



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

LABORATORIO DE GENÉTICA MOLECULAR

**IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS RESISTENTES A
DIFERENTES ANTIBIÓTICOS EN MUESTRAS DE PLACA
DENTOBACTERIANA SUBGINGIVAL DE SUJETOS MEXICANOS**

TESIS QUE PARA OBTENER
EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:
CD. ARGELIA ALMAGUER FLORES

TUTOR:
DRA. LAURIE ANN XIMÉNEZ FYVIE



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

*I am among those who think that science has great beauty.
A scientist in his laboratory is not only a technician: he is
also a child placed before natural phenomena, which impress
him, like a fairy tale.*

Marie Curie

*I have been trying to point out that in our lives chance may
have an astonishing influence and, if I may offer advice to
the young laboratory worker, it would be this - never to
neglect an extraordinary appearance or happening.*

Alexander Fleming

DEDICATORIA

Quiero dedicar este trabajo a las siguientes personas:

A mi familia, mi Papá Victor, a mi Mamá Coty y a mis dos hermanas Thania y Mariana. Gracias por ayudarme a cumplir una meta más y por ser un aliciente para superarme cada día. Gracias por su apoyo pero sobre todo gracias por su amor.

A René. Honito, muchas gracias por recorrer conmigo todo este camino, por estar siempre presente. Gracias por toda la ayuda que me brindaste en el lab con mis experimentos y el apoyo que siempre me has dado. Gracias por hacer tuyas mis tristezas y sobre todo mis alegrías. Gracias por todo lo que he aprendido de ti, por que me has demostrado con hechos lo que significa “ser mejor cada día”. Gracias por tu amor y por hacerme tan feliz. TE AMOOOO.

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a todas y cada una de las siguientes personas:

Primeramente, mi agradecimiento a la Dra. Laurie Ann Ximénez, mi tutora, por todo el apoyo, la confianza y los ánimos brindados desde que entré a trabajar a su laboratorio. Laurie, muchas gracias por haberme guiado en este trabajo de doctorado, gracias por esas charlas siempre enriquecedoras que me ayudaron a ampliar mi visión de la ciencia y que ahora me encaminan hacia el mundo de la investigación. Gracias por todo lo que he aprendido y sigo aprendiendo del maravilloso mundo de la microbiología. Y más que todo, muchas gracias por que de ti he aprendido, que los límites para hacer las cosas se los pone uno mismo y que todas las experiencias, los éxitos y también fracasos, sólo sirven para aprender de ellos, para superarnos y ser mejores cada vez. Muchas gracias por hacer de mi doctorado una experiencia llena de satisfacciones, para ti mi cariño, respeto y admiración.

Al Dr. Higinio Arzate, por haber aceptado ser parte de mi comité tutorial. Higinio, muchas gracias por haber estado junto a mi durante este tiempo, gracias por tu apoyo y las observaciones hechas a mi trabajo, pero sobre todo gracias por que tu ejemplo de constancia y amor al trabajo es una de las mejores enseñanzas que obtuve de mi doctorado.

Al Dr. Alfredo Ponce de León, por haber aceptado ser parte de mi comité tutorial, aún sin conocerme. Dr. Alfredo, no sabe de verdad cuánto le agradezco y aprecio su apoyo en mi trabajo de investigación, sus observaciones y recomendaciones siempre fueron muy útiles y acertadas, pero hay algo que en especial le quisiera agradecer, el entusiasmo y ánimo que siempre aportó durante las sesiones tutorales y la disposición siempre amable para hacer las correcciones al trabajo, muchas gracias.

A la Dra. Celia Alpuche, a la Dra. Ingerborg Becker, al Dr. José Ignacio Santos, al Dr. José Sifuentes y a la Dra. Patricia Tato, por la atención que tuvieron para leer mi tesis y por aceptar ser parte de mi jurado de examen. Muchas gracias por todas las observaciones y críticas que, sin duda, enriquecieron y mejoraron este escrito.

También quisiera hacer un reconocimiento a la Facultad de Odontología, en especial al Mtro. José Vela y al Mtro. Javier de la Fuente por el apoyo brindado durante la realización de mi doctorado. Al programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Médicas, Odontológicas y de la Salud, especialmente a la Dra. Elba Leyva, a la Mtra. Claudia de León y a Ana María, Vicky y Lorena por toda su ayuda y apoyo durante todo este tiempo.

A mis amigos y compañeros de laboratorio Yunuen Moreno, Araceli Salgado, Marco Antonio Sánchez y al Sr. Eulalio Alcántara, nuestro técnico. Gracias a todos ellos por su ayuda durante muchos de mis experimentos y por hacer de las interminables horas de trabajo en el laboratorio, momentos siempre felices y agradables.

También quisiera agradecerles su ayuda y disposición para colaborar en este trabajo a los nuevos integrantes del laboratorio: Adriana Pérez, Patricia Rodríguez, Valentina García e Israel Madrigal, gracias por sus ánimos y por seguir dando vida a nuestro laboratorio.

Hay otras personas que no puedo dejar de mencionar, por que también han sido importantes durante este recorrido me refiero a: Viri, Marco, Bruno, Pedro y Du, gracias por los ánimos, la convivencia, la ayuda y sobre todo la amistad brindada durante este tiempo que llevamos de conocernos.

A mis amigos de toda la vida: Sofía, Ma. Luisa, Dante, Ricardito y Manuel. Gracias por su amistad, aguante y apoyo durante este tiempo del doctorado.

Finalmente, quisiera hacer un reconocimiento a la Universidad Nacional Autónoma de México, nuestra máxima casa de estudios, por ser fuente de inspiración para la continua superación académica de las personas que pertenecemos a ella.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	<i>i-v</i>
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
I. INTRODUCCIÓN	3
A. Antecedentes	3
Composición microbiológica de la placa dentobacteriana subgingival	3
Etiología bacteriana de las enfermedades periodontales	6
Administración de antibióticos sistémicos en la terapia periodontal	9
Antibióticos y mecanismos de resistencia bacteriana	14
i. Antibióticos β -lactámicos	15
ii. Tetraciclinas	18
iii. Macrólidos y lincosamidas	21
iv. Quinolonas	23
v. Metronidazol	25
B. Objetivos	26
C. Planteamiento y justificación del problema	27
D. Hipótesis	28
II. MATERIALES Y MÉTODOS	29
A. Diseño experimental	29
B. Población de estudio	29
Criterios de selección	29
Captura de sujetos de estudio	30
C. Evaluación clínica	30
D. Evaluaciones microbiológicas	31
Recolección y procesamiento de muestras de placa dentobacteriana	31
Determinación del porcentaje de microorganismos resistentes en la flora total cultivable (Objetivo 1)	32
Determinación de concentraciones mínimas inhibitorias y los porcentajes de resistencia y multiresistencia en especies bacterianas de la placa dentobacteriana subgingival (Objetivo 2)	33

Identificación de especies bacterianas resistentes (Objetivo 3)	34
i. Preparación de aislados	34
ii. Especies bacterianas para la elaboración de sondas de DNA	35
iii. Purificación de DNA bacteriano y preparación de sondas de DNA	35
iv. Hibridaciones DNA-DNA	36
v. Enumeración de especies bacterianas	37
E. Análisis estadístico de datos	38
III. RESULTADOS	40
A. Características Clínicas de la población de estudio	40
B. Objetivo 1: Determinación del porcentaje de microorganismos resistentes en la flora total cultivable	40
C. Objetivo 2: Determinación de concentraciones mínimas inhibitorias y los porcentajes de resistencia y multiresistencia en especies bacterianas de la placa dentobacteriana subgingival	41
D. Objetivo 3: Identificación de especies bacterianas resistentes	42
IV. DISCUSIÓN	45
V. CONCLUSIONES	55
VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57
VII. TABLAS	80
VIII. FIGURAS	86
IX. ANEXOS	96
A. Experimentos preliminares	96
Determinación del periodo de actividad de los antibióticos dentro del agar	96
Determinación de concentraciones mínimas inhibitorias de cepas de referencia	97
Comparación de dos medios de cultivo para la determinación de concentraciones mínimas inhibitorias en especies bacterianas anaeróbicas	99
B. Formato de consentimiento informado	109
C. Artículos y resúmenes publicados	115

RESUMEN

Introducción: Una práctica común en el tratamiento de las enfermedades periodontales, es el empleo de diversos antibióticos como coadyuvantes en el tratamiento de estas infecciones. Sin embargo, existe una preocupación creciente acerca del uso excesivo de antibióticos en el tratamiento de las enfermedades periodontales y sobre el papel que esto puede jugar en el desarrollo de especies bacterianas resistentes. Más aún, se sabe que los patrones de resistencia pueden variar de manera significativa en diferentes poblaciones debido a diferentes estrategias en el control y uso de los antibióticos. El objetivo del presente estudio fue determinar la presencia de resistencia a antibióticos frecuentemente utilizados en la terapia periodontal, en bacterias provenientes de placa dentobacteriana subgingival de sujetos Mexicanos.

Materiales y métodos: 40 muestras de placa dentobacteriana subgingival de sujetos Mexicanos (N=20) fueron procesadas para determinar el % de UFC que crecieron en presencia de amoxicilina y doxiciclina. Además, de cada muestra fueron aisladas 50 cepas, las cuales fueron procesadas para determinar la resistencia y las CMIs a seis antibióticos (amoxicilina, cefotaxima, ciprofloxacina, clindamicina, doxiciclina y metronidazol), así como para ser identificadas utilizando la técnica de “checkerboard” para hibridaciones DNA-DNA.

Resultados: El 1% y 4% de las UFCs provenientes de placa dentobacteriana subgingival, crecieron en presencia de 8 µg/ml de amoxicilina y doxiciclina, respectivamente. Del total de las cepas analizadas (n=1,679), el 44.3% fue sensible a todos los antibióticos y el 55.7% fue resistente o multiresistente. Del total de las cepas identificadas (n=962), el 50.7% fue sensible a todos los antibióticos y el 49.3% fue resistente. Del total de cepas identificadas que fueron resistentes (n=467), el 69.6% fue resistente a un solo antibiótico, el 27.4% a dos antibióticos y el 3.0% a tres antibióticos. Ninguna de las cepas evaluadas mostró resistencia a 4 o más antibióticos. El mayor porcentaje de cepas identificadas que mostró resistencia, la presentó a metronidazol (34.3%), por el contrario, el menor porcentaje de cepas identificadas que mostró resistencia, la presentó a cefotaxima (0.3%). Algunas de las cepas que mostraron resistencia y/o multiresistencia fueron identificadas como *A. actinomycetemcomitans*, *E. corrodens*, *P. micros*, *S. noxia*, *P. gingivalis*, *F. nucleatum* y diferentes especies de *Streptococcus*, *Actinomyces* y *Prevotella*.

Conclusiones: Los resultados del presente estudio indicaron que antibióticos comúnmente utilizados en la terapia periodontal como amoxicilina y doxiciclina son potencialmente eficaces en la inhibición de un gran número de especies de la placa dentobacteriana subgingival. Sin embargo, en presencia de metronidazol, un gran número de las especies evaluadas incluyendo especies consideradas patógenos periodontales, mostró resistencia. Los resultados de este estudio reflejan la necesidad de ampliar la información obtenida, para que en consecuencia, seamos capaces de establecer parámetros más específicos para la selección de antibióticos sistémicos en el tratamiento de las enfermedades periodontales en la población Mexicana.

ABSTRACT

Introduction: The use of a number of systemic antibiotics as adjuncts to conventional periodontal therapy is common. However, there is growing concern about the wide-spread use of antimicrobial agents in the treatment of periodontal infections and of its role in the development of bacterial resistance. It is well known that antibiotic resistance patterns can vary significantly in different populations due to varying strategies of antibiotic usage and control. The purpose of the present study was to determine the presence of resistance to different antibiotics in subgingival microbial species in samples from Mexican subjects.

Materials and methods: 40 subgingival plaque samples collected from Mexican subjects (N=20) were processed to determine the % of CFUs that grew in the presence of amoxicillin and doxycycline. Also, 50 strains were isolated from each sample and processed to determine the resistance and MICs to six different antibiotics (amoxicillin, cefotaxime, ciprofloxacin, clindamycin, doxycycline and metronidazole), and for identification using the “checkerboard” DNA-DNA hybridization technique.

Results: 1% and 4% of CFUs from subgingival plaque samples grew in the presence of 8 µg/ml of amoxicillin and doxycycline, respectively. Of the total number of strains evaluated (n=1,679), 44.3% were sensitive to all of the test antibiotics and 55.7% were resistant or multiresistant. Of the total number of strains identified (n=962), 50.7% were sensitive to all of the test antibiotics and 49.3% were resistant. Of the total number of resistant strains that were identified (n=467), 69.6% were resistant to one antibiotic only, 27.4% to two antibiotics and 3.0% to three antibiotics. None of the strains evaluated exhibited resistance to 4 or more antibiotics. The largest proportion of resistant strains that were identified were resistant to metronidazole (34.3%), in contrast, the lowest proportion of resistant strains that were identified were resistant to cefotaxime (0.3%). Some of the strains that exhibited resistance and/or multiresistance were identified as *A. actinomycetemcomitans*, *E. corrodens*, *P. micros*, *S. noxia*, *P. gingivalis*, *F. nucleatum* and different species of *Streptococcus*, *Actinomyces* and *Prevotella*.

Conclusion: The results of the present study suggested that various antibiotics commonly used in periodontal practice such as amoxicillin and doxycycline, are potentially effective in inhibiting the growth of a large number of bacterial species in subgingival plaque samples. However, others such as metronidazole seem not to be as effective given that a number of the bacterial species evaluated including various periodontal pathogens exhibited resistance to this particular antibiotic. Furthermore, the results of the present study reflect the need for broader information regarding antibiotic resistance patterns in order to enable the establishment of effective and more specific parameters for the selection and use of systemic antibiotics for the treatment of periodontal diseases in the Mexican population.

I. INTRODUCCIÓN

A. ANTECEDENTES

Composición microbiológica de la placa dentobacteriana subgingival

La placa dentobacteriana está compuesta por comunidades microbianas adheridas a la superficie dental, embebidas en una matriz de exopolisacáridos y organizadas en una estructura llamada biopelícula (Marsh & Bradshaw, 1995; Costerton, et al., 1999; Molin, 1999). Esta biopelícula, también conocida como placa dentobacteriana, está compuesta por aproximadamente 500 especies bacterianas diferentes (Moore, et al., 1982; Moore, et al., 1983; Paster, et al., 2001). La superficie dental provee un sustrato estable para la colonización bacteriana en la cavidad bucal. En contraste, las agregaciones bacterianas en la mucosa masticatoria y en la mucosa de carrillos, piso de la boca y paladar duro son, en general, limitadas debido al recambio y descamación de las células epiteliales que los conforman (Listgarten, 1999).

La secuencia de colonización y formación de la placa dentobacteriana es un proceso orquestado y altamente ordenado (Xie, et al., 2000). Pocos minutos después de realizar una limpieza dental profesional, los primeros colonizadores, cocos y bacilos Gram-positivos principalmente de los géneros *Streptococcus* y *Actinomyces*, se adhieren a la superficie dental por medio de moléculas específicas de adhesión bacteriana (Saxton, 1973; Theilade, et al., 1982; Scannapieco, 1994; Jenkinson & Lamont, 1997), las cuales interactúan con moléculas adheridas a la superficie dental derivadas de componentes salivales y del fluido crevicular (Gibbons, et al., 1988; Gibbons, et al., 1991; Kolenbrander, et al., 1999). Estos primeros colonizadores

juegan un papel muy importante en la formación de la placa dentobacteriana, ya que tienen receptores específicos para las diferentes especies bacterianas que posteriormente se coagregarán a la estructura inicialmente formada (Gibbons & Nygaard, 1970; Cook, et al., 1998).

Los segundos colonizadores, también llamados colonizadores puente o secundarios, poseen mecanismos de adhesión tanto con los primeros colonizadores como con las especies que se coagregarán de forma tardía a la placa bacteriana. Este grupo de microorganismos está formado principalmente por especies pertenecientes a los géneros *Campylobacter*, *Capnocytophaga*, *Veillonella*, *Fusobacterium* y *Prevotella* entre otros (Kolenbrander, et al., 1999). Finalmente, si la secuencia de colonización de la placa bacteriana no se ve interrumpida, un tercer grupo de microorganismos principalmente especies anaeróbicas Gram-negativas como especies de los géneros *Treponema* y *Porphyromonas* (Kolenbrander, et al., 1999; Listgarten, 1999), se unen a la biopelícula dental.

Con el fin de ampliar y mejorar nuestro entendimiento sobre la composición y la asociación que existe entre las bacterias que conforman la placa dentobacteriana, se realizó un estudio en donde fueron analizadas muestras de placa dentobacteriana subgingival provenientes de pacientes periodontalmente sanos y con enfermedad periodontal (Socransky, et al., 1998). Las muestras fueron analizadas utilizando la técnica de “checkerboard” para hibridaciones DNA-DNA (Socransky, et al., 1994), la cual permite la identificación simultánea de múltiples especies bacterianas en un gran número de muestras que contengan mezclas complejas de microorganismos (Socransky, et al., 2004). A continuación se mencionan los cinco complejos

bacterianos descritos en dicho estudio, a los que con fines prácticos les fueron asignados colores:

- **Complejo amarillo:** especies del género *Streptococcus* como *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus gordonii* y *Streptococcus intermedius*.
- **Complejo verde:** *Capnocytophaga gingivalis*, *Capnocytophaga ochracea*, *Capnocytophaga sputigena*, *Campylobacter concisus*, *Eikenella corrodens* y *Actinobacillus actinomycescomitans* serotipo a.
- **Complejo morado:** *Veillonella parvula* y *Actinomyces odontolyticus*.
- **Complejo naranja:** *Fusobacterium* sp. y subespecies, *Peptostreptococcus micros*, *Prevotella nigrescens*, *Prevotella intermedia*, *Campylobacter rectus*, *Campylobacter gracilis*, *Campylobacter showae*, *Eubacterium nodatum* y *Streptococcus constellatus*.
- **Complejo Rojo:** *Tannerella forsythia* (antes llamada *Bacteroides forsythus*), *Porphyromonas gingivalis* y *Treponema denticola*.
- **Especies no agrupada:** *A. actinomycescomitans* serotipo b, *Selenomonas noxia* y *Actinomyces viscosus*.

Las bacterias que conforman cada complejo se encuentran fuertemente asociadas entre sí. Como se puede observar en la **Figura 1**, los complejos amarillo, verde y morado se encuentran más fuertemente asociados entre sí y éstos a su vez asociados al complejo naranja pero no con los miembros del complejo rojo. A su vez, los complejos también ejemplifican la secuencia de colonización, de tal manera que los miembros de los complejos amarillo y morado forman parte de los colonizadores

primarios, los miembros del complejo naranja, junto con los miembros del complejo verde son colonizadores puente y finalmente los miembros del complejo rojo son colonizadores tardíos (Socransky, et al., 1998).

Etiología bacteriana de las enfermedades periodontales

Las enfermedades periodontales son infecciones que se caracterizan por la pérdida progresiva de los tejidos de soporte del diente (encía, ligamento periodontal, cemento radicular y hueso alveolar), son causadas por grupos específicos de microorganismos que colonizan la superficie dental y el espacio subgingival (Armitage, 1999). La diversidad de las especies bacterianas capaces de colonizar la cavidad bucal así como la dificultad o imposibilidad técnica para obtener una muestra cultivable representativa de la placa dentobacteriana subgingival ha dificultado la determinación de los agentes etiológicos de las enfermedades periodontales.

La búsqueda de los agentes causales de las enfermedades periodontales tiene sus inicios en la llamada “época de oro” de la microbiología (entre 1880-1920 aproximadamente) (Socransky & Haffajee, 1994). Durante esta época se realizaron grandes descubrimientos, uno muy significativo fue la aportación de Roberto Koch, quien pudo demostrar lo que ya desde tiempo atrás se sospechaba, que las enfermedades infecciosas eran causadas por “pequeños organismos vivos” así como sentar las bases para el estudio metódico de los organismos patógenos (Koch, 1881; Koch, 1882; Koch, 1884). Con la ayuda de las técnicas disponibles en ese tiempo, los investigadores sugirieron como posibles agentes causantes de la destrucción de los tejidos periodontales cuatro grupos de microorganismos: amibas, espiroquetas, fusiformes y estreptococos (Meyer, 1917).

Sin embargo, el estudio de las bacterias que colonizan la cavidad bucal y el papel que desempeñan en el desarrollo de las enfermedades periodontales se vio interrumpido, y para mediados de los años 1930, prácticamente ningún investigador dirigió su atención a este campo (Belding & Belding, 1936).

Fue hasta principios de los años 1960, que la etiología bacteriana de las enfermedades periodontales, volvió a incitar el interés de los investigadores. Los primeros estudios de esta época hechos con animales experimentales, demostraban que la enfermedad periodontal podía ser transmitida a otros animales sanos y que un microorganismo ahora conocido como *A. viscosus* era capaz de causar la destrucción de los tejidos periodontales de animales sanos (Jordan & Keys, 1964; Keyes & Jordan, 1964). Más tarde, los estudios de la gingivitis experimental en humanos, demostraron que la gingivitis puede ser inducida intencionalmente por la acumulación de placa dentobacteriana y que conforme ésta madura, los signos clínicos de la gingivitis se acentúan (Löe, et al., 1965; Löe, et al., 1967). Finalmente, estudios como los de Gibbons (Gibbons, et al., 1963), Socransky (Socransky, et al., 1963; Socransky, 1970; Socransky, et al., 1970) y Newman (Newman, et al., 1976; Newman & Socransky, 1977) marcaron la pauta y encaminaron la búsqueda de los agentes bacterianos específicos causantes de las enfermedades periodontales.

Utilizando técnicas de microbiología tradicional, se realizaron excelentes trabajos como los de Moore y Moore, quienes analizaron muestras de placa dentobacteriana subgingival en sujetos con diferentes grados de enfermedad periodontal y en sujetos periodontalmente sanos. Sus resultados mostraron una variación en la microbiota subgingival de acuerdo a los diferentes estadios periodontales de salud y enfermedad. Las especies compatibles con salud incluían

miembros de los géneros *Actinomyces*, *Streptococcus* y *Veillonella*, mientras que especies de los géneros *Eubacterium*, *Campylobacter*, *Fusobacterium*, *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Tannerella* (*Bacteroides*) y *Treponema* fueron detectadas en mayores proporciones en sitios con enfermedad (Moore & Moore, 1994; Moore, 1994).

De igual manera, pero utilizando la técnica de “checkerboard” para hibridaciones DNA-DNA, fueron analizadas muestras de placa dentobacteriana subgingival de sujetos sanos y con diferentes tipos de periodontitis. De acuerdo con la descripción de los complejos bacterianos, los miembros de los complejos rojo y naranja fueron encontrados más comúnmente en bolsas periodontales profundas, mientras que especies de los complejos amarillo, verde y morado junto con *A. viscosus* fueron consideradas como benéficas ó compatibles con la salud periodontal (Socransky, et al., 1998).

