)	0.8 (0.5, 1.0)	0.8 (0.5, 1.1)	<0.001	<0.001
	Test	5.7 (5.3, 6.1)	1.1 (1.0, 1.2)	1.3 (1.2, 1.4)	<0.001	<0.001
Mean LCAL at sites with initial pockets ≥7 mm	Placebo	8.2 (7.5, 8.9)	1.3 (1.0, 1.6)	1.3 (1.0, 1.6)	<0.001	<0.001
	Test	8.1 (7.7, 8.4)	1.8 (1.6, 2.1)	2.3 (2.0, 2.5)	<0.001	<0.001

PPD, probing pocket depth; LCAL, life cumulative attachment loss.

Table 3. Analysis of covariance for PPD reduction and LCAL gain at 2 and 6 months in different pockets categories

Multivariate ‘‘ANCOVA’’ analysis models	Parameter	Difference 0–2 months		Difference 0–6 months	
		estimate (95% CI)	<i>p</i> -value	estimate (95% CI)	<i>p</i> -value
Full-mouth mean PPD reduction	Treatment group (test-placebo)	0.3 (0.1, 0.5)	0.002	0.5 (0.2, 0.7)	0.001
	Smoking (no-yes)	0.4 (0.1, 0.7)	0.007	0.4 (0.1, 0.7)	0.040
Mean PPD reduction in pockets 4–6 mm	Treatment group (test-placebo)	0.5 (0.2, 0.8)	0.001	0.4 (0.1, 0.7)	0.005
	Smoking (no-yes)	0.4 (0.0, 0.8)	0.050	0.2 (-0.1, 0.6)	0.183
Mean PPD reduction in pockets ≥7 mm	Treatment group (test-placebo)	0.9 (0.4, 1.5)	0.001	1.4 (0.8, 2.0)	<0.001
	Smoking (no-yes)	0.9 (0.3, 1.5)	0.007	1.0 (0.3, 1.7)	0.007
Mean LCAL gain in sites with initial PPD ≥7 mm	Treatment group (test-placebo)	0.6 (0.2, 0.9)	0.002	1.0 (0.7, 1.3)	<0.001
	Smoking (no-yes)	0.6 (0.2, 1.0)	0.005	0.7 (0.3, 1.1)	0.001
Mean LCAL gain in sites with initial PPD 4–6 mm	Treatment group (test-placebo)	-0.2 (-0.4, 0.0)	0.650	0.5 (0.2, 0.8)	0.001
	Smoking (no-yes)	0.0 (-0.4, 0.2)	0.203	0.0 (-0.3, 0.4)	0.903

PPD, probing pocket depth; LCAL, life cumulative attachment loss.

reduction at  $\geq 7$  mm pockets) was statistically significant ( $p = 0.007$ ), and the difference between a non-smoker and a smoker on PPD reduction at deep pockets was 0.9 mm (95% CI 0.3, 1.5) at 2 months and 1.0 mm (0.3, 1.7) at 6 months. The corresponding value for the difference between non-smokers and smokers on PPD reduction in initial pockets of 4–6 mm was 0.4 mm (0.0, 0.8), demonstrating a borderline significance ( $p = 0.050$ ) at 2 months and a non-significant difference of 0.2 mm ( $-0.1, 0.6$ ) at 6 months ( $p = 0.183$ ), whereas there were no statistically significant differences for LCAL.

#### Percentage of sites with pockets

The percentage of sites (median and inter-quartile range) with a PPD of a specific threshold at baseline and the reduction in the percentage of pockets within groups (difference between baseline – 2 months and baseline – 6 months) are reported in Table 4. The significance of the reduction in the percentage of pockets between the groups is also shown. At baseline, there were no statistically significant differences between the groups in any of the specific PPD thresholds.

Analysis within groups (Wilcoxon's Signed rank test) indicated that all PPD thresholds within each group showed a highly statistically significant difference between baseline and two months and

between baseline and 6 months in both treatment groups. Furthermore, analysis of the differences between test and placebo treatments for the outcome of treatment (baseline – 2 months) showed a statistically significant difference ( $p < 0.05$ ) for the reduction in the percentage of pockets  $\geq 5$ ,  $\geq 6$  and  $\geq 7$  mm that favoured the test treatment. The statistical significance of the difference between baseline and 6 months was  $p < 0.02$  for the reduction in the percentage of pockets  $\geq 5$ ,  $\geq 6$  mm, and was  $p < 0.05$  for pockets  $\geq 4$ ,  $\geq 7$  mm.

#### Oral hygiene and bleeding on probing

FMPS and FMBS at baseline, and the reduction (difference baseline – 2 months and baseline – 6 months) within each group are displayed in Table 5.

Plaque scores decreased in both treatments from baseline to 2 months, and the difference was statistically significant for test and placebo groups. However, the 6-month plaque scores values were equal to baseline values. The effects of both treatments had a large impact on bleeding, and these changes were statistically significant at 2 and 6 months ( $p < 0.001$ ). Furthermore, there was a statistically significant difference between test and placebo for the improvement in the percentage of bleeding sites at 2 and 6 months ( $p < 0.02$ ).

#### Percentage of sites with clinically relevant changes

A subset analysis was carried out to test the changes of some clinically relevant parameters at 2 and 6 months (Table 6). All the median values (inter-quartile range) showed statistically significant differences favouring the test treatment for the percentage of sites with LCAL gain  $\geq 2$  mm at 2 months ( $p = 0.047$ ), at 6 months ( $p = 0.028$ ), the percentage of sites with PPD reduction of  $\geq 2$  mm at 2 months ( $p = 0.029$ ) and at 6 months ( $p = 0.021$ ), and the percentage of pockets that had converted from  $\geq 5$  mm at baseline to  $\leq 4$  mm at 2 months ( $p = 0.039$ ) and at 6 months ( $p = 0.008$ ). Conversely, the percentage of sites with LCAL loss  $\geq 2$  mm was higher in the placebo group as compared with the test group at 2 months ( $p = 0.041$ ) and at 6 months ( $p = 0.072$ ).

The percentage of pockets that converted from  $\geq 4$  mm at baseline to  $\leq 3$  mm at 2 months failed to show a statistically significant difference ( $p = 0.112$ ) while at 6 months the difference between the groups demonstrated a statistical significance ( $p = 0.038$ ).

#### Adverse events, concomitant antimicrobials and compliance

At the 1-week follow-up visit, 11 subjects (55%) in the test group and four subjects (19%) in the placebo reported

Table 4. Percentage of pockets at baseline and differences between 0–2 and 0–6 months

Median of percentage (IQ)	Group	Baseline	Difference between 0 and 2 months	Difference between 0 and 6 months	p-value Wilcoxon's signed-ranks test	
					difference 0–2 months	difference 0–6 months
Percentage of pockets $\geq 4$ mm	Placebo	45.8 (33.7, 60.0)	15.3 (9.4, 24.2)	14.9 (7.6, 24.8)	<0.001	<0.001
	Test	46.3 (37.6, 57.4)	19.6 (16.1, 28.5)	21.3* (14.6, 32.0)	<0.001	<0.001
Percentage of pockets $\geq 5$ mm	Placebo	31.5 (24.9, 48.1)	17.3 (10.9, 24.7)	17.3 (9.2, 23.1)	<0.001	<0.001
	Test	35.5 (26.6, 47.3)	22.1* (19.5, 30.2)	24.1** (19.2, 32.8)	<0.001	<0.001
Percentage of pockets $\geq 6$ mm	Placebo	18.0 (13.0, 31.0)	11.9 (7.0, 18.3)	11.9 (4.1, 16.3)	<0.001	<0.001
	Test	22.1 (13.2, 28.9)	16.4* (11.5, 27.5)	18.2** (10.7, 27.7)	<0.001	<0.001
Percentage of pockets $\geq 7$ mm	Placebo	9.0 (5.2, 17.3)	6.0 (1.0, 11.5)	5.3 (0.7, 10.5)	<0.001	0.001
	Test	12.0 (5.8, 19.0)	10.5* (5.7, 16.6)	10.8* (5.6, 17.6)	<0.001	<0.001

\*Significant difference between groups favoring test treatment ( $p < 0.05$ ).

\*\*Significant difference between groups favoring test treatment ( $p < 0.02$ ).



Table 5. Analysis on FMPS and FMBS at baseline (post-oral hygiene instructions) and differences between 0–2 and 0–6 months.

Median (IQ)	Group	Baseline	Difference 0–2 months	Difference 0–6 months	<i>p</i> -value Wilcoxon' signed-ranks test	
					difference 0–2 months	difference 0–6 months
Full-mouth plaque score (%)	Placebo	20.0 (10.0, 29.0)	3.0 (– 1.0, 7.0)	0.0 (– 2.5, 8.0)	0.029	0.112
	Test	25.5 (13.3, 36.8)	6.0 (– 3.8, 19.0)	1.0 (– 5.0, 15.0)	0.038	0.170
Full-mouth bleeding score (%)	Placebo	55.0 (35.5, 66.5)	17.0 (10.0, 32.5)	21.0 (9.5, 28.5)	<0.001	0.001
	Test	61.5 (50.8, 74.8)	34.5** (27.3, 34.5)	32.0** (26.0, 39.0)	<0.001	<0.001

\*\*Significant difference between groups favoring test treatment ( $p < 0.02$ ).

FMPS, full-mouth plaque score; FMBS, full-mouth bleeding score.

Table 6. Percentage of sites with clinically relevant changes in test and placebo groups at 2 and 6 months

Median of percentage (IQ)	0–2 months data			0–6 months data		
	test group	placebo group	<i>p</i> -value Mann–Whitney test	test group	placebo group	<i>p</i> -value Mann–Whitney test
Percentage of sites with $\geq 2$ mm of LCAL gain at 2 months	19.6 (15.5, 26.2)	14.3 (8.6, 21.3)	0.047	25.4 (18.5, 34.1)	16.1 (8.8, 24.9)	0.028
Percentage of sites with $\geq 2$ mm of PPD reduction at 2 months	29.4 (23.9, 43.8)	20.8 (10.5, 32.7)	0.029	30.2 (21.1, 46.6)	20.8 (8.6, 32.7)	0.021
Percentage of sites with LCAL loss $\geq 2$ mm at 2 months	1.3 (0.3, 3.5)	3.0 (1.8, 5.4)	0.041	1.5 (1.2, 2.3)	3.3 (1.5, 5.5)	0.072
Percentage of pockets converting from $\geq 5$ mm at baseline to $\leq 4$ mm after treatment	71.2 (63.3, 78.2)	56.6 (30.4, 72.7)	0.039	74.1 (63.7, 83.5)	54.2 (29.1, 75.7)	0.008
Percentage of pockets converting from $\geq 4$ mm at baseline to $\leq 3$ mm after treatment	49.0 (42.9, 60.6)	41.6 (21.1, 58.1)	0.112	55.2 (38.9, 65.2)	37.2 (18.0, 56.4)	0.038

LCAL, life cumulative attachment loss.

adverse events. At the 5-week follow-up visit only two subjects (10%) in the test group and one subject (4.8%) in the placebo group reported to have continuing adverse events. The types of adverse events at the 1- and 5-week follow-up visits are described in Table 7. Two subjects (one in the test group and one in the placebo group) had a tooth extraction each between the baseline visit and the 2-month visit. The baseline values of these two teeth were carried forward through all the analysis. One subject from the test group lost three front teeth because of an accident between the 2-month visit and the 6-month visit. The 2-month values of these three teeth were carried forward to the 6-month visit.

Concomitant antimicrobial medication during the study period was recorded. Two subjects in the test group took amoxicillin capsules for medical reasons, while no subject in the placebo group had any concomitant antimicrobials.

Compliance with the course of systemic medication and the number of

pills not taken by the non-compliant patients were also documented. All subjects returned the medication bottles. Sixteen subjects (80%) in the test group and 19 subjects 90.5% in the placebo group completed the course of systemic medication as indicated. The reasons advocated by the four non-compliant subjects in the test group for not having taken all the pills were the following: two subjects reported diarrhoea, one subject reported vomiting and one subject failed to remember to take the prescribed medication. These four subjects missed 38%, 45%, 52% and 9% of the whole number of pills, respectively.

## Discussion

This was the first randomized-controlled clinical study (RCT) designed to assess the adjunctive effect of the metronidazole–amoxicillin antibiotic combination, originally proposed by van Winkelhoff et al. (1989), in the treat-

ment of GAP. The data indicated that the experimental therapy resulted in clinically significant short-term improvements in clinical parameters.

As all patients had pre-treatment sessions of oral hygiene instructions and reinforcement as necessary, FMPS were low from the beginning of the study. There was little additional benefit to plaque reduction from the therapy at 2 and 6 months, and there was no difference between the treatment regimes. Pre-treatment sessions to achieve plaque scores  $< 20\%$  were included in order to reduce the impact of inadequate plaque control in the success of non-surgical treatment (Magnusson et al. 1984). This was important because full-mouth instrumentation was performed in two visits, and thus the therapist had fewer opportunities to deliver, check and reinforce the necessary oral hygiene instructions.

Our experimental population consisted of subjects with the clinical characteristics of GAP according to the criteria of the 1999 international classi-



Table 7. Type of adverse events at the 1- and 5-week follow-up visit

Type of adverse event number (percentage) of subjects	Time period (week)	Test group, N = 20	Placebo group, N = 21
Stomach upset (nausea and vomiting)	1	3(15%)	0
	5	1(5%)	0
Gastrointestinal disorder (diarrhea)	1	3(15%)	0
	5	0	0
Headache	1	1(5%)	0
	5	0	0
Periodontal abscess	1	0	2 (9.5%)
	5	0	0
Tooth loss, tooth extraction	1	0	0
	5	1(5%)	1(4.8%)
Metallic taste	1	1(5%)	0
	5	0	0
Intra-oral tissue alteration	1	0	2 (9.5%)
	5	0	0
General unwellness (irritability, flu, etc.)	1	3 (15%)	0
	5	0	0

fication (Armitage 1999). Because of the recently reported difficulties encountered with this classification (Mombelli et al. 2002, Meyer et al. 2004), extra efforts were directed towards selecting "clear cases". Our patients were mainly Caucasians, with an average of 31 years of age, who presented with almost all teeth and with severe widespread disease (an average of 33% of the sites with PPD  $\geq$  5 mm after probing six sites around each tooth). Patients, however, were not screened or selected based upon a microbiological diagnosis. The lack of microbiological entry criteria had implications on the choice of antibiotic regimen, and indicates that our results are applicable to subjects where the antibiotic is used empirically, i.e. without specific targeting based on the microbial results (Mombelli 2005, van Winkelhoff et al. 2005). Nevertheless, microbiological outcomes of treatment will be reported in a separate paper.

In this study, we prescribed 500 mg of amoxicillin combined with 500 mg of metronidazole three times a day for 7 days. This dosage has not been reported in previous clinical trials. It aims to provide a wide spectrum of activity and to reach and maintain serum concentrations above the minimum effective concentration. The rationale for the wide spectrum has been previously discussed and is based on the reported high prevalence of *A. actinomycetemcomitans* and anaerobic pathogens in GAP patients (Sasaki et al. 1989, Kamma et al. 1994, Listgarten et al. 1995, Lopez et al. 1995, Tonetti and Mombelli 1999, Ishikawa et al. 2002, Lee et al. 2003, Takeuchi et al. 2003). The choice of dosage comes from an

analysis of previous studies in chronic periodontitis subjects and the lack of significant adjunctive benefit reported in studies that have used marginally effective doses of antibiotic (Van Winkelhoff et al. 1992, Winkel et al. 1997, Palmer et al. 1999). Attention has been drawn recently to the fact that the amount of metronidazole needed for effective concentration in body fluids amounts to 20–25 mg/kg, and that an insufficient antibiotic concentration would turn into a lack of effect on clinical and microbiological parameters (Van Winkelhoff et al. 1999). This means that 1400–1750 mg/day of the medication should be taken by a 70 kg adult patient (Winkel et al. 1997). Therefore, in GAP patients with a high prevalence of anaerobic and micro-aerophilic periodontal pathogens, a moderate dose of amoxicillin (375–500 mg) will have synergistic effects with metronidazole and its hydroxymetabolite against *A. actinomycetemcomitans* (Pavicic et al. 1992), while a high dose of metronidazole (500 mg) will target the anaerobic microflora.