A la fecha, se reconoce que las infecciones periodontales son de origen endógeno y que especies consideradas patógenos periodontales se encuentran también colonizando la placa dentobacteriana de sujetos sanos (Dahlen, et al., 1992; Riviere, et al., 1995; Ashimoto, et al., 1996; Ali, et al., 1997; Haffajee, et al., 1998; Tanner, et al., 1998; Haffajee, et al., 1999; Willis, et al., 1999; Ximenez-Fyvie, et al., 2000). Sin embargo, el grado de patogenicidad de la placa dentobacteriana se ve influenciado por el medio ambiente local (Socransky & Haffajee, 1991), factores de virulencia de ciertos microorganismos (Neiders, et al., 1989; Shah, et al., 1989) y la cantidad e identidad de las bacterias presentes; se estima que en un surco subgingival sano las cuentas bacterianas son de 10^3 mientras que un surco enfermo puede tener cuentas mayores o iguales a 10^8 (Socransky & Haffajee, 1994).

Por otro lado, la susceptibilidad del hospedero para padecer periodontitis incluye factores como respuestas inmunes deficientes (Genco, 1992; Petit, et al., 1999; Petit, et al., 2001), polimorfismos genéticos (Kornman & Duff, 1997; Newman, 1997; Kornman & di Giovine, 1998; Quappe, et al., 2004), tabaquismo (Bergstrom & Eliasson, 1987; Haber, 1994; Haffajee & Socransky, 2001) y algunas enfermedades sistémicas que pueden influir en el grado de severidad de la periodontitis como la diabetes y algunos padecimientos congénitos y autoinmunes (Najera, et al., 1997; Grossi & Genco, 1998; Kinane & Marshall, 2001; Teng, et al., 2002).

Administración de antibióticos sistémicos en la terapia periodontal

A principios del siglo XX surgieron terapias enfocadas a la eliminación de los agentes microbianos que se creía causaban las enfermedades periodontales. Estas terapias incluían vacunas (Medalia, 1916; Hoffman, 1919; Briggs, 1924; Nikolaewa, 1926), empleo de luz ultravioleta (Rasmussen, 1929) y el uso de agentes cáusticos como fenol y ácido sulfúrico o tricloracético (Chance, 1928; Frachtmann, 1928; Hartzell, 1928).

Actualmente en la terapia periodontal, una práctica común es el empleo de diversos antibióticos sistémicos y locales como coadyuvantes en el tratamiento de estas infecciones. Los agentes antibacterianos más frecuentemente utilizados en la terapia periodontal, son las penicilinas, tetraciclinas, metronidazol, clindamicina y azitromicina (Walker, 1996; Slots, 2002; Slots & Ting, 2002).

Una de las penicilinas con mayor uso en la terapia periodontal es la amoxicilina, la cual pertenece al grupo de las aminopenicilinas (Handsfield, et al., 1973). Esto se debe, a que es un antibiótico que alcanza niveles altos en el fluido crevicular (de 1.5

a 14 µg/ml) (Walker, et al., 1983; Gordon & Walker, 1993; Tenenbaum, et al., 1997). Se ha reportado que la administración sistémica de amoxicilina sola ó en combinación con ácido clavulónico o con otros antibióticos como metronidazol mejora los parámetros clínicos periodontales como el nivel de inserción y disminuye la prevalencia de bacterias periodonto-patógenas (Berglundh, et al., 1998; Winkel, et al., 2001; Rooney, et al., 2002). Sin embargo, también existen algunos estudios que sugieren, que el uso de amoxicilina en comparación con el uso de otros antibióticos (Haffajee, et al., 1995a) ó inclusive con placebos (Winkel, et al., 1999) no proporciona ningún beneficio adicional a la terapia mecánica convencional.

El uso de antibióticos como las cefalosporinas en el tratamiento de las enfermedades periodontales no es habitual. Sin embargo, algunos estudios realizados *in vitro* sugieren que agentes como la cefotaxima son capaces de inhibir microorganismos periodonto-patógenos como *P. gingivalis*, *P. intermedia* (Fanali, et al., 1990) y *A. actinomycetemcomitans* (Kaplan, et al., 1989) así como un porcentaje importante de cepas aisladas de pacientes con gingivitis ó con algún grado de periodontitis (Saini, et al., 2003). La efectividad de las cefalosporinas en contra de las bacterias Gram-negativas, se debe a su habilidad para penetrar la membrana externa, su estabilidad a la hidrólisis β-lactámica en el espacio periplásmico y a su afinidad por las proteínas de unión a la penicilina (PBPs) (Belfiglio, 1999).

Las tetraciclinas son sin duda de los antibióticos más frecuentemente utilizados en la terapia periodontal (Seymour & Heasman, 1995; Feres, et al., 1999a; Ramberg, et al., 2001). El uso clínico de estos antibióticos se debe en parte a los niveles que alcanza en el fluido crevicular (1 a 8 µg/ml) (Gordon, et al., 1981; Sakellari, et al.,

2000) y a propiedades consideradas de gran valor en el manejo de las enfermedades periodontales, como el efecto anti-inflamatorio y la inhibición de la actividad de la colagenasa (Plewig & Schopf, 1975; Golub, et al., 1984; Wikesjo, et al., 1986; Rifkin, et al., 1993). Los estudios realizados para analizar la efectividad de la doxiciclina demuestran que el uso de doxiciclina sistémicamente administrada en combinación con las terapias mecánica y/o quirúrgica convencionales, mejora los parámetros clínicos periodontales (Feres, et al., 1999a; Ramberg, et al., 2001).

La clindamicina es un antibiótico de uso moderado en la terapia periodontal que alcanza niveles en el fluido crevicular de aproximadamente 2 µg/ml (Walker, et al., 1981). Los estudios clínicos en los que se ha evaluado el efecto de la clindamicina como coadyuvante a la terapia periodontal convencional, en el tratamiento de pacientes con periodontitis refractaria o en pacientes con enfermedad periodontal severa, reportan que el uso de este antibiótico mejora los parámetros clínicos periodontales y disminuye la actividad de la enfermedad (Gordon, et al., 1985; Gordon, et al., 1990; Walker & Gordon, 1990; Magnusson, et al., 1994).

Por otra parte, el uso de la ciprofloxacina en la terapia periodontal es limitado. Esto se debe en parte a que diversos estudios sugieren que la eficacia de la ciprofloxacina en contra de microorganismos anaerobios es moderada (Prabhala, et al., 1984; Goldstein & Citron, 1985; Sutter, et al., 1985). Sin embargo, se ha reportado que la ciprofloxacina puede inhibir el crecimiento *in vitro* de importantes patógenos periodontales como *T. forsythia* y *P. micros* (Lakhssassi, et al., 2005). Más aún, un estudio sugirió que la administración sistémica de ciprofloxacina en combinación con la terapia mecánica convencional podía erradicar temporalmente a

A. actinomycetemcomitans en pacientes con periodontitis crónica (Muller, et al., 1998).

El metronidazol alcanza niveles en el suero y en el fluido crevicular que van de 3.6 a 13.8 µg/ml (Notten, et al., 1982; Britt & Pohlod, 1986; van Oosten, et al., 1986). El uso del metronidazol en la terapia periodontal ha sido bien estudiado (Gusberti, et al., 1988; Jenkins, et al., 1989; Loesche, et al., 1993), sin embargo su efectividad como adjunto al tratamiento periodontales aún es controversial. Algunos estudios sugieren que después del uso de este antibiótico en combinación con el raspado y alisado radicular se reduce de manera importante la profundidad de la bolsa además de que existe una ganancia en el nivel de inserción periodontal (Sigusch, et al., 2001; Carvalho, et al., 2004) mientras otros, reportan mejorías clínicas demasiado discretas para recomendar su uso (Walsh, et al., 1986; Jenkins, et al., 1989; Yilmaz, et al., 1996). Los mejores resultados han sido observados cuando se administra el metronidazol en combinación con otros antibióticos como amoxicilina (Berglundh, et al., 1998; Winkel, et al., 2001; Rooney, et al., 2002) y espiramicina (Quee, et al., 1987).

Existen dos factores que deben ser considerados en la elección de antibióticos sistémicos utilizados en el tratamiento de las enfermedades periodontales. El primero es la concentración que el antibiótico alcanza en el fluido crevicular (C_{GCF}), la cual proporciona información acerca de los niveles alcanzados por el antibiótico en el hábitat ecológico ocupado por especies periodonto-patógenas. El segundo factor es la concentración mínima inhibitoria (CMI) del antibiótico, la cual es una determinación *in vitro* de la concentración mínima capaz de inhibir el crecimiento de las especies

bacterianas. La actividad antimicrobiana es definida entonces como la relación que existe entre la C_{GCF} y la CMI (Genco, 1981; Goodson, 1994; Goodson, 1996).

Se ha concluido de manera general, que la administración de antibióticos locales ó sistémicos “mejora” los signos clínicos característicos de las enfermedades periodontales tales como nivel de inserción, sangrado al sondeo y supuración (Goodson, 1994; Ramberg, et al., 2001; Serino, et al., 2001; Herrera, et al., 2002; Addy & Martin, 2003; Dorfer, 2003; Haffajee, et al., 2003). Así mismo, se han reportado mejorías clínicas en pacientes con formas agresivas de periodontitis cuando los antibióticos se utilizan en combinación con el raspado y alisado radicular y con algunas terapias periodontales quirúrgicas (Listgarten, et al., 1978; Quee, et al., 1987; Haffajee, et al., 1995a; Haffajee, et al., 1995b; van Winkelhoff, et al., 1996; Carvalho, et al., 2004).

Sin embargo, existe una preocupación creciente acerca del uso excesivo de antibióticos en el tratamiento de las enfermedades periodontales y el papel que esto puede jugar en el desarrollo de especies bacterianas resistentes (Palmer, et al., 2000; Addy & Martin, 2003). Más aún, se sabe que los patrones de resistencia pueden variar de manera significativa en diferentes poblaciones (Pacini, et al., 1997; Poulet, et al., 1999; van Winkelhoff, et al., 2000; Ready, et al., 2002; Handal, et al., 2003; Rodrigues, et al., 2004; van Winkelhoff, et al., 2005; Ready, et al., 2006). Esto, puede deberse en parte, a diferentes estrategias en el control y uso de los antibióticos (Baquero, et al., 1991; Calva, et al., 1993; Cullmann, 1996; Pradier, et al., 1997; Leyva, 1999). Debido a esto, el estudio de la presencia de especies resistentes en la placa dentobacteriana (Kinder, et al., 1986; Fiehn & Westergaard, 1990; Listgarten, et al., 1993; Feres, et al., 1999b; Madinier, et al., 1999; Feres, et al., 2002;

Handal, et al., 2003; Quirynen, et al., 2003; Rodrigues, et al., 2004), puede proveer información útil para entender la efectividad potencial de los antibióticos en el tratamiento de las enfermedades periodontales, sobre todo en un país como México en donde el uso excesivo de antibióticos y la automedicación, son una práctica común por la mayoría de la población (Calva, et al., 1993; Leyva, 1999).

Antibióticos y mecanismos de resistencia bacteriana

La resistencia bacteriana a los antibióticos no es un hecho reciente, el mismo Alexander Fleming observó que ciertas cepas no eran susceptibles al “filtrado líquido” que obtenía del *Penicillium* (Fleming, 1929). Sin embargo, la incidencia de cepas resistentes a uno o varios antibióticos ha ido en aumento año con año. El potencial de las bacterias para desarrollar resistencia se ha incrementado debido al abuso de los antibióticos y a ciertas prácticas en la agricultura y acuicultura donde son administradas dosis sub-terapéuticas de antibióticos (Levy, 1992; Roberts, 2002; Livermore, 2003).

Se sabe que las bacterias, han desarrollado resistencia prácticamente contra todos los antibióticos que se encuentran en uso (Fluit, et al., 2001a; Fluit, et al., 2001b). Algunas especies bacterianas pueden ser naturalmente resistentes o bien, volverse resistentes a uno o más antibióticos por medio de mutaciones cromosomales en genes que codifican vías metabólicas ó por la presencia de DNA extracromosomal como pueden ser plásmidos, transposones y/o integrones (Stokes & Hall, 1989; Hall & Stokes, 1993; Normark & Normark, 2002).

A continuación se mencionan algunas características básicas de los antibióticos utilizados con mayor frecuencia en el tratamiento de las enfermedades periodontales, así como sus mecanismos de acción y resistencia.

i. Antibióticos β -lactámicos

De acuerdo con su estructura química, los antibióticos β -lactámicos se pueden dividir en diferentes grupos que incluyen a las penicilinas, cefalosporinas, carbapenems y monobactámicos (Yu, et al., 2006). Los antibióticos β -lactámicos inhiben la síntesis del peptidoglicano de la pared celular bacteriana, interrumpiendo el proceso de transpeptidación en el que se unen mediante enlaces cruzado las cadenas de glicanos. La acción β -lactámica se debe a la habilidad de la droga para unirse a las proteínas de unión a la penicilina (PBPs). Las PBPs son enzimas involucradas en los estadios terminales del ensamblaje de las cadenas del peptidoglicano, durante el crecimiento y división de la célula (Ghuysen, 1994). Las penicilinas intervienen en la etapa final de la síntesis del peptidoglicano, es decir cuando las cadenas largas se entrelazan por transpeptidación, actuando como análogos estructurales de la enzima acil-d-alanil-d-alanina, evitando el entrecruzamiento de las cadenas largas (Atlas, 1997). Esto da por consecuencia que la estructura del peptidoglicano se debilite y la célula eventualmente muera (Tomasz, 1979; Yocum, et al., 1980; Tomasz, 1986).

Mecanismos de resistencia. La resistencia a los antibióticos β -lactámicos se debe principalmente a dos mecanismos: 1) presencia de enzimas β -lactamasas y 2) cambios cromosomales.

Resistencia enzimática. Las β -lactamasas son enzimas bacterianas que se encuentran codificadas en plásmidos o dentro del cromosoma bacteriano. Estas enzimas protegen a los microorganismos contra los efectos letales de los antibióticos β -lactámicos, actúan hidrolizando el anillo β -lactámico causando la inactivación de estas drogas (Lamotte-Brasseur, et al., 1994), previniendo así, su unión a las PBPs (Bush, et al., 1995; Livermore, 1995).

Las β -lactamasas se encuentran en la mayoría de las especies Gram-negativas (Sykes & Matthew, 1976) y en algunas especies Gram-positivas (el Solh, et al., 1986). Se han identificado más de 190 enzimas β -lactamasas. De acuerdo con su secuencia de aminoácidos, las β -lactamasas, pueden ser clasificadas en 4 grupos molecularmente diferentes, clases A, B, C y D (Bush, et al., 1995). Las β -lactamasas A, C (AmpC) y D, poseen un residuo activo de serina, el cual es esencial para la inactivación del agente β -lactámico. Mientras que las β -lactamasas B, son un grupo de metalo-enzimas, las cuales requieren de zinc para ser activas.

Las β -lactamasas del grupo A, están principalmente codificadas en plásmidos portadores de genes de las familias TEM y SHV, las cuales son las β -lactamasas más comúnmente producidas por la familia *Enterobacteriaceae* como *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*. TEM-1 es la más común de las β -lactamasas en las bacterias entéricas Gram-negativas, aunque también se encuentra en *Haemophilus influenzae*, *Haemophilus parainfluenzae* y *Haemophilus paraphrohaemolyticus* (Scheifele, et al., 1982; Facinelli, et al., 1992). La enzima TEM-1 puede estar asociada a grandes plásmidos conjugativos o en pequeños plásmidos en especies de *Haemophilus*, los cuales se han diseminado al género *Neisseria* dentro del cual

ha reportado un alto nivel de resistencia a las penicilinas en especies como *Neisseria gonorrhoeae* (Roberts, 1989).

A mediados de los años 1980 fueron aprobadas para su uso, cefalosporinas de espectro-extendido, y poco después, bacterias resistentes a estos antibióticos empezaron a emerger. La primera β -lactamasa de espectro extendido clase A (ESBL, extended-spectrum β -lactamase), es la SHV2, la cual confiere resistencia a la cefotaxima y esta enzima fue encontrada en aislados de *K. pneumoniae*, *Serratia marcescens*, y *Klebsiella ozaenae* recolectadas en Alemania (Knothe, et al., 1983; Kliebe, et al., 1985). Las cefalosporinas de espectro-extendido no son hidrolizadas por las β -lactamasas de amplio espectro TEM-1, TEM-2 y SHV-1 (Bush, et al., 1995; Jacoby, 1997), sin embargo, éstas pueden ser inhibidas por el inhibidor β -lactámico por excelencia, el ácido clavulónico (Bush, et al., 1995).

En la flora bucal, han sido detectados plásmidos de multi-resistencia que contienen al gen para β -lactamasa TEM-1 en especies de *Neisseria* y *E. corrodens* aisladas de países Europeos (Pintado, et al., 1985; Rotger, et al., 1986a; Rotger, et al., 1986b; Roberts, 1989). También se han identificado β -lactamasas en especies Gram-negativas de *Bacteroides*, *Capnocytophaga*, *Veillonella* (Kinder, et al., 1986; Bush, et al., 1995), *Prevotella* (Valdes, et al., 1982; van Winkelhoff, et al., 1997; Handal, et al., 2003; Handal, et al., 2004) y *Fusobacterium nucleatum* (Nyfors, et al., 2003).

Cambios cromosomales. La resistencia a las penicilinas no es siempre debida a la presencia de una enzima. Existen aislados de especies de *Neisseria* y *Streptococcus*, en donde la resistencia se debe al reemplazo de fragmentos de los genes que codifican para las PBPs con fragmentos correspondientes de especies

más resistentes (Bowler, et al., 1994). Algunas de las especies más estudiadas que muestran este tipo de resistencia no-enzimática son *Streptococcus pneumoniae* y *Neisseria meningitidis* en las cuales se han descrito diferentes mosaicos de genes *pbp2x* y *pbp2b*, respectivamente. Algunos de los segmentos de estos genes de resistencia, provienen de genes relacionados de *S. mitis*, mientras que otros, se piensa que provienen de otras especies de *Streptococcus* (Dowson, et al., 1994).

La resistencia mediada por PBPs también ocurre en *Staphylococcus aureus*. Estos aislados tienen una PBP adicional de baja afinidad PBP2a (PBP2') codificada en el gen *mecA* (Archer & Niemeyer, 1994; Pinho, et al., 2001). Este gen codifica una nueva proteína la cual tiene baja afinidad por las penicilinas y está presente junto con el conjunto normal de PBPs que se encuentran en las cepas susceptibles. Se cree que la nueva proteína funciona cuando existen altas concentraciones de β -lactámicos en el ambiente y que las PBPs normales funcionan cuando hay un ambiente libre de β -lactámicos (Tomasz, 1994).

La resistencia natural es una propiedad genética estable codificada en el DNA genómico y compartida por todos los miembros del mismo género. Un ejemplo de esto es el caso de los miembros del género *Enterococcus*, los cuales, son intrínsecamente resistentes a todas las cefalosporinas clínicamente disponibles (McManus, 1997).

ii. Tetraciclinas

Las tetraciclinas, son una familia de antibióticos que inhiben la síntesis de proteínas evitando la unión del tRNA en el sitio aceptor A (aminoacil) del ribosoma (Chopra & Roberts, 2001). La doxiciclina y la minociclina son consideradas las

tetraciclinas con mayor actividad. La doxiciclina es un antibiótico de amplio espectro que tiene actividad contra un gran número de microorganismos Gram-positivos y Gram-negativos así como contra protozoarios, miembros de los géneros *Mycobacterium*, *Chlamydia* y *Rickettsia* (Perdue & Standiford, 1999). Las tetraciclinas entran a la célula bacteriana por difusión pasiva a través de poros hidrofílicos de la membrana externa y luego a la membrana citoplasmática por medio de transporte dependiente de energía (Chopra, et al., 1992). Una vez que las tetraciclinas se encuentran en el citoplasma bacteriano, éstas se unen la subunidad ribosomal 30S reduciendo la afinidad del tRNA con el complejo ribosomal y el mRNA (Perdue & Standiford, 1999).

Mecanismos de resistencia. Se han descrito diferentes determinantes de resistencia que codifican para alguno de estos tres mecanismos de resistencia: 1) proteínas efflux, 2) proteínas que protegen a los ribosomas de la acción de las tetraciclinas y 3) modificación enzimática de las tetraciclinas (Levy, et al., 1999). También han sido descritas mutaciones cromosomales que confieren resistencia a las tetraciclinas, principalmente en especies Gram-negativas (Roberts, 1996). Sin embargo, el principal mecanismo de resistencia bacteriana contra las tetraciclinas, se debe a la adquisición de determinantes genéticos de resistencia.

Proteínas efflux. El grupo de genes que codifican para este tipo de proteínas, son los más abundantes (Levy, et al., 1999) y los genes más representativos son *tetA*, *tetB*, *tetC*, *tetD* y *tetE* (Roberts, 1996). La mayoría de las proteínas efflux son proteínas transmembranales que se encuentran localizadas en la bicapa lipídica de la membrana citoplasmática (Chopra & Roberts, 2001). El gen *tetB* efflux en especies Gram-negativas, ha sido identificado en 18 géneros bacterianos incluyendo especies

de *Actinobacillus*, *Klebsiella* y *Haemophilus* (Roberts, 1996). El gen *tetB* se ha encontrado en plásmidos conjugativos, sin embargo, no es móvil en un pequeño número de aislados de *Moraxella* y *Treponema* que han sido analizados (Roberts, et al., 1990; Roberts, et al., 1996). Por otro lado, los genes *efflux tetK* y *tetL* que se pensaba que estaban presentes exclusivamente en bacterias Gram-positivas, se han encontrado ocasionalmente en especies bucales Gram-negativas como *F. nucleatum*, *Haemophilus aphrophilus* y *V. parvula*, las cuales pueden presentar alguno de estos dos genes (Roberts, 1996).

Proteínas de protección ribosomal. Las proteínas de protección ribosomal actúan uniéndose al ribosoma causando una alteración en su conformación, esto evita que la tetraciclina se una a éste y por consiguiente la síntesis de proteínas no se ve alterada (Chopra & Roberts, 2001). Los genes de resistencia que codifican para este tipo de resistencia más ampliamente distribuidos y estudiados son *tetM* y *tetO* (Roberts, 1996). El gen *tetM*, es el segundo gen *tet* más frecuentemente descrito, y ha sido encontrado en 15 diferentes géneros bacterianos y una gran variedad de especies (Roberts & Lansciardi, 1990; Roberts, 1996). El gen *tetM* parece tener un origen Gram-positivo, sin embargo, a diferencia del gen *tetB*, el gen *tetM* se encuentra tanto en bacterias Gram-positivas como Gram-negativas (Roberts, 1996). El gen *tetM* ha sido asociado con elementos conjugativos que han sido descritos tanto en especies Gram-positivas del género *Clostridium*, *Peptostreptococcus* y *Streptococcus*, como en especies Gram-negativas de *Fusobacterium* y *Veillonella* (Roberts & Lansciardi, 1990; Roberts, 1996). El gen *tetO* tiene 76% de homología con el gen *tetM* y se ha encontrado en especies bucales/respiratorias Gram-positivas de los géneros *Lactobacillus*, *Staphylococcus* y

Streptococcus (Roberts, 1996). El gen *tetQ* tiene 56% de homología con el gen *tetM*, y fue descrito por primera vez en colonias de *Bacteroides* (Roberts, 1996). También ha sido identificado en especies Gram-negativas de diferentes géneros como *Capnocytophaga*, *Porphyromonas* y *Prevotella* (Olsvik, et al., 1994; Olsvik, et al., 1995; Olsvik, et al., 1996; Leng, et al., 1997).

Proteínas de modificación enzimática. Este mecanismo de resistencia sólo se ha encontrado codificado en un gen conocido como *tetX* (Speer, et al., 1991). El producto de este gen es una proteína que modifica la estructura química de las tetraciclinas, provocando la pérdida de la función de éstas (Chopra & Roberts, 2001). Se ha encontrado, que este gen está relacionado a dos transposones, encontrados en especies intestinales del género *Bacteroides*. Sin embargo, poco se sabe del gen *tetX* (Roberts, 1996).

iii. Macrólidos y lincosamidas

Este grupo de antibióticos, inhibe la síntesis de proteínas, uniéndose a la subunidad ribosomal 50S (Weisblum, 1995), debido a que comparten sitios de unión con esta subunidad (Champney & Burdine, 1995). La eritromicina es mas activa contra organismos Gram-positivos que contra Gram-negativos y no es activa en ambientes anaeróbicos, sin embargo, los nuevos derivados como la azitromicina y la claritromicina, tienen mejor actividad en contra de Gram-negativos y han sido sugeridos para el tratamiento de muchas infecciones (Kirst, 1991). La clindamicina es un derivado de la lincosamida y al igual que ésta, inhibe la síntesis de proteínas (Reusser, 1975). La clindamicina actúa inhibiendo la unión del tRNA o la reacción de translocación seguida de la unión del aminoácidos en el ribosoma (Le, et al., 1982).

Este antibiótico, actúa en el mismo sitio de unión al ribosoma que la eritromicina y el cloranfenicol por lo que estos antibióticos se antagonizan y no deben ser administrados juntos (Wilson & Cockerill, 1987). La clindamicina es altamente efectiva en contra de microorganismos anaerobios Gram-positivos y Gram-negativos (Verhoef & Levison, 1999). A diferencia de los macrólidos, las lincosamidas como la clindamicina son usadas para el tratamiento de infecciones anaeróbicas.

Mecanismo de resistencia. Existen diferentes mecanismos de resistencia a los macrólidos como 1) inactivación enzimática del fármaco, 2) protección por medio de efflux y 3) mutaciones cromosomales.

Inactivación enzimática. El mecanismo de resistencia más común se debe a la presencia de rRNA metilasas que modifican un solo residuo de adenina en la posición 2058 del la fracción 23S del rRNA, lo cual evita que los macrólidos y las lincosamidas, se unan a la subunidad ribosomal 50S (Rasmussen, et al., 1993; Weisblum, 1995). Este único cambio da lugar a la resistencia cruzada a estos antibióticos estructuralmente diferentes (Leclercq & Courvalin, 1991).

Existen más de 30 genes *erm* que codifican para las metilasas del rRNA. Estos genes, han sido aislados de una gran variedad de especies principalmente Gram-positivas (Weisblum, 1995). Los diferentes genes *erm* pueden ser agrupados en familias basados en su DNA y la homología en su secuencia de aminoácidos. La mayor cantidad de genes *erm* están altamente relacionados a los genes *ermB* y *ermAM*. El gen *ermB* fue descrito por primera vez en especies de *Streptococcus*, pero puede ser encontrado en especies tanto Gram-positivas como Gram-negativas como *A. actinomycetemcomitans*, *C. rectus*, *Fusobacterium* sp., *Haemophilus* sp., *Peptostreptococcus* sp., *Prevotella* sp., *Staphylococcus* sp. y *Streptococcus* sp. (Roe,

et al., 1995; Weisblum, 1995; Roe, et al., 1996). El gen *ermF* fue descrito primero en *Bacteroides*, y ahora se ha encontrado en *A. actinomycetemcomitans*, *C. rectus*, *Fusobacterium* sp., *Haemophilus* sp., *Peptostreptococcus* sp., *Porphyromonas* sp., *Veillonella* sp. y *T. denticola* (Roe, et al., 1995; Roberts, et al., 1996; Roe, et al., 1996). El gen *ermC* se puede encontrar en *A. actinomycetemcomitans*, *C. rectus*, *Lactobacillus* sp., *Haemophilus* sp. y *Peptostreptococcus* sp. (Roe, et al., 1995; Weisblum, 1995; Roe, et al., 1996). El gen *ermA* ha sido descrito en especies de *Staphylococcus* y el gen *ermQ* en *A. actinomycetemcomitans* y *C. rectus* (Roe, et al., 1995; Roe, et al., 1996). Muchos otros genes *erm* están asociados ya sea a transposones o a transposones conjugativos, que se encuentran principalmente dentro del cromosoma (Roe, et al., 1995; Roe, et al., 1996).

Protección efflux. Se ha descrito un mecanismo de efflux en *S. aureus* debido a la presencia de un gen *msrA* (Eady, et al., 1990). Otros genes efflux se han encontrado en *Streptococcus pyogenes* debido a *mefA* y *S. pneumoniae* debido a *mefE* (Clancy, et al., 1996; Wondrack, et al., 1996).

Mutaciones cromosomales. Estas mutaciones, ocasionan alteraciones en el sitio receptor de la droga en la fracción 50S del rRNA (Verhoef & Levison, 1999). Se han encontrado mutaciones en las secuencias de la fracción 23S del rRNA en aislados resistentes a la eritromicina de *Mycoplasma pneumoniae* (Lucier, et al., 1995).

iv. Quinolonas

Las quinolonas tienen un espectro en contra de microorganismos Gram-positivos y Gram-negativos (Schentag & Scully, 1999). El blanco de molecular de las quinolonas es la enzima DNA girasa. La DNA girasa es la enzima topoisomerasa tipo

II, la cual es esencial para la replicación del DNA y la transcripción (Gootz & Brighty, 1996). En las bacterias Gram-positivas, las fluoroquinolonas penetran la membrana celular y entran al citoplasma para alcanzar a la DNA girasa. En las bacterias Gram-negativas se han descrito tres mecanismos por los cuales las fluoroquinolonas pueden ingresar a la célula. El primero es por difusión simple, las fluoroquinolonas se unen a la superficie celular y rápidamente se difunden entre la membrana externa y la membrana citoplasmática, el segundo mecanismo de entrada es por medio de porinas, particularmente la OmpF y el tercer mecanismo se debe a que al parecer las fluoroquinolonas quelan el magnesio y causan el desprendimiento de lipopolisacáridos causando hoyos hidrofóbicos que exponen a la membrana externa. Debido a esto, la hidrofobicidad de una fluoroquinolona es importante en su actividad antimicrobiana en contra de bacterias Gram-negativas (Schentag & Scully, 1999).

Algunas especies que tienen una alta susceptibilidad intrínseca a las quinolonas son miembros de la familia *Enterobacteriaceae*, así como de los géneros *Neisseria* y *Haemophilus*, sin embargo, se ha reportado un incremento en la resistencia en *Enterobacteriaceae* y *N. gonorrhoeae* (Wiedemann & Heisig, 1994; Kam, et al., 1996). Por otro lado, especies que muestran baja susceptibilidad intrínseca a las quinolonas incluyen *S. aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*, aunque también se ha encontrado una variedad de microorganismos anaeróbicos resistentes (Wexler, et al., 1992).

Mecanismo de resistencia. Existen principalmente dos mecanismos de resistencia a las fluoroquinolonas que son, 1) alteración de la DNA girasa y 2) reducción de la acumulación de quinolonas (Wiedemann & Heisig, 1994).

Alteración de la DNA girasa. Los genes *gyrA* y *gyrB* codifican para las dos subunidades A y B en *E. coli* y genes semejantes han sido encontrados en otras especies (Wiedemann & Heisig, 1994). Un gran número de mutaciones cromosomales que producen resistencia a las quinolonas han sido mapeadas al locus *gyrA* de especies Gram-positivas y Gram-negativas y algunas mutaciones en *gyrB* también han sido descritas (Wiedemann & Heisig, 1994). En *H. influenzae* y algunas otras especies, se ha asociado resistencia a las quinolonas por mutaciones en el gen *parC*, el cual produce una subunidad de la topoisomerasa IV (Georgiou, et al., 1996).

Reducción de la acumulación del antibiótico. Este mecanismo, se debe al cambio de un mecanismo pasivo independiente de energía, basado en cambios en la estructura o reducción en la expresión de proteínas porinas responsables del paso de las quinolonas, por el cambio en la permeabilidad o la adquisición de un mecanismo efflux, dependiente de energía que bombea al antibiótico fuera de la célula (Yoshida, et al., 1994).

v. Metronidazol

El metronidazol es un compuesto nitroimidazol, con buena actividad en contra de protozoarios y bacterias anaerobias Gram-positivas y Gram-negativas (Freeman, et al., 1997). El metronidazol entra a la célula por difusión y el grupo nitro es reducido, esto libera productos tóxicos los cuales se piensa que interfieren con la síntesis de DNA y degradan el DNA existente (Tocher & Edwards, 1992; Tocher & Edwards, 1994). El proceso ocurre en condiciones anaeróbicas de bajo potencial de

reducción oxidativa, la reducción se piensa que es debido a ferredoxinas-hidrogenasas (Muller, 1983; Edwards, 1993; Greenstein, 1993).

Mecanismo de resistencia: Se han encontrado cuatro genes que pueden ser capaces de conferir resistencia al metronidazol en especies de *Bacteroides* conocidos como *nimA*, *nimB*, *nimC* y *nimD*. Estos genes, se pueden encontrar dentro del cromosoma o en una variedad de plásmidos, algunos de estos plásmidos pueden ser transferidos por conjugación (Trinh & Reysset, 1996). Los genes *nim* codifican una 5-nitroimidazol reductasa, la cual enzimáticamente reduce el 5-nitroimidazol a un derivado 5-amino (Reysset, 1996). Se ha sugerido que el gen *nimA* y los genes relacionados, pueden codificar para una 5-nitroimidazol reductasa, la cual reduce la ferredoxina (Carrier, et al., 1997), causando disminución en la activación del metronidazol así como su entrada a la célula (Narikawa, et al., 1991).

Se ha reportado que *Helicobacter pylori*, se ha vuelto resistente al metronidazol, debido a mutaciones cromosomales en el gen *rdxA*, el cual codifica para una nitroreductasa (Samuelson, 1999). Sin embargo la presencia de los genes de resistencia en especies bucales/respiratorias, no ha sido bien estudiada (Roberts, 2002).

PLANTEAMIENTO Y JUSTIFICACIÓN DEL PROBLEMA

Una de las principales metas en la terapia periodontal, es lograr un equilibrio entre las bacterias que colonizan la superficie dental y los mecanismos de defensa de los tejidos periodontales. Para lograr dicho objetivo, uno de los métodos más empleados es la administración de antibióticos por vía sistémica o local como terapia adjunta a los tratamientos periodontales convencionales (raspado y alisado radicular y cirugías periodontales). Debido a esto, un gran número de estudios se han enfocado en los efectos clínicos de los diferentes antibióticos utilizados en la terapia periodontal antimicrobiana.

En general, se considera que la utilización de antibióticos aunada a la terapia periodontal mecánica o quirúrgica, “mejora” los parámetros clínicos presentes cuando hay enfermedad periodontal como: inflamación, pérdida de inserción, sangrado y supuración. Sin embargo, la presencia y aumento de especies resistentes, ha incrementado la preocupación acerca del uso indiscriminado o “mal uso” de los antibióticos en el tratamiento de las enfermedades periodontales. Más aún, se sabe que los patrones de resistencia pueden variar de manera importante en diferentes regiones geográficas debido, en parte, a diferentes estrategias de control y uso de los mismos.

En México enfrentamos un panorama particularmente grave, debido a que no existe control en la adquisición y consumo de antibióticos y la automedicación es una práctica común en nuestra población. Hasta ahora, no existe información publicada acerca de la presencia de especies bacterianas subgingivales resistentes a los antibióticos más comúnmente utilizados en nuestro país para el tratamiento de las

infecciones periodontales. Por lo tanto, el presente proyecto de investigación pretende proporcionar información acerca de la presencia de especies bacterianas subgingivales resistentes a diferentes antibióticos, así como contribuir en el campo del conocimiento de la terapia antimicrobiana, con el fin de proporcionar resultados que permitan establecer parámetros más específicos para mejorar el uso de los antibióticos sistémicos en el tratamiento de las enfermedades periodontales en la población Mexicana.

OBJETIVOS

El principal objetivo de este estudio fue analizar la presencia de resistencia a los antibióticos amoxicilina, cefotaxima, ciprofloxacina, clindamicina, doxiciclina y metronidazol en bacterias subgingivales de sujetos Mexicanos.

Los objetivos específicos del presente proyecto de investigación fueron los siguientes:

1. Determinar y comparar el porcentaje de crecimiento de la flora total cultivable en presencia de amoxicilina y doxiciclina, en muestras de placa dentobacteriana subgingival.
2. Determinar las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) y el porcentaje de resistencia a la amoxicilina, cefotaxima, ciprofloxacina, clindamicina, doxiciclina y metronidazol de cepas bacterianas aisladas a partir de las muestras de placa dentobacteriana subgingival.
3. Identificar las cepas bacterianas sensibles, resistentes y multi-resistentes a los antibióticos antes mencionados, aisladas a partir de las muestras de placa dentobacteriana subgingival.

D. HIPOTESIS

H1: Existe una proporción elevada de especies bacterias resistentes a diferentes antibióticos en muestras de placa dentobacteriana subgingival de sujetos Mexicanos.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

A. DISEÑO EXPERIMENTAL

El presente proyecto de investigación comprendió la realización de un estudio transversal en donde fueron evaluadas un total de 2 muestras de placa dentobacteriana subgingival de cada uno de 20 sujetos de estudio (10 periodontalmente sanos y 10 con periodontitis crónica), con el objetivo de determinar el porcentaje e identidad de especies bacterianas cultivables resistentes y multi-resistentes a los diferentes antibióticos que fueron analizados. Los experimentos preliminares realizados para la estandarización de la metodología utilizada, se encuentran descritos en el **Anexo A**.

Los sujetos de estudio fueron evaluados en una visita; en la que se realizó una evaluación de su estado de salud general y periodontal, se registraron los datos clínicos periodontales y se realizó la recolección de muestras de placa dentobacteriana.

B. POBLACIÓN DE ESTUDIO

La población de sujetos de estudio consistió de un total de 20 sujetos Mexicanos por nacimiento que no hubieran recibido ningún tipo de tratamiento periodontal en el pasado más allá de profilaxis (limpiezas dentales profesionales).

Criterios de selección

En la **Tabla 1** se proporciona una descripción de los criterios utilizados para la selección de las poblaciones de estudio. Fueron excluidos del estudio todos los sujetos que presentaron embarazo o que estuvieran lactando, que hubieran tomado

cualquier clase de antibiótico sistémico en los 3 meses previos a su evaluación para el estudio, ó que presentaron afecciones sistémica que pudieran influir sobre el curso o severidad de la enfermedad periodontal tales como diabetes, VIH/SIDA, hemofilia y enfermedades autoinmunes.

Captura de sujetos de estudio

Todos los sujetos de estudio provinieron de la población de pacientes que reciben atención en alguna de las clínicas de la División de Estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Odontología de la UNAM. Los sujetos recibieron copia de la forma de consentimiento informado (**Anexo B**), la cual firmaron estableciendo así su entendimiento sobre el estudio y el deseo voluntario de participar.

C. EVALUACIÓN CLÍNICA

Cada sujeto de estudio recibió una evaluación periodontal completa realizada por un clínico calibrado para este propósito. Todas las mediciones clínicas fueron tomadas en una sola visita y registradas de 6 sitios por diente (mesiobucal, bucal, distobucal, distolingual, lingual y mesiolingual) de todos los dientes de la boca de cada sujeto de estudio excluyendo los terceros molares (máximo 168 sitios por sujeto dependiendo del número de dientes faltantes) de acuerdo con procedimientos previamente descritos en la literatura (Haffajee, et al., 1983).

Los parámetros clínicos evaluados y el orden de las mediciones se realizaron de la siguiente manera:

1. Acumulación de placa (0 ó 1)
2. Enrojecimiento gingival (0 ó 1)
3. Profundidad de bolsa (mm)
4. Nivel de inserción (mm)
5. Sangrado al sondeo (0 ó 1)
6. Supuración al sondeo (0 ó 1)

La profundidad de bolsa y el nivel de inserción fueron registradas dos veces por el mismo clínico y el promedio de las dos mediciones fue utilizado para el análisis de datos. El resto de los parámetros clínicos fueron evaluados en una sola ocasión con mediciones dicotómicas de presencia (1) ó ausencia (0).

D. EVALUACIONES MICROBIOLÓGICAS

Las evaluaciones microbiológicas se realizaron en el Laboratorio de Genética Molecular de la División de Estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Odontología de la UNAM.

Recolección y procesamiento de muestras de placa dentobacteriana

Dos muestras de placa dentobacteriana subgingival fueron recolectadas de los sitios distobucales de cualquiera de los primeros molares en cada sujeto de estudio utilizando curetas Gracey estériles (N = 40 muestras). Cada muestra fue colocada en un tubo de ensayo individual que contenía 5 ml de medio de transporte de Ringer suplementado con 0.5 mg/ml de L-cisteína y 0.0001% de rezasurina, preparado con la técnica de PRAS (Pre-reduced Anaerobically Sterilized) (Dzink, et al., 1988). Las muestras fueron dispersadas mediante sonicación durante 10 segundos con flujo constante de nitrógeno. Se realizaron 4 diluciones seriales de las muestras dispersadas en medio de transporte de Ringer en atmósfera libre de oxígeno transfiriendo 500 µl a tubos que contenían 4.5 ml del mismo medio. 100 µl de cada

dilución fueron sembrados por duplicado en placas de agar enriquecido NHK (agar base para *Mycoplasma* (Becton Dickinson, Microbiology Systems, BBL®, Sparks, MD, USA) suplementado con 5% de sangre de carnero desfibrinada (Laboratorios Microlab S.A. de C.V., México, D.F.), 0.3 µg/ml de menadione (vitamina K, Sigma-Aldrich Química, S.A. de C.V., Toluca, México), 5 µg/ml de hemina (Sigma) y 10 µg/ml de ácido N-acetilmurámico (Sigma)) libre de antibiótico y con diferentes concentraciones de doxiciclina (Sigma) y amoxicilina (Sigma) (0.5, 1, 2, 4, 8 y 16 µg/ml). Todas las placas fueron incubadas en una cámara de anaerobiosis con ambiente de 80% N₂, 10% CO₂ y 10% H₂ a 35°C durante 7 días. El tiempo entre la recolección de muestras y el término de su procesamiento no excedió en ningún caso de 40 minutos.

Determinación del porcentaje de microorganismos resistentes en la flora total cultivable (Objetivo 1)

Después de 7 días de incubación anaeróbica se realizó el conteo de las unidades formadoras de colonias (UFCs) que crecieron tanto en las placas con antibiótico como en las placas sin antibiótico en la dilución en la que crecieron entre 30 a 300 colonias. El porcentaje de microorganismos resistentes a cada antibiótico fue determinado con base al número de microorganismos que se observaron en las placas sin antibiótico.

Determinación de las concentraciones mínimas inhibitorias y los porcentajes de resistencia y multiresistencia en especies bacterianas de la placa dentobacteriana subgingival (Objetivo 2)

A partir de los crecimientos en las placas sin antibiótico, se transfirieron 50 cepas al azar de cada muestra a placas individuales que contenían agar enriquecido NHK sin antibiótico. Cada una de las cepas fueron propagadas y transferidas hasta obtener cultivos puros. Muestras de los cultivos puros de cada cepa fueron conservadas en congelación a -85°C en caldo base para *Mycoplasma* con 5% de dimetil sulfóxido (DMSO).

De cada cepa, se recolectó el crecimiento de la superficie del agar el cual fue suspendido en un tubo con caldo enriquecido (caldo base para *Mycoplasma* (Becton Dickinson), 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de hemina y 0.3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de menadione). La densidad óptica de cada tubo fue ajustada a 1 en un espectrofotómetro con longitud de onda de 600 nm. 200 μl de cada tubo fueron transferidos a pozos de placas para microtitulación de 96 pozos. Las 50 cepas de cada muestra fueron transferidas por duplicado con la ayuda de un replicador a placas rectangulares que contenían agar enriquecido NHK sin antibiótico y con 0.5, 1, 2, 4, 8 y 16 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de cada uno de los siguientes antibióticos: amoxicilina, cefotaxima, ciprofloxacina, clindamicina, doxiciclina y metronidazol (38 placas por muestra). Cabe mencionar que cada una de las 38 placas empleadas fueron réplicas exactas de las 50 cepas aisladas de cada muestra. Todas las placas fueron incubadas a 35°C durante 7 días en condiciones anaeróbicas (80% N_2 , 10% CO_2 , 10% H_2). Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se realizó la inspección

visual de cada placa para determinar las CMI de cada cepa a cada antibiótico, así como el porcentaje de cepas multi-resistentes.