It is clear from other clinical trials that mean full-mouth PPD and LCAL values may not be the best way to describe the data. Shallow sites, which are not expected to change as a result of therapy, are likely to significantly dilute the changes observed at the deeper sites, which are the ones of therapeutic concern. Therefore, the primary outcome variable selected was the difference in PPD reduction between the treatment groups at deep pockets. The mean PPD reduction at 6 months was 1.8 mm (95% CI 1.3, 2.3) for the placebo group and 3.1 mm (2.7, 3.5) for the test group. A

multivariate model (Table 3) determined that the additional benefit for test subjects after taking into account the potential sources of variability was 1.4 mm (0.8, 2.0). It should be noted that the results obtained in the control group were within the range expected from non-surgical periodontal treatment in chronic periodontitis patients. Cobb (1996) reviewed the most relevant clinical studies related to PPD reduction after non-surgical therapy alone, and found that at deep pockets (PPD  $\geq$  7 mm), the mean PPD reduction was 2.2 mm. This was in excellent agreement with the results of our placebo group, which exhibited a mean PPD reduction of 2.1 mm at 2 months and 1.8 mm at 6 months. The results are also comparable with those of the control group in a similar study in aggressive periodontitis patients treated with the adjunctive use of three different single antibiotic regimens (Sigusch et al. 2001). They showed that in pockets  $>$  6 mm, a 2.3 mm PPD reduction was achieved 6 months after treatment. The similarity between the outcomes of subgingival instrumentation at deep pockets of chronic and aggressive periodontitis patients is in agreement with reports indicating that aggressive periodontitis patients respond well to mechanical instrumentation alone (Wennstrom et al. 1986).

In contrast, the adjunctive benefits are more difficult to compare with other studies because of the paucity of randomized controlled clinical trial in GAP patients. Recent meta-analyses by Herrera et al. (2002) and Haffajee et al. (2003) have suggested that the adjunctive benefit expected from antibiotic usage may be greater in aggressive periodontitis patients. An additional gain in LCAL of 0.7 mm was observed in seven studies including 231 subjects receiving the antibiotic adjunctively to non-surgical or surgical root instrumentation. In the present study, the use of adjunctive antimicrobials resulted in an additional benefit of 0.5 mm in LCAL gain in moderate pockets (4–6 mm), while a 1.0 mm benefit was observed in deeper pockets ( $\geq$  7 mm) compared with non-surgical root debridement alone.

Our test subjects showed a mean PPD reduction of 3.1 mm in pockets  $\geq$  7 mm at 6 months. These results are slightly inferior but comparable with the 6-month outcomes reported by Sigusch et al. (2001) with the use of adjunctive metronidazole or clindamycin. In terms of PPD reduction at 6 months, the added benefit

that we observed was 0.4 mm for moderate pockets (4–6 mm) and 1.4 mm for the deep pockets ( $\geq 7$  mm). This gradient of effect is consistent with the notion that the benefit of the antibiotic is particularly evident at deeper pockets where mechanical debridement is less effective.

The multivariate analysis identified cigarette smoking as a significant factor ( $p = 0.007$ ): in a non-smoker, deep pockets reduced by an average of 0.9 mm more than in a smoker, regardless of the treatment group. This result is in accordance with previous studies that have demonstrated, in chronic periodontitis patients, that less PPD reduction and less LCAL gain occur in smokers as compared with non-smokers (Preber and Bergstrom 1986, Jin et al. 2000) or even former smokers (Grossi et al. 1997).

For most clinicians, results reported as mean full-mouth values offer little insight into the clinical relevance of the findings. To illustrate tangible clinical benefits, after the analysis on the primary outcome variable (PPD reduction in pockets  $\geq 7$  mm) and the other parameters based on full-mouth mean or median values, secondary analyses were carried out. Accordingly, the test treatment significantly decreased the percentage of pockets that remained above specific thresholds at 2 and 6 months after subgingival debridement (Table 6). As in previous studies (Berglundh et al. 1998), the percentage of all sites that gained  $\geq 2$  mm in LCAL and the percentage of all sites that had a PPD reduction  $\geq 2$  mm were statistically significantly higher in the test group at 2 and 6 months. Furthermore, the percentage of sites experiencing disease progression (LCAL loss of 2 mm or more over the 6-month observation period) was significantly decreased by the antibiotic combination.

However, a critical question at re-evaluation 3–6 months after the completion of non-surgical therapy is related to what to do with residual pockets and the need for further treatment beyond maintenance care. A recent systematic review on the clinical parameters used during re-evaluation (residual pockets, bleeding on probing and presence of furcation defects) and predict further attachment loss (Renvert & Persson 2002) concluded that the presence of deep residual pockets was associated with further disease progression and hence decreased maintainability. This conclusion can be used as a rationale for providing further treatment to

patients, e.g. pocket reduction surgery. As reported in other studies (Loesche et al. 1992, Smith et al. 2002), we compared the reduction in the frequency of sites in test and control patients who would require surgical intervention for PPD reduction at 2 or 6 months using 5 mm as the discriminant value. At 2 months post-therapy, we found that the subjects receiving the test treatment showed a 71% reduction in the number of sites in need of surgical intervention, while the subjects in the placebo group had a reduction of 57% ( $p = 0.039$ ). These values were maintained at 6 months. Using an even stricter discriminant value (4 mm), at 6 months, 55% of the test sites with baseline pockets showed maintainable probing depths (3 mm or less) as compared with 37% of the placebo sites ( $p = 0.038$ ).

Two subjects in the placebo group and four subjects in the test group did not fully comply with the medication. The fact that 20% of test subjects did not complete the full cycle of antibiotic may have led to an underestimation of the adjunctive effect in our intention-to-treat analysis. On the other hand, this fact provides the study with a higher external validity as lack of compliance is a reality in clinical practice (Grob 1992). Furthermore, given the fact that some of the observed incomplete compliance can be attributed to the onset of significant side effects, clinicians prescribing this regimen to their patients should expect less than optimal compliance. An additional analysis assessing the impact of incomplete compliance will be presented in a companion paper focused on the microbiological outcomes of the study where an "on-drug" analysis gives important additional information.

In conclusion, the findings of the present study have indicated that the adjunctive use of systemic amoxicillin plus metronidazole, during full-mouth non-surgical cause-related periodontal treatment (FSR) performed within 24 h, has resulted in significant additional improvements in the clinical conditions of GAP patients when compared with FSR alone. These observations are valid for both the 2- and 6-month evaluations after the completion of active treatment.

#### Acknowledgements

This study was supported by the Periodontal Research Fund of the Eastman

Dental Institute. L. N. is supported by a fellowship from the Italian Society of Periodontology, SidP.

#### References

- Apatzidou, D. A. & Kinane, D. F. (2004) Quadrant root planing versus same-day full-mouth root planing. I. Clinical findings. *Journal of Clinical Periodontology* **31**, 132–140.
- Armitage, G. C. (1999) Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Annals of Periodontology* **4**, 1–6.
- Berglundh, T., Krok, L., Liljenberg, B., Westfelt, E., Serino, G. & Lindhe, J. (1998) The use of metronidazole and amoxicillin in the treatment of advanced periodontal disease. A prospective, controlled clinical trial. *Journal of Clinical Periodontology* **25**, 354–362.
- Bollen, C. M., Vandekerckhove, B. N., Papaioannou, W., van Eldere, J. & Quirynen, M. (1996) Full- versus partial-mouth disinfection in the treatment of periodontal infections. A pilot study: long-term microbiological observations. *Journal of Clinical Periodontology* **23**, 960–970.
- Buchmann, R., Nunn, M. E., Van Dyke, T. E. & Lange, D. E. (2002) Aggressive periodontitis: 5-year follow-up of treatment. *Journal of Periodontology* **73**, 675–683.
- Cobb, C. M. (1996) Non-surgical pocket therapy: mechanical. *Annals of Periodontology* **1**, 443–490.
- Flemmig, T. F., Milian, E., Karch, H. & Klaiiber, B. (1998) Differential clinical treatment outcome after systemic metronidazole and amoxicillin in patients harboring *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and/or *Porphyromonas gingivalis*. *Journal of Clinical Periodontology* **25**, 380–387.
- Greenstein, G. (2002) Full-mouth therapy versus individual quadrant root planning: a critical commentary. *Journal of Periodontology* **73**, 797–812.
- Grob, P. R. (1992) Antibiotic prescribing practices and patient compliance in the community. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases* **83** (Suppl.), 7–14.
- Grossi, S. G., Zambon, J., Machtei, E. E., Schifferle, R., Andreana, S., Genco, R. J., Cummins, D. & Harrap, G. (1997) Effects of smoking and smoking cessation on healing after mechanical periodontal therapy. *Journal of the American Dental Association* **128**, 599–607.
- Haffajee, A. D., Socransky, S. S. & Gunsolley, J. C. (2003) Systemic anti-infective periodontal therapy. A systematic review. *Annals of Periodontology* **8**, 115–181.
- Herrera, D., Sanz, M., Jepsen, S., Needleman, I. & Roldan, S. (2002) A systematic review on the effect of systemic antimicrobials as an adjunct to scaling and root planing in periodontitis patients. *Journal of Clinical Periodontology* **29** (Suppl. 3), 136–159.
- Hollis, S. & Campbell, F. (1999) What is meant by intention to treat analysis? Survey of

- published randomised controlled trials. *British Medical Journal* **319**, 670–674.
- Ishikawa, I., Kawashima, Y., Oda, S., Iwata, T. & Arakawa, S. (2002) Three case reports of aggressive periodontitis associated with *Porphyromonas gingivalis* in younger patients. *Journal of Periodontal Research* **37**, 324–332.
- Jin, L., Wong, K. Y., Leung, W. K. & Corbet, E. F. (2000) Comparison of treatment response patterns following scaling and root planing in smokers and non-smokers with untreated adult periodontitis. *Journal of Dentistry* **11**, 35–41.
- Kamma, J. J., Nakou, M. & Manti, F. A. (1994) Microbiota of rapidly progressive periodontitis lesions in association with clinical parameters. *Journal of Periodontology* **65**, 1073–1078.
- Kinane, D. F. (2005) Single-visit, full-mouth ultrasonic debridement: a paradigm shift in periodontal therapy? *Journal of Clinical Periodontology* **32**, 732–733.
- Koshy, G., Kawashima, Y., Kiji, M., Nitta, H., Umeda, M., Nagasawa, T. & Ishikawa, I. (2005) Effects of single-visit full-mouth ultrasonic debridement versus quadrant-wise ultrasonic debridement. *Journal of Clinical Periodontology* **32**, 734–743.
- Lee, J. W., Choi, B. K., Yoo, Y. J., Choi, S. H., Cho, K. S., Chai, J. K. & Kim, C. K. (2003) Distribution of periodontal pathogens in Korean aggressive periodontitis. *Journal of Periodontology* **74**, 1329–1335.
- Listgarten, M. A., Wong, M. Y. & Lai, C. H. (1995) Detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, and *Bacteroides forsythus* in an *A. actinomycetemcomitans*-positive patient population. *Journal of Periodontology* **66**, 158–164.
- Loesche, W. J., Giordano, J. R., Hujoel, P., Schwarcz, J. & Smith, B. A. (1992) Metronidazole in periodontitis: reduced need for surgery. *Journal of Clinical Periodontology* **19**, 103–112.
- Lopez, N. J., Mellado, J. C., Giglio, M. S. & Leighton, G. X. (1995) Occurrence of certain bacterial species and morphotypes in juvenile periodontitis in Chile. *Journal of Periodontology* **66**, 559–567.
- Magnusson, I., Lindhe, J., Yoneyama, T. & Liljenberg, B. (1984) Recolonization of a subgingival microbiota following scaling in deep pockets. *Journal of Clinical Periodontology* **11**, 193–207.
- Meyer, J., Lallam-Laroye, C. & Dridi, M. (2004) Aggressive periodontitis – what exactly is it? *Journal of Clinical Periodontology* **31**, 586–587.
- Mombelli, A. (2005) Antimicrobial profiles of periodontal pathogens and systemic antimicrobial therapy. *Journal of Clinical Periodontology* **32**, 891–892.
- Mombelli, A., Casagni, F. & Madianos, P. N. (2002) Can presence or absence of periodontal pathogens distinguish between subjects with chronic and aggressive periodontitis? A systematic review. *Journal of Clinical Periodontology* **29** (Suppl. 3), 10–21.
- Mongardini, C., van Steenberghe, D., Dekeyser, C. & Quirynen, M. (1999) One stage full-versus partial-mouth disinfection in the treatment of chronic adult or generalized early-onset periodontitis. I. Long-term clinical observations. *Journal of Periodontology* **70**, 632–645.
- Palmer, R. M., Matthews, J. P. & Wilson, R. F. (1999) Non-surgical periodontal treatment with and without adjunctive metronidazole in smokers and non-smokers. *Journal of Clinical Periodontology* **26**, 158–163.
- Pavlicic, M. J., Van Winkelhoff, A. J. & de Graaff, J. (1991) Synergistic effects between amoxicillin, metronidazole, and the hydroxy-metabolite of metronidazole against *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **35**, 961–966.
- Pavlicic, M. J., Van Winkelhoff, A. J. & de Graaff, J. (1992) In vitro susceptibilities of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* to a number of antimicrobial combinations. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **36**, 2634–2638.
- Pavlicic, M. J., Van Winkelhoff, A. J., Douque, N. H., Steures, R. W. & de Graaff, J. (1994a) Microbiological and clinical effects of metronidazole and amoxicillin in *Actinobacillus actinomycetemcomitans*-associated periodontitis. A 2-year evaluation. *Journal of Clinical Periodontology* **21**, 107–112.
- Pavlicic, M. J., Van Winkelhoff, A. J., Pavlicic-Temming, Y. A. & de Graaff, J. (1994b) Amoxicillin causes an enhanced uptake of metronidazole in *Actinobacillus actinomycetemcomitans*: a mechanism of synergy. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **34**, 1047–1050.
- Preber, H. & Bergstrom, J. (1986) The effect of non-surgical treatment on periodontal pockets in smokers and non-smokers. *Journal of Clinical Periodontology* **13**, 319–323.
- Quirynen, M., Bollen, C. M., Vandekerckhove, B. N., Dekeyser, C., Papaioannou, W. & Eyssen, H. (1995) Full- vs. partial-mouth disinfection in the treatment of periodontal infections: short-term clinical and microbiological observations. *Journal Dental Research* **74**, 1459–1467.
- Renvert, S. & Persson, G. R. (2002) A systematic review on the use of residual probing depth, bleeding on probing and furcation status following initial periodontal therapy to predict further attachment and tooth loss. *Journal of Clinical Periodontology* **29** (Suppl. 3), 82–89.
- Rooney, J., Wade, W. G., Sprague, S. V., Newcombe, R. G. & Addy, M. (2002) Adjunctive effects to non-surgical periodontal therapy of systemic metronidazole and amoxicillin alone and combined. A placebo controlled study. *Journal of Clinical Periodontology* **29**, 342–350.
- Sasaki, N., Nakagawa, T., Seida, K., Ishihara, K. & Okuda, K. (1989) Clinical, microbiological and immunological studies of post-juvenile periodontitis. *Bulletin of Tokyo Dental College* **30**, 205–211.
- Sigusch, B., Beier, M., Klinger, G., Pfister, W. & Glockmann, E. (2001) A 2-step non-surgical procedure and systemic antibiotics in the treatment of rapidly progressive periodontitis. *Journal of Periodontology* **72**, 275–283.
- Smith, S. R., Foyle, D. M., Daniels, J., Joyston-Bechal, S., Smales, F. C., Sefton, A. & Williams, J. (2002) A double-blind placebo-controlled trial of azithromycin as an adjunct to non-surgical treatment of periodontitis in adults: clinical results. *Journal of Clinical Periodontology* **29**, 54–61.
- Takeuchi, Y., Umeda, M., Ishizuka, M., Huang, Y. & Ishikawa, I. (2003) Prevalence of periodontopathic bacteria in aggressive periodontitis patients in a Japanese population. *Journal of Periodontology* **74**, 1460–1469.
- Tonetti, M. S., Lang, N. P., Cortellini, P., Suvar, J. E., Adriaens, P., Dubravec, D., Fonzar, A., Fourmoussis, I., Mayfield, L., Rossi, R., Silvestri, M., Tiedemann, C., Topoll, H., Vangsted, T. & Wallkamm, B. (2002) Enamel matrix proteins in the regenerative therapy of deep intrabony defects. *Journal of Clinical Periodontology* **29**, 317–325.
- Tonetti, M. S. & Mombelli, A. (1999) Early-onset periodontitis. *Annals of Periodontology* **4**, 39–53.
- Tu, Y. K., Maddick, I. H., Griffiths, G. S. & Gilthorpe, M. S. (2004) Mathematical coupling can undermine the statistical assessment of clinical research: illustration from the treatment of guided tissue regeneration. *Journal of Dentistry* **32**, 133–142.
- Vandekerckhove, B. N., Bollen, C. M., Dekeyser, C., Darius, P. & Quirynen, M. (1996) Full- versus partial-mouth disinfection in the treatment of periodontal infections. Long-term clinical observations of a pilot study. *Journal of Periodontology* **67**, 1251–1259.
- Wennstrom, A., Wennstrom, J. & Lindhe, J. (1986) Healing following surgical and non-surgical treatment of juvenile periodontitis. A 5-year longitudinal study. *Journal of Clinical Periodontology* **13**, 869–882.
- Wennstrom, J. L., Tomasi, C., Bertelle, A. & Dellasega, E. (2005) Full-mouth ultrasonic debridement versus quadrant scaling and root planing as an initial approach in the treatment of chronic periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology* **32**, 851–859.
- Winkel, E. G., Van Winkelhoff, A. J., Timmerman, M. F., van der Velden, U. & Van der Weijden, G. A. (2001) Amoxicillin plus metronidazole in the treatment of adult periodontitis patients. A double-blind placebo-controlled study. *Journal of Clinical Periodontology* **28**, 296–305.
- Winkel, E. G., Van Winkelhoff, A. J., Timmerman, M. F., Vangsted, T. & van der Velden, U. (1997) Effects of metronidazole in patients with “refractory” periodontitis associated with *Bacteroides forsythus*. *Journal of Clinical Periodontology* **24**, 573–579.
- Winkel, E. G., Van Winkelhoff, A. J. & van der Velden, U. (1998) Additional clinical and microbiological effects of amoxicillin and metronidazole after initial periodontal therapy. *Journal of Clinical Periodontology* **25**, 857–864.
- van Winkelhoff, A. J., Herrera, D., Oteo, A. & Sanz, M. (2005) Antimicrobial profiles of

periodontal pathogens isolated from periodontitis patients in the Netherlands and Spain. *Journal of Clinical Periodontology* **32**, 893–898.

van Winkelhoff, A. J., Rodenburg, J. P., Goene, R. J., Abbas, F., Winkel, E. G. & de Graaff, J. (1989) Metronidazole plus amoxicillin in the treatment of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* associated periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology* **16**, 128–131.

van Winkelhoff, A. J., Tjihof, C. J. & de Graaff, J. (1992) Microbiological and clinical results of metronidazole plus amoxicillin therapy in *Actinobacillus actinomycetemcomitans*-associated periodontitis. *Journal of Periodontology* **63**, 52–57.

van Winkelhoff, A. J., Winkel, E. G. & Van denbroucke-Grauls, C. M. (1999) On the dosage of antibiotics in clinical trials. *Journal of Clinical Periodontology* **26**, 764–766.