Identificación de especies bacterianas resistentes (Objetivo 3)

Las 50 cepas aisladas de cada muestra fueron identificadas mediante la utilización de la técnica de “checkerboard” para hibridaciones DNA-DNA (Socransky, et al., 1994), utilizando 40 sondas de DNA para especies bacterianas conocidas de la placa subgingival. El método empleado para la identificación de las cepas aisladas se describe a continuación:

i. Preparación de aislados

Se recolectó el crecimiento sobre la superficie del agar de cada una de las cepas en cultivo puro, el cual fue suspendido en un tubo para microcentrifugación de 1.5 ml con buffer TE pH 7.6 (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA). La densidad óptica de cada tubo fue ajustada a 1 en un espectrofotómetro con longitud de onda de 600 nm. La cantidad de células fue ajustada a 10^6 transfiriendo 100 μ l de dicha suspensión a un nuevo tubo para microcentrifugación de 1.5 ml. Se agregaron 100 μ l de 0.5 M NaOH a cada tubo y el tubo fue mezclado con vortex. Los tubos fueron hervidos durante 10 minutos y posteriormente se agregaron 800 μ l de 5 M acetato de amonio. El volumen total de cada tubo fue colocado en uno de los canales abiertos de un Minislot-30 (Immunetics, Cambridge, MA), concentrado en una membrana de nylon de carga positiva de 15 x 15 cm (Roche) y fijado a la membrana mediante entrecruzamiento bajo luz ultravioleta seguido por incubación a 120°C durante 20 min. El Minislot-30 permitió la deposición de 29 cepas y un estándar en una sola membrana. El canal con el estándar microbiológico fue colocado en el último carril de

cada membrana y consistió de una mezcla ajustada a 10^6 células de cultivos puros de cada una de las cepas bacterianas que fueron analizadas con las sondas de DNA. El estándar sirvió para verificar el correcto funcionamiento de las sondas en cada experimento.

ii. Especies bacterianas para la elaboración de sondas de DNA

La lista de las 40 cepas bacterianas de referencia que fueron utilizadas en el presente estudio para la preparación de sondas de DNA se encuentra en la **Tabla 2**. Todas las cepas fueron adquiridas como cultivos liofilizados del American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA). Las cepas fueron rehidratadas en caldo para *Mycoplasma* y cultivadas en agar enriquecido a 35°C de 3 a 7 días dentro de una cámara de anaerobiosis con ambiente de 80% N₂, 10% CO₂ y 10% H₂ (exceptuando *Neisseria mucosa*, cultivada aeróbicamente). Las cepas que se mencionan a continuación fueron sembradas en medios suplementados: *Campylobacter* sp.: agar enriquecido suplementado en la superficie con 0.5 ml de formato (60mg/ml) - fumarato (60mg/ml); *T. denticola*: caldo para *Mycoplasma* suplementado con glucosa (1mg/ml), niacinamida (400µg/ml), tetrahidrocloreuro de esparmina (150 µg/ml), isobutirato de sodio (20µg/ml), L-cisteina (1 mg/ml), pirofosfato de tiamina (5 µg/ml) y suero bovino (0.5%).

iii. Purificación de DNA bacteriano y preparación de sondas de DNA

El crecimiento bacteriano después de 3 a 7 días de cultivo fue recolectado y colocado en tubos para microcentrifugación de 1.5 ml que contenían 1 ml de buffer TE pH 7.6. Las células fueron lavadas dos veces mediante centrifugación en buffer

TE pH 7.6 a 3,500 rpm durante 10 min. Posteriormente, fueron resuspendidas mediante sonicación durante 15 seg. y lisadas a 37°C durante 1 hora ya sea con 10% SDS y proteinasa K (20 mg/ml) (Sigma) para las especies Gram negativas, ó con una mezcla enzimática que contenía 15 mg/ml de lisozima (Sigma) y 5 mg/ml de achromopeptidasa (Sigma) en buffer TE (pH 8.0) para las especies Gram positivas. El DNA fue aislado y purificado utilizando una técnica estándar previamente descrita (Smith, et al., 1989). La concentración de DNA fue determinada mediante mediciones espectrofotométricas de la absorbancia a 260 nm. La pureza de las preparaciones fue valorada mediante el cálculo de la relación entre las mediciones de las absorbancias a 260 nm y 280 nm. Las sondas de DNA genómicas fueron preparadas para las 40 especies bacterianas (**Tabla 2**) mediante el marcaje con digoxigenina (Roche) de 1µg de DNA purificado utilizando la técnica de primers aleatorios (random primer technique) previamente descrita (Feinberg & Vogelstein, 1983).

iv. Hibridaciones DNA-DNA

Las membranas fueron prehibridizadas a 42°C durante 1 hora en solución de prehibridación que contenía 50% de formamida, 5x citrato salino estándar (SSC) (1x SSC = 150 mM NaCl, 15 mM citrato de sodio, pH 7.0), 1% caseína, 5x solución Denhardt, 25mM fosfato de sodio (pH 6.5) y 0.5mg/ml de RNA de levadura (Roche). La membrana con DNA fijado de las cepas aisladas fue colocada en un Miniblotter-45 (Immunetics) con los canales de las muestras rotados 90° en relación a los canales de hibridación. Esto produjo un patrón de tablero de ajedrez (checkerboard) de 30 x 45. Las sondas de DNA fueron diluidas a una concentración de aproximadamente 20 ng/ml en solución de hibridación (45% formamida, 5x SSC, 1x

solución Denhardt, 20mM fosfato de sodio (pH 6.5), 0.2mg/ml de RNA de levadura, 10% sulfato de dextrano y 1% caseína), colocadas en canales de hibridación individuales del Miniblotter-45 e hibridizadas una noche a 42°C con el aparato sellado dentro de una bolsa de plástico para evitar evaporación de las sondas de DNA. La concentración de cada sonda fue ajustada mediante pruebas preliminares de ensayo y error para que todas las sondas detectaran un rango de células entre 10^4 y 10^7 . Las membranas fueron lavadas dos veces a alta astringencia durante 20 min. cada vez a 68°C en buffer de fosfato (0.1x SSC y 0.1% SDS) utilizando un baño con circulación.

v. Enumeración de especies bacterianas

Las membranas fueron bloqueadas mediante su incubación durante 1 hora en buffer bloqueador que contenía 1% de caseína en buffer de maleato (100mM ácido maleico, 150mM NaCl, pH 7.5). Los híbridos fueron detectados incubando las membranas en una dilución de 1:50,000 de anticuerpo contra digoxigenina conjugado a fosfatasa alcalina (Roche) utilizando la modificación previamente descrita (Engler-Blum, et al., 1993). Después de ser lavadas, las membranas fueron incubadas en un agente quimioluminiscente de detección (CDP-Star, Roche) a 37°C durante 1 hora y las señales fueron detectadas mediante la exposición de las membranas a películas autoradiográficas dentro de cassettes a temperatura ambiente durante 35 min. Las películas fueron reveladas siguiendo procedimientos estándar y las señales fueron evaluadas visualmente sobre un negatoscopio para determinar la identidad de las cepas aisladas de cada muestra.

E. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE DATOS

Se realizó un análisis estadístico descriptivo de los parámetros clínicos evaluados tales como edad, número de dientes faltantes, género, porcentaje de fumadores, profundidad de bolsa, nivel de inserción, acumulación de placa, enrojecimiento gingival, sangrado al sondeo y supuración, los cuales se expresan como media \pm error estándar de la media (EEM) y rango. Estos resultados fueron comparados entre la población de sujetos periodontalmente sanos y con periodontitis crónica mediante la prueba U de Mann-Whitney.

El porcentaje total promedio de las UFCs que mostraron crecimiento en presencia de seis concentraciones de amoxicilina y doxiciclina de todos los sujetos de estudio (N=20), fue determinado mediante el cálculo del promedio de UFCs presentes en el duplicado de placas para cada muestra de placa dentobacteriana, promediado entre las 2 muestras de cada sujeto y posteriormente entre los 20 sujetos del total de la población. Las diferencias entre los dos antibióticos en relación al porcentaje de UFCs presentes en cada concentración evaluada fueron determinadas mediante la prueba de Wilcoxon.

El porcentaje total promedio de las UFCs que mostraron crecimiento en presencia de seis concentraciones de amoxicilina y doxiciclina provenientes de sujetos periodontalmente sanos (n=10) y con periodontitis crónica (n=10), fue calculado para cada grupo de sujetos mediante el cálculo del promedio de los porcentajes para los sujetos en cada grupo, expresado como media \pm error estándar de la media (EEM) para cada antibiótico. Estos promedios fueron comparados mediante la prueba U de Mann-Whitney.

La proporción de cepas totales e identificadas sensibles, resistentes y multiresistentes a los antibióticos amoxicilina, cefotaxima, ciprofloxacina, clindamicina, doxiciclina y metronidazol fue determinada para cada antibiótico individualmente, así como para las combinaciones de los mismos y se expresan como porcentajes del total de aislados utilizados para cada análisis en particular.

La proporción de cada una de las 39 especies bacterianas evaluadas mediante la técnica de “checkerboard” para hibridaciones DNA-DNA, fue calculada en base a un total 948 aislados y se expresa como porcentaje.

III. RESULTADOS

A. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LA POBLACIÓN DE ESTUDIO

Las características clínicas de las poblaciones de estudio se describen en la **Tabla 3**. En promedio, los sujetos con periodontitis presentaron una profundidad de bolsa al sondeo de $4.6 \text{ mm} \pm 0.2$ (media \pm EEM) y un nivel de inserción de $5.2 \text{ mm} \pm 0.2$, mientras que los sujetos periodontalmente sanos mostraron una profundidad de bolsa al sondeo de $2.0 \text{ mm} \pm 0.1$ y un nivel de inserción de $2.0 \text{ mm} \pm 0.1$ ambos parámetros con diferencias significativas ($p < 0.001$) utilizando la prueba U de Mann Whitney. Los sujetos sanos presentaron un mayor porcentaje de sitios con acumulación de placa (38.8%) en comparación con los sujetos con periodontitis (24.8%). El porcentaje promedio de sitios que presentaron otros parámetros clínicos periodontales como sangrado al sondeo y supuración, fue mayor para los sujetos con periodontitis con diferencias estadísticamente significativas entre ambas poblaciones ($p < 0.001$) utilizando la prueba U de Mann Whitney.

B. OBJETIVO 1: DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE MICROORGANISMOS RESISTENTES EN LA FLORA TOTAL CULTIVABLE

El porcentaje promedio (\pm EEM) de UFCs que mostraron crecimiento en presencia de 6 diferentes concentraciones de amoxicilina y doxiciclina en el total de la población ($N = 20$) se presenta en la **Figura 2**. Un menor porcentaje de la flora total cultivable creció en presencia de amoxicilina en cualquiera de las 6 concentraciones evaluadas. Dichas diferencias fueron estadísticamente significativas para las concentraciones de 0.5, 2 y 4 $\mu\text{g/ml}$ en las que los porcentajes de UFCs que

mostraron crecimiento fueron respectivamente de 13.4%, 3.5% y 2.2% en presencia de amoxicilina y de 20.4%, 7.9% y 5.5% en presencia de doxiciclina. En la concentración correspondiente al punto de corte sugerido por el CLSI (antes llamado NCCLS) (NCCLS, 2001) para amoxicilina y doxiciclina (8 µg/ml), el porcentaje promedio de UFCs que mostraron crecimiento fue de 1.2% y 3.8%, respectivamente para cada antibiótico. Las diferencias en los porcentajes de UFCs que mostraron crecimiento en presencia de amoxicilina y doxiciclina en concentraciones de 8 a 16 µg/ml, no fueron estadísticamente significativas.

En la **Figura 3** se presenta el análisis de promedio de UFCs que mostraron crecimiento en presencia de diferentes concentraciones de amoxicilina y doxiciclina en sujetos periodontalmente sanos y con periodontitis crónica. Las diferencias entre los dos grupos de estudio no fueron estadísticamente significativas para ninguno de los 2 antibióticos. Sin embargo, en ambos grupos de estudio el porcentaje de UFCs que mostró crecimiento en presencia de cada concentración de doxiciclina fue mayor que en presencia de concentraciones similares de amoxicilina.

C. OBJETIVO 2: DETERMINACIÓN DE CONCENTRACIONES MÍNIMAS INHIBITORIAS Y LOS PORCENTAJES DE RESISTENCIA Y MULTIRESISTENCIA EN ESPECIES BACTERIANAS DE LA PLACA DENTOBACTERIANA SUBGINGIVAL

De cada una de las muestras de placa subgingival de cada sujeto de estudio (N=20 sujetos, n=2 muestras por sujeto) fueron seleccionadas al azar 50 cepas bacterianas, obteniéndose un total de 2000 cepas aisladas. Dichas cepas fueron cultivadas y purificadas para posteriormente determinar las CMI de cada aislado así

como la presencia de resistencia a uno o más de los seis antibióticos analizados. La resistencia fue determinada tomando en consideración los siguientes puntos de corte sugeridos por el CLSI (NCCLS, 2001), con excepción de ciprofloxacina: amoxicilina (8 µg/ml), cefotaxima (32 µg/ml) clindamicina (4 µg/ml), doxiciclina (8 µg/ml), metronidazol (16 µg/ml) y ciprofloxacina (4 µg/ml) (Snydman, et al., 2000). Durante la purificación, procesamiento y análisis de los aislados se perdieron 10 cepas y se excluyeron del estudio 311 cepas debido a que no fue posible obtener cultivos puros de las mismas al momento de realizar el experimento (**Tabla 4**).

Un total de 1,679 cepas bacterianas en cultivo puro fueron analizadas para determinar la presencia de resistencia y multi-resistencia a los diferentes antibióticos que fueron probados. La **Figura 4** muestra los porcentajes de sensibilidad y resistencia de los 1,679 aislados clínicos analizados, así como un desglose de los porcentajes de resistencia a uno o diferentes combinaciones de dos y tres antibióticos en las cepas analizadas. El 43.3% de las 1,679 cepas analizadas fue sensible a todos los antibióticos, mientras que el 55.7% de las cepas mostró resistencia (64.1% a un solo antibiótico y el 33% y 2.9% a dos y tres antibióticos simultáneamente). Ninguna de las cepas evaluadas mostró resistencia a 4 o más antibióticos.

D. OBJETIVO 3: IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES BACTERIANAS RESISTENTES

Como se mencionó en el apartado anterior, se aislaron 2000 cepas provenientes de muestras de placa dentobacteriana subgingival, de las cuales fueron procesadas para su identificación 1,679 cepas (**Tabla 4**). Un total de 962 aislados

fueron identificados (48.2%) mediante la técnica de “checkerboard” para hibridaciones DNA-DNA (Socransky, et al., 1994) utilizando 40 sondas de DNA para especies bacterianas conocidas de la placa subgingival.

De las especies identificadas (962), el 50.7% fue sensible a todos los antibióticos analizados y el 49.3% resistente. De las cepas resistentes, el 69.6% fue resistente a un solo antibiótico, el 27.4% a dos y el 3% a tres antibióticos simultáneamente (**Figura 5**).

La **Figura 6** muestra los porcentajes de resistencia a cada uno de los antibióticos analizados en el total de las cepas analizadas (n= 1,679) y en el total de las cepas identificadas (n= 948). En promedio, los mayores porcentajes de resistencia observados en ambos análisis se observaron en presencia de metronidazol (41.3% y 34.3%, respectivamente), clindamicina (12.4% y 10.3%, respectivamente) y doxiciclina (9.2% y 8.2%, respectivamente), mientras que en presencia de amoxicilina se observó un porcentaje menor de resistencia en los aislados identificados (4.5%) comparándolo con el análisis hecho en el total de las cepas analizadas (7.6%). Por el contrario, el porcentaje de resistencia a la ciprofloxacina fue mayor en las cepas identificadas (8%) que en el total de las cepas analizadas (6.7%). El menor porcentaje de resistencia se observó en presencia de cefotaxima tanto en el total de los aislados analizados como en las cepas identificadas (0.2% y 0.3%, respectivamente).

La proporción de las especies identificadas (n= 948) se muestra en la **Figura 7**. Las especies identificadas con mayor frecuencia fueron *V. parvula*, *P. gingivalis*, *P. intermedia* y *Propionibacterium acnes*. Por el contrario, las especies identificadas con

menor frecuencia fueron *N. mucosa*, *Corynebacterium matruchotii*, *Leptotrichia buccalis* y *Porphyromonas endodontalis*.

Las **Figuras 8 y 9** muestran el análisis de las especies bacterianas que mostraron diferentes patrones de susceptibilidad a los antibióticos analizados. Las especies que mostraron sensibilidad a todos los antibióticos fueron *T. forsythia*, *Selenomonas artemidis* y *C. matruchotii*. Las especies bacterianas que mostraron cepas resistentes a un solo antibiótico fueron *Actinomyces naeslundii* stp. 1, *C. gracilis*, *Eubacterium sulci*, *P. micros*, *P. nigrescens* y *S. noxia*. De las 39 especies bacterianas identificadas, 19 especies mostraron cepas resistentes a un solo antibiótico y a dos antibióticos simultáneamente, como *P. intermedia*, *F. nucleatum*, *P. gingivalis*, *C. rectus*, *Prevotella melaninogenica* y *A. actinomycetemcomitans*. Especies como *Fusobacterium periodonticum*, *A. odontolyticus*, *S. intermedius*, *S. oralis*, *S. sanguinis*, *Actinomyces georgiae*, *S. mitis* y *E. corrodens* mostraron cepas resistentes a dos y tres antibióticos simultáneamente.

En la **Figura 10** se resumen los resultados obtenidos al analizar cada una de las especies que mostraron resistencia y multiresistencia a los seis antibióticos que fueron analizados y en la **Tabla 5** se encuentra la determinación de las CMI's así como los rangos y porcentajes de resistencia obtenidos en aislados clínicos pertenecientes a algunas especies bacterianas consideradas patógenas o putativas.

IV. DISCUSIÓN

El presente estudio es, hasta donde sabemos, el primero que reporta las CMI's así como la presencia de resistencia a diferentes antibióticos en especies que forman parte de la microflora bucal de sujetos Mexicanos. Con fines prácticos, la discusión está dividida de acuerdo con cada uno de los objetivos de este estudio y los hallazgos encontrados en cada uno de los antibióticos evaluados.

Objetivo 1. En nuestro estudio, considerando el punto de corte de la NCCLS para amoxicilina a una concentración de 8 µg/ml (NCCLS, 2001), solamente el 1.2% de la flora total cultivable creció en presencia de este antibiótico. Este resultado es congruente con otros hallazgos que han reportado que la amoxicilina puede inhibir *in vitro* el 99% del crecimiento de muestras de placa dentobacteriana subgingival (Walker, et al., 1983). Otros estudios, también reportan porcentajes bajos de crecimiento de muestras totales de placa dentobacteriana en presencia de amoxicilina (Pacini, et al., 1997; van Winkelhoff, et al., 2000; Feres, et al., 2002). En conjunto, estos estudios sugieren que la amoxicilina es un antibiótico capaz de eliminar un porcentaje importante de la placa dentobacteriana subgingival de pacientes con periodontitis crónica. Esto confirma su amplio uso en la terapia periodontal anti-infecciosa (Haffajee, et al., 1995a; Berglundh, et al., 1998; Winkel, et al., 1999; Winkel, et al., 2001; Rooney, et al., 2002). Sin embargo, no podemos dejar de lado los estudios que reportan el aumento en la presencia de especies bacterianas bucales resistentes a las penicilinas (Valdes, et al., 1982; Kinder, et al., 1986; van Winkelhoff, et al., 1997; Nyfors, et al., 2003; Handal, et al., 2004).

Por otro lado, nuestro estudio muestra un porcentaje de crecimiento de la flora total cultivable de 3.8% en presencia de 8 µg/ml de doxiciclina. Resultados similares han sido reportados en otros estudios realizados en países con diferentes patrones de consumo de antibióticos. Por ejemplo, estudios hechos en poblaciones de Estados Unidos, muestran porcentajes de crecimiento que van del 1.6 al 6% (Feres, et al., 1999b; Walker, et al., 2000; Rodrigues, et al., 2004). De igual manera, la proporción de crecimiento en presencia de doxiciclina o tetraciclina fue del 4 y 7% en muestras de placa subgingival, proveniente de sujetos de Dinamarca y Brasil, respectivamente (Fiehn & Westergaard, 1990; Rodrigues, et al., 2004). Más aún, estos estudios, reportan que después del incremento en la proporción de aislados resistentes a las tetraciclinas cuando los sujetos de estudio fueron expuestos a alguna de ellas, los niveles de resistencia regresaron a los niveles base después de 3 a 12 meses. En contraste, otros estudios han reportado un incremento significativo en la proporción de resistencia a las tetraciclinas en bacterias bucales después de haber sido expuestas a esta droga (Olsvik, et al., 1995; Ready, et al., 2002). Un estudio comparó el porcentaje de crecimiento de muestras de placa subgingival proveniente de pacientes de España y de Holanda en presencia de 8 µg/ml de tetraciclina, sus resultados mostraron que el porcentaje de crecimiento era mayor en las muestras provenientes de los sujetos de España (10%), que en las muestras provenientes de los sujetos de Holanda (1%), los autores concluyen que estos resultados, reflejan las diferencias en el consumo de antibióticos entre ambas poblaciones (van Winkelhoff, et al., 2000).

En conjunto, nuestros resultados muestran que no hubo diferencias significativas entre las dos poblaciones estudiadas, en cuanto a la proporción de

especies que crecieron en presencia de amoxicilina y doxiciclina. Resultados similares han sido reportados previamente (Fiehn & Westergaard, 1990). Esto indica, que a pesar de las diferencias microbiológicas que existen entre sujetos con salud y enfermedad periodontal (Moore, 1994; Tanner, et al., 1998; Haffajee, et al., 1999; Ximenez-Fyvie, et al., 2000), la proporción de bacterias subgingivales que crecieron en presencia de diferentes concentraciones de estos dos antibióticos, parece no estar relacionada al estado de salud periodontal.

Objetivos 2 y 3. Fueron analizadas un total de 1,679 cepas bacterianas, aisladas a partir de muestras totales de placa dentobacteriana. Al igual que lo observado entre las muestras de placa dentobacteriana total cultivable proveniente de pacientes sanos y con periodontitis crónica, no se encontraron diferencias significativas cuando se realizó el análisis por separado de las cepas entre ambas poblaciones. El menor porcentaje de aislados clínicos resistentes fue encontrado en presencia de cefotaxima (0.3%), y el mayor porcentaje de resistencia fue encontrado en presencia de metronidazol (34.3%).

Algunos estudios reportan que la cefotaxima es un agente capaz de inhibir *in vitro* a microorganismos periodonto-patógenos como *P. gingivalis*, *P. intermedia* y *A. actinomycetemcomitans* (Kaplan, et al., 1989; Fanali, et al., 1990; Pajukanta, et al., 1993; Andres, et al., 1998). Sin embargo, se ha reportado que existen especies del género *Prevotella*, capaces de inhibir a la cefotaxima debido a su alta producción de β -lactamasas (Kuriyama, et al., 2001). En nuestro estudio, las únicas cepas que mostraron resistencia a la cefotaxima pertenecían a especies bacterianas de *F. nucleatum* y *F. periodonticum*. Sin embargo, aunque algunos estudios sugieren que

el uso de las cefalosporinas podría ser un tratamiento potencialmente eficaz en el tratamiento de las infecciones periodontales (Pajukanta, et al., 1993; Andres, et al., 1998; Chan & Chan, 2003; Saini, et al., 2003), antibióticos como la cefotaxima, no debieran ser recomendados el tratamiento de las infecciones periodontales, principalmente por que no son antibióticos de primera elección para el tratamiento de infecciones causadas por microorganismos anaerobios, además de considerar el potencial de las bacterias para desarrollar cepas más resistentes a este tipo de antibióticos (Livermore, 2003).

Por otra parte, se encontró que el porcentaje de resistencia a la amoxicilina en los aislados clínicos analizados, fue de 4.5%. Las cepas que mostraron resistencia, fueron especies de *F. nucleatum*, *F. periodonticum*, *P. micros*, *P. intermedia*, *P. melaninogenica*, *P. nigrescens*, *P. acnes*, *V. parvula*, *S. oralis* y *S. sanguinis*. De manera similar, diversos estudios han reportado especies de *Prevotella* resistentes a la amoxicilina, provenientes de sujetos con diversos tipos de enfermedad periodontal (Kinder, et al., 1986; van Winkelhoff, et al., 1997; Feres, et al., 2002; Chan & Chan, 2003; Handal, et al., 2003; Handal, et al., 2004; Lakhssassi, et al., 2005; van Winkelhoff, et al., 2005). Más aún, algunos de estos estudios reportan que entre el 68% y 70% de sujetos con periodontitis refractaria albergan bacterias periodontales productoras de β -lactamasas (Handal, et al., 2003; Handal, et al., 2004). Por otro lado, hay estudios que reportan especies bacterianas como *E. corrodens*, *P. intermedia* y *P. nigrescens* susceptibles a la amoxicilina (Luong, et al., 2001). En nuestro estudio, cuando fueron analizadas 40 cepas de referencia, los resultados mostraron, que solamente *Fusobacterium nucleatum* ss *vincentii* y *F. periodonticum*

fueron resistentes a este antibiótico, confirmando hallazgos previos en donde cepas de *F. nucleatum*, fueron resistentes a amoxicilina y a amoxicilina con ácido clavulónico presentando además una importante actividad β -lactámica (Valdes, et al., 1982; Kinder, et al., 1986; van Winkelhoff, et al., 1997; Chan & Chan, 2003; Nyfors, et al., 2003; Handal, et al., 2004). En las muestras analizadas, el porcentaje de resistencia a la amoxicilina de los aislados clínicos identificados fue relativamente bajo (4.5%), lo que nos hace suponer, que este antibiótico es potencialmente eficaz en el manejo de las infecciones periodontales, sin embargo, la identidad de las especies resistentes, nos hace reflexionar acerca del uso que la amoxicilina debe tener en el tratamiento de las infecciones periodontales.

Pocos estudios han reportado el uso y eficacia de la ciprofloxacina como coadyuvante en el tratamiento de las enfermedades periodontales (Muller, et al., 1998). Se sabe que la ciprofloxacina puede inhibir el crecimiento *in vitro* de importantes patógenos periodontales como *T. forsythia*, *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans* y *P. micros* (Madinier, et al., 1999; Muller, et al., 2002; Talan, et al., 2003; van Winkelhoff, et al., 2005). Sin embargo, también hay estudios que reportan la presencia de cepas resistentes de *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *T. forsythia* y *F. nucleatum* (Lakhssassi, et al., 2005). En nuestro estudio, el porcentaje de resistencia a la ciprofloxacina en los aislados clínicos analizados fue de 8.0%. Cuando fueron analizadas 40 cepas de referencia, solamente mostraron resistencia a este antibiótico especies consideradas benéficas en la ecología microbiana periodontal, como *A. odontolyticus* y *Actinomyces israelii*. Por el contrario, cuando fueron analizados los aislados clínicos, cepas pertenecientes a especies de *P.*

melaninogenica, *P. intermedia*, *F. periodonticum*, *C. rectus*, *S. oralis*, *Streptococcus anginosus*, *S. intermedius* y *V. parvula* mostraron resistencia a la ciprofloxacina, confirmando hallazgos previos (Lakhssassi, et al., 2005). Aunado a esto, existe una preocupación creciente acerca del uso de las quinolonas, debido al incremento tan importante de especies bacterianas resistentes a este grupo de antibióticos, especialmente a la ciprofloxacina, la cual es la fluoroquinolona más ampliamente utilizada (Davies, et al., 2003; Karlowsky, et al., 2003; Zhanel, et al., 2003), por lo que su uso en la terapia periodontal no es recomendado.

En nuestro estudio, el porcentaje de aislados identificados resistentes a la doxiciclina fue de 8.2%. Cuando fueron analizadas las cepas de referencia, la única especie resistente a la doxiciclina fue *S. constellatus*. Sin embargo, los resultados obtenidos al analizar los aislados clínicos en presencia de doxiciclina, mostraron una mayor diversidad de especies bacterianas resistentes a la doxiciclina, como *A. actinomycetemcomitans*, *E. corrodens*, *F. periodonticum*, *P. gingivalis* y todas las especies de *Streptococcus* y *Prevotella* analizadas. Confirmando estos hallazgos, ha sido reportado que especies de *Streptococcus* aisladas de muestras subgingivales de pacientes con diferentes tipos de enfermedad periodontal son resistentes a doxiciclina o tetraciclina (Olsvik, et al., 1995; Feres, et al., 1999b; Rodrigues, et al., 2004). De igual manera especies de *Prevotella* y *Veillonella* también han sido reportadas como resistentes (Baker, et al., 1985; Kinder, et al., 1986; Listgarten, et al., 1993; Lacroix & Walker, 1995; Olsvik, et al., 1995; Preus, et al., 1995; Rodrigues, et al., 2004; Lakhssassi, et al., 2005). Considerando que la doxiciclina, junto con la minociclina y tetraciclina, son el grupo de antibióticos más ampliamente utilizados en el tratamiento de las enfermedades periodontales (Goodson, 1994; van Winkelhoff, et

al., 1996), nuestros resultados, revelan un porcentaje de resistencia a la doxiciclina en los aislados que fueron identificados relativamente bajo (8.2%). Sin embargo, considerando la identidad de los aislados clínicos que mostraron resistencia a la doxiciclina, (cepas de *A. actinomycetemcomitans*, *E. corrodens*, *P. gingivalis* y *Prevotella* sp.), es importante considerar el uso de este antibiótico en el tratamiento en pacientes Mexicanos, con infecciones periodontales.

Se ha reportado que un número importante de microorganismos anaeróbicos son sensibles a la clindamicina (Martin, et al., 1972; Sutter, 1976; Walker, et al., 1983; van Winkelhoff, et al., 2000). En nuestro estudio, el 10.3% de los aislados clínicos identificados, fue resistente a la clindamicina. Especies como *A. actinomycetemcomitans* y *E. corrodens* se han descrito como especies históricamente resistentes a ella (Slots, et al., 1980; Baker, et al., 1985; Miyake, et al., 1995; Chan & Chan, 2003; van Winkelhoff, et al., 2005). Confirmando estos hallazgos, en este estudio, las cepas de referencia de *A. actinomycetemcomitans* serotipo a y b y *E. corrodens* que fueron analizadas, mostraron resistencia. Más aún, nuestros resultados muestran que un gran número de los aislados clínicos de *A. actinomycetemcomitans* y de *E. corrodens* fue resistentes a este antibiótico. Algunos estudios, reportan que especies de *P. melaninogenica* y *P. intermedia* aisladas de pacientes con periodontitis crónica y refractaria, fueron sensibles a la clindamicina (Kinder, et al., 1986; Handal, et al., 2003). Sin embargo, en nuestro estudio, las especies bacterianas que mostraron resistencia a este antibiótico fueron cepas de *P. intermedia*, *P. melaninogenica* y *P. nigrescens* confirmando otros reportes en donde cepas de *P. intermedia*, *P. nigrescens* y *F. nucleatum* fueron resistentes a la clindamicina (Pajukanta, et al., 1993; Chan & Chan, 2003; Bahar, et al., 2005;

Lakhssassi, et al., 2005). En conjunto, estos resultados sugieren que, aunque la clindamicina ha sido utilizada con cierto éxito en el tratamiento de las enfermedades periodontales, particularmente en el tratamiento de pacientes con periodontitis refractaria (Gordon, et al., 1985; Gordon, et al., 1990; Walker & Gordon, 1990; Magnusson, et al., 1994), y considerando los efectos adversos de este antibiótico (Walker, et al., 2004), su uso en la terapia periodontal antimicrobiana debe ser cuidadoso.

Un hallazgo interesante, es el número de aislados resistentes al metronidazol que fue observado en los aislados clínicos analizados (34.3%). El metronidazol es un antibiótico ampliamente utilizado en el tratamiento de las infecciones periodontales (Loesche, et al., 1981; Gusberti, et al., 1988; Jenkins, et al., 1989; Loesche, et al., 1993; Sigusch, et al., 2001; Carvalho, et al., 2004), a pesar de que algunos estudios reportan porcentajes de crecimiento en muestras totales de placa dentobacteriana en presencia de metronidazol que van del 25 al 50% (Walker, et al., 1983; van Winkelhoff, et al., 2000; Feres, et al., 2002). Esto se debe principalmente a la noción de que, con excepción de *A. actinomycetemcomitans*, la mayoría de microorganismos que se han reportado como resistentes al metronidazol, son considerados benéficos dentro de la ecología bacteriana subgingival (principalmente especies de *Streptococcus* y *Actinomyces*) (Baker, et al., 1985; Feres, et al., 2002; Eick, et al., 2004). El hecho de que *A. actinomycetemcomitans*, sea un microorganismo frecuentemente encontrado resistente al metronidazol (Slots, et al., 1980; Miyake, et al., 1995; Madinier, et al., 1999; Eick, et al., 2004; van Winkelhoff, et al., 2005), hace que este antibiótico sea descartado cuando se quiere tratar periodontitis agresivas, las cuales según ciertos reportes se encuentran dominadas

por este microorganismo (Page, et al., 1985; Williams, et al., 1985; Slots, et al., 1986; Mandell, et al., 1987; Haraszthy, et al., 2000). Por otra parte, nuestros resultados mostraron, que al analizar las cepas de referencia, efectivamente, todas las especies de *Actinomyces* y *Streptococcus* fueron resistentes al metronidazol. Sin embargo, otras especies analizadas encontradas resistentes fueron, *A. actinomycetemcomitans* serotipo b, *P. micros*, *P. endodontalis*, *S. noxia* y *T. forsythia*. Cuando fueron identificados los aislados clínicos resistentes al metronidazol, la identidad de las cepas mostró una mayor diversidad de especies, 31 de las 39 especies bacterianas evaluadas mostraron cepas con diversos porcentajes de resistencia al metronidazol, entre ellas se encuentran 7 de las 8 especies de *Actinomyces*, las tres especies de *Prevotella* evaluadas, además de *A. actinomycetemcomitans*, *E. corrodens*, *F. periodonticum*, *P. gingivalis* y todas las especies de *Streptococcus* evaluadas. Confirmando estos hallazgos, hay estudios reportan la presencia de especies resistentes al metronidazol como *P. intermedia*, *F. nucleatum* y *E. corrodens* (Andres, et al., 1998; Chan & Chan, 2003; van Winkelhoff, et al., 2005). Aunque por otro lado, existen estudios que reportan el 100% de susceptibilidad al metronidazol en especies de *Prevotella*, *Fusobacterium* y *Porphyromonas* (Matto, et al., 1999; Aldridge, et al., 2001; Litterio, et al., 2004). Cabe mencionar que se ha reportado que la presencia de especies resistentes al metronidazol *in vitro*, puede ser detectada solamente después de un período prolongado de incubación (Dublanquet, et al., 1986; Gal & Brazier, 2004).

El hecho que exista una mayor cantidad de aislados clínicos resistentes a los diferentes antibióticos analizados en este estudio, podría deberse por un lado, al historial de uso de diferentes antibióticos de cada sujeto de estudio en particular, y

por otro lado, al aumento intrínseco de la resistencia que existe en especies que forman parte de una biopelícula (Larsen & Fiehn, 1996; Costerton, et al., 1999; Larsen, 2002; Socransky & Haffajee, 2002; Eick, et al., 2004).

Un punto interesante es la presencia de especies bacterianas resistentes al mercurio (Hg). Se ha sugerido, que el mercurio liberado de las amalgamas dentales podría actuar como agente selectivo de resistencia para bacterias bucales e intestinales, resistentes tanto a los antibióticos como al Hg (Summers, et al., 1993). Los genes de resistencia al mercurio se encuentran en plásmidos y/o asociados a transposones e integrones. Estos elementos pueden incluir tanto genes que codifican resistencia a antibióticos así como genes que codifican resistencia al mercurio en especies entéricas Gram-negativas (Khesin & Karasyova, 1984; Foster, 1987; Silver & Walderhaug, 1992). Unidades móviles similares con resistencia al Hg han sido encontradas en *S. aureus* (Foster, 1987) y especies de *Enterococcus* (Zscheck & Murray, 1990). Algunas especies bucales/respiratorias, especialmente del género *Streptococcus*, han mostrado ser fenotípicamente resistentes, aunque los mecanismos de resistencia no han sido identificados (Lyttle & Bowden, 1993; Summers, et al., 1993). Summers, et al. sugieren que el mercurio de las amalgamas incrementa la prevalencia de bacterias de la flora normal con multiresistencia debido al nexo que existe entre los genes de resistencia al Hg y a los antibióticos (Summers, et al., 1993). Se ha hipotetizado y ocasionalmente demostrado, que la flora normal resistente puede actuar como reservorio de genes de resistencia a los antibióticos, los cuales en determinadas ocasiones, pueden ser transferidos a especies patógenas creando especies patógenas resistentes (Cohen, 1992; Roberts, 1998; Roberts, 2002).

V. CONCLUSIONES

En el presente estudio, se analizaron muestras de placa dentobacteriana subgingival de sujetos periodontalmente sanos y con periodontitis crónica con el fin de determinar el porcentaje de UFC que crecieron en presencia de diferentes concentraciones de amoxicilina y doxiciclina (Objetivo 1). También, se determinó la resistencia y las CMI's a seis diferentes antibióticos: amoxicilina, cefotaxima, ciprofloxacina, clindamicina, doxiciclina y metronidazol en especies bacterianas aisladas a partir de las mismas muestras de placa dentobacteriana (Objetivo 2) así como la identificación de dichos aislados utilizando la técnica de "checkerboard" para hibridaciones DNA-DNA (Objetivo 3).

El propósito de analizar muestras de sujetos con periodontitis crónica y con salud periodontal, se hizo con la finalidad buscar si existían diferencias, en proporción de resistencia hacia distintas especies bacterianas, entre ambas poblaciones. Nuestros resultados mostraron que la proporción de especies bacterianas que creció en presencia de amoxicilina y doxiciclina no estuvo relacionada con el estado de salud periodontal de los pacientes. De las muestras de placa dentobacteriana subgingival cultivable, sólo el 1% creció en presencia de amoxicilina (8 µg/ml) y aproximadamente el 4 % en presencia de doxiciclina (8 µg/ml) en el total de la población.

Tomando en cuenta los resultados en el porcentaje de aislados clínicos resistentes a los seis diferentes antibióticos que se analizaron, podemos concluir que más del 50% de las 1,709 cepas analizadas mostraron resistencia (35.7% a un solo antibiótico y 20% a dos o más antibióticos). Del total de cepas consideradas como

multi-resistentes por presentar resistencia a dos ó más antibióticos, el 92% fue resistente a dos antibióticos y el 8% a 3 antibióticos. Ninguna de las cepas evaluadas mostró resistencia a 4 o más antibióticos. El número de aislados resistentes fue en orden creciente para, cefotaxima, amoxicilina, ciprofloxacina, doxiciclina, clindamicina y metronidazol.

De las especies identificadas (962), el 50.7% fue sensible a todos los antibióticos analizados y el 49.3% fue resistente. Treinta y tres de las 39 especies identificadas presentaron resistencia y/o multiresistencia. Entre esas especies se encontraban cepas de *A. actinomycetemcomitans*, *E. corrodens*, *P. micros*, *S. noxia*, *P. gingivalis*, *F. nucleatum* y diferentes especies de *Streptococcus*, *Actinomyces* y *Prevotella* entre otras.

Finalmente, la presencia de resistencia antimicrobiana de bacterias bucales provenientes de pacientes Mexicanos, no ha recibido la atención adecuada. Esto es particularmente grave, si consideramos por un lado, que nuestra población está muy expuesta al uso indiscriminado de antibióticos, y por otro, que se desconocen los efectos clínicos y microbiológicos de diferentes antibióticos en pacientes Mexicanos que padecen periodontitis crónica. El hecho de incluir un número tan limitado de sujetos de estudio, nos hace cuestionarnos, si este grupo de individuos en particular, refleja las condiciones microbiológicas y de resistencia de una población tan extensa como la Mexicana. Evidentemente la respuesta es no, sin embargo, los resultados de este estudio sí reflejan la necesidad de realizar más estudios para ampliar la información obtenida y que por consecuencia seamos capaces de establecer parámetros más específicos para la selección de antibióticos sistémicos en el tratamiento de las enfermedades periodontales en la población Mexicana.

VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Addy, M. & Martin, M. (2003) Systemic antimicrobials in the treatment of chronic periodontal diseases: a dilemma. *Oral Dis* **9 Suppl 1**, 38-44.
2. Aldridge, K. E., Ashcraft, D., Cambre, K., Pierson, C. L., Jenkins, S. G. & Rosenblatt, J. E. (2001) Multicenter survey of the changing in vitro antimicrobial susceptibilities of clinical isolates of *Bacteroides fragilis* group, *Prevotella*, *Fusobacterium*, *Porphyromonas*, and *Peptostreptococcus* species. *Antimicrob Agents Chemother* **45**, 1238-1243.
3. Ali, R. W., Johannessen, A. C., Dahlen, G., Socransky, S. S. & Skaug, N. (1997) Comparison of the subgingival microbiota of periodontally healthy and diseased adults in northern Cameroon. *J Clin Periodontol* **24**, 830-835.
4. Andres, M. T., Chung, W. O., Roberts, M. C. & Fierro, J. F. (1998) Antimicrobial susceptibilities of *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, and *Prevotella nigrescens* spp. isolated in Spain. *Antimicrob Agents Chemother* **42**, 3022-3023.
5. Archer, G. L. & Niemeyer, D. M. (1994) Origin and evolution of DNA associated with resistance to methicillin in staphylococci. *Trends Microbiol* **2**, 343-347.
6. Armitage, G. (1999) Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol* **4**, 1-6.
7. Ashimoto, A., Chen, C., Bakker, I. & Slots, J. (1996) Polymerase chain reaction detection of 8 putative periodontal pathogens in subgingival plaque of gingivitis and advanced periodontitis lesions. *Oral Microbiol Immunol* **11**, 266-273.
8. Atlas, R. M. (1997). Organization and structure of microorganisms In *Principles of Microbiology*. Second edition edition, pp. 84-143. Boston, MA: McGraw-Hill.
9. Bahar, H., Torun, M. M., Demirci, M. & Kocazeybek, B. (2005) Antimicrobial resistance and beta-lactamase production of clinical isolates of *Prevotella* and *Porphyromonas* species. *Chemotherapy* **51**, 9-14.
10. Baker, P. J., Evans, R. T., Slots, J. & Genco, R. J. (1985) Antibiotic susceptibility of anaerobic bacteria from the human oral cavity. *J Dent Res* **64**, 1233-1244.
11. Baquero, F., Martinez-Beltran, J. & Loza, E. (1991) A review of antibiotic resistance patterns of *Streptococcus pneumoniae* in Europe. *J Antimicrob Chemother* **28 Suppl C**, 31-38.
12. Belding, P. H. & Belding, L. J. (1936) Bacteria - dental orphans. *Dent Cosmos* **78**, 506-513.

13. Belfiglio, S. R. (1999). Cephalosporins: Parenteral In *Antimicrobial Therapy and Vaccines*. eds. V. L. Yu, T. C. Merigan Jr & S. L. Barriere, pp. 748-764. Baltimore, MD: Williams&Wilkins.
14. 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.
15. Bergstrom, J. & Eliasson, S. (1987) Noxious effect of cigarette smoking on periodontal health. *J Periodontal Res* **22**, 513-517.
16. Bowler, L. D., Zhang, Q. Y., Riou, J. Y. & Spratt, B. G. (1994) Interspecies recombination between the penA genes of *Neisseria meningitidis* and commensal *Neisseria* species during the emergence of penicillin resistance in *N. meningitidis*: natural events and laboratory simulation. *J Bacteriol* **176**, 333-337.
17. Briggs, H. F. (1924) Local vaccine treatment of pyorrhea alveolaris. *Dent Cosmos* **66**, 697.
18. Britt, M. & Pohlod, D. (1986) Serum and crevicular fluid concentrations after a single oral dose of metronidazole. *J Periodontol* **57**, 104-107.
19. Bush, K., Jacoby, G. A. & Medeiros, A. A. (1995) A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother* **39**, 1211-1233.
20. Calva, J., Cerón, E., Bojalil, R. & Holbrook, A. (1993) Antibiotic consumption in a community of Mexico City. II. Survey of purchases at pharmacies. *Bol Med Hosp Infant Mex* **50**, 145-150.
21. Carlier, J. P., Sellier, N., Rager, M. N. & Reysset, G. (1997) Metabolism of a 5-nitroimidazole in susceptible and resistant isogenic strains of *Bacteroides fragilis*. *Antimicrob Agents Chemother* **41**, 1495-1499.
22. Carvalho, L., D'Avila, G., Leao, A., Haffajee, A., Socransky, S. & Feres, M. (2004) Scaling and root planing, systemic metronidazole and professional plaque removal in the treatment of chronic periodontitis in a Brazilian population. I. clinical results. *J Clin Periodontol* **31**, 1070-1076.
23. Clancy, J., Petitpas, J., Dib-Hajj, F., Yuan, W., Cronan, M., Kamath, A. V., Bergeron, J. & Retsema, J. A. (1996) Molecular cloning and functional analysis of a novel macrolide-resistance determinant, mefA, from *Streptococcus pyogenes*. *Mol Microbiol* **22**, 867-879.
24. Cohen, M. L. (1992) Epidemiology of drug resistance: implications for a post-antimicrobial era. *Science* **257**, 1050-1055.

25. Cook, G. S., Costerton, J. W. & Lamont, R. J. (1998) Biofilm formation by *Porphyromonas gingivalis* and *Streptococcus gordonii*. *J Periodontal Res* **33**, 323-327.
26. Costerton, J., Cook, G. & Lamont, R. (1999) The community architecture of biofilms: dynamic structures and mechanisms. In: Newman HN & Wilson M, ed *Dental Plaque Revisited: Oral Biofilms in Health and Disease* Eastman Dental Institute, University College London, 5-14.
27. Cullmann, W. (1996) Comparative evaluation of orally active antibiotics against community-acquired pathogens: results of eight European countries. *Chemotherapy* **42**, 11-20.
28. Champney, W. S. & Burdine, R. (1995) Macrolide antibiotics inhibit 50S ribosomal subunit assembly in *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* **39**, 2141-2144.
29. Chan, Y. & Chan, C. H. (2003) Antibiotic resistance of pathogenic bacteria from odontogenic infections in Taiwan. *J Microbiol Immunol Infect* **36**, 105-110.
30. Chance, P. R. (1928) Vincent's infection (trench mouth). *Dent Cosmos* **70**, 1226.
31. Chopra, I., Hawkey, P. M. & Hinton, M. (1992) Tetracyclines, molecular and clinical aspects. *J Antimicrob Chemother* **29**, 245-277.
32. Chopra, I. & Roberts, M. (2001) Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiol Mol Biol Rev* **65**, 232-260 ; second page, table of contents.
33. Dahlen, G., Manji, F., Baelum, V. & Fejerskov, O. (1992) Putative periodontopathogens in "diseased" and "non-diseased" persons exhibiting poor oral hygiene. *J Clin Periodontol* **19**, 35-42.
34. Davies, T. A., Goldschmidt, R., Pflieger, S., Loeloff, M., Bush, K., Sahm, D. F. & Evangelista, A. (2003) Cross-resistance, relatedness and allele analysis of fluoroquinolone-resistant US clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* (1998-2000). *J Antimicrob Chemother* **52**, 168-175.
35. Dorfer, C. (2003) Antimicrobials for the treatment of aggressive periodontitis. *Oral Dis* **9 Suppl 1**, 51-53.
36. Dowson, C. G., Coffey, T. J. & Spratt, B. G. (1994) Origin and molecular epidemiology of penicillin-binding-protein-mediated resistance to beta-lactam antibiotics. *Trends Microbiol* **2**, 361-366.