Address:  
 Maurizio S. Tonetti  
 Department of Periodontology  
 University of Connecticut Health Center  
 263 Farmington Ave  
 Farmington, CT 06030  
 USA  
 E-mail: MTonetti@uchc.edu

<p><b>Clinical relevance</b></p> <p><i>Scientific rationale for study:</i> Adjunctive systemic antibiotics may benefit aggressive periodontitis patients during non-surgical therapy. Insufficient data, however, exist supporting this approach.</p>	<p><i>Principal findings:</i> Subjects receiving the adjunctive amoxicillin and metronidazole combination demonstrated statistically significant additional improvements in clinical outcomes with respect to debridement alone. The improvements were clinically significant, as demon-</p>	<p>strated by the reduced prevalence of pockets.</p> <p><i>Practical implications:</i> Patients with generalized aggressive periodontitis may benefit from the adjunctive administration of amoxicillin and metronidazole during the initial phase of periodontal treatment.</p>
---	--	--

# II









2. Griffiths GS, Ayob R, Guerrero A, Nibali L, Suvan J, Moles DR, Tonetti MS. Amoxicillin and metronidazole as an adjunctive treatment in generalized aggressive periodontitis at initial therapy or re-treatment: a randomized controlled clinical trial. *J Clin Periodontol* 2011; 38:43-49.

Antecedentes: De manera previa hemos demostrado que el metronidazol y la amoxicilina sistémica mejoraron significativamente los resultados del desbridamiento no quirúrgico en pacientes con periodontitis agresiva generalizada. Este estudio tuvo como objetivo observar si el retratamiento con antimicrobianos coadyuvantes proporcionaría al grupo placebo beneficios comparables con los obtenidos en el grupo test.

Métodos: Treinta y ocho de los 41 sujetos, del estudio inicial de los 6 meses, completaron la segunda fase consistente en el retratamiento de los sitios con bolsas residuales  $\geq 5$  mm. Los sujetos tratados con medicación placebo en la fase 1 recibieron antibióticos coadyuvantes durante 7 días. Los parámetros clínicos se recogieron a los 2 meses después del tratamiento (8 meses desde el inicio del estudio 1)

Resultados: Los pacientes que recibieron antibióticos al inicio del estudio (AB1) mostraron una mejoría estadísticamente significativa en la reducción de profundidad de bolsa al sondaje (PBS) y en el porcentaje de los sitios que mejoraron por encima de los umbrales clínicamente relevantes, en comparación con los pacientes que recibieron antibióticos en el retratamiento (AB2) tras 8 meses de seguimiento. En las bolsas profundas ( $\geq 7$  mm) la diferencia media entre AB1 y AB2 fue de 0,9 mm ( $P=0,003$ ), y en bolsas moderadas (4-6 mm) fue de 0,4 mm ( $p=0,036$ ) respectivamente. El porcentaje de bolsas  $\geq 5$  mm que se convirtieron de a  $\leq 4$  mm tras el tratamiento, fue de 83% en AB1 en comparación con el 67% ( $p=0,041$ ) en AB2, y para las bolsas que se convirtieron de  $\geq 4$  a  $\leq 3$  mm los resultados fueron de 63% en comparación con el 49% ( $p=0,297$ ) respectivamente.

Conclusiones: A los 8 meses, los pacientes que recibieron antibióticos en al inicio del estudio demostraron beneficios estadísticamente significativos en comparación con los que recibieron el antibiótico como parte del retratamiento.



# Amoxicillin and metronidazole as an adjunctive treatment in generalized aggressive periodontitis at initial therapy or re-treatment: a randomized controlled clinical trial

Gareth S. Griffiths<sup>1</sup>, Rasidah Ayob<sup>2</sup>, Adrian Guerrero<sup>3</sup>, Luigi Nibali<sup>2</sup>, Jean Suvan<sup>2</sup>, David R. Moles<sup>4</sup> and Maurizio S. Tonetti<sup>5</sup>

<sup>1</sup>University of Sheffield, Academic Unit of Restorative Dentistry, Sheffield, UK; <sup>2</sup>Unit of Periodontology and Eastman Clinical Investigation Centre, UCL Eastman Dental Institute, London, UK; <sup>3</sup>Graduate Comprehensive Dentistry, University of Barcelona, and Private Periodontal Practice, Malaga, Spain; <sup>4</sup>Health Services Research, Peninsula Dental School, University of Plymouth, Plymouth, UK; <sup>5</sup>European Research Group on Periodontology (ERGOPero), Berne, Switzerland

Griffiths GS, Ayob R, Guerrero A, Nibali L, Suvan J, Moles DR, Tonetti MS. Amoxicillin and metronidazole as an adjunctive treatment in generalized aggressive periodontitis at initial therapy or re-treatment: a randomized controlled clinical trial. J Clin Periodontol 2011; 38: 43–49. doi: 10.1111/j.1600-051X.2010.01632.x

## Abstract

**Background:** Previously, we showed that systemic metronidazole and amoxicillin significantly improved the outcomes of non-surgical debridement in generalized aggressive periodontitis patients. This study aimed to observe whether re-treatment with adjunctive antimicrobials would give the placebo group benefits comparable with the test group.

**Methods:** Thirty-eight of 41 subjects, from the initial 6-month trial, completed the second phase, re-treatment of sites with remaining pockets  $\geq 5$  mm. Subjects on placebo in phase one, received adjunctive antibiotics for 7 days. Clinical parameters were collected at 2 months posttreatment (8 months from baseline).

**Results:** Patients who received antibiotics at initial therapy, showed statistically significant improvement in pocket depth reduction and in the % of sites improving above clinically relevant thresholds, compared with patients who received antibiotics at re-treatment. In deep pockets ( $\geq 7$  mm), the mean difference was 0.9 mm ( $p = 0.003$ ) and in moderate pockets (4–6 mm) it was 0.4 mm ( $p = 0.036$ ). For pockets converting from  $\geq 5$  to  $\leq 4$  mm, this was 83% compared with 67% ( $p = 0.041$ ) and pockets converting from  $\geq 4$  to  $\leq 3$  mm was 63% compared with 49% ( $p = 0.297$ ).

**Conclusions:** At 8 months, patients who had antibiotics at initial therapy showed statistically significant benefits compared with those who had antibiotics at re-treatment.

Key words: generalized aggressive periodontitis; antibiotics; treatment; randomized controlled clinical trial; human

Accepted for publication 14 September 2010

## Conflict of interest and source of funding statement

There is no conflict of interest associated with the present study. This study was supported by the Periodontal Research Fund of the Eastman Dental Institute. L. N. was supported by a fellowship from the Italian Society of Periodontology, SIdP.

Generalized aggressive periodontitis (GAgP) affects a minority of the patients presenting with periodontal disease. However, it is highly significant because it is characterized by severe destruction of the supporting apparatus of the teeth, which may lead to edentulism early in life. Because of its relatively rare occur-

rence (Demmer & Papapanou 2010), few studies have evaluated how to treat this condition (Xajigeorgiou et al. 2006, Mestnik et al. 2010). The current notion is that, as with most forms of periodontitis, the first step in treatment of GAgP is a cause-related treatment phase aimed at the reduction and/or elimination

of the pathogenic microorganisms. In addition, it has been suggested that there may be adjunctive benefits from the use of systemic antimicrobials (Herrera et al. 2002, Haffajee et al. 2003).

In a previous study (Guerrero et al. 2005), we showed that a 7-day adjunctive course of systemic metronidazole and amoxicillin significantly improved the short-term clinical outcomes of non-surgical debridement in subjects with GAgP. However, because non-surgical therapy has been shown to be effective in treating periodontal diseases, most clinicians adopt a non-surgical approach without adjuncts and will review the situation before considering alternative treatments, which may include the use of systemic antimicrobials. Thus, antimicrobials are more likely to be used at re-treatment rather than as part of the initial therapy.

As the first patients from the study, by Guerrero et al. (2005) were completing the 6 months re-assessment it was clear that although there was an improvement in most subjects, there were still residual pockets  $\geq 5$  mm. Further treatment was indicated and we planned extending the study to answer the question, "If we

performed further instrumentation and gave adjunctive antimicrobials to the group that had previously received placebo medication, would both groups end up with similar outcomes"? As both groups would have received similar treatments at this stage the null hypothesis would be that there was no difference in outcomes between the two groups. If differences were observed between the two groups, these may be attributable to the timing of when antibiotics were given.

## Material and Methods

### Experimental design

The first phase of the study was a randomized placebo-controlled, parallel design, double-blind clinical trial with 6-month follow-up, while the second phase study was a further 2-month follow-up on the same patient sample. During this second phase study, subjects who comprised the placebo group of the first phase study received re-treatment with the adjunctive use of antibiotics, while the subjects who comprised the first phase study test group received

re-treatment alone. Throughout this second phase, the operator and examiner remained blinded to treatment assignment. As no placebo was used at this stage, the subjects were no longer blinded to the treatment received.

Ethical approval was obtained from the Eastman Dental Institute University College London Hospitals Joint Research and Ethics Committee and the study was conducted according to the principles outlined in the Declaration of Helsinki on experimentation involving human subjects.

### Inclusion/exclusion criteria

The details of the initial study have been described previously (Guerrero et al. 2005) and are summarized in Fig. 1. Briefly, 51 subjects diagnosed with GAgP as per the 1999 classification (Armitage 1999) were considered eligible. The study included subjects (i) with at least 20 teeth present; (ii) in good general health; (iii) aged between 16 and 35 when first diagnosed with aggressive periodontal disease; (iv) exhibiting at least eight teeth presenting at least one site with probing pocket depth (PPD)

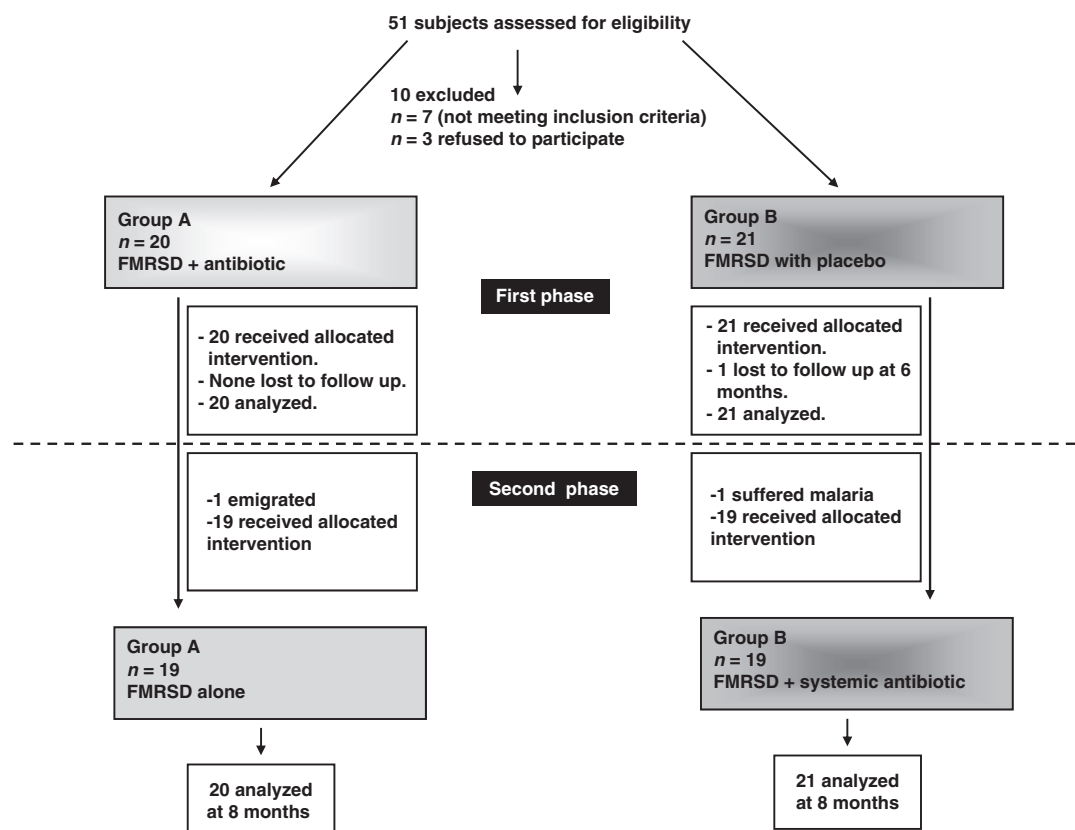


Fig. 1. Flow diagram showing recruitment, retention and the different phases of the study design. FMRSD, full-mouth root surface debridement.

and lifetime cumulative attachment loss (LCAL)  $\geq 5$  mm, with three or more being other than first molars or incisors. Subjects were excluded from the study if they: (i) were considered to have a diagnosis of chronic periodontitis (Armitage 1999); (ii) were pregnant or lactating females; (iii) were females of child-bearing age not using a standard accepted method of birth control; (iv) required antibiotic pre-medication; (v) had any other systemic diseases; (vi) had received antibiotic treatment in the previous 3 months; (vii) had received a course of periodontal treatment within the last 6 months; (viii) were allergic to penicillin or metronidazole and (ix) were not able or willing to consent to participating in the study. Informed consent was obtained from all the subjects to be entered in the study.

#### Sample size calculation

The sample size calculation was based on the requirements of the first phase study and used data from the study by Sigusch et al. (2001). This determined that 17 subjects per treatment arm would provide 80% power to detect a true difference of 1.0 mm between test and placebo using PPD reduction in pockets  $\geq 7$  mm as the primary outcome variable, assuming that the common standard deviation is 1.0 mm. Accordingly, a sample of 21 subjects per arm (42 in total) were to be recruited to compensate for possible drop-out during the study period.

#### Population screening

Ten subjects were excluded as shown in Fig. 1, and 41 commenced the first phase study. Subject and clinical characteristics of the two groups at baseline are shown in Table 1. Baseline examinations were completed by an examiner (L. N.) and the operator (A. G.) completed all instrumentations within a 24 h period. Patients were then given identical bottles containing antibiotics or placebo according to the randomization. Only the study co-ordinator (J. S.) knew what was in the bottles; thus, the examiner, operator and the patient were blind to the medication given. Subjects were randomly assigned by a computer-generated table to receive one of the two treatments.

Before entering the second phase, one subject from the original test group and two from the placebo withdrew; one of these two later subjects was lost to follow-up between the 2- and 6-month visit

Table 1. Subject and clinical characteristics of the two groups at baseline

Parameter	Antibiotic initially (n = 20)	Antibiotic at re-treatment (n = 21)
Age mean (95% CI)	31 (28, 34)	32 (29, 35)
Females nos (%)	16 (80%)	12 (57%)
Smokers nos (%)	5 (25%)	4 (19%)
Caucasians nos (%)	13 (65%)	10 (48%)
Mean nos of teeth at baseline (95% CI)	26 (25, 27)	26 (25, 27)
Baseline % of pockets $\geq 4$ mm median (IQ range)	46 (38, 57)	46 (34, 60)

Mann-Whitney test,  $\chi^2$ -test; and paired *t*-test showed no significant differences between groups. CI, confidence intervals; IQ, interquartile range; nos, numbers.