37. Dublanchet, A., Caillon, J., Emond, J. P., Chardon, H. & Drugeon, H. B. (1986) Isolation of *Bacteroides* strains with reduced sensitivity to 5-nitroimidazoles. *Eur J Clin Microbiol* **5**, 346-347.
38. Dzink, J. L., Socransky, S. S. & Haffajee, A. D. (1988) The predominant cultivable microbiota of active and inactive lesions of destructive periodontal diseases. *J Clin Periodontol* **15**, 316-323.
39. Eady, E. A., Ross, J. I. & Cove, J. H. (1990) Multiple mechanisms of erythromycin resistance. *J Antimicrob Chemother* **26**, 461-465.
40. Edwards, D. (1993) Nitroimidazole drugs--action and resistance mechanisms. I. Mechanisms of action. *J Antimicrob Chemother* **31**, 9-20.
41. Eick, S., Seltmann, T. & Pfister, W. (2004) Efficacy of antibiotics to strains of periodontopathogenic bacteria within a single species biofilm - an in vitro study. *J Clin Periodontol* **31**, 376-383.
42. el Solh, N., Allignet, J., Bismuth, R., Buret, B. & Fouace, J. (1986) Conjugative transfer of staphylococcal antibiotic resistance markers in the absence of detectable plasmid DNA. *Antimicrob Agents Chemother* **30**, 161-169.
43. Engler-Blum, G., Meier, M., Frank, J. & Muller, G. A. (1993) Reduction of background problems in nonradioactive northern and Southern blot analyses enables higher sensitivity than ³²P-based hybridizations. *Anal Biochem* **210**, 235-244.
44. Facinelli, B., Tarsi, R., Giovanetti, E., Varaldo, P. E. & Roberts, M. C. (1992) Molecular characterization of a beta-lactamase-producing *Haemophilus paraphrohaemolyticus* strain. *J Antimicrob Chemother* **30**, 551-553.
45. Fanali, S., Paolantonio, M., Di, B. A., Bascelli, A., Tete, S. & Piccolomini, R. (1990) [A comparative evaluation of oral and parenteral cephalosporins in inhibiting the growth of bacteria pathogenic to the periodontium]. *Minerva Stomatol* **39**, 637-640.
46. Feinberg, A. P. & Vogelstein, B. (1983) A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem* **132**, 6-13.
47. Feres, M., Haffajee, A. D., Allard, K., Som, S., Goodson, J. M. & Socransky, S. S. (2002) Antibiotic resistance of subgingival species during and after antibiotic therapy. *J Clin Periodontol* **29**, 724-735.
48. Feres, M., Haffajee, A. D., Goncalves, C., Allard, K. A., Som, S., Smith, C., Goodson, J. M. & Socransky, S. S. (1999a) Systemic doxycycline administration in the treatment of periodontal infections (I). Effect on the subgingival microbiota. *J Clin Periodontol* **26**, 775-783.

49. Feres, M., Haffajee, A. D., Goncalves, C., Allard, K. A., Som, S., Smith, C., Goodson, J. M. & Socransky, S. S. (1999b) Systemic doxycycline administration in the treatment of periodontal infections (II). Effect on antibiotic resistance of subgingival species. *J Clin Periodontol* **26**, 784-792.
50. Fiehn, N. & Westergaard, J. (1990) Doxycycline-resistant bacteria in periodontally diseased individuals after systemic doxycycline therapy and in healthy individuals. *Oral Microbiol Immunol* **5**, 219-222.
51. Fleming, A. (1929) On the bacterial action of cultures of a *penicillium*, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. *Br J Exp Pathol* **X**, 226-238.
52. Fluit, A., Schmitz, F. & Verhoef, J. (2001a) Multi-resistance to antimicrobial agents for the ten most frequently isolated bacterial pathogens. *Int J Antimicrob Agents* **18**, 147-160.
53. Fluit, A., Visser, M. & Schmitz, F. (2001b) Molecular detection of antimicrobial resistance. *Clin Microbiol Rev* **14**, 836-871, table of contents.
54. Foster, T. J. (1987) The genetics and biochemistry of mercury resistance. *Crit Rev Microbiol* **15**, 117-140.
55. Frachtmann, M. (1928) Treatment of Vincent's infection. *Dent Cosmos* **70**, 1131-1132.
56. Freeman, C., Klutman, N. & Lamp, K. (1997) Metronidazole. A therapeutic review and update. *Drugs* **54**, 679-708.
57. Gal, M. & Brazier, J. S. (2004) Metronidazole resistance in *Bacteroides* spp. carrying nim genes and the selection of slow-growing metronidazole-resistant mutants. *J Antimicrob Chemother* **54**, 109-116.
58. Genco, R. J. (1981) Antibiotics in the treatment of human periodontal diseases. *J Periodontol* **52**, 545-558.
59. Genco, R. J. (1992) Host responses in periodontal diseases: current concepts. *J Periodontol* **63**, 338-355.
60. Georgiou, M., Munoz, R., Roman, F., Canton, R., Gomez-Lus, R., Campos, J. & De La Campa, A. G. (1996) Ciprofloxacin-resistant *Haemophilus influenzae* strains possess mutations in analogous positions of GyrA and ParC. *Antimicrob Agents Chemother* **40**, 1741-1744.
61. Ghuysen, J. M. (1994) Molecular structures of penicillin-binding proteins and beta-lactamases. *Trends Microbiol* **2**, 372-380.
62. Gibbons, R. & Nygaard, M. (1970) Interbacterial aggregation of plaque bacteria. *Arch Oral Biol* **15**, 1397-1400.

63. Gibbons, R. J., Hay, D. I., Cisar, J. O. & Clark, W. B. (1988) Adsorbed salivary proline-rich protein 1 and statherin: receptors for type 1 fimbriae of *Actinomyces viscosus* T14V-J1 on apatitic surfaces. *Infect Immun* **56**, 2990-2993.
64. Gibbons, R. J., Hay, D. I. & Schlesinger, D. H. (1991) Delineation of a segment of adsorbed salivary acidic proline-rich proteins which promotes adhesion of *Streptococcus gordonii* to apatitic surfaces. *Infect Immun* **59**, 2948-2954.
65. Gibbons, R. J., Socransky, S. S., Sawyer, S., Kapsimalis, B. & MacDonald, J. B. (1963) The microbiota of the gingival crevice area of man. II. The predominant cultivable organisms. *Arch Oral Biol* **8**, 281-289.
66. Goldstein, E. & Citron, D. (1985) Comparative activity of the quinolones against anaerobic bacteria isolated at community hospitals. *Antimicrob Agents Chemother* **27**, 657-659.
67. Golub, L., Ramamurthy, N., McNamara, T., Gomes, B., Wolff, M., Casino, A., Kapoor, A., Zambon, J., Ciancio, S., Schneir, M. & et, a. (1984) Tetracyclines inhibit tissue collagenase activity. A new mechanism in the treatment of periodontal disease. *J Periodontal Res* **19**, 651-655.
68. Goodson, J. (1994) Antimicrobial strategies for treatment of periodontal diseases. *Periodontol 2000* **5**, 142-168.
69. Goodson, J. (1996) Principles of pharmacologic intervention. *J Clin Periodontol* **23**, 268-272.
70. Gootz, T. & Brighty, K. (1996) Fluoroquinolone antibacterials: SAR mechanism of action, resistance, and clinical aspects. *Med Res Rev* **16**, 433-486.
71. Gordon, J., Walker, C., Hovliaras, C. & Socransky, S. (1990) Efficacy of clindamycin hydrochloride in refractory periodontitis: 24- month results. *J Periodontol* **61**, 686-691.
72. Gordon, J., Walker, C., Lamster, I., West, T., Socransky, S., Seiger, M. & Fasciano, R. (1985) Efficacy of clindamycin hydrochloride in refractory periodontitis. 12- month results. *J Periodontol* **56**, 75-80.
73. Gordon, J. M. & Walker, C. B. (1993) Current status of systemic antibiotic usage in destructive periodontal disease. *J Periodontol* **64**, 760-771.
74. Gordon, J. M., Walker, C. B., Murphy, J. C., Goodson, J. M. & Socransky, S. S. (1981) Tetracycline: levels achievable in gingival crevice fluid and in vitro effect on subgingival organisms. Part I. Concentrations in crevicular fluid after repeated doses. *J Periodontol* **52**, 609-612.
75. Greenstein, G. (1993) The role of metronidazole in the treatment of periodontal diseases. *J Periodontol* **64**, 1-15.

76. Grossi, S. G. & Genco, R. J. (1998) Periodontal disease and diabetes mellitus: a two-way relationship. *Ann Periodontol* **3**, 51-61.
77. Gusberti, F., Syed, S. & Lang, N. (1988) Combined antibiotic (metronidazole) and mechanical treatment effects on the subgingival bacterial flora of sites with recurrent periodontal disease. *J Clin Periodontol* **15**, 353-359.
78. Haber, J. (1994) Smoking is a major risk factor for periodontitis. *Curr Opin Periodontol*, 12-18.
79. Haffajee, A., Socransky, S., Feres, M. & Ximenez-Fyvie, L. (1999) Plaque microbiology in health and disease. In: Newman HN & Wilson M, ed *Dental Plaque Revisited: Oral Biofilms in Health and Disease* Eastman Dental Institute, University College London, 255-282.
80. Haffajee, A., Socransky, S. & Gunsolley, J. (2003) Systemic anti-infective periodontal therapy. A systematic review. *Ann Periodontol* **8**, 115-181.
81. Haffajee, A. D., Cugini, M. A., Tanner, A., Pollack, R. P., Smith, C., Kent, R. L., Jr. & Socransky, S. S. (1998) Subgingival microbiota in healthy, well-maintained elder and periodontitis subjects. *J Clin Periodontol* **25**, 346-353.
82. Haffajee, A. D., Dibart, S., Kent, R. L., Jr. & Socransky, S. S. (1995a) Clinical and microbiological changes associated with the use of 4 adjunctive systemically administered agents in the treatment of periodontal infections. *J Clin Periodontol* **22**, 618-627.
83. Haffajee, A. D., Dibart, S., Kent, R. L., Jr. & Socransky, S. S. (1995b) Factors associated with different responses to periodontal therapy. *J Clin Periodontol* **22**, 628-636.
84. Haffajee, A. D. & Socransky, S. S. (2001) Relationship of cigarette smoking to the subgingival microbiota. *J Clin Periodontol* **28**, 377-388.
85. Haffajee, A. D., Socransky, S. S. & Goodson, J. M. (1983) Comparison of different data analyses for detecting changes in attachment level. *J Clin Periodontol* **10**, 298-310.
86. Hall, R. & Stokes, H. (1993) Integrons: novel DNA elements which capture genes by site-specific recombination. *Genetica* **90**, 115-132.
87. Handal, T., Caugant, D. & Olsen, I. (2003) Antibiotic resistance in bacteria isolated from subgingival plaque in a norwegian population with refractory marginal periodontitis. *Antimicrob Agents Chemother* **47**, 1443-1446.
88. Handal, T., Olsen, I., Walker, C. & Caugant, D. (2004) Beta-lactamase production and antimicrobial susceptibility of subgingival bacteria from refractory periodontitis. *Oral Microbiol Immunol* **19**, 303-308.

89. Handsfield, H., Clark, H., Wallace, J., Holmes, K. & Turck, M. (1973) Amoxicillin, a new penicillin antibiotic. *Antimicrob Agents Chemother* **3**, 262-265.
90. 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.
91. Hartzell, T. B. (1928) Report of five recently cured pyorrhea cases. *Dent Cosmos* **70**, 506-511.
92. 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; discussion 160-132.
93. Hoffman, G. M. (1919) Pyorrhea and autogenous vaccines. *Dent Cosmos* **61**, 1095.
94. Jacoby, G. A. (1997) Extended-spectrum beta-lactamases and other enzymes providing resistance to oxyimino-beta-lactams. *Infect Dis Clin North Am* **11**, 875-887.
95. Jenkins, W., MacFarlane, T., Gilmour, W., Ramsay, I. & MacKenzie, D. (1989) Systemic metronidazole in the treatment of periodontitis. *J Clin Periodontol* **16**, 443-450.
96. Jenkinson, H. & Lamont, R. (1997) Streptococcal adhesion and colonization. *Crit Rev Oral Biol Med* **8**, 175-200.
97. Jordan, H. V. & Keys, P. H. (1964) Aerobic, gram-positive, filamentous bacteria as etiologic agents of experimental periodontal disease in hamsters. *Arch Oral Biol* **32**, 401-414.
98. Kam, K. M., Wong, P. W., Cheung, M. M. & Ho, N. K. (1996) Detection of quinolone-resistant *Neisseria gonorrhoeae*. *J Clin Microbiol* **34**, 1462-1464.
99. Kaplan, A., Weber, D., Oddone, E. & Perfect, J. (1989) Infection due to *Actinobacillus actinomycetemcomitans*: 15 cases and review. *Rev Infect Dis* **11**, 46-63.
100. Karlowsky, J. A., Thornsberry, C., Jones, M. E. & Sahm, D. F. (2003) Susceptibility of antimicrobial-resistant urinary *Escherichia coli* isolates to fluoroquinolones and nitrofurantoin. *Clin Infect Dis* **36**, 183-187.
101. Keyes, P. H. & Jordan, H. V. (1964) Periodontal lesions in the syrian hamster. III. Findings related to an infectious and transmissible component. *Arch Oral Biol* **32**, 377-400.
102. Khesin, R. B. & Karasyova, E. V. (1984) Mercury-resistant plasmids in bacteria from a mercury and antimony deposit area. *Mol Gen Genet* **197**, 280-285.
103. Kinane, D. & Marshall, G. (2001) Periodontal manifestations of systemic disease. *Aust Dent J* **46**, 2-12.

104. Kinder, S. A., Holt, S. C. & Korman, K. S. (1986) Penicillin resistance in the subgingival microbiota associated with adult periodontitis. *J Clin Microbiol* **23**, 1127-1133.
105. Kirst, H. A. (1991) New macrolides: expanded horizons for an old class of antibiotics. *J Antimicrob Chemother* **28**, 787-790.
106. Kliebe, C., Nies, B. A., Meyer, J. F., Tolxdorff-Neutzling, R. M. & Wiedemann, B. (1985) Evolution of plasmid-coded resistance to broad-spectrum cephalosporins. *Antimicrob Agents Chemother* **28**, 302-307.
107. Knothe, H., Shah, P., Krcmery, V., Antal, M. & Mitsuhashi, S. (1983) Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. *Infection* **11**, 315-317.
108. Koch, R. (1881) Untersuchung von pathogenen Organismen. *Mitteilungen aus dem Kaiserlichen Gesundheitsamte* **1**, 1-48.
109. Koch, R. (1882) Die Ätiologie der Tuberkulose. *Berliner Klinischen Wochenschrift*, 221-230.
110. Koch, R. (1884) Die Ätiologie der Tuberkulose. *Mitteilungen aus dem Kaiserlichen Gesundheitsamte* **2**, 1-88.
111. Kolenbrander, P., Andersen, R., Clemans, D., Whittaker, C. & Klier, C. (1999) Potential role of functionally similar coaggregation mediators in bacterial succession. In: Newman HN & Wilson M, ed *Dental Plaque Revisited: Oral Biofilms in Health and Disease* Eastman Dental Institute, University College London, 171-186.
112. Kornman, K. S. & di Giovine, F. S. (1998) Genetic variations in cytokine expression: a risk factor for severity of adult periodontitis. *Ann Periodontol* **3**, 327-338.
113. Kornman, K. S. & Duff, G. W. (1997). Detecting genetic predisposition to periodontal disease In *United States Patent Office*. United States: 5,686,246.
114. Kuriyama, T., Karasawa, T., Nakagawa, K., Yamamoto, E. & Nakamura, S. (2001) Incidence of beta-lactamase production and antimicrobial susceptibility of anaerobic gram-negative rods isolated from pus specimens of orofacial odontogenic infections. *Oral Microbiol Immunol* **16**, 10-15.
115. Lacroix, J. M. & Walker, C. B. (1995) Detection and incidence of the tetracycline resistance determinant tet(M) in the microflora associated with adult periodontitis. *J Periodontol* **66**, 102-108.
116. Lakhssassi, N., Elhajoui, N., Lodter, J. P., Pineill, J. L. & Sixou, M. (2005) Antimicrobial susceptibility variation of 50 anaerobic periopathogens in aggressive periodontitis: an interindividual variability study. *Oral Microbiol Immunol* **20**, 244-252.

117. Lamotte-Brasseur, J., Knox, J., Kelly, J. A., Charlier, P., Fonze, E., Dideberg, O. & Frere, J. M. (1994) The structures and catalytic mechanisms of active-site serine beta-lactamases. *Biotechnol Genet Eng Rev* **12**, 189-230.
118. Larsen, T. (2002) Susceptibility of *Porphyromonas gingivalis* in biofilms to amoxicillin, doxycycline and metronidazole. *Oral Microbiol Immunol* **17**, 267-271.
119. Larsen, T. & Fiehn, N. E. (1996) Resistance of *Streptococcus sanguis* biofilms to antimicrobial agents. *Apmis* **104**, 280-284.
120. Le, F. J., Molavi, A. & Prince, R. (1982) Clindamycin. *Med Clin North Am* **66**, 103-120.
121. Leclercq, R. & Courvalin, P. (1991) Bacterial resistance to macrolide, lincosamide, and streptogramin antibiotics by target modification. *Antimicrob Agents Chemother* **35**, 1267-1272.
122. Leng, Z., Riley, D., Berger, R., Krieger, J. & Roberts, M. (1997) Distribution and mobility of the tetracycline resistance determinant tetQ. *J Antimicrob Chemother* **40**, 551-559.
123. Levy, S. B. (1992). Reliance of Medicines and Self-medication: The Seeds of Antibiotic Misuse In *The antibiotic paradox: how miracle drugs are destroying the miracle*, pp. 57-70. New York: Plenum Press.
124. Levy, S. B., McMurry, L. M., Barbosa, T. M., Burdett, V., Courvalin, P., Hillen, W., Roberts, M. C., Rood, J. I. & Taylor, D. E. (1999) Nomenclature for new tetracycline resistance determinants. *Antimicrob Agents Chemother* **43**, 1523-1524.
125. Leyva, R. (1999) La libre venta de medicamentos y los OTC en farmacias de México. *International Workshop on Responsible Self-Medication in Latin America in the Global Society Information*, 23-24.
126. Listgarten, M. (1999) Formation of dental plaque and other oral biofilms. In: Newman HN & Wilson M, ed *Dental Plaque Revisited: Oral Biofilms in Health and Disease* Eastman Dental Institute, University College London, 187-210.
127. Listgarten, M. A., Lai, C. H. & Young, V. (1993) Microbial composition and pattern of antibiotic resistance in subgingival microbial samples from patients with refractory periodontitis. *J Periodontol* **64**, 155-161.
128. Listgarten, M. A., Lindhe, J. & Hellden, L. (1978) Effect of tetracycline and/or scaling on human periodontal disease. Clinical, microbiological, and histological observations. *J Clin Periodontol* **5**, 246-271.

129. Litterio, M., Bianchini, H., Carloni, G., Di Martino, A., Fernandez Canigia, L., Greco, G., Legaria, C., Rollet, R., Rossetti, A., Predari, S. C. & Castello, L. (2004) ["In vitro" activity of ten antimicrobial agents against anaerobic bacteria. A collaborative study, 1999-2002]. *Rev Argent Microbiol* **36**, 130-135.
130. Livermore, D. (1995) beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbiol Rev* **8**, 557-584.
131. Livermore, D. (2003) Bacterial resistance: origins, epidemiology, and impact. *Clin Infect Dis* **36**, S11-23.
132. Loe, H., Theilade, E. & Jensen, S. B. (1965) Experimental gingivitis in man. *J Periodontol* **36**, 177-187.
133. Loe, H., Theilade, E., Jensen, S. B. & Schiott, C. R. (1967) Experimental gingivitis in man. 3. Influence of antibiotics on gingival plaque development. *J Periodontol Res* **2**, 282-289.
134. Loesche, W., Syed, S., Morrison, E., Laughon, B. & Grossman, N. (1981) Treatment of periodontal infections due to anaerobic bacteria with short-term treatment with metronidazole. *J Clin Periodontol* **8**, 29-44.
135. Loesche, W. J., Grossman, N. & Giordano, J. (1993) Metronidazole in periodontitis (IV). The effect of patient compliance on treatment parameters. *J Clin Periodontol* **20**, 96-104.
136. Lucier, T. S., Heitzman, K., Liu, S. K. & Hu, P. C. (1995) Transition mutations in the 23S rRNA of erythromycin-resistant isolates of *Mycoplasma pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* **39**, 2770-2773.
137. Luong, N., Tsai, J. & Chen, C. (2001) Susceptibilities of *Eikenella corrodens*, *Prevotella intermedia*, and *Prevotella nigrescens* clinical isolates to amoxicillin and tetracycline. *Antimicrob Agents Chemother* **45**, 3253-3255.
138. Lyttle, H. A. & Bowden, G. H. (1993) The level of mercury in human dental plaque and interaction in vitro between biofilms of *Streptococcus mutans* and dental amalgam. *J Dent Res* **72**, 1320-1324.
139. Madinier, I. M., Fosse, T. B., Hitzig, C., Charbit, Y. & Hannoun, L. R. (1999) Resistance profile survey of 50 periodontal strains of *Actinobacillus actinomycescomitans*. *J Periodontol* **70**, 888-892.
140. Magnusson, I., Low, S., McArthur, W., Marks, R., Walker, C., Maruniak, J., Taylor, M., Padgett, P., Jung, J. & Clark, W. (1994) Treatment of subjects with refractory periodontal disease. *J Clin Periodontol* **21**, 628-637.

141. Mandell, R. L., Ebersole, J. L. & Socransky, S. S. (1987) Clinical immunologic and microbiologic features of active disease sites in juvenile periodontitis. *J Clin Periodontol* **14**, 534-540.
142. Marsh, P. D. & Bradshaw, D. J. (1995) Dental plaque as a biofilm. *J Ind Microbiol* **15**, 169-175.
143. Martin, W., Gardner, M. & Washington, J. (1972) In vitro antimicrobial susceptibility of anaerobic bacteria isolated from clinical specimens. *Antimicrob Agents Chemother* **1**, 148-158.
144. Matto, J., Asikainen, S., Vaisanen, M. L., Von Troil-Linden, B., Kononen, E., Saarela, M., Salminen, K., Finegold, S. M. & Jousimies-Somer, H. (1999) Beta-lactamase production in *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens*, and *Prevotella pallens* genotypes and in vitro susceptibilities to selected antimicrobial agents. *Antimicrob Agents Chemother* **43**, 2383-2388.
145. McManus, M. (1997) Mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial agents. *Am J Health Syst Pharm* **54**, 1420-1433; quiz 1444-1426.
146. Medalia, L. S. (1916) The present status of alveolar osteomyelitis pyorrhea alveolaris. Its causes and treatment and vaccines. *Dent Cosmos*, 1000-1012.
147. Meyer, K. F. (1917) The present status of dental bacteriology. *J Am Dent Assoc* **4**, 966-996.
148. Miyake, Y., Tsuruda, K., Okuda, K., Widowati, Iwamoto, Y. & Suginaka, H. (1995) In vitro activity of tetracyclines, macrolides, quinolones, clindamycin and metronidazole against periodontopathic bacteria. *J Periodontal Res* **30**, 290-293.
149. Molin, S. (1999) Microbial activity in biofilm communities. In: Newman HN & Wilson M, ed *Dental Plaque Revisited: Oral Biofilms in Health and Disease Eastman Dental Institute, University College London*, 73-78.
150. Moore, W. E., Holdeman, L. V., Cato, E. P., Smibert, R. M., Burmeister, J. A. & Ranney, R. R. (1983) Bacteriology of moderate (chronic) periodontitis in mature adult humans. *Infect Immun* **42**, 510-515.
151. Moore, W. E., Holdeman, L. V., Smibert, R. M., Hash, D. E., Burmeister, J. A. & Ranney, R. R. (1982) Bacteriology of severe periodontitis in young adult humans. *Infect Immun* **38**, 1137-1148.
152. Moore, W. E. & Moore, L. V. (1994) The bacteria of periodontal diseases. *Periodontol 2000* **5**, 66-77.
153. Moore, W. E. C. M., L. V. H. (1994) Periodontal microbiota in different clinical conditions. *Periodontology 2000* **5**, 66-77.