(Fig. 1). These were viewed as random events and not study related. Consequently, 19 subjects entered each group for the second phase. However, data from the last observation of the three subjects who dropped out during the earlier phases of the study were carried forward until the end of the study.

#### Clinical procedures and allocation concealment

All of these subjects had instrumentation within a 24-h period, by a single experienced therapist (R. A.), not the same individual as the first phase of the study. Randomization had occurred during the first phase of the study and allocation concealment was preserved as follows. The study coordinator prepared a closed envelope, which indicated whether or not subjects should have adjunctive antimicrobials. This envelope was opened by the therapist at the end of the instrumentation. Thus, the operator (R. A.) and examiner (L. N.) remained blind to treatment assignment. In order to keep the examiner masked from treatment assignment, self-reported adverse events were recorded by the therapist during the 1-week posttreatment control visit, and the subjects were asked not to mention to the examiner anything about adverse events or the medication taken. All 38 subjects completed the examination 2 months after the second phase of the study (8 months of the total study).

#### Clinical examination

Clinical parameters were assessed by the calibrated examiner (L. N.) using a UNC-15 periodontal probe, at six sites/tooth excluding third molars. The examiner recorded PPD and recession of the gingival margin (REC), and LCAL was calculated as the sum of PPD and REC. Ten non-study subjects with aggressive periodontitis were recruited and used for

the calibration exercise, where the examiner showed 99.7% reproducibility within  $\pm 2$  mm in LCAL measurements. Details of the clinical examination were as described previously (Guerrero et al. 2005). Thus, the same information was recorded, by the same examiner at the baseline appointment of the first phase of treatment, at 2 months, at 6 months (second phase baseline) and at 8 months.

#### Non-surgical periodontal therapy

As in the first phase study reported by Guerrero et al. (2005), a standard cycle of periodontal therapy consisting of oral hygiene instructions, supra and subgingival mechanical instrumentation of the root surface was performed by a single experienced therapist (R. A.) using a piezoelectric instrument with fine tips (EMS, Nyon, Switzerland) and hand instruments as appropriate. The operator was not restricted by time, but completed the task until satisfied that each root surface to be treated had been adequately instrumented. The time taken for this instrumentation was recorded by the therapist. Local anaesthesia was used as necessary. The 19 subjects who took the antibiotics at re-treatment were provided with two bottles of medication. One bottle contained 21 capsules of 500 mg of amoxicillin, while the other contained 21 capsules of 500 mg metronidazole. Subjects were asked to take a pill of each medication three times a day during 7 days. All subjects used a 0.2% chlorhexidine rinse (supplied to improve and standardize initial plaque control compliance) for 2 weeks posttreatment and thereafter relied on standard oral hygiene methods as instructed at the commencement of the study.

#### 1 week posttreatment controls

The objectives of the posttreatment appointments were to control and rein-

force the oral hygiene habits of the subject, to monitor the early healing events, and report on any adverse events or additional medications taken. In addition, the 1-week posttreatment visit served as a compliance control, because subjects were asked to return any medication not taken and/or the empty bottles. The number of pills not taken by the subject was documented.

#### Re-assessment examinations

Re-assessment visit occurred at 2 months after the completion of the second phase treatment, 8 months since the baseline examination. During this appointment, the examiner recorded any medical history changes and the clinical periodontal parameters recorded at the baseline visit were repeated.

#### Primary and secondary outcome measures

The primary outcome measure of the study was PPD reduction at sites with initial PPD  $\geq 7$  mm. Secondary outcomes included differences between groups for (i) changes in mean PPD and LCAL at different initial PPD categories; (ii) changes in percentage of sites with PPD reduction of  $\geq 2$  mm; (iii) percentage of sites with PPD changing from  $\geq 5$  to  $\leq 4$  mm and the percentage of sites with PPD changing from  $\geq 4$  to  $\leq 3$  mm; (iv) description and frequency of adverse events; (v) instrumentation time and (vi) compliance with the systemic medication.

#### Data management and statistical analysis

Data were entered into an Excel (Microsoft Office 2000) database and were proofed for entry errors. The database was subsequently locked, imported into SPSS for Windows (SPSS Inc. version 11.0) formatted and analysed. A subject-level analysis was performed by computing a subject-level variable (at different PPD categories) for each of the parameters. Numerical data were summarized as means and 95% confidence intervals, and the percentage-based measures were summarized as the median of the percentage and inter-quartile range. Significance of differences between test and placebo groups in terms of numerical data was evaluated via univariate analysis using the independent sample *t*-test. The percentage data between the two groups were compared with the Mann-Whitney

test. The significance of the treatment option (antibiotics initially or antibiotics at re-assessment) on the dependent variables PPD reduction and LCAL gain at different initial PPD categories was estimated by analysis of covariance (ANCOVA). The models were adjusted for baseline values and controlled for smoking. The final model was then selected by including significant factors only. Model estimates included adjusted means and 95% confidence intervals. An intention-to-treat, last observation carried forward analysis was performed (Hollis & Campbell 1999). In addition, a per protocol analysis excluding those subjects who did not fully comply with the medication regimen, or that were lost to follow up, was also performed on the primary outcome variable (Dunn et al. 2005).

## Results

#### Subject characteristic accountability

Figure 1 indicates what happened to all potential subjects throughout the study from possible recruitment to completion. None of the demographic parameters (age, ethnicity, gender and smoking) showed a statistically significant difference between groups at baseline (Table 1).

Figure 2 shows the mean differences in PPD change for 0–2 months, 0–6 months and 0–8 months in deep pockets ( $\geq 7$  mm). The solid red line (antibiotics at the re-treatment phase) shows instrumentation alone in the first phase, which

at 0–2 months gives a mean reduction in PPD of 2.1 mm. The solid blue line (antibiotics at initial therapy) shows that the adjunctive use of antimicrobials gave an additional 0.9 mm mean reduction of PPD. At 0–6 months, the instrumentation alone (placebo group) shows some rebound, while the adjunctive antimicrobials show continued improvement. This magnifies the differences between the treatment groups, which at this stage was a mean difference of 1.4 mm. These data were reported previously in a tabular form by Guerrero et al. (2005). At 0–8 months, there was a big improvement in the red line, as this group had now received instrumentation plus antibiotics. There was a slight improvement of the blue line as this had undergone further instrumentation. The blue line still showed a 0.9 mm mean PPD improvement over the red line.

Multivariate models based on linear regression analysis of covariance (ANCOVA) were constructed taking into account potential sources of variability such as smoking status and baseline pocket depth. Table 2 shows the analysis of covariance for PPD reduction and LCAL gain at sites with baseline PPD classified as moderate (4–6 mm), or deep ( $\geq 7$  mm). The highlighted band for PPD reduction in sites with initial PPD  $\geq 7$  mm (primary outcome variable) represents the statistical analysis related to the data presented in Fig. 2 and shows that the differences were highly significant statistically. Furthermore, a per protocol analysis on this primary outcome variable (excluding subjects who did

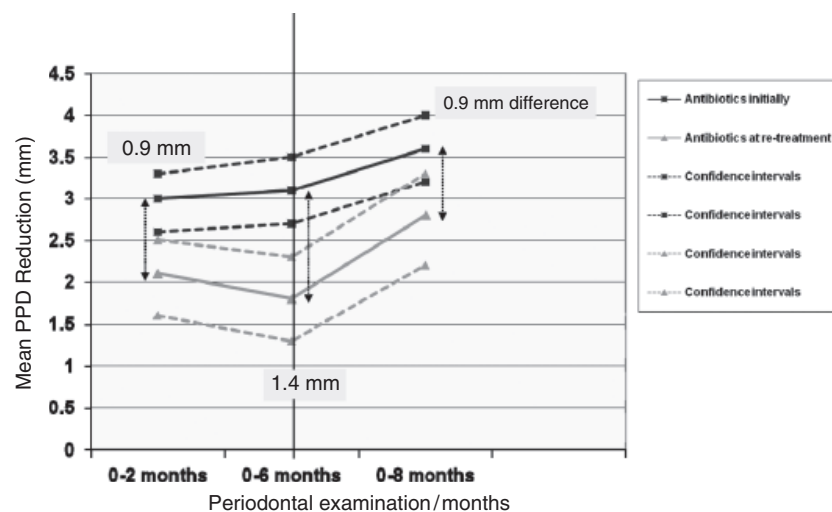


Fig. 2. Mean probing pocket depth (PPD) reduction and confidence intervals between 0–2, 0–6 and 0–8 months at sites probed as  $\geq 7$  mm at baseline. The differences between the two groups in mean PPD reduction at each time interval are highlighted within the figure.

Table 2. Analysis of covariance (ANCOVA) for probing pocket depth reduction (PPD) and gain in lifetime cumulative attachment loss (LCAL), at 0–2, 0–6 and 0–8 months

Multivariate ANCOVA models	Differences 0–2 months		Differences 0–6 months		Differences 0–8 months	
	estimate (95% CI)	<i>p</i> value	estimate (95% CI)	<i>p</i> value	estimate (95% CI)	<i>p</i> value
Mean PPD reduction in pockets 4–6 mm	0.5 (0.2, 0.8)	0.001	0.4 (0.1, 0.7)	0.005	0.4 (0.0, 0.7)	0.036
Mean PPD reduction in pockets $\geq 7$ mm	0.9 (0.4, 1.5)	0.001	1.4 (0.8, 2.0)	<0.001	0.9 (0.3, 1.5)	0.003
Mean gain in LCAL at sites with initial PPD 4–6 mm	-0.2 (-0.4, 0.0)	0.605	0.5 (0.2, 0.8)	<0.001	0.3 (0.1, 0.5)	0.077
Mean gain in LCAL at sites with initial PPD $\geq 7$ mm	0.6 (0.2, 0.9)	0.002	1.0 (0.7, 1.3)	<0.001	0.7 (0.2, 1.6)	0.007

Differences were calculated as “antibiotics during initial therapy-antibiotics at re-assessment and data are presented as mean and confidence intervals (95% CI)”. The highlighted bar represents the statistical analysis related to Fig. 2.

Table 3. Subset analysis showing clinically relevant changes in probing pocket depth (PPD) presented at median and interquartile range (IQ) using Mann-Whitney test

Clinical measure	Timing of antibiotic	0–2 months	<i>p</i> value	0–6 months	<i>p</i> value	0–8 months	<i>p</i> value
% of sites with $\geq 2$ mm of PPD reduction	Initially	29 (24, 44)	0.029	30 (21, 47)	0.021	31 (24, 46)	0.179
	Re-treatment	21 (11, 33)		21 (9, 33)		27 (19, 39)	
% of pockets converting from $\geq 5$ to $\leq 4$ mm	Initially	71 (63, 78)	0.039	74 (64, 84)	0.008	83 (74, 86)	0.041
	Re-treatment	57 (30, 73)		54 (29, 76)		67 (45, 85)	
% of pockets converting from $\geq 4$ to $\leq 3$ mm	Initially	49 (43, 61)	0.112	55 (39, 65)	0.038	63 (48, 65)	0.297
	Re-treatment	42 (21, 58)		37 (18, 56)		49 (36, 72)	

not fully comply with the medication or that were lost to follow up) showed a very similar result as compared with the one obtained in the intention-to-treat analysis. The difference at 0–8 months for mean PPD reduction was 0.8 mm (95% CI, 0.1, 1.4,  $p = 0.023$ ). Table 2 shows similar patterns for LCAL with highly significant differences, but a lower magnitude of difference. However, it is still a mean difference in LCAL of 0.7 mm at 0–8 months ( $p = 0.007$ ). This also showed that for moderate pockets there was a statistically significant difference at 0–6 months, but the magnitude was smaller (0.4 mm,  $p = 0.005$ ). At 0–8 months, the level of significance is much lower ( $p = 0.036$ ) and for LCAL in moderate pockets it is no longer statistically significant (0.3 mm,  $p = 0.077$ ).

A subset analysis was carried out to test the changes of some clinically relevant parameters at 2, 6 and 8 months (Table 3.) These were defined as a PPD reduction of large magnitude  $\geq 2$  mm, or reducing the number of pockets that were in need of treatment. This latter outcome was variously defined as either

Table 4. Reported adverse events following antibiotic treatment at re-treatment phase (8 months)

Type of adverse event	Number <i>n</i> = 19 (%)	Severity of event
Nausea	3 (16%)	Two mild, one moderate*
Vomiting	1 (5%)	Mild
Diarrhoea	1 (5%)	Mild
Rashes	2 (10.5%)	One mild, one severe*
Headaches/drowsy	1 (5%)	Mild
Metallic taste	1 (5%)	Mild
Total events	9	Seven mild, one moderate and one severe
% of subjects with one or more event	8 (42%)	

\*Patients who did not complete the antibiotic therapy as prescribed.

PPD  $\geq 5$  mm, which it is often suggested requires surgery, or any sites with PPD  $\geq 4$  mm at initial therapy, which are usually viewed as being in need of some instrumentation. At 0–6 months, the initial treatment showed an additional improvement of 9% of sites for PPD reduction  $\geq 2$  mm, 20% for sites converting from PPD  $\geq 5$  to  $\leq 4$  mm and 18% of sites converting from PPD  $\geq 4$  to  $\leq 3$  mm. At this stage, the differences were statistically significant, whereas this

was not always the case for the data at 0–2 months. The biggest % improvement was always the change from 0 to 8 months, but at this time the differences between the two groups were smaller, and they were no longer statistically significant apart from pockets  $\geq 5$  mm converting to  $\leq 4$  mm ( $p = 0.041$ ).

There was a high incidence of adverse events, affecting 42% of subjects who took the medication as part of the re-treatment phase (Table 4). The majority

were minor events, but serious adverse events sufficient to withdraw the medication occurred in two patients. One subject developed a severe rash at 3 days and another discontinued at 5 days because of nausea, diarrhoea and drowsiness. All other patients complied with the medication regime. The clinical results of these subjects were included in the intention-to-treat analysis

The mean time for instrumentation after the 6 months evaluation (second phase of the study) was 76.9 min. for the original placebo group and 63.3 min. for the initial test group.

## Discussion

In this study, patients who previously received placebo in the first study of the randomized placebo-controlled clinical trial design (Guerrero et al. 2005) had the antibiotics 6 months after the initial full-mouth root surface debridement (FMRSD). The second phase of the study was designed as the first few patients completed the 6 months evaluation, in the first study, before masking was broken. At this stage, a decision needed to be made on the need for further treatment and an additional research question arose. "If we performed a further instrumentation and gave adjunctive antimicrobials to the group that had received placebo medication previously, would both groups end up with similar outcomes"? This represents one of the dilemmas in the current use of antibiotics. Namely should antibiotics be given as part of initial therapy, or only in patients who have not been successfully treated by mechanical cleaning alone?

At both phases, we implemented FMRSD within 24 h to reduce the load of periodontal pathogens in a short period of time (Herrera et al. 2008) and prevent cross-contamination of the treated sites (Quirynen et al. 2001). Each treatment was followed by chlorhexidine (0.2%) mouth rinse for 2 weeks for anti-plaque activity while the patient's home care cleaning could be compromised.

This present investigation consisted of 41 patients – three of which were lost to follow-up at different time points during the study – with a mean age of 31 years (Table 1) and clear features of GAgP according to the criteria of the 1999 International Classification (Armitage 1999). They had severe generalized disease as evidenced by the 46% pockets  $\geq 4$  mm that needed treatment at

baseline (Table 1). Good compliance and acceptable retention of patients to the end of the 8 months evaluation enabled this study to be at least 80% powered to detect a true difference of 1.0 mm between groups using our primary outcome variable. Although three patients from the initial phase did not continue with the re-treatment phase, they appeared to be largely random events and we did not suspect any presence of attrition bias. At baseline, randomization was performed and both groups were matched, with no difference between the groups in terms of clinical characteristics

Both treatments resulted in improvement of the mean PPD and LCAL, which continued to show improvement such that the maximum improvement was evident at 8 months. Initial PPD category of  $\geq 7$  and 4–6 mm were selected as our primary and secondary outcome measures respectively, as treatment is normally provided in these categories of pockets.