154. Muller, H. P., Heinecke, A., Borneff, M., Kiencke, C., Knopf, A. & Pohl, S. (1998) Eradication of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* from the oral cavity in adult periodontitis. *J Periodontal Res* **33**, 49-58.
155. Muller, H. P., Holderrieth, S., Burkhardt, U. & Hoffler, U. (2002) In vitro antimicrobial susceptibility of oral strains of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* to seven antibiotics. *J Clin Periodontol* **29**, 736-742.
156. Muller, M. (1983) Mode of action of metronidazole on anaerobic bacteria and protozoa. *Surgery* **93**, 165-171.
157. Najera, M., al-Hashimi, I., Plemons, J., Rivera-Hidalgo, F., Rees, T., Haghighat, N. & Wright, J. (1997) Prevalence of periodontal disease in patients with Sjogren's syndrome. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* **83**, 453-457.
158. Narikawa, S., Suzuki, T., Yamamoto, M. & Nakamura, M. (1991) Lactate dehydrogenase activity as a cause of metronidazole resistance in *Bacteroides fragilis* NCTC 11295. *J Antimicrob Chemother* **28**, 47-53.
159. NCCLS (2001) Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing of Anaerobic Bacteria; Approved Standard-Fifth Edition. *NCCLS document M11-A5*[ISBN 1-56238-429-5] **21**, 45.
160. Neiders, M. E., Chen, P. B., Suido, H., Reynolds, H. S., Zambon, J. J., Shlossman, M. & Genco, R. J. (1989) Heterogeneity of virulence among strains of *Bacteroides gingivalis*. *J Periodontal Res* **24**, 192-198.
161. Newman, M. G. (1997) Genetic risk for severe periodontal disease. *Compend Contin Educ Dent* **18**, 881-884, 886, 888 passim; quiz 894.
162. Newman, M. G. & Socransky, S. S. (1977) Predominant cultivable microbiota in periodontosis. *J Periodontal Res* **12**, 120-128.
163. Newman, M. G., Socransky, S. S., Savitt, E. D., Propas, D. A. & Crawford, A. (1976) Studies of the microbiology of periodontosis. *J Periodontol* **47**, 373-379.
164. Nikolaewa, E. (1926) Essai d'application des vaccines d'apres Besredka dans des cas d'inflammation locales, aiguës et chroniques. *Ann L'Institute Pasteur* **10**, 869-875.
165. Normark, B. & Normark, S. (2002) Evolution and spread of antibiotic resistance. *J Intern Med* **252**, 91-106.
166. Notten, F., Koek-Van, O. A. & Mikx, F. (1982) Capillary agar diffusion assay for measuring metronidazole in human gingival crevice fluid. *Antimicrob Agents Chemother* **21**, 836-837.

167. Nyfors, S., Kononen, E., Syrjanen, R., Komulainen, E. & Jousimies-Somer, H. (2003) Emergence of penicillin resistance among *Fusobacterium nucleatum* populations of commensal oral flora during early childhood. *J Antimicrob Chemother* **51**, 107-112.
168. Olsvik, B., Flynn, M. J., Tenover, F. C., Slots, J. & Olsen, I. (1996) Tetracycline resistance in *Prevotella* isolates from periodontally diseased patients is due to the tet(Q) gene. *Oral Microbiol Immunol* **11**, 304-308.
169. Olsvik, B., Hansen, B. F., Tenover, F. C. & Olsen, I. (1995) Tetracycline-resistant microorganisms recovered from patients with refractory periodontal disease. *J Clin Periodontol* **22**, 391-396.
170. Olsvik, B., Olsen, I. & Tenover, F. C. (1994) The tet(Q) gene in bacteria isolated from patients with refractory periodontal disease. *Oral Microbiol Immunol* **9**, 251-255.
171. Pacini, N., Zanchi, R., Ferrara, A., Canzi, E. & Ferrari, A. (1997) Antimicrobial susceptibility tests on anaerobic oral mixed cultures in periodontal diseases. *J Clin Periodontol* **24**, 401-409.
172. Page, R. C., Vandesteen, G. E., Ebersole, J. L., Williams, B. L., Dixon, I. L. & Altman, L. C. (1985) Clinical and laboratory studies of a family with a high prevalence of juvenile periodontitis. *J Periodontol* **56**, 602-610.
173. Pajukanta, R., Asikainen, S., Forsblom, B., Saarela, M. & Jousimies-Somer, H. (1993) beta-Lactamase production and in vitro antimicrobial susceptibility of *Porphyromonas gingivalis*. *FEMS Immunol Med Microbiol* **6**, 241-244.
174. Palmer, N., Pealing, R., Ireland, R. & Martin, M. (2000) A study of therapeutic antibiotic prescribing in National Health Service general dental practice in England. *Br Dent J* **188**, 554-558.
175. Paster, B., Boches, S., Galvin, J., Ericson, R., Lau, C., Levanos, V., Sahasrabudhe, A. & Dewhirst, F. (2001) Bacterial diversity in human subgingival plaque. *J Bacteriol* **183**, 3770-3783.
176. Perdue, B. E. & Standiford, H. C. (1999). Tetracyclines In *Antimicrobial Therapy and Vaccines*. eds. V. L. Yu, T. C. Merigan Jr & S. L. Barriere, pp. 981-995. Baltimore, MD: Williams&Wilkins.
177. Petit, M., Hovenkamp, E., Hamann, D., Roos, M., van, d. V. U., Miedema, F. & Loos, B. (2001) Phenotypical and functional analysis of T cells in periodontitis. *J Periodontal Res* **36**, 214-220.

178. Petit, M., Wassenaar, A., van, d. V. U., van, E. W. & Loos, B. (1999) Depressed responsiveness of peripheral blood mononuclear cells to heat-shock proteins in periodontitis patients. *J Dent Res* **78**, 1393-1400.
179. Pinho, M. G., Filipe, S. R., de Lencastre, H. & Tomasz, A. (2001) Complementation of the essential peptidoglycan transpeptidase function of penicillin-binding protein 2 (PBP2) by the drug resistance protein PBP2A in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* **183**, 6525-6531.
180. Pintado, C., Salvador, C., Rotger, R. & Nombela, C. (1985) Multiresistance plasmid from commensal *Neisseria* strains. *Antimicrob Agents Chemother* **27**, 120-124.
181. Plewig, G. & Schopf, E. (1975) Anti-inflammatory effects of antimicrobial agents: an in vivo study. *J Invest Dermatol* **65**, 532-536.
182. Poulet, P. P., Duffaut, D. & Lodter, J. P. (1999) Metronidazole susceptibility testing of anaerobic bacteria associated with periodontal disease. *J Clin Periodontol* **26**, 261-263.
183. Prabhala, R., Rao, B., Marshall, R., Bansal, M. & Thadepalli, H. (1984) In vitro susceptibility of anaerobic bacteria to ciprofloxacin (Bay o 9867). *Antimicrob Agents Chemother* **26**, 785-786.
184. Pradier, C., Dunais, B., Carsenti-Etesse, H. & Dellamonica, P. (1997) Pneumococcal resistance patterns in Europe. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **16**, 644-647.
185. Preus, H. R., Lassen, J., Aass, A. M. & Ciancio, S. G. (1995) Bacterial resistance following subgingival and systemic administration of minocycline. *J Clin Periodontol* **22**, 380-384.
186. Quappe, L., Jara, L. & Lopez, N. (2004) Association of interleukin-1 polymorphisms with aggressive periodontitis. *J Periodontol* **75**, 1509-1515.
187. Quee, T., Chan, E., Clark, C., Lautar-Lemay, C., Bergeron, M., Bourgoquin, J. & Stamm, J. (1987) The role of adjunctive Rodogyl therapy in the treatment of advanced periodontal disease. A longitudinal clinical and microbiologic study. *J Periodontol* **58**, 594-601.
188. Quirynen, M., Teughels, W. & van, S. D. (2003) Microbial shifts after subgingival debridement and formation of bacterial resistance when combined with local or systemic antimicrobials. *Oral Dis* **9 Suppl 1**, 30-37.
189. Ramberg, P., Rosling, B., Serino, G., Hellstrom, M. K., Socransky, S. S. & Lindhe, J. (2001) The long-term effect of systemic tetracycline used as an adjunct to non- surgical treatment of advanced periodontitis. *J Clin Periodontol* **28**, 446-452.

190. Rasmussen, A. T. (1929) Ultraviolet radiation in the treatment of periodontal disease. *J Am Dent Assoc* **16**, 3-17.
191. Rasmussen, B., Bush, K. & Tally, F. (1993) Antimicrobial resistance in Bacteroides. *Clin Infect Dis* **16 Suppl 4**, S390-400.
192. Ready, D., Lancaster, H., Mullany, P., Bedi, R. & Wilson, M. (2006) Antibiotic resistance in the cultivable plaque microbiota of children from different ethnic groups. *Int J Antimicrob Agents* **27**, 376-382.
193. Ready, D., Roberts, A., Pratten, J., Spratt, D., Wilson, M. & Mullany, P. (2002) Composition and antibiotic resistance profile of microcosm dental plaques before and after exposure to tetracycline. *J Antimicrob Chemother* **49**, 769-775.
194. Reusser, F. (1975) Effect of lincomycin and clindamycin on peptide chain initiation. *Antimicrob Agents Chemother* **7**, 32-37.
195. Reysset, G. (1996) Genetics of 5-Nitroimidazole Resistance in Bacteroides Species. *Anaerobe* **2**, 59-69.
196. Rifkin, B., Vernillo, A. & Golub, L. (1993) Blocking periodontal disease progression by inhibiting tissue-destructive enzymes: a potential therapeutic role for tetracyclines and their chemically-modified analogs. *J Periodontol* **64**, 819-827.
197. Riviere, G., Smith, K., Carranza, N., Tzagaroulaki, E., Kay, S. & Dock, M. (1995) Subgingival distribution of Treponema denticola, Treponema socranskii, and pathogen-related oral spirochetes: prevalence and relationship to periodontal status of sampled sites. *J Periodontol* **66**, 829-837.
198. Roberts, M. (1996) Tetracycline resistance determinants: mechanisms of action, regulation of expression, genetic mobility, and distribution. *FEMS Microbiol Rev* **19**, 1-24.
199. Roberts, M. (1998) Antibiotic resistance in oral/respiratory bacteria. *Crit Rev Oral Biol Med* **9**, 522-540.
200. Roberts, M. (2002) Antibiotic toxicity, interactions and resistance development. *Periodontol 2000* **28**, 280-297.
201. Roberts, M., Chung, W. & Roe, D. (1996) Characterization of tetracycline and erythromycin resistance determinants in Treponema denticola. *Antimicrob Agents Chemother* **40**, 1690-1694.
202. Roberts, M. C. (1989) Plasmids of Neisseria gonorrhoeae and other Neisseria species. *Clin Microbiol Rev* **2 Suppl**, S18-23.

203. Roberts, M. C., Brown, B. A., Steingrube, V. A. & Wallace, R. J., Jr. (1990) Genetic basis of tetracycline resistance in *Moraxella* (*Branhamella*) *catarrhalis*. *Antimicrob Agents Chemother* **34**, 1816-1818.
204. Roberts, M. C. & Lansciardi, J. (1990) Transferable Tet M in *Fusobacterium nucleatum*. *Antimicrob Agents Chemother* **34**, 1836-1838.
205. Rodrigues, R., Goncalves, C., Souto, R., Feres-Filho, E., Uzeda, M. & Colombo, A. (2004) Antibiotic resistance profile of the subgingival microbiota following systemic or local tetracycline therapy. *J Clin Periodontol* **31**, 420-427.
206. Roe, D., Weinberg, A. & Roberts, M. (1996) Mobile rRNA methylase genes coding for erythromycin resistance in *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J Antimicrob Chemother* **37**, 457-464.
207. Roe, D. E., Weinberg, A. & Roberts, M. C. (1995) Mobile rRNA methylase genes in *Campylobacter* (*Wolinella*) *rectus*. *J Antimicrob Chemother* **36**, 738-740.
208. Rooney, J., Wade, W., Sprague, S., Newcombe, R. & 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.
209. Rotger, R., Garcia-Valdes, E. & Trallero, E. P. (1986a) Characterization of a beta-lactamase-specifying plasmid isolated from *Eikenella corrodens* and its relationship to a commensal *Neisseria* plasmid. *Antimicrob Agents Chemother* **30**, 508-509.
210. Rotger, R., Rubio, F. & Nombela, C. (1986b) A multi-resistance plasmid isolated from commensal *Neisseria* species is closely related to the enterobacterial plasmid RSF1010. *J Gen Microbiol* **132**, 2491-2496.
211. Saini, S., Aparna, Gupta, N., Mahajan, A. & Saini, O. (2003) Antibiotic susceptibility of bacterial isolates in gingivitis and periodontitis. *Indian J Dent Res* **14**, 95-100.
212. Sakellari, D., Goodson, J. M., Kolokotronis, A. & Konstantinidis, A. (2000) Concentration of 3 tetracyclines in plasma, gingival crevice fluid and saliva. *J Clin Periodontol* **27**, 53-60.
213. Samuelson, J. (1999) Why metronidazole is active against both bacteria and parasites. *Antimicrob Agents Chemother* **43**, 1533-1541.
214. Saxton, C. (1973) Scanning electron microscope study of the formation of dental plaque. *Caries Res* **7**, 102-119.
215. Scannapieco, F. A. (1994) Saliva-bacterium interactions in oral microbial ecology. *Crit Rev Oral Biol Med* **5**, 203-248.

216. Scheifele, D. W., Fussell, S. J. & Roberts, M. C. (1982) Characterization of ampicillin-resistant *Haemophilus parainfluenzae*. *Antimicrob Agents Chemother* **21**, 734-739.
217. Schentag, J. J. & Scully, B. E. (1999). Quinolones In *Antimicrobial Therapy and Vaccines*. eds. V. L. Yu, T. C. Merigan Jr & S. L. Barriere, pp. 875-901. Baltimore, MD: Williams&Wilkins.
218. Serino, G., Rosling, B., Ramberg, P., Hellstrom, M. K., Socransky, S. S. & Lindhe, J. (2001) The effect of systemic antibiotics in the treatment of patients with recurrent periodontitis. *J Clin Periodontol* **28**, 411-418.
219. Seymour, R. A. & Heasman, P. A. (1995) Pharmacological control of periodontal disease. II. Antimicrobial agents. *J Dent* **23**, 5-14.
220. Shah, H., Seddon, S. & Gharbia, S. (1989) Studies on the virulence properties and metabolism of pleiotropic mutants of *Porphyromonas gingivalis* (*Bacteroides gingivalis*) W50. *Oral Microbiol Immunol* **4**, 19-23.
221. 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.
222. Silver, S. & Walderhaug, M. (1992) Gene regulation of plasmid- and chromosome-determined inorganic ion transport in bacteria. *Microbiol Rev* **56**, 195-228.
223. Slots, J. (2002) Selection of antimicrobial agents in periodontal therapy. *J Periodontal Res* **37**, 389-398.
224. Slots, J., Bragd, L., Wikstrom, M. & Dahlen, G. (1986) The occurrence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Bacteroides gingivalis* and *Bacteroides intermedius* in destructive periodontal disease in adults. *J Clin Periodontol* **13**, 570-577.
225. Slots, J., Evans, R. T., Lobbins, P. M. & Genco, R. J. (1980) In vitro antimicrobial susceptibility of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Antimicrob Agents Chemother* **18**, 9-12.
226. Slots, J. & Ting, M. (2002) Systemic antibiotics in the treatment of periodontal disease. *Periodontol 2000* **28**, 106-176.
227. Smith, G. L., Socransky, S. S. & Smith, C. M. (1989) Rapid method for the purification of DNA from subgingival microorganisms. *Oral Microbiol Immunol* **4**, 47-51.
228. Snyderman, D. R., Jacobus, N. V., McDermott, L. A. & Supran, S. E. (2000) Comparative in vitro activities of clinafloxacin and trovafloxacin against 1,000 isolates of *bacteroides fragilis* group: effect of the medium on test results. *Antimicrob Agents Chemother* **44**, 1710-1712.

229. Socransky, S. & Haffajee, A. (2002). *Dental biofilms: difficult therapeutic targets*. (vol. 28).
230. Socransky, S., Haffajee, A., Smith, C., Martin, L., Haffajee, J., Uzel, N. & Goodson, J. (2004) Use of checkerboard DNA-DNA hybridization to study complex microbial ecosystems. *Oral Microbiol Immunol* **19**, 352-362.
231. Socransky, S. S. (1970) Relationship of bacteria to the etiology of periodontal disease. *J Dent Res* **49**, 203-222.
232. Socransky, S. S., Gibbons, R. J., Dale, A. C., Bortnick, L., Rosenthal, E. & MacDonald, J. B. (1963) The microbiota of the gingival crevice area of man. I. Total microscopic and viable counts and counts of specific organisms. *Arch Oral Biol* **8**, 275-280.
233. Socransky, S. S. & Haffajee, A. D. (1991) Microbial mechanisms in the pathogenesis of destructive periodontal diseases: a critical assessment. *J Periodontal Res* **26**, 195-212.
234. Socransky, S. S. & Haffajee, A. D. (1994) Evidence of bacterial etiology: a historical perspective. *Periodontol 2000* **5**, 7-25.
235. Socransky, S. S., Haffajee, A. D., Cugini, M. A., Smith, C. & Kent, R. L., Jr. (1998) Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol* **25**, 134-144.
236. Socransky, S. S., Hubersak, C. & Propas, D. (1970) Induction of periodontal destruction in gnotobiotic rats by a human oral strain of *Actinomyces naeslundii*. *Arch Oral Biol* **15**, 993-995.
237. Socransky, S. S., Smith, C., Martin, L., Paster, B. J., Dewhirst, F. E. & Levin, A. E. (1994) "Checkerboard" DNA-DNA hybridization. *Biotechniques* **17**, 788-792.
238. Speer, B., Bedzyk, L. & Salyers, A. (1991) Evidence that a novel tetracycline resistance gene found on two *Bacteroides* transposons encodes an NADP-requiring oxidoreductase. *J Bacteriol* **173**, 176-183.
239. Stokes, H. & Hall, R. (1989) A novel family of potentially mobile DNA elements encoding site-specific gene-integration functions: integrons. *Mol Microbiol* **3**, 1669-1683.
240. Summers, A. O., Wireman, J., Vimy, M. J., Lorscheider, F. L., Marshall, B., Levy, S. B., Bennett, S. & Billard, L. (1993) Mercury released from dental "silver" fillings provokes an increase in mercury- and antibiotic-resistant bacteria in oral and intestinal floras of primates. *Antimicrob Agents Chemother* **37**, 825-834.
241. Sutter, V. (1976) Antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria. *Am J Med Technol* **42**, 111-114.
242. Sutter, V., Kwok, Y. & Bulkacz, J. (1985) Comparative activity of ciprofloxacin against anaerobic bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* **27**, 427-428.

243. Sykes, R. & Matthew, M. (1976) The beta-lactamases of gram-negative bacteria and their role in resistance to beta-lactam antibiotics. *J Antimicrob Chemother* **2**, 115-157.
244. Talan, D. A., Abrahamian, F. M., Moran, G. J., Citron, D. M., Tan, J. O. & Goldstein, E. J. (2003) Clinical presentation and bacteriologic analysis of infected human bites in patients presenting to emergency departments. *Clin Infect Dis* **37**, 1481-1489.
245. Tanner, A., Maiden, M. F., Macuch, P. J., Murray, L. L. & Kent, R. L., Jr. (1998) Microbiota of health, gingivitis, and initial periodontitis. *J Clin Periodontol* **25**, 85-98.
246. Tenenbaum, H., Jehl, F., Gallion, C. & Dahan, M. (1997) Amoxicillin and clavulanic acid concentrations in gingival crevicular fluid. *J Clin Periodontol* **24**, 804-807.
247. Teng, Y., Taylor, G., Scannapieco, F., Kinane, D., Curtis, M., Beck, J. & Kogon, S. (2002) Periodontal health and systemic disorders. *J Can Dent Assoc* **68**, 188-192.
248. Theilade, E., Theilade, J. & Mikkelsen, L. (1982) Microbiological studies on early dento-gingival plaque on teeth and Mylar strips in humans. *J Periodontal Res* **17**, 12-25.
249. Tocher, J. & Edwards, D. (1992) The interaction of reduced metronidazole with DNA bases and nucleosides. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **22**, 661-663.
250. Tocher, J. & Edwards, D. (1994) Evidence for the direct interaction of reduced metronidazole derivatives with DNA bases. *Biochem Pharmacol* **48**, 1089-1094.
251. Tomasz, A. (1979) The mechanism of the irreversible antimicrobial effects of penicillins: how the beta-lactam antibiotics kill and lyse bacteria. *Annu Rev Microbiol* **33**, 113-137.
252. Tomasz, A. (1986) Penicillin-binding proteins and the antibacterial effectiveness of beta-lactam antibiotics. *Rev Infect Dis* **8 Suppl 3**, S260-278.
253. Tomasz, A. (1994) Benefit and risk in the beta-lactam antibiotic-resistance strategies of *Streptococcus pneumoniae* and *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol* **2**, 380-385.
254. Trinh, S. & Reysset, G. (1996) Detection by PCR of the nim genes encoding 5-nitroimidazole resistance in *Bacteroides* spp. *J Clin Microbiol* **34**, 2078-2084.
255. Valdes, M. V., Lobbins, P. M. & Slots, J. (1982) Beta-lactamase producing bacteria in the human oral cavity. *J Oral Pathol* **11**, 58-63.
256. van Oosten, M., Notten, F. & Mikx, F. (1986) Metronidazole concentrations in human plasma, saliva, and gingival crevice fluid after a single dose. *J Dent Res* **65**, 1420-1423.
257. 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. *J Clin Periodontol* **32**, 893-898.