The primary outcome of mean PPD difference in deep pockets ( $\geq 7$  mm) demonstrated a statistically significant difference between the group who had antibiotics initially and the group that had antibiotics at the re-treatment phase and this was large enough to have clinical relevance (Fig. 2 and Table 2), with a difference of 0.9 mm ( $p < 0.001$ ) between groups at 2 months, 1.4 mm ( $p < 0.001$ ) at 6 months and 0.9 mm ( $p = 0.003$ ) at 8 months. A similar pattern was detected for PPD in sites with an initial PPD of 4–6 mm and for LCAL in moderate and deep pockets, but with a smaller magnitude of change compared with the initial PPD  $\geq 7$  mm. It is important to note that the results for FMRSD alone were in agreement with recent systematic reviews (Cobb 1996, 2002, Suvan 2005). Therefore, the differences in Fig. 2 with the adjunctive use of antimicrobials, which reached a maximum at 6 months, are additive to normal outcomes for FMRSD. Interestingly, the gap in clinical response between groups closed when antibiotics were given to the group that received placebo initially. The median percentage of sites with  $\geq 2$  mm pocket reduction and the percentage sites showing pocket reduction from a "diseased" to "healthy" status showed a similar pattern (Table 3). Although the best outcome was observed at 8 months, the largest change occurred between 0 and 2 months regardless of the treatment provided. This substantiates the observa-

tions from cited studies on the effect of non-surgical mechanical therapy, which suggest that the biggest changes occur during 1–3 months following the initial treatment (Cobb 1996, Adriaens & Adriaens 2004). At 8 months, 63% and 49% of pockets that were in need of treatment ( $\geq 4$  mm) at baseline had been converted to healthy sites ( $\leq 3$  mm) posttreatment, for the antibiotic initially group and the antibiotic at re-assessment group, respectively. Therefore, as suggested by others (Loesche et al. 1991, 1992), there may be less need for invasive treatments like surgery.

The observations of this study must be made with some caution, as the therapist between the first and second phase of the study changed. However, they are in agreement with findings from a retrospective study from Kaner et al. (2007), who reported that administration of amoxicillin/metronidazole at initial FMRSD may provide more clinical benefits than late administration at re-treatment. Kaner and colleagues suggested that differences in pharmacokinetics may account for the different magnitude of effect of the antibiotics if given at initial therapy or at re-treatment. In particular, perfusion and permeability of capillaries may be increased in cases of advanced inflammation (such as at initial presentation), thus increasing the local uptake and effect of antibiotics when the local inflammation is greater (Kaner et al. 2007). This speculation, if confirmed by further investigations, may have clinical repercussions.

Comparison of the time taken for instrumentation between groups was not possible because of the different therapists involved. However, in the first study at 6 months, the time taken for FMRSD for both groups was comparable (unpublished data). In the second phase, the time taken was shorter by 14 min. for FMRSD in the group that received the systemic antibiotic at the initial phase.

Generally, there were high percentages (42%) of patients reporting adverse events in the second phase (Table 4). Because no placebo was provided, the patients were not blinded and we do not know whether this is purely due to the antibiotic or some other effect. When we had blinding in the initial phase, due to the use of a placebo, some patients experienced adverse events with the placebo. Most of the reported incidents were considered as mild by patients and only two (10%) did not complete the medication as prescribed. The total percentage



was smaller compared with the subjects reporting adverse events by test group in the initial study (Guerrero et al. 2005), which occurred on 55% of subjects. Furthermore, these were more severe with three patients who were generally un-well. The percentage of subjects experiencing adverse events, if reported, in other studies has varied from patients that had no adverse events at all (Rooney et al. 2002), 5% (van Winkelhoff et al. 1989), 22% (Flemmig et al. 1998) to as high as 77% (Winkel et al. 1998). Therefore, clinicians must take account of this factor when weighing the risk-benefits of prescribing these antibiotics to patients.

Within the protocol of the current study, we can conclude that: patients that received the antibiotics at the initial therapy showed significant additional benefits compared with those who received the same regime at the re-treatment phase.

## References

- Adriaens, P. A. & Adriaens, L. M. (2004) Effects of nonsurgical periodontal therapy on hard and soft tissues. *Periodontology 2000* **36**, 121–145.
- Armitage, G. C. (1999) Development of a classification system for periodontal diseases of conditions. *Annals of Periodontology* **4**, 1–6.
- Cobb, C. M. (1996) Non-surgical pocket therapy, mechanical. *Annals of Periodontology* **1**, 443–490.
- Cobb, C. M. (2002) Clinical significance of non-surgical periodontal therapy: an evidence-based perspective of scaling and root planing. *Journal of Clinical Periodontology* **23** (Suppl. 2), 6–16.
- Demmer, R. T. & Papapanou, P. N. (2010) Epidemiologic patterns of chronic and aggressive periodontitis. *Periodontology 2000* **53**, 28–44.
- Dunn, G., Maracy, M. & Tomenson, B. (2005) Estimating treatment effects from randomized clinical trials with noncompliance and loss to follow-up: the role of instrumental variable methods. *Statistical Methods in Medical Research* **14**, 369–395.
- Flemmig, T. F., Milian, E., Karch, H. & Klaiber, B. (1998) Differential clinical treatment outcome after systemic metronidazole and amoxicillin in patients harbouring *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and/or *Porphyromonas gingivalis*. *Journal of Clinical Periodontology* **25**, 380–387.
- Guerrero, A., Griffiths, G. S., Nibali, L., Suvan, J., Moles, D. R., Laurell, L. & Tonetti, M. S. (2005) Adjunctive benefits of systemic amoxicillin and metronidazole in non-surgical treatment of generalized aggressive periodontitis: a randomized placebo-controlled clinical trial. *Journal of Clinical Periodontology* **32**, 1096–107.
- Haffajee, A. D., Socransky, S. S. & Gunsolley, J. C. (2003) Systemic anti-infective periodontal therapy. A systematic review. *Annals of Periodontology* **8**, 115–181.
- Herrera, D., Alonso, B., León, R., Roldán, S. & Sanz, M. (2008) Antimicrobial therapy in periodontitis: the use of systemic antimicrobials against the subgingival biofilm. *Journal of Clinical Periodontology* **35** (Suppl. 8), 45–66.
- Herrera, D., Sanz, M., Jepsen, S., Needleman, I. & Roldán, S. (2002) A systematic review on the effect of systemic antimicrobials as an adjunct to scaling and root planing in periodontitis patients. *Journal of Clinical Periodontology* **29** (Suppl. 3), 136–159.
- Hollis, S. & Campbell, F. (1999) What is meant by intention to treat analysis? Survey of published randomised controlled trials. *British Medical Journal* **319**, 670–674.
- Kaner, D., Christan, C., Dietrich, T., Bernimoulin, J. P., Kleber, B. M. & Friedman, A. (2007) Timing affects the clinical outcome of adjunctive systemic antibiotic therapy for generalized aggressive periodontitis. *Journal of Periodontology* **78**, 1201–1208.
- Loesche, W. J., Giordano, J. R., Hujoel, P., Schwarcz, J. & Smith, B. A. (1992) Metronidazole in periodontitis: reduced need for surgery. *Journal of Clinical Periodontology* **19**, 103–112.
- Loesche, W. J., Schmidt, E., Smith, B. A., Morrison, E. C., Caffesse, R. & Hujoel, P. P. (1991) Effect of metronidazole on periodontal treatment needs. *Journal of Periodontology* **62**, 247–257.
- Mestnik, M. J., Feres, M., Figueiredo, L. C., Duarte, P. M., Lira, E. A. & Faveri, M. (2010) Short-term benefits of the adjunctive use of metronidazole plus amoxicillin in the microbial profile and in the clinical parameters of subjects with generalized aggressive periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology* **37**, 353–365.
- Quirynen, M., De Soete, M., Dierickx, K. & van Steenberghe, D. (2001) The intra-oral translocation of periodontopathogens jeopardises the outcome of periodontal therapy. A review of the literature. *Journal of Clinical Periodontology* **6**, 499–507.
- Rooney, J., Wade, W. G., Sprague, S. V., Newcombe, R. G. & Addy, M. (2002) Adjunctive effects to non-surgical periodontal therapy of systemic metronidazole and amoxicillin alone and combined. A placebo controlled study. *Journal of Clinical Periodontology* **29**, 342–350.
- Sigusch, B., Beier, M., Klinger, G., Pfister, W. & Glockmann, E. (2001) A 2-step non-surgical procedure and systemic antibiotics in the treatment of rapidly progressive periodontitis. *Journal of Periodontology* **72**, 275–283.
- Suvan, J. E. (2005) Effectiveness of mechanical non-surgical pocket therapy. *Periodontology 2000* **37**, 48–71.
- Van Winkelhoff, A. J., Rodenburg, J. P., Goene, R. J., Abbas, F., Winkel, E. G. & de Graaff, J. (1989) Metronidazole plus amoxicillin in the treatment of A.a. associated periodontitis. *Journal of Periodontology* **16**, 128–131.
- Winkel, E. G., Van Winkelhoff, A. J. & van der Velden, U. (1998) Additional clinical and microbiological effects of amoxicillin and metronidazole after initial periodontal therapy. *Journal of Clinical Periodontology* **25**, 857–864.
- Xajigeorgiou, C., Sakellari, D., Slini, T., Baka, A. & Konstantinidis, A. (2006) Clinical and microbiological effects of different antimicrobials on generalized aggressive periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology* **33**, 254–264.

Address:  
Gareth S. Griffiths  
University of Sheffield  
Academic Unit of Restorative Dentistry  
Claremont Crescent  
Sheffield S10 2TA  
UK  
E-mail: g.s.griffiths@sheffield.ac.uk

## Clinical Relevance

*Scientific rationale for the study:* Management of aggressive periodontitis is challenging and the use of systemic antibiotics, such as the combination of amoxicillin and metronidazole has been suggested as beneficial. Antibiotics are frequently used after a course of non-

surgical therapy. This study compared antimicrobials given at either initial therapy or the re-treatment phase of periodontal care.

*Principal findings:* In deep pockets, there was a significant benefit in the use of amoxicillin and metronidazole as an adjunct to non-surgical therapy. Antibiotics given at initial therapy

resulted in significantly better outcomes than antibiotics given at re-treatment.

*Practical implications:* Amoxicillin and metronidazole have an adjunctive effect and this study suggests that the timing of antibiotic therapy may be important.



III



3. Guerrero A, Nibali L, Lambertenghi R, Ready D, Suvan J, Griffiths GS, Wilson M, Tonetti MS. Impact of baseline microbiological status on clinical outcomes in generalized aggressive periodontitis patients treated with or without adjunctive amoxicillin and metronidazole: an exploratory analysis from a randomized controlled clinical trial. *J Clin Periodontol* 2014; 41: 1080–1089.

Objetivo: Explorar si los sujetos que albergaban *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*A. Actinobacillus*), *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) o *Tannerella forsythia* (*T. forsythia*) al inicio del estudio, mostraron mayores beneficios clínicos tras el uso coadyuvante sistémico de amoxicilina y metronidazol (AMX-MET) durante el tratamiento no quirúrgico de la periodontitis agresiva generalizada (PAG).

Material y métodos: 41 sujetos fueron incluidos en este estudio aleatorizado y controlado con placebo, de 6 meses de duración, utilizando un tratamiento de 7 días con administración sistémica de AMX-MET o placebo de manera coadyuvante a la terapia periodontal no quirúrgica. Los parámetros clínicos y microbiológicos se recogieron al inicio del estudio, a los 2 y a los 6 meses después del tratamiento. Los cultivos microbiológicos se procesaron para muestras subgingivales agrupadas y las identidades de las muestras aisladas fueron determinadas por PCR para *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* y *T. forsythia*

Resultados: A los 6 meses, en comparación con el placebo, el tratamiento test experimentó (estudio 1) mejorías adicionales significativas sobre la variable de resultado primaria y, en el análisis primario, el efecto de los antimicrobianos coadyuvantes no se modificó por el estado microbiológico al inicio del estudio. Sin embargo, los análisis secundarios exploratorios por subgrupos, mostraron mejores resultados clínicos en sujetos portadores de *A. actinomycetemcomitans* al inicio del estudio, en comparación con los sujetos que no portaban este patógeno.

Conclusiones: Todos los pacientes se beneficiaron del régimen antimicrobiano coadyuvante estudiado, aunque los sujetos que albergaron *A.*

*actinomycetemcomitans* al inicio del estudio podrían obtener mayores beneficios clínicos. Se necesitan estudios más amplios, con un poder estadístico adecuado, para confirmar si la combinación AMX-MET coadyuvante es más beneficiosa para los

pacientes con PAG que albergan *A. actinomycetemcomitans*, junto con otros patógenos periodontales clave.

# Impact of baseline microbiological status on clinical outcomes in generalized aggressive periodontitis patients treated with or without adjunctive amoxicillin and metronidazole: an exploratory analysis from a randomized controlled clinical trial

Adrián Guerrero<sup>1</sup>, Luigi Nibali<sup>2</sup>, Roberta Lambertenghi<sup>2</sup>, Derren Ready<sup>3,4</sup>, Jean Suvan<sup>2</sup>, Gareth S. Griffiths<sup>5</sup>, Michael Wilson<sup>4</sup> and Maurizio S. Tonetti<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Graduate Periodontology, University of Granada and Private Periodontal Practice, Málaga, Spain; <sup>2</sup>University College London (UCL) Eastman Dental Institute, London, UK; <sup>3</sup>PHL London, Public Health England, London, UK; <sup>4</sup>Department of Microbial Diseases, Eastman Dental Institute and Hospital, University College London, London, UK; <sup>5</sup>Academic Unit of Restorative Dentistry, University of Sheffield, Sheffield, UK; <sup>6</sup>European Reserach Group on Periodontology (ERGOperio), Genova, Italy

Guerrero A, Nibali L, Lambertenghi R, Ready D, Suvan J, Griffiths GS, Wilson M, Tonetti MS. Impact of baseline microbiological status on clinical outcomes in generalized aggressive periodontitis patients treated with or without adjunctive amoxicillin and metronidazole: an exploratory analysis from a randomized controlled clinical trial. *J Clin Periodontol* 2014; 41: 1080–1089. doi: 10.1111/jcpe.12299.

## Abstract

**Aim:** To explore whether subjects harbouring *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* or *T. forsythia* at baseline showed increased clinical benefits with the adjunctive use of systemic amoxicillin and metronidazole (AMX-MET) during non-surgical treatment of generalized aggressive periodontitis (GAgP).

**Material and Methods:** Forty one subjects were included in this 6-month randomized placebo-controlled clinical trial using a 7-day course of systemic AMX-MET or placebo as adjuncts to non-surgical periodontal therapy. Clinical and microbiological parameters were collected at baseline, 2 and 6 months after treatment. Microbiological cultures were processed for pooled subgingival samples and identities of isolates were determined by PCR for *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* and *T. forsythia*

**Results:** At 6 months, the test treatment resulted in significant additional improvements in the primary outcome variable compared to placebo, and the effect of the adjunctive antimicrobials was not modified by the baseline microbiological status in the primary analysis. However, secondary exploratory subgroup analyses showed improved clinical outcomes in subjects harbouring

**Key words:** *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*; antimicrobials; exploratory analysis; generalized aggressive periodontitis; human; treatment

Accepted for publication 12 August 2014

## Conflict of interest and source of funding statement

The authors declare that they have no conflict of interests. This study was supported by the Periodontal Research Fund of the Eastman Dental Institute.

*A. actinomycetemcomitans* at baseline compared to subjects who did not harbour this pathogen.

**Conclusions:** All subjects benefited from the tested adjunctive antimicrobial regimen, although subjects who harboured *A. actinomycetemcomitans* at baseline may show greater clinical benefits. Larger appropriately powered studies are needed to confirm whether adjunctive AMX-MET is more beneficial for GAgP patients who harbour *A. actinomycetemcomitans*, along with other key periodontal pathogens.

The adjunctive clinical benefits of amoxicillin and metronidazole in the non-surgical treatment of generalized aggressive periodontitis (GAgP) were first evaluated by a study from our group (Guerrero et al. 2005). Since then, other similar studies (Xajigeorgiou et al. 2006, Baltacioglu et al. 2011, Varela et al. 2011, Aimetti et al. 2012, Mestnik et al. 2012) and recent systematic reviews (Sgolastra et al. 2012, Zandbergen et al. 2013) have confirmed the added clinical benefits of this adjunctive antimicrobial combination when compared with placebo in GAgP.

The combination amoxicillin–metronidazole was originally proposed for its wide spectrum of activity as well as its effectiveness in terms of suppression of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*A. actinomycetemcomitans*) (Van Winkelhoff et al. 1989) due to a synergistic effect of amoxicillin on metronidazole and its hydroxymetabolite against *A. actinomycetemcomitans* which has been demonstrated in vitro (Pavicic et al. 1991, 1994b). Some studies report on the benefits of this drug combination (Aimetti et al. 2012, Mestnik et al. 2012) as related to the reduction of baseline levels of the main periodontal pathogens, whereas others do not show a significant adjunctive microbiological benefit over the control group (Xajigeorgiou et al. 2006, Heller et al. 2011).

Studies in the 1980s suggested that the elimination of *A. actinomycetemcomitans* was clinically useful but difficult to achieve by mechanical means alone (Christersson et al. 1985, Renvert et al. 1990). Then, it was shown (Pavicic et al. 1994a) that the suppression of *A. actinomycetemcomitans* could be accomplished predictably if adjunctive systemic amoxicillin and metronidazole were

prescribed during non-surgical periodontal treatment, and the microbiological outcome was accompanied by clinical improvements up to 24 months. Although *A. actinomycetemcomitans* is more prevalent in patients with AgP (Armitage 1999), not every patient harbours it (Tonetti & Mombelli 1999). Hence, it would seem reasonable to explore the differential clinical outcomes of the adjunctive therapy in the presence or absence of the main target pathogen. Conflicting evidence has been reported on whether the presence or absence of *A. actinomycetemcomitans* at baseline affects the clinical improvements (probing pocket depth reduction and gain in attachment) in chronic periodontitis cases (Cionca et al. 2010). To date, no data in AgP patients are available to establish whether subjects harbouring a specific pathogen before treatment will benefit more from the adjunctive antimicrobial therapy as compared to the ones who do not harbour it. Because of this lack of evidence, adjunctive antimicrobial therapy has been used empirically, i.e. without specific targeting based on the microbial results trial (Guerrero et al. 2005, Mombelli 2005).

Therefore, the aim of this secondary analysis of the previously reported trial (Guerrero et al. 2005), was to explore whether the baseline presence of *A. actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) or *Tannerella forsythia* (*T. forsythia*) influenced the adjunctive clinical benefits of a course of systemic amoxicillin plus metronidazole during full-mouth non-surgical periodontal treatment in GAgP. In addition, a further aim was to compare microbiological treatment outcomes and changes in antibiotic resistance after treatment between the subjects who

received the antimicrobial combination and those who received placebo.

## Materials and Methods

Detailed descriptions of the experimental design, population screening, sample size calculation, randomization and allocation concealment, clinical parameters and non-surgical periodontal therapy have been previously published (Guerrero et al. 2005).

### Experimental design

This study was a randomized placebo-controlled, parallel design, double blind clinical trial with 6 months follow-up. Ethical approval was obtained from the Eastman Dental Institute University College London Hospitals Joint Research and Ethics Committee and the study was conducted according to the principles outlined in the Declaration of Helsinki on experimentation involving human subjects.

### Population screening

In brief, potential subjects suitable for the study were identified from the population referred to the periodontal clinic of the Eastman Dental Hospital, London. The study included subjects with GAgP according to the criteria of the 1999 INTERNATIONAL CLASSIFICATION (Armitage 1999). Written informed consent was obtained from all the subjects to be entered in the study. No microbiological inclusion/exclusion criteria were used.

### Sample size calculation

The original study was sized to provide 80% power to detect a true dif-



ference of 1.0 mm between test and placebo using PPD reduction in pockets  $\geq 7$  mm as the primary outcome variable assuming a standard deviation of 1.0 mm. The power of this exploratory analysis with the microbiological outcomes was not determined a priori.

#### Randomization and allocation concealment

Equal balance between the two treatments was assured by restricted randomization (minimization) to account for smoking habits (yes or no) and number of initial pockets  $\geq 5$  mm ( $\leq 50$ , 50–80,  $>80$ ). No microbiological criteria were used for stratification.

#### Clinical parameters

Clinical parameters were assessed using a UNC-15 periodontal probe by the calibrated examiner (LN) at six sites/tooth excluding third molars at baseline, 2 months and 6 months (Tonetti et al. 2002). The calibration exercise showed that the examiner was reproducible in 99.7% of the measurements ( $\pm 2$  mm between repeated measurements of Lifetime Cumulative Attachment Loss – LCAL–).

#### Microbiological samples and procedures

The four deepest sites in each quadrant were selected for sampling (Mombelli et al. 1991). Samples were obtained by the examiner, at the same selected sites, with four sterile curettes (one for each site) at baseline, 2 months and 6 months after treatment. The microbiologist was masked to treatment assignment. Each sample was pooled in a vial containing 1 ml of reduced transport fluid (Syed & Loesche 1972). Samples were processed immediately on arrival in the Department of Microbiology. Each sample was accompanied by a bacteriology request form and was clearly labelled.

Each sample was vortexed for 30 s and then diluted in reduced transport fluid to a dilution factor of  $10^{-6}$ . Duplicate 50  $\mu$ l aliquots of the undiluted sample and duplicate 50  $\mu$ l aliquots from each dilution were plated on the following media: (a) Fastidious anaerobic agar (FAA)

containing 5% defibrinated horse blood (for total anaerobic count), (b) Chocolate blood agar with 75 mg/l bacitracin and 5 mg/l vancomycin (Madinier et al. 1999) (all colonies were counted and subcultured for identification of *A. actinomycetemcomitans*), (c) FAA containing 5% defibrinated horse blood – all black-pigmented colonies were counted and subcultured for identification of *P. gingivalis*, (d) FAA containing 7% defibrinated horse blood and 10 mg/l N-acetyl muramic acid (colonies with the appropriate morphology were counted and subcultured for identification of *T. forsythia*). All plates were incubated in an anaerobic environment (10% hydrogen, 10% carbon dioxide, balanced with nitrogen) in an anaerobic cabinet at 37°C for at least 5 days (negative plates were incubated for additional 2 days). The theoretical limit of detection (LOD) of the culture method was determined using a serial dilution of each cultured bacterium. The LOD for *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* and *T. forsythia* was shown to be 10–100 CFU/ml for each of the three bacteria tested. Once cultured, the identity of the isolates was determined as followed. The whole genomic DNA of presumptive isolates of *A. actinomycetemcomitans*, *T. forsythia* and *P. gingivalis* was extracted using the Puregene™ DNA isolation Kit, (Gentra Systems, Minneapolis, MN, USA). The extracted DNA was then used as a template for species confirmation via block-based PCR which targeted specific regions within the 16S rRNA gene. The nucleotide sequences for the primers were as follows: *A. actinomycetemcomitans*-specific forward primer (AaF), 5'-ATTGGGGTTTAGCCC TGGTG-3'; *T. forsythia*-specific forward primer (TfF), 5'-TACAGGGG AATAAAATGAGATACG-3', *P. gingivalis*-specific forward primer (PgF), 5'-TG TAGATGACTGATG GTGAAAACC-3' and a conserved reverse primer (ConR), 5'-ACGTCATCCCCACCTTCCTC-3' (Genosys, Cambridgeshire, UK). The expected product lengths were 360 bp for *A. actinomycetemcomitans*, 745 bp for *T. forsythia* and 197 bp for *P. gingivalis*. The PCR conditions were as follows: an initial 10 min denaturation step at 95°C,

followed by 35 cycles of 1 min at 95°C, 1 min at 65°C and 5 min at 72°C and a final extension step of 10 min at 72°C. Each PCR was carried out with a negative control consisting of sterile deionized water as well as a positive control consisting of genomic DNA extracted from pure cultures of *P. g.* NCTC 11834, *A. a.* NCTC 9710 and *T. f.* ATCC 43037, all at a final concentration of 10 ng/ $\mu$ l. Post-PCR analysis was carried out by electrophoresis of the PCR products on a 2.3% agarose gel. For quality control purposes, 10% of the samples were re-tested to confirm that consistent results were obtained. The PCR results were confirmed by DNA sequencing randomly selected amplicons, and this was carried out using an ABI310 Genetic Analyser (PE Biosystems, Warrington, UK). Sequences were analysed using the Ribosomal Database project II (Maidak et al. 2000, 2001) and BLAST at the National Centre for Biotechnological Information (Altschul et al. 1997).

The proportion of the total oral microbiota resistant to amoxicillin or metronidazole was determined by inoculating duplicate 50  $\mu$ l aliquots of the undiluted sample and duplicate 50  $\mu$ l aliquots from each dilution onto agar containing antibiotic concentrations found in gingival crevicular fluid: 2  $\mu$ g/ml for amoxicillin (Walker et al., 1983) and 8  $\mu$ g/ml for metronidazole (Britt & Pohlod 1986, Kleinfelder et al. 1999). For anaerobic microbiota, resistance was determined by plating onto FAA containing each antibiotic. Plates were incubated in an anaerobic environment (10% hydrogen, 10% carbon dioxide, balanced with nitrogen) within an anaerobic cabinet at 37°C for 5 days. Amoxicillin resistance for aerobic microbiota was determined by inoculating onto isosensitest agar containing amoxicillin. Plates were incubated in an aerobic environment with increased CO<sub>2</sub> to allow for the isolation of aerobic bacteria. To calculate the proportion of antibiotic-resistant bacteria, all dilutions of these samples were inoculated onto antibiotic-containing and antibiotic-free agar plates. The total viable counts determined using the antibiotic-containing agar plates were compared with the total viable

counts present on the antibiotic-free agar plates.”

#### Non-surgical periodontal therapy

Both groups received non-surgical periodontal therapy under local anaesthesia in two long appointments during the same day. Test subjects received an adjunctive course of systemic antibiotics consisting of 500 mg of amoxicillin and 500 mg of metronidazole three times a day for 7 days, whereas control subjects received placebo. All subjects used a 0.2% chlorhexidine rinse (Corsodyl<sup>®</sup>, GlaxoSmithKline Consumer Healthcare, Middlesex, UK), twice a day for 2 weeks.

#### Exploratory outcome measures

The primary exploratory measure of this study was the interaction of the microbiological status (presence or absence of any of the three main periodontal pathogens at baseline) with the treatment effect (test or placebo) on PPD reduction in sites with initial PPD  $\geq 7$  mm (the primary outcome of the original trial). Secondary exploratory outcomes included: (i) the interaction of the microbiological status/treatment effect on clinical outcomes at different initial PPD categories; (ii) treatment effect modification (test or placebo) on clinical outcomes within subgroups of subjects (pathogen-positive and pathogen-negative); (iii) baseline microbiological status effect on PPD reduction and CAL gain at moderate and deep pockets within the subgroup of subjects from the test group (subjects who took the antimicrobial combination); (iv) differences between treatment groups in the percentage of subjects harbouring *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* or *T. forsythia* at baseline, 2 months and 6 months, (v) differences between test and placebo groups in the reduction of mean values of log of colony forming units of *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* and *T. forsythia* in positive samples at baseline; (vi) differences between test and placebo groups in the percentage of the total oral microbiota resistant to amoxicillin and metronidazole at baseline, 2 months and 6 months.

#### Data management and statistical analysis

Microbiological data were entered into an Excel (Microsoft corporation, Redmond, WA, USA) database and were proofed for entry errors. The database was subsequently locked, imported into SPSS for Windows (SPSS Inc. version 17.0, Chicago, IL, USA) formatted and merged with the database containing all clinical data. A subject-level analysis was performed by computing a subject-level variable for each of the parameters. The significance of the primary outcome variable of this study was estimated by analysis of covariance (ANCOVA). The models were adjusted for baseline values and controlled for the baseline detection of the target pathogens, smoking, ethnic group and age. The final model was then selected by including significant factors only. Model estimates included adjusted means and 95% confidence intervals. Subjects were then divided into subgroups, according to whether they tested positive or negative to each of the three target pathogens at baseline, to further explore the treatment effect modification within each of the study subgroups (test or placebo). The significance of the treatment option (test or placebo) on the dependent variables PPD reduction and change in attachment at different initial PPD categories was estimated by analysis of covariance (ANCOVA). This later approach was also applied for another exploratory analysis on the effect of the microbiological status (presence or absence of a specific pathogen at baseline) on the main clinical outcomes of the subgroup of subjects from the test group only. An intention-to-treat, last observation carried forward analysis was performed (Hollis & Campbell 1999).

## Results

#### Subject accountability

Forty-one subjects were randomly allocated to participate in the study. All participants received the allocated intervention and one patient from the placebo group was lost to follow-up between the 2-month visit and the 6-month visit due to reasons unrelated to the study as detailed in

Guerrero et al. (2005). All participants were included in this analysis and their baseline characteristics have been previously described.

#### Clinical parameters and microbiological status

##### *Interaction between microbiological status and treatment effect (primary outcome variable)*

Table 1 shows results of the interaction between baseline microbiological status and treatment effect (test or placebo) on PPD reduction in pockets with initial PPD  $\geq 7$  mm at 6 months for each tested bacteria in separate ANCOVA models, to determine whether the microbiological status modified the effect of the antimicrobial therapy in the whole subject's sample. The interaction term treatment effect x microbiological status did not prove to be statistically significant for any of the three main periodontal pathogens ( $p = 0.136$ ,  $p = 0.238$ ,  $p = 0.751$ , respectively, for *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* and *T. forsythia*), whereas smoking and treatment group (test or placebo) proved to be significant cofactors in all three models.

##### *Treatment effect modification*

Table 2 displays the mean differences between test and placebo groups at 6 months for PPD reduction and gain in attachment in subgroups of subjects who harboured or did not harbour *A. actinomycetemcomitans* at baseline (*A.a.+ve* or *A.a.-ve* respectively).

In *A.a.+ve* subjects, the difference between the test group and the placebo group on PPD reduction at pockets  $\geq 7$  mm at 6 months was 1.8 mm [95% Confidence interval (C.I.) 0.9–2.8] favouring the test group ( $p = 0.001$ ). This was consistent in the subgroup of *A.a.-ve* subjects ( $p = 0.045$ ), with a smaller magnitude of difference (1.0 mm, 95% C.I. 0.0–1.9). In moderate pockets (4–6 mm), the difference between the test and the placebo groups was 0.7 mm (95% C.I. 0.3–1.1) for PPD reduction which was only significant for *A.a.+ve* subjects ( $p = 0.001$ ), for *A.a.-ve* subjects the difference was 0.1 mm (95% C.I. –0.2–0.5) and was not statistically significant ( $p = 0.512$ ). For gain in

**Table 1.** Analysis of covariance for PPD reduction in pockets with initial PPD  $\geq 7$  mm at 6 months testing the interaction between the treatment group and the baseline status of each of the three main periodontal pathogens in the whole subject sample (PPD baseline values, microbiological baseline status, treatment group, smoking, age and ethnicity as covariates. Only significant covariates shown)

Multivariate "ANCOVA" Models	Parameter	Difference 0–6 months	
		Estimate (95% C.I.)	<i>p</i> value
Depended variable			
Model 1 PPD reduction in pockets with initial PPD $\geq 7$ mm	Interaction term: <i>A.a.</i> +ve at baseline x treatment group	0.6 (–0.2, 1.5)	0.136
	Smoking (no-yes)	1.2 (0.5, 1.9)	0.002
	Treatment group (test-placebo)	1.1 (0.4, 1.8)	0.002
Model 2 PPD reduction in pockets with initial PPD $\geq 7$ mm	Interaction term: <i>P.g.</i> +ve at baseline x treatment group	0.5 (–0.3, 1.3)	0.238
	Smoking (no-yes)	1.1 (0.3, 1.8)	0.003
	Treatment group (test-placebo)	1.2 (0.5, 1.8)	0.001
Model 3 PPD reduction in pockets with initial PPD $\geq 7$ mm	Interaction term: <i>T.f.</i> +ve at baseline x treatment group	0.1 (–0.8, 1.1)	0.751
	Smoking (no-yes)	1.0 (–0.3, 1.7)	0.006
	Treatment group (test-placebo)	1.3 (0.3, 2.2)	0.009

PPD, probing pocket depth.

*A.a.*+ve, baseline detection of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*; *P.g.*+ve, baseline detection of *Porphyromonas gingivalis*; *T.f.*+ve, baseline detection of *Tannerella forsythia*.

**Table 2.** Mean differences between test and placebo groups, at 6 months, for PPD reduction and gain in attachment in subgroups of subjects harbouring (*A.a.*+ve) or not harbouring (*A.a.*–ve) *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* at baseline

Multivariate "ANCOVA" models for study subgroups	Clinical parameter	Mean difference Test-placebo (0–6 months) <sup>†</sup> (95% C.I.)	<i>p</i> value	Covariates
<i>A.a.</i> +ve at baseline ( <i>N</i> = 20)	PPD reduction in pockets $\geq 7$ mm	1.8 (0.9, 2.8)	0.001	Baseline status, smoking
	PPD reduction in pockets 4–6 mm	0.7 (0.3, 1.1)	0.001	–
	Gain in attachment at sites with initial PPD $\geq 7$ mm	1.2 (0.7, 1.8)	<0.001	Smoking
	Gain in attachment at sites with initial PPD 4–6 mm	0.5 (0.0, 1.0)	0.058	Baseline status
<i>A.a.</i> –ve at baseline ( <i>N</i> = 21)	PPD reduction in pockets $\geq 7$ mm	1.0 (0.0, 1.9)	0.045	–
	PPD reduction in pockets 4–6 mm	0.1 (–0.2, 0.5)	0.512	–
	Gain in attachment at sites with initial PPD $\geq 7$ mm	0.9 (0.4, 1.4)	0.001	–
	Gain in attachment at sites with initial PPD 4–6 mm	0.4 (0.1, 0.7)	0.002	–

PPD, probing pocket depth.

<sup>†</sup>Difference favouring the test group.

attachment at deep and moderate pockets, differences between *A.a.*+ve and *A.a.*–ve subjects were very similar. However, gain in attachment in moderate pockets showed a statistically significant difference between the test and the placebo groups in the subgroup of

*A.a.*–ve subjects ( $p = 0.002$ ) that was not replicated in *A.a.*+ve ( $p = 0.058$ ).

Results for the subgroups of subjects harbouring or not harbouring *P. gingivalis* or *T. forsythia* at baseline, may be found in Appendices S1 and S2 respectively.

Table 3 displays the percentages of sites with clinically relevant changes in the test and the placebo groups analysed in subgroups of *A.a.*+ve and *A.a.*–ve subjects. In *A.a.*+ve the percentage of sites converting from  $\geq 5$  mm at baseline to  $\leq 4$  mm at 6 months and from  $\geq 4$  mm at baseline to  $\leq 3$  mm at 6 months was higher in the test group ( $p = 0.025$  and  $p = 0.016$  respectively). In *A.a.*–ve subjects, no statistically significant differences were detected. No further significant differences were found for the rest of the parameters shown on Table 5. Results for the subgroups of subjects harbouring or not harbouring *P. gingivalis* or *T. forsythia* at baseline, may be found in Appendices S3 and S4 respectively.

#### Secondary exploratory subgroup analysis within each of the treatment groups (test or placebo)

In the test group (Table 4) statistically significant differences were found between *A.a.*+ve subjects and *A.a.*–ve subjects, whereas the same was not observed when using the presence or absence of *P. gingivalis* or *T. forsythia* as the grouping factor (data not shown). In 4–6 mm pockets, an adjusted difference of 0.4 mm for PPD reduction at 6 months favoured *A.a.*+ve subjects (ANCOVA,  $p = 0.028$ ). In pockets  $\geq 7$  mm, this difference was of a bigger magnitude: 0.6 mm at 6 months (ANCOVA,  $p = 0.036$ ). For gain in attachment at sites with initial PPD  $\geq 7$  mm, the results were also significantly better in *A.a.*+ve subjects (ANCOVA,  $p = 0.008$ ): an adjunctive benefit of 0.4 mm at 6 months was observed. Smoking proved to be a significant cofactor for PPD reduction at moderate and deep pockets as well as for attachment gain at deep pockets. No further statistically significant benefits were found for the rest of the explored clinical outcome variables at 6 months in the test group or within the placebo group (data not shown).

#### Microbiological detection

The number and percentage of subjects who tested positive to detectable levels of the three main periodontal pathogens at baseline,

Table 3. Percentage of sites with clinically relevant changes in test and placebo groups, at 6 months, in subgroups of subjects harbouring (*A.a.+ve*) or not harbouring (*A.a.-ve*) *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* at baseline.

Parameter	<i>A.a.+ve</i> at baseline			<i>A.a.-ve</i> at baseline		
	Test group ( <i>N</i> = 9)	Placebo group ( <i>N</i> = 11)	<i>p</i> value	Test group ( <i>N</i> = 11)	Placebo group ( <i>N</i> = 10)	<i>p</i> value
Percentage (IQ) of sites converting from $\geq 5$ mm at baseline to $\leq 4$ mm after treatment	80.9 (61.1, 92.0)	52.6 (22.2, 74.0)	0.025	71.1 (64.1, 74.1)	60.9 (35.0, 77.4)	0.223
Percentage (IQ) of sites converting from $\geq 4$ mm at baseline to $\leq 3$ mm after treatment	60.0 (46.0, 71.2)	35.1 (17.0, 51.1)	0.016	44.4 (38.9, 57.3)	46.0 (28.3, 60.0)	0.705
Percentage (IQ) of sites with $\geq 2$ mm gain in attachment	29.3 (18.5, 34.3)	17.5 (8.9, 33.3)	0.175	24.7 (16.1, 31.3)	14.7 (8.6, 22.6)	0.072
Percentage (IQ) of sites with $\geq 2$ mm PPD reduction	31.5 (26.8, 46.1)	18.3 (8.3, 38.2)	0.067	24.7 (14.6, 42.7)	21.2 (11.3, 30.9)	0.197

IQ, Inter-quartile range; PPD, probing pocket depth.

Table 4. Analysis of covariance for PPD reduction and gain in attachment at 6 months in moderate and deep pockets in the test group (Baseline detectable levels of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* and *Tannerella forsythia*, PPD baseline values, smoking, age and ethnicity as covariates. Only significant covariates shown)

Multivariate "ANCOVA" analysis Models	Parameter	Difference 0–6 months TEST GRUOP	
		Estimate (95% C.I.)	<i>p</i> value
Mean PPD reduction in pockets $\geq 7$ mm	<i>A.a.+ve</i> at baseline (yes-no)	0.6 (0.0, 1.2)	0.036
	Smoking (no-yes)	1.2 (0.6, 1.9)	0.010
Mean PPD reduction in pockets 4–6 mm	<i>A.a.+ve</i> at baseline (yes-no)	0.4 (0.0, 0.7)	0.028
Mean gain in attachment at sites with initial PPD $\geq 7$ mm	<i>A.a.+ve</i> at baseline (yes-no)	0.4 (0.1, 0.7)	0.008
	Smoking (no-yes)	1.1 (0.7, 1.4)	0.001
Mean gain in attachment at sites with initial PPD 4–6 mm	<i>A.a.+ve</i> at baseline (yes-no)	0.2 (–0.0, 0.4)	0.155

PPD, Probing pocket depth.

*A.a.+ve*, baseline detection of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

2 months and 6 months are displayed in Table 5. There was a statistically significant difference between the groups in the detection of *P. gingivalis* at 2 and 6 months ( $p = 0.009$  and  $p = 0.043$  respectively) and in the detection of *T. forsythia* at 6 months ( $p = 0.043$ ), that

favoured the test group in both cases. *A. actinomycetemcomitans* detection at 2 and 6 months, although less marked in test subjects, were not statistically different from placebo subjects. On the other hand, the Log<sub>10</sub> of colony forming units of *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingi-*

*valis* and *T. forsythia* did not show any inter-group differences at any time point (data not shown), whereas a subgroup analysis performed on subjects who tested positive to those bacteria at baseline (Table 6), showed intra-group and some inter-group statistically significant differences between baseline and the 2-months and the 6-months visits.

#### Antibiotic resistance to amoxicillin and metronidazole

The median percentage and the inter-quartile range of the total anaerobic microbiota which was resistant to amoxicillin in the test and placebo groups at baseline, 2 months and 6 months is represented in Table 7. Intra-group comparisons among the different time points showed a statistically significant increase in resistance within the test group between the baseline and the 2-months evaluation (Wilcoxon Sign Rank Test,  $p = 0.009$ ) as well as a significant decrease between the 2-months and the 6-months

Table 5. Number (percentage) of subjects that showed the presence of the three main periodontal pathogens above detectable levels at baseline, 2 months and 6 months

Number (%)	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>			<i>Porphyromonas gingivalis</i>			<i>Tannerella forsythia</i>		
	Baseline	2-months	6-month	Baseline	2-months	6-month	Baseline	2-months	6-month
Test group, <i>N</i> = 20	9 (45%)	1 (5%)	2 (10%)	8 (40%)	0 (0%)	3 (15%)	15 (75%)	3 (15%)	3 (15%)
Placebo group, <i>N</i> = 21	11 (52.4%)	6 (28.6%)	5 (23.8%)	13 (61.9%)	7 (17.1%)	10 (47.6%)	14 (66.7%)	5 (23.8%)	10 (47.6%)
<i>p</i> -value	0.758	0.093	0.410	0.217	0.009	0.043	0.734	0.697	0.043
$\chi^2$ test									
Test versus placebo									



Table 6. Geometric mean of colony forming units (95% C.I) of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (A.a.), *Porphyromonas gingivalis* (P.g.) and *Tannerella forsythia* (T.f.) in positive samples at baseline and differences between 0–2 and 0–6 months

Mean (95% C.I.)	Treatment group	Baseline Log <sub>10</sub> CFU/ml	Difference Between 0–2 months Log <sub>10</sub> CFU/ml	Difference Between 0–6 months Log <sub>10</sub> CFU/ml	<i>p</i> value paired samples <i>t</i> -test	
					Difference 0–2 months	Difference 0–6 months
A.a.	Test, <i>N</i> = 9	4.3 (3.4, 5.2)	3.1 (2.0, 4.1)	3.3 <sup>†‡</sup> (2.5, 4.2)	0.001	<0.001
	Placebo, <i>N</i> = 11	4.5 (3.7, 5.4)	2.1 (1.1, 3.2)	2.1 (0.6, 3.7)	0.006	0.012
P.g.	Test, <i>N</i> = 8	6.1 (5.4, 6.9)	5.2 <sup>†</sup> (4.5, 6.0)	4.1 (1.9, 6.3)	<0.001	0.003
	Placebo, <i>N</i> = 13	6.2 (5.8, 6.7)	3.1 (1.6, 4.5)	1.9 (0.3, 3.4)	0.001	0.020
T.f.	Test, <i>N</i> = 15	6.3 (6.0, 6.5)	4.7 (3.7, 5.6)	5.0 <sup>†</sup> (4.4, 5.6)	<0.001	0.023
	Placebo, <i>N</i> = 14	6.2 (5.9, 6.4)	4.3 (3.2, 5.3)	3.1 (1.5, 4.7)	<0.001	0.004

<sup>†</sup>Significant differences between groups favouring test treatment ( $p < 0.03$ , ANCOVA adjusting for smoking, baseline values, age and ethnicity).

<sup>‡</sup>Baseline values as a significant cofactor.

Table 7. Median percentage (IQ) of the total anaerobic microbiota resistant to amoxicillin in the test and placebo groups at baseline, 2 months and 6 months

% of total anaerobic microbiota resistant to amoxicillin (median IQ)	Baseline	2 months	6 months
Test <sup>†</sup>	5.5 (1.0, 13.7)	28.3 (10.1, 64.6)	4.9 (0.9, 12.2)
Placebo	7.0 (1.5, 34.3)	11.9 (5.9, 43.3)	4.1 (0.9, 22.4)

IQ, Inter-quartile range.

<sup>†</sup>Intra-group significant differences within the test group between baseline and 2 months ( $p = 0.009$ , Wilcoxon Sign Rank Test) and between 2 months and 6 months ( $p = 0.008$ ). No inter-group significant differences were found (Mann–Whitney Test) for any of the time points.

( $p = 0.008$ ) evaluations. No further significant differences were found within the placebo group or between both groups (Mann–Whitney test). The median percentage of the total anaerobic microbiota which was resistant to metronidazole in the test and placebo groups did show a similar profile to each other in both treatment groups at all time points (data not shown).

## Discussion

The primary report of this trial (Guerrero et al. 2005) showed that adjunctive antimicrobial therapy with amoxicillin and metronidazole had a significant beneficial impact on the clinical outcomes obtained after non-surgical treatment of aggressive periodontitis patients. This has now been confirmed in a variety of studies from multiple research groups and patient populations and summarized in two systematic reviews and meta-analysis (Sgolastra et al. 2012, Zandbergen et al. 2013). A follow-up analysis of this patient population showed that

the timing of antibiotic therapy had a major impact on the outcome. Immediate treatment with mechanical debridement and adjunctive antibiotics resulted in 0.9 mm additional PPD reduction in pockets  $\geq 7$  mm compared to when adjunctive antibiotics were used in a subsequent phase of debridement (Griffiths et al. 2011).

Although as a whole, the data indicated that in GAgP the adjunctive systemic antibiotic regimen provided a significant clinical benefit, questions were raised regarding whether the overall benefit was due to a smaller subset of the population. It has been speculated that a subset with specific microbial characteristics, show better or worse results. The question is clinically relevant as it centres on whether or not the potential adverse events of this empiric systemic antibiotic regimen could be spared to a subset of the population based on baseline microbiological diagnosis. The results of our primary analysis (Table 1) show that the benefits of this antibiotic regimen over mechanical debridement

alone were influenced by smoking status but not by the presence of each one of the tested bacteria, if the treatment effect term is included in the analysis and thus the whole population is included. Within the obvious limits related to power of the study to discriminate the significance of the bacterial parameters and to the employed microbiological techniques, this is in agreement with a secondary analysis from a recent randomized study on patients who were classified as *A. actinomycetemcomitans* positive or negative and who received the same antibiotic combination – but at a different dose than the one used in our study – or placebo (Mombelli et al. 2013). That study concluded that *A. actinomycetemcomitans* positive subjects did not benefit more from the antibiotic combination.

Although the initial interaction model did not show a significant effect of microbiological status on antibiotic clinical effect and all test (antibiotic) subjects benefited from the adjunctive antimicrobials irrespective of microbiological status at baseline, it was striking to notice that test subjects who harboured *A. actinomycetemcomitans* at baseline (*A.a.+ve*) (Table 2) contributed much more to the observed PPD improvement at deep sites (1.8 mm;  $p$ -value 0.001) as compared to the subjects who did not harbour the pathogen at baseline (*A.a.–ve*) (1.0 mm;  $p$ -value 0.045) and the same trend was observed for PPD reduction at moderate pockets. These differences between subgroups were not seen for gain in attachment, or when the same analysis was

applied to the subgroups of subjects classified by baseline presence or absence of *P. gingivalis* or *T. forsythia*. (Appendices S1 and S2). Therefore, it could be speculated that within the test group, subjects who tested positive to *A. actinomycetemcomitans* may have contributed more to the overall positive response. Conversely, subgroup analysis, within the placebo group, confirm findings from previous studies: if *A. actinomycetemcomitans* is present at baseline, clinical results of scaling and root planing are less favourable as compared to when that species is not detected before treatment (Renvert et al. 1990) (data not shown).

Further exploratory analyses were also conducted with "clinically meaningful" end points (Greenstein & Lamster 2000). For instance, if our therapeutic end point was to convert periodontal pockets from  $\geq 5$  mm at baseline to  $\leq 4$  after 6 months or, a more stringent end point, from  $\geq 4$  mm at baseline to  $\leq 3$  after 6 months, the differences between the test group and the placebo group were only significant in *A.a.+ve* but not in *A.a.-ve* subjects (Table 3). These results suggest, from the clinical stand point, a larger impact of the adjunctive antimicrobial regimen if *A. actinomycetemcomitans* was present at baseline. This trend was further confirmed by another secondary exploratory analysis performed just among the subjects from the test group (Table 4). That analysis showed that the presence of *A. actinomycetemcomitans* at baseline was a significant covariate that resulted in more clinical benefits at moderate (PPD reduction) and deep pockets (PPD reduction and attachment gain). On the contrary, these clinical benefits were not seen in subjects who harboured *P. gingivalis* or *T. forsythia* (Appendices S3 and S4) at baseline as compared to the ones who did not harbour these pathogens. These results are in agreement with the study by Flemmig et al. (1998) on chronic periodontitis subjects in which subjects harbouring *A. actinomycetemcomitans* at baseline benefited from the combined adjunctive antimicrobial therapy as compared to their control group, but the same did not occur for subjects

harbouring *P. gingivalis*. All the above-mentioned findings need to be cautiously interpreted due to the limitations of this study design, however, it would also seem reasonable to mention that despite having no microbiological criteria for subject stratification at baseline, a similar bacterial distribution between groups was observed by chance (Table 5), which would represent a proper scenario for statistical comparisons with the aim of exploring the effect of microbiological status and its impact on clinical outcomes. In addition, the potential influence of other modifying factors, such as the differences between the main subgroup of subjects (*A.a.+ve* versus *A.a.-ve*) in their baseline clinical values (Appendix S6) or in their full-mouth plaque scores before and after treatment (Appendix S5), was excluded.

Secondary outcomes on the prevalence of the three main pathogens at different time points (Table 5) and statistical comparisons between the treatment groups for *P. gingivalis* and *T. forsythia* showed a significant difference between treatment groups at 6 months that favoured the test group. In contrast, *A. actinomycetemcomitans* was detected at 6 months in only two subjects (10%) from the test group compared to five subjects (23.8%) in the placebo group, which was not statistically significantly different ( $p = 0.410$ ). This may be due to the higher "eradication rate" obtained in this study in placebo subjects, more marked than expected in comparison to other classical studies (Renvert et al. 1990). On the other hand, the reduction in *A. actinomycetemcomitans* detection amongst test subjects (81.1%) at 6 months, is close to that obtained in one of the first publications dealing with this antibiotic combination (Van Winkelhoff et al. 1992) in which 96.6% of the patients did not have detectable *A. actinomycetemcomitans* after active treatment. Total microbiological counts, besides, if evaluated in the whole group, did not show any statistically significant differences between groups.

Amoxicillin gets degraded by bacterial  $\beta$ -lactamases which are quite frequently encountered in many subjects. In fact, a recent clinical study (Rams et al. 2013) performed in 564

chronic periodontitis subjects found that 52.1% harboured  $\beta$ -lactamase-producing subgingival bacteria, out of which 98.9% were susceptible to metronidazole. Our data show that in the test group there was a statistically significant increase in the percentage of antibiotic resistance to amoxicillin at 2 months, which returned to baseline values at 6 months, whereas there were only modest changes which were not statistically significant in the placebo group (Table 7). This increase may be a result of either an increase in intrinsically resistant bacteria or an increased in bacteria after the acquisition of amoxicillin resistance. The rationale for adding amoxicillin to the prescription of this combined drug regimen is based on a synergistic effect of amoxicillin on metronidazole and its hydroxymetabolite against *A. actinomycetemcomitans* (Pavicic et al. 1991, 1994b). Based on only 45% of the subjects in the test group harbouring *A. actinomycetemcomitans* at baseline, adding amoxicillin to metronidazole may have not been of help to 55% of our study sample. Furthermore, a very recent study in which metronidazole, alone or combined with amoxicillin, was evaluated as an adjunct to non-surgical therapy in chronic periodontitis subjects, showed that the clinical and microbiological benefits of both treatment options were very similar (Feres et al. 2012, Soares et al. 2014). Those authors, on the other hand, have also suggested that the indication of amoxicillin and metronidazole may go beyond the mere suppression of *A. actinomycetemcomitans* as they showed an increase in the proportions of the host-compatible *Actinomyces* species up to 1 year in subjects who received this adjunctive antimicrobial combination in contrast to the ones who received metronidazole alone.

Therefore, the widespread prescription of the drug combination in patients with advanced chronic periodontitis or generalized aggressive periodontitis is open to debate, and clinicians should balance the risk/benefit ratio of the prescription of a single (metronidazole) or a double (metronidazole and amoxicillin) adjunctive antimicrobial regimen which might benefit from baseline microbi-

ological sampling. Other elements such as cost or adherence to the medication (Guerrero et al. 2007) should also be part of the decision. Nonetheless, clinicians should be aware that when prescribing systemic antibiotic, especially  $\beta$ -lactamic antibiotics, there is a risk of increasing antibiotic resistance in the population (Herrera et al. 2000, Van Winkelhoff et al. 2005) and whilst in some countries it has been shown that adjunctive antimicrobials are not overused (Choudhury et al. 2001) the same may not be said in other countries where the antibiotic usage policy was more flexible (Herrera et al. 2000). It has been suggested, on the contrary, that the use of antimicrobial combinations prevents the emergence of resistance bacterial strains (D'Agata et al. 2008).

Amoxicillin and metronidazole in GAgP subjects are usually prescribed empirically without specific targeting based on baseline microbiological information (Guerrero et al. 2005, Mombelli 2005, Mombelli et al. 2013). Exploratory data obtained from this study showed that there is a tendency towards more beneficial antimicrobial effect if *A. actinomycetemcomitans* is detected at baseline. However, all subjects who received the adjunctive medication showed better clinical outcome as compared to the ones who received placebo. Therefore, no definitive conclusions can be drawn from this report as this study i) was not primarily designed to test this research question, ii) was sized on clinical parameters, therefore, it is likely underpowered to explore the modifying effect of the microbiological status and iii) used microbiological sampling techniques who have certain limitations (Sanz et al. 2004).

Consequently, the interesting trends that have been observed in this secondary analysis need to be interpreted with caution. Further studies should be designed with appropriate sample size calculation and adequate design to confirm or reject the results observed in this study.

#### Acknowledgements

The authors thank Dr. Aurelio Tobías, Dr. David Moles and Dr.

Yu-Kang Tu, for their valuable advice during the statistical analysis.

#### References

- Aimetti, M., Romano, F., Guzzi, N. & Carnevale, G. (2012) Full-mouth disinfection and systemic antimicrobial therapy in generalized aggressive periodontitis: a randomized, placebo-controlled trial. *Journal of Clinical Periodontology* **39**, 284–294.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. & Lipman, D. J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* **25**, 3389–3402.
- Armitage, G. C. (1999) Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Annals of Periodontology* **4**, 1–6.
- Baltacioglu, E., Aslan, M., Sarac, O., Saybak, A. & Yuva, P. (2011) Analysis of clinical results of systemic antimicrobials combined with non-surgical periodontal treatment for generalized aggressive periodontitis: a pilot study. *Journal of the Canadian Dental Association* **77**, b97.
- Britt, M. R. & Pohlod, D. J. (1986) Serum and crevicular fluid concentrations after a single oral dose of metronidazole. *Journal of Periodontology* **57**, 104–107.
- Choudhury, M., Needleman, I., Gillam, D. & Moles, D. R. (2001) Systemic and local antimicrobial use in periodontal therapy in England and Wales. *Journal of Clinical Periodontology* **28**, 833–839.
- Christerson, L. A., Slots, J., Rosling, B. G. & Genco, R. J. (1985) Microbiological and clinical effects of surgical treatment of localized juvenile periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology* **12**, 465–476.
- Cionca, N., Giannopoulou, C., Ugolotti, G. & Mombelli, A. (2010) Microbiologic testing and outcomes of full-mouth scaling and root planing with or without amoxicillin/metronidazole in chronic periodontitis. *Journal of Periodontology* **81**, 15–23.
- D'Agata, E. M., Dupont-Rouzeyrol, M., Magal, P., Olivier, D. & Ruan, S. (2008) The impact of different antibiotic regimens on the emergence of antimicrobial-resistant bacteria. *PLoS One* **3**, e4036.
- Feres, M., Soares, G. M., Mendes, J. A., Silva, M. P., Faveri, M., Teles, R., Socransky, S. S. & Figueiredo, L. C. (2012) Metronidazole alone or with amoxicillin as adjuncts to non-surgical treatment of chronic periodontitis: a 1-year double-blinded, placebo-controlled, randomized clinical trial. *Journal of Clinical Periodontology* **39**, 1149–1158.
- Flemmig, T. F., Milian, E., Karch, H. & Klaiber, B. (1998) Differential clinical treatment outcome after systemic metronidazole and amoxicillin in patients harboring *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and/or *Porphyromonas gingivalis*. *Journal of Clinical Periodontology* **25**, 380–387.
- Greenstein, G. & Lamster, I. (2000) Efficacy of periodontal therapy: statistical versus clinical significance. *Journal of Periodontology* **71**, 657–662.
- Griffiths, G. S., Ayob, R., Guerrero, A., Nibali, L., Suvan, J., Moles, D. R. & Tonetti, M. S. (2011) Amoxicillin and metronidazole as an adjunctive treatment in generalized aggressive periodontitis at initial therapy or re-treatment: a randomized controlled clinical trial. *Journal of Clinical Periodontology* **38**, 43–49.
- Guerrero, A., Echeverria, J. J. & Tonetti, M. S. (2007) Incomplete adherence to an adjunctive systemic antibiotic regimen decreases clinical outcomes in generalized aggressive periodontitis patients: a pilot retrospective study. *Journal of Clinical Periodontology* **34**, 897–902.
- Guerrero, A., Griffiths, G. S., Nibali, L., Suvan, J., Moles, D. R., Laurell, L. & Tonetti, M. S. (2005) Adjunctive benefits of systemic amoxicillin and metronidazole in non-surgical treatment of generalized aggressive periodontitis: a randomized placebo-controlled clinical trial. *Journal of Clinical Periodontology* **32**, 1096–1107.
- Heller, D., Varela, V. M., Silva-Senem, M. X., Torres, M. C., Feres-Filho, E. J. & Colombo, A. P. (2011) Impact of systemic antimicrobials combined with anti-infective mechanical debridement on the microbiota of generalized aggressive periodontitis: a 6-month RCT. *Journal of Clinical Periodontology* **38**, 355–364.
- Herrera, D., vanWinkelhoff, A. J., Lemijn-Kippuw, N., Winkel, E. G. & Sanz, M. (2000) Beta-lactamase producing bacteria in the subgingival microbiota of adult patients with periodontitis. A comparison between Spain and The Netherlands. *Journal of Clinical Periodontology* **27**, 520–525.
- Hollis, S. & Campbell, F. (1999) What is meant by intention to treat analysis? Survey of published randomised controlled trials. *British Medical Journal* **319**, 670–674.
- Kleinfelder, J. W., Muller, R. F. & Lange, D. E. (1999) Antibiotic susceptibility of putative periodontal pathogens in advanced periodontitis patients. *Journal of Clinical Periodontology* **26**, 347–351.
- Madinier, I. M., Fosse, T. B., Hitzig, C., Charbit, Y. & Hannoun, L. R. (1999) Resistance profile survey of 50 periodontal strains of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Journal of Periodontology* **70**, 888–892.
- Maidak, B. L., Cole, J. R., Lilburn, T. G., Parker, C. T. Jr, Saxman, P. R., Farris, R. J., Garrity, G. M., Olsen, G. J., Schmidt, T. M. & Tiedje, J. M. (2001) The RDP-II (Ribosomal Database Project). *Nucleic Acids Research* **29**, 173–174.
- Maidak, B. L., Cole, J. R., Lilburn, T. G., Parker, C. T. Jr, Saxman, P. R., Stredwick, J. M., Garrity, G. M., Li, B., Olsen, G. J., Pramanik, S., Schmidt, T. M. & Tiedje, J. M. (2000) The RDP (Ribosomal Database Project) continues. *Nucleic Acids Research* **28**, 173–174.
- Mestnik, M. J., Feres, M., Figueiredo, L. C., Soares, G., Teles, R. P., Fermiano, D., Duarte, P. M. & Faveri, M. (2012) The effects of adjunctive metronidazole plus amoxicillin in the treatment of generalized aggressive periodontitis: a 1-year double-blinded, placebo-controlled, randomized clinical trial. *Journal of Clinical Periodontology* **39**, 955–961.
- Mombelli, A. (2005) Antimicrobial profiles of periodontal pathogens and systemic antimicrobial therapy. *Journal of Clinical Periodontology* **32**, 891–892.
- Mombelli, A., Cionca, N., Almaghouth, A., Decaillat, F., Courvoisier, D. S. & Giannopoulou, C. (2013) Are there specific benefits of amoxicillin plus metronidazole in *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*-associated periodontitis? Double-masked, randomized clinical trial of efficacy and safety. *Journal of Periodontology* **84**, 715–724.



- Mombelli, A., McNabb, H. & Lang, N. P. (1991) Black-pigmenting gram-negative bacteria in periodontal disease. II. Screening strategies for detection of *P. gingivalis*. *Journal of Periodontal Research* **26**, 308–313.
- Pavicic, M. J., Van Winkelhoff, A. J. & de, G. J. (1991) Synergistic effects between amoxicillin, metronidazole, and the hydroxymetabolite of metronidazole against *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **35**, 961–966.
- Pavicic, M. J., Van Winkelhoff, A. J., Douque, N. H., Steures, R. W. & de Graaff J. (1994a) Microbiological and clinical effects of metronidazole and amoxicillin in *Actinobacillus actinomycetemcomitans*-associated periodontitis. A 2-year evaluation. *Journal of Clinical Periodontology* **21**, 107–112.
- Pavicic, M. J., Van Winkelhoff, A. J., Pavicic-Temming, Y. A. & de, G. J. (1994b) Amoxicillin causes an enhanced uptake of metronidazole in *Actinobacillus actinomycetemcomitans*: a mechanism of synergy. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **34**, 1047–1050.
- Rams, T. E., Degener, J. E. & van Winkelhoff, A. J. (2013) Prevalence of beta-lactamase-producing bacteria in human periodontitis. *Journal of Periodontal Research* **48**, 493–496.
- Renvert, S., Wikstrom, M., Dahlen, G., Slots, J. & Egelberg, J. (1990) Effect of root debridement on the elimination of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Bacteroides gingivalis* from periodontal pockets. *Journal of Clinical Periodontology* **17**, 345–350.
- Sanz, M., Lau, L., Herrera, D., Morillo, J. M. & Silva, A. (2004) Methods of detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* and *Tannerella forsythensis* in periodontal microbiology, with special emphasis on advanced molecular techniques: a review. *Journal of Clinical Periodontology* **31**, 1034–1047.
- Sgolastra, F., Petrucci, A., Gatto, R. & Monaco, A. (2012) Effectiveness of systemic amoxicillin/metronidazole as an adjunctive therapy to full-mouth scaling and root planing in the treatment of aggressive periodontitis: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Periodontology* **83**, 731–743.
- Soares, G. M. S., Mendes, J. A. V., Silva, M. P., Faveri, M., Teles, R., Socransky, S. S., Wang, X., Figueiredo, L. C. & Feres, M. (2014) Metronidazole alone or with amoxicillin as adjuncts to nonsurgical treatment of Chronic Periodontitis: a secondary analysis of microbiological results from a randomized clinical trial. *Journal of Clinical Periodontology* **41**, 366–376.
- Syed, S. A. & Loesche, W. J. (1972) Survival of human dental plaque flora in various transport media. *Applied Microbiology* **4**, 638–644.
- Tonetti, M. S., Lang, N. P., Cortellini, P., Suvar, J. E., Adriaens, P., Dubravec, D., Fonzar, A., Fourmousis, I., Mayfield, L., Rossi, R., Silvestri, M., Tiedemann, C., Topoll, H., Vangsted, T. & Wallkamm, B. (2002) Enamel matrix proteins in the regenerative therapy of deep intrabony defects. *Journal of Clinical Periodontology* **29**, 317–325.
- Tonetti, M. S. & Mombelli, A. (1999) Early-onset periodontitis. *Annals of Periodontology* **4**, 39–53.
- Van Winkelhoff, A. J., Herrera, D., Oteo, A. & Sanz, M. (2005) Antimicrobial profiles of periodontal pathogens isolated from periodontitis patients in The Netherlands and Spain. *Journal of Clinical Periodontology* **32**, 893–898.
- Van Winkelhoff, A. J., Rodenburg, J. P., Goene, R. J., Abbas, F., Winkel, E. G. & de Graaff, J. (1989) Metronidazole plus amoxicillin in the treatment of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* associated periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology* **16**, 128–131.
- Van Winkelhoff, A. J., Tjihof, C. J. & de Graaff, J. (1992) Microbiological and clinical results of metronidazole plus amoxicillin therapy in *Actinobacillus actinomycetemcomitans*-associated periodontitis. *Journal of Periodontology* **63**, 52–57.
- Varela, V. M., Heller, D., Silva-Senem, M. X., Torres, M. C., Colombo, A. P. & Feres-Filho, E. J. (2011) Systemic antimicrobials adjunctive to a repeated mechanical and antiseptic therapy for aggressive periodontitis: a 6-month randomized controlled trial. *Journal of Periodontology* **82**, 1121–1130.
- Walker, C. B., Gordon, J. M. & Socransky, S. S. (1983) Antibiotic susceptibility testing of subgingival plaque samples. *Journal of Clinical Periodontology* **10**, 422–432.
- Xajigeorgiou, C., Sakellari, D., Slini, T., Baka, A. & Konstantinidis, A. (2006) Clinical and microbiological effects of different antimicrobials on generalized aggressive periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology* **33**, 254–264.
- Zandbergen, D., Slot, D. E., Cobb, C. M. & Van der Weijden, F. A. (2013) The clinical effect of scaling and root planing and the concomitant administration of systemic amoxicillin and metronidazole: a systematic review. *Journal of Periodontology* **84**, 332–351.

## Supporting Information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

**Appendix S1.** Mean differences between test and placebo groups, at 6 months, for PPD reduction and gain in attachment in subgroups of subjects harbouring or not harbouring *Porphyromonas gingivalis* at baseline.

**Appendix S2.** Mean differences between test and placebo groups, at 6 months, for PPD reduction and gain in attachment in subgroups of subjects harbouring or not harbouring *Tannerella Forsythia* at baseline.

**Appendix S3.** Percentage of sites with clinically relevant changes in test and placebo groups, at 6 months, in subgroups of subjects harbouring or not harbouring *Porphyromonas gingivalis* at baseline.

**Appendix S4.** Percentage of sites with clinically relevant changes in test and placebo groups, at 6 months, in subgroups of subjects harbouring or not harbouring *Tannerella forsythia* at baseline.

**Appendix S5.** FMPS and FMBS at baseline and differences between 2-0 and 6-0 in subjects harbouring and not harbouring *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* at baseline.

**Appendix S6.** Baseline clinical outcome variables in subjects positive or negative to *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* at baseline.

Address:

Adrián Guerrero

Paseo de Reding 41, 1º Izqda.

Málaga 29016, Spain

E-mail: ag@clinicaadrianguerrero.com

## Clinical Relevance

**Scientific rationale for the study:** It has been suggested that periodontal patients infected with specific bacteria benefit more than others from adjunctive antimicrobials and it has been implied that microbial diagnosis at baseline may provide an additional benefit over empiric antibiotic usage.

**Principal findings:** The benefit of the adjunctive antibiotics was not

affected by the presence of any of the main pathogens. However, secondary exploratory analysis suggests that subjects harbouring *A. actinomycetemcomitans* at baseline may demonstrate additional improvements as compared to the subjects who did not harbour this pathogen.

**Practical implications:** Notwithstanding the established clinical benefit of adjunctive antimicrobial treatment in all subjects with generalized aggres-

sive periodontitis, patients harbouring *A. actinomycetemcomitans* might benefit more from this adjunctive antimicrobial therapy. Further research is needed to better assess the benefit of antibiotic treatment specifically targeted to the presence of a specific pathogen.