258. van Winkelhoff, A. J., Herrera Gonzales, D., Winkel, E. G., Dellelijn-Kippuw, N., Vandembroucke-Grauls, C. M. & Sanz, M. (2000) Antimicrobial resistance in the subgingival microflora in patients with adult periodontitis. A comparison between The Netherlands and Spain. *J Clin Periodontol* **27**, 79-86.
259. van Winkelhoff, A. J., Rams, T. E. & Slots, J. (1996) Systemic antibiotic therapy in periodontics. *Periodontol 2000* **10**, 45-78.
260. van Winkelhoff, A. J., Winkel, E. G., Barendregt, D., Dellelijn-Kippuw, N., Stijne, A. & van der Velden, U. (1997) beta-Lactamase producing bacteria in adult periodontitis. *J Clin Periodontol* **24**, 538-543.
261. Verhoef, J. & Levison, M. E. (1999). Clindamycin In *Antimicrobial Therapy and Vaccines*. eds. V. L. Yu, T. C. Merigan Jr & S. L. Barriere, pp. 774-789. Baltimore, MD: Williams&Wilkins.
262. Walker, C. (1996) Selected antimicrobial agents: mechanisms of action, side effects and drug interactions. *Periodontol 2000* **10**, 12-28.
263. Walker, C. & Gordon, J. (1990) The effect of clindamycin on the microbiota associated with refractory periodontitis. *J Periodontol* **61**, 692-698.
264. Walker, C. B., Godowski, K. C., Borden, L., Lennon, J., Nango, S., Stone, C. & Garrett, S. (2000) The effects of sustained release doxycycline on the anaerobic flora and antibiotic-resistant patterns in subgingival plaque and saliva. *J Periodontol* **71**, 768-774.
265. Walker, C. B., Gordon, J. M., Cornwall, H. A., Murphy, J. C. & Socransky, S. S. (1981) Gingival crevicular fluid levels of clindamycin compared with its minimal inhibitory concentrations for periodontal bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* **19**, 867-871.
266. Walker, C. B., Gordon, J. M. & Socransky, S. S. (1983) Antibiotic susceptibility testing of subgingival plaque samples. *J Clin Periodontol* **10**, 422-432.
267. Walker, C. B., Karpinia, K. & Baehni, P. (2004) Chemotherapeutics: antibiotics and other antimicrobials. *Periodontol 2000* **36**, 146-165.
268. Walsh, M., Buchanan, S., Hoover, C., Newbrun, E., Taggart, E., Armitage, G. & Robertson, P. (1986) Clinical and microbiologic effects of single-dose metronidazole or scaling and root planing in treatment of adult periodontitis. *J Clin Periodontol* **13**, 151-157.
269. Weisblum, B. (1995) Erythromycin resistance by ribosome modification. *Antimicrob Agents Chemother* **39**, 577-585.

270. Wexler, H. M., Molitoris, E. & Finegold, S. M. (1992) In vitro activities of three of the newer quinolones against anaerobic bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* **36**, 239-243.
271. Wiedemann, B. & Heisig, P. (1994) Mechanisms of quinolone resistance. *Infection* **22 Suppl 2**, S73-79.
272. Wikesjo, U. M., Baker, P. J., Christersson, L. A., Genco, R. J., Lyall, R. M., Hic, S., DiFlorio, R. M. & Terranova, V. P. (1986) A biochemical approach to periodontal regeneration: tetracycline treatment conditions dentin surfaces. *J Periodontal Res* **21**, 322-329.
273. Wilson, W. & Cockerill, F. (1987) Tetracyclines, chloramphenicol, erythromycin, and clindamycin. *Mayo Clin Proc* **62**, 906-915.
274. Williams, B. L., Ebersole, J. L., Spektor, M. D. & Page, R. C. (1985) Assessment of serum antibody patterns and analysis of subgingival microflora of members of a family with a high prevalence of early-onset periodontitis. *Infect Immun* **49**, 742-750.
275. Willis, S., Smith, K., Dunn, V., Gapter, L., Riviere, K. & Riviere, G. (1999) Identification of seven *Treponema* species in health- and disease-associated dental plaque by nested PCR. *J Clin Microbiol* **37**, 867-869.
276. Winkel, E. G., van Winkelhoff, A. J., Barendregt, D. S., van der Weijden, G. A., Timmerman, M. F. & van der Velden, U. (1999) Clinical and microbiological effects of initial periodontal therapy in conjunction with amoxicillin and clavulanic acid in patients with adult periodontitis. A randomised double-blind, placebo-controlled study. *J Clin Periodontol* **26**, 461-468.
277. 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. *J Clin Periodontol* **28**, 296-305.
278. Wondrack, L., Massa, M., Yang, B. V. & Sutcliffe, J. (1996) Clinical strain of *Staphylococcus aureus* inactivates and causes efflux of macrolides. *Antimicrob Agents Chemother* **40**, 992-998.
279. Xie, H., Cook, G. S., Costerton, J. W., Bruce, G., Rose, T. M. & Lamont, R. J. (2000) Intergeneric communication in dental plaque biofilms. *J Bacteriol* **182**, 7067-7069.
280. Ximenez-Fyvie, L. A., Haffajee, A. D. & Socransky, S. S. (2000) Comparison of the microbiota of supra- and subgingival plaque in health and periodontitis. *J Clin Periodontol* **27**, 648-657.

281. Yilmaz, S., Kuru, B., Noyan, U., Kadir, T., Acar, O. & Buget, E. (1996) A clinical and microbiological evaluation of systemic and local metronidazole delivery in early onset periodontitis patients. *J Marmara Univ Dent Fac* **2**, 500-509.
282. Yocum, R., Rasmussen, J. & Strominger, J. (1980) The mechanism of action of penicillin. Penicillin acylates the active site of *Bacillus stearotherophilus* D-alanine carboxypeptidase. *J Biol Chem* **255**, 3977-3986.
283. Yoshida, T., Muratani, T., Iyobe, S. & Mitsunashi, S. (1994) Mechanisms of high-level resistance to quinolones in urinary tract isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* **38**, 1466-1469.
284. Yu, W. L., Chuang, Y. C. & Rasmussen, J. W. (2006) Extended-spectrum beta-lactamases in Taiwan: epidemiology, detection, treatment and infection control. *J Microbiol Immunol Infect* **39**, 264-277.
285. Zhanel, G. G., Walkty, A., Nichol, K., Smith, H., Noreddin, A. & Hoban, D. J. (2003) Molecular characterization of fluoroquinolone resistant *Streptococcus pneumoniae* clinical isolates obtained from across Canada. *Diagn Microbiol Infect Dis* **45**, 63-67.
286. Zscheck, K. K. & Murray, B. E. (1990) Evidence for a staphylococcal-like mercury resistance gene in *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob Agents Chemother* **34**, 1287-1289.

VII. TABLAS

TABLA 1. Criterios utilizados para seleccionar a las poblaciones de estudio.

Grupo de Estudio	No. Sujetos	Edad	No. Dientes	Nivel de Inserción
Periodontitis crónica	10	≥ 28 años	≥ 20 excluyendo terceros molares	≥ 8 sitios con NI ≥ 6 mm
Periodontalmente sanos	10		y con ≥ 2 1os molares	≤ 4 sitios con NI = 4 mm y 0 sitios con NI ≥ 5 mm

TABLA 2. Cepas de referencia utilizadas para la elaboración de sondas de DNA.

Cepa	Ref.*	Cepa	Ref.*
<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i>	†	<i>Neisseria mucosa</i>	19696
<i>Actinomyces georgiae</i>	49285	<i>Peptostreptococcus micros</i>	33270
<i>Actinomyces israelii</i>	12102	<i>Porphyromonas endodontalis</i>	35406
<i>Actinomyces naeslundii</i> stp. 1	12104	<i>Porphyromonas gingivalis</i>	33277
<i>Actinomyces odontolyticus</i>	17929	<i>Prevotella intermedia</i>	25611
<i>Actinomyces viscosus</i>	43146	<i>Prevotella melaninogenica</i>	25845
<i>Campylobacter gracilis</i>	33236	<i>Prevotella nigrescens</i>	33563
<i>Campylobacter rectus</i>	33238	<i>Propionibacterium acnes</i>	6919
<i>Campylobacter showae</i>	51146	<i>Selenomonas artemidis</i>	43528
<i>Capnocytophaga gingivalis</i>	33624	<i>Selenomonas noxia</i>	43541
<i>Capnocytophaga ochracea</i>	27872	<i>Streptococcus anginosus</i>	33397
<i>Capnocytophaga sputigena</i>	33612	<i>Streptococcus constellatus</i>	27823
<i>Corynebacterium matruchotii</i>	14266	<i>Streptococcus gordonii</i>	10558
<i>Eikenella corrodens</i>	23834	<i>Streptococcus intermedius</i>	27335
<i>Eubacterium saburreum</i>	33271	<i>Streptococcus mitis</i>	49456
<i>Eubacterium sulci</i>	35585	<i>Streptococcus oralis</i>	35037
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	‡	<i>Streptococcus sanguinis</i>	10556
<i>Fusobacterium periodonticum</i>	33693	<i>Tannerella forsythia</i>	43037
<i>Gemella morbillorum</i>	27824	<i>Treponema denticola</i>	35405
<i>Leptotrichia buccalis</i>	14201	<i>Veillonella parvula</i>	10790

* Número de referencia del American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA)

† DNA de serotipos a (43717) y b (43718) fue combinado para generar una sonda de DNA

‡ DNA de subespecies *nucleatum* (25586), *polymorphum* (10953) y *vincentii* (49256) fue combinado para generar una sonda de DNA.

TABLA 3. Características clínicas de la población de estudio (N = 20).

	Periodontitis (n = 10)		Sanos (n = 10)	
	Media ± EEM	Rango	Media ± EEM	Rango
Edad (años)**	45.1 ± 2.7	35-64	33.1 ± 2.0	28-48
Número de dientes perdidos	3.6 ± 0.7	1-7	2.1 ± 0.7	0-7
Género (% mujeres)	60		50	
% fumadores	40		20	
Profundidad de bolsa promedio (mm)***	4.6 ± 0.3	3.2-5.9	2.0 ± 0.1	1.8-2.2
Nivel de inserción promedio (mm)***	5.1 ± 0.3	3.6-6.0	2.0 ± 0.1	1.8-2.3
% de sitios con:				
placa	23.7 ± 8.7	0.6-92.7	35.8 ± 11.7	0-83.3
enrojecimiento gingival	5.8 ± 3.9	0-40	1.5 ± 0.6	0-4.8
sangrado al sondeo***	36.0 ± 3.8	4.5-45.3	2.3 ± 0.5	0-4.8
supuración***	7.5 ± 2.3	0-24	0 ± 0	0-0

** p < 0.01, *** p < 0.001, Prueba U de Mann Whitney

TABLA 4. Descripción de aislados clínicos analizados a partir de muestras de placa dentobacteriana subgingival.

Descripción		Número de aislados	Porcentaje (%)
Aislados analizados para determinar resistencia (1, 679)	Identificados con la técnica de “checkerboard”	948	47.40%
	No identificados	731	36.55%
Aislados no analizados (321)	Contaminados	311	15.55%
	Perdidos	10	0.50%
TOTAL		2000	100%

TABLA 5. Determinación de CMI, rangos y porcentaje de resistencia de aislados clínicos de algunas especies patógenas.

Especie	# de aislados	Amoxicilina	Cefotaxima	Ciprofloxacina	Clindamicina	Doxiciclina	Metronidazol
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	4						
CMI 50		0.5	0.5	0.5	2	2	4
CMI 90		1	1	1	16	32	32
Rango		≤0.5 - 1	≤0.5 - 1	≤0.5 - 1	≤0.5 - ≥32	≤0.5 - ≥32	≤0.5 - ≥32
% de resistencia		0%	0%	0%	50%	25%	50%
<i>C. rectus</i>	16						
CMI 50		0.5	0.5	0.5	2	0.5	1
CMI 90		0.5	0.5	16	8	1	2
Rango		≤0.5 - 1	≤0.5 - 4	≤0.5 - ≥32	1 - ≥32	≤0.5 - 1	≤0.5 - ≥32
% de resistencia		0%	0%	37.5%	18.7%	0%	6.2%
<i>E. corrodens</i>	29						
CMI 50		2	0.5	0.5	32	0.5	32
CMI 90		2	8	0.5	32	16	32
Rango		≤0.5 - 8	≤0.5 - 1	≤0.5 - 4	1 - ≥32	≤0.5 - 16	≥32
% de resistencia		0%	0%	0%	89.6%	10.3%	100%
<i>F. nucleatum</i>	50						
CMI 50		0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
CMI 90		32	4	1	0.5	0.5	0.5
Rango		≤0.5 - ≥32	≤0.5 - ≥32	≤0.5 - 1	≤0.5 - 1	≤0.5 - 1	≤0.5 - 16
% de resistencia		20%	4%	0%	0%	0%	0%
<i>P. micros</i>	6						
CMI 50		0.5	0.5	0.5	2	0.5	0.5
CMI 90		32	0.5	2	4	1	32
Rango		≤0.5 - ≥32	≤0.5	≤0.5 - 2	≤0.5 - 4	≤0.5 - 1	≤0.5 - ≥32
% de resistencia		16.6%	0%	0%	0%	0%	16.6%

(Continúa en la siguiente página)

TABLA 5. (Continuación).

Especie	# de aislados	Amoxicilina	Cefotaxima	Ciprofloxacina	Clindamicina	Doxiciclina	Metronidazol
<i>P. gingivalis</i>	104						
CMI 50		0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
CMI 90		1	0.5	0.5	0.5	0.5	16
Rango		≤0.5 - 1	≤0.5 - 1	≤0.5 - 2	≤0.5 - 4	≤0.5 - ≥32	≤0.5 - ≥32
% de resistencia		0%	0%	0%	0%	1.9%	9.6%
<i>P. intermedia</i>	77						
CMI 50		0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
CMI 90		32	4	1	0.5	8	1
Rango		≤0.5 - ≥32	≤0.5 - 8	≤0.5 - 8	≤0.5 - ≥32	≤0.5 - 16	≤0.5 - ≥32
% de resistencia		27.2%	0%	2.5%	1.2%	1.2%	5.1%
<i>S. noxia</i>	9						
CMI 50		0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
CMI 90		0.5	0.5	0.5	0.5	8	0.5
Rango		≤0.5	≤0.5 - 1	≤0.5	≤0.5 - 1	≤0.5 - 16	≤0.5
% de resistencia		0%	0%	0%	0%	11.1%	0%
<i>T. forsythia</i>	19						
CMI 50		0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
CMI 90		0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Rango		≤0.5	≤0.5	≤0.5	≤0.5	≤0.5 - 2	≤0.5 - 2
% de resistencia		0%	0%	0%	0%	0%	0%

La resistencia fue determinada en base a los siguientes puntos de corte (µg/ml): ciprofloxacina y clindamicina 4, amoxicilina y doxiciclina 8, metronidazol 16 y cefotaxima 32.

VIII. FIGURAS

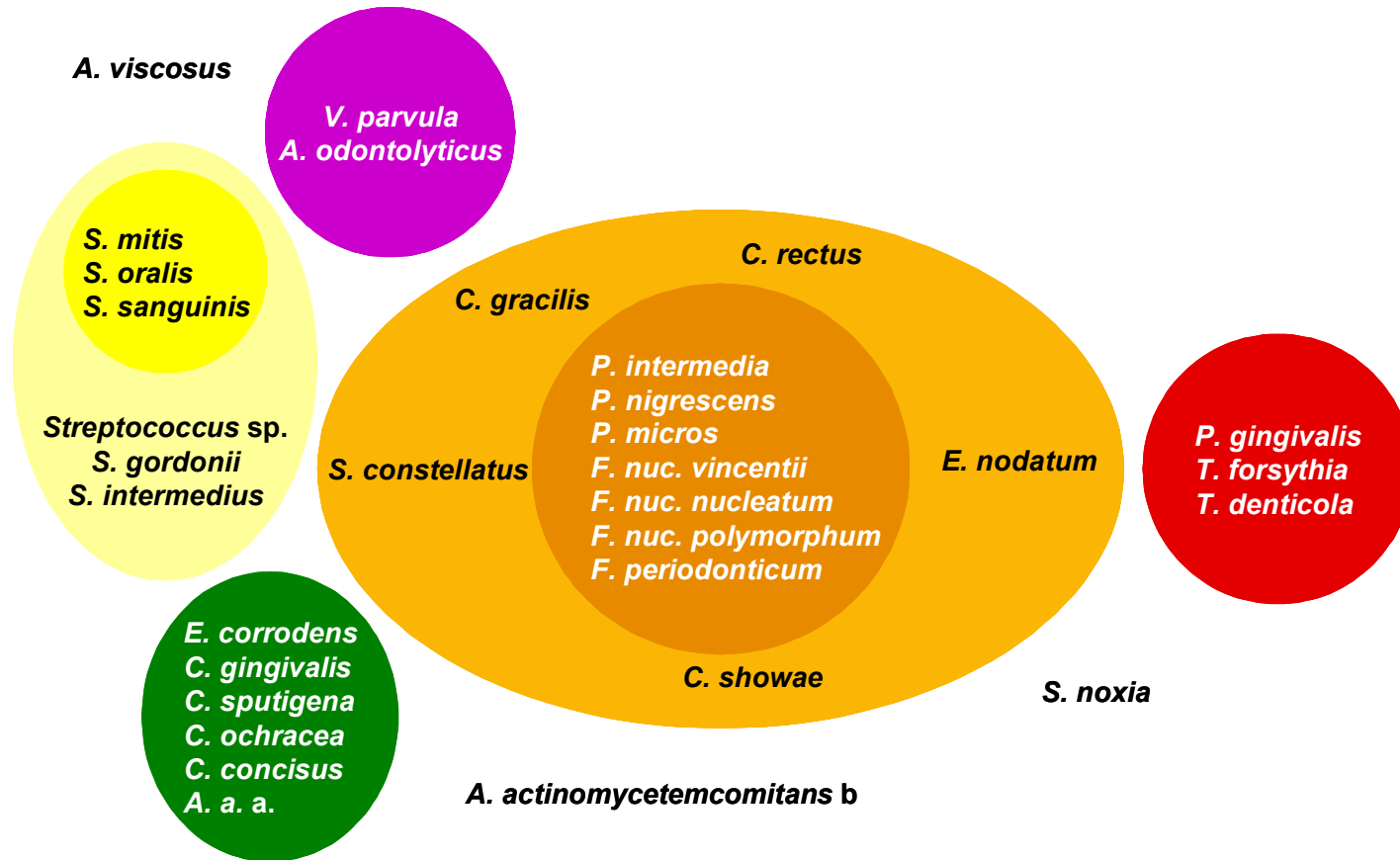


FIGURA 1. Complejos bacterianos en la placa subgingival. Los datos de esta figura, resumen las asociaciones entre especies en la placa dentobacteriana subgingival. Adaptado de Socransky et al. 1998 [Socransky, 1998 #3261].

F. nuc.: *Fusobacterium nucleatum*, *A.a.a:* *A. actinomycetemcomitans* a

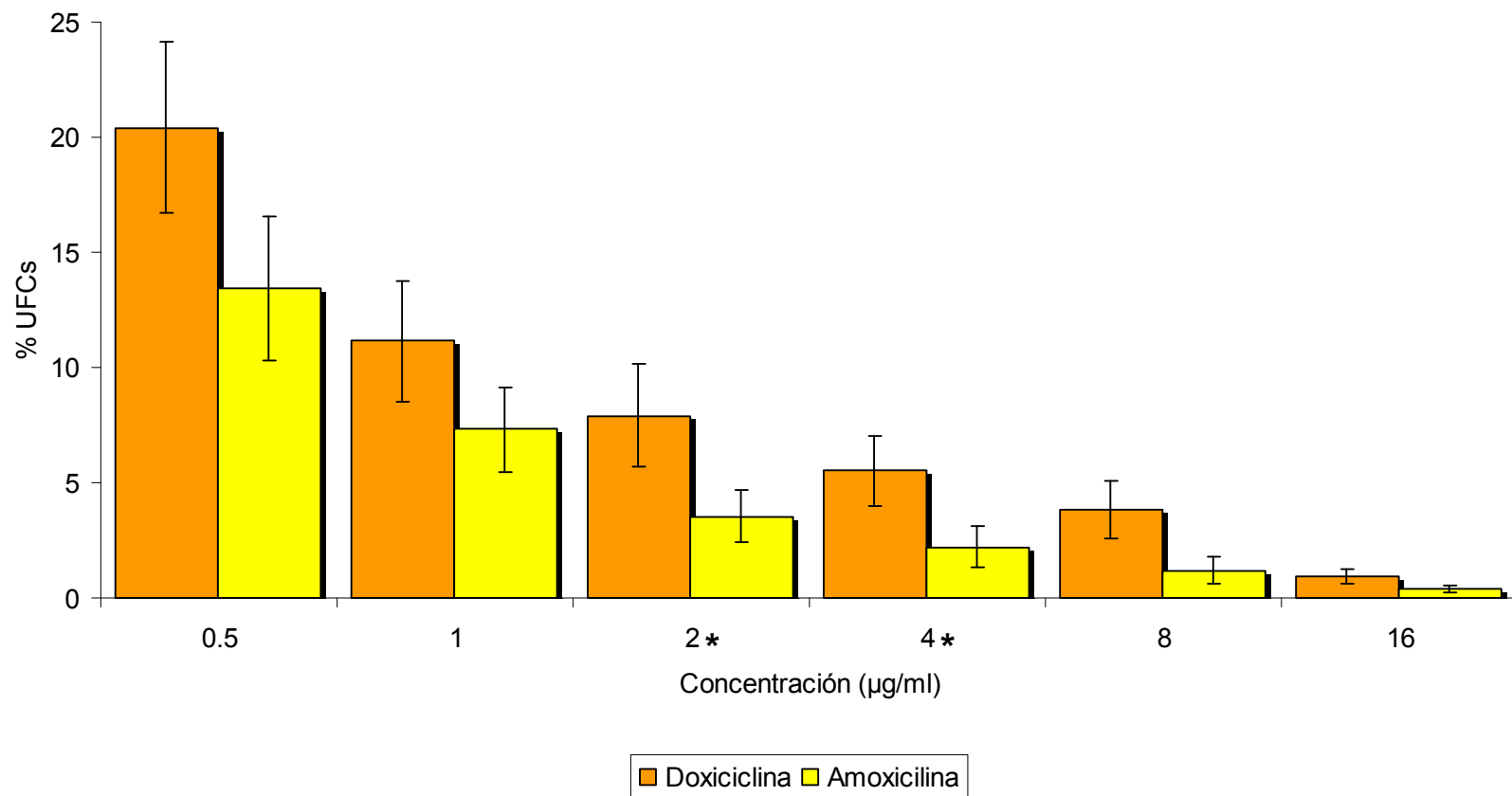


FIGURA 2. Porcentaje promedio (\pm EEM) de unidades formadoras de colonias (UFCs) provenientes de muestras de placa dentobacteriana subgingival de sujetos Mexicanos (N=20) que mostraron crecimiento en presencia de 6 concentraciones de amoxicilina y doxiciclina. El porcentaje promedio de UFCs en cada una de las concentraciones probadas fue determinado en base al total de UFCs detectadas en placas sin antibiótico para cada muestra de cada sujeto de estudio. Dichos porcentajes fueron promediados entre las dos muestras de cada sujeto y posteriormente entre los 20 sujetos de la población. * $p < 0.0.5$, prueba de Wilcoxon.

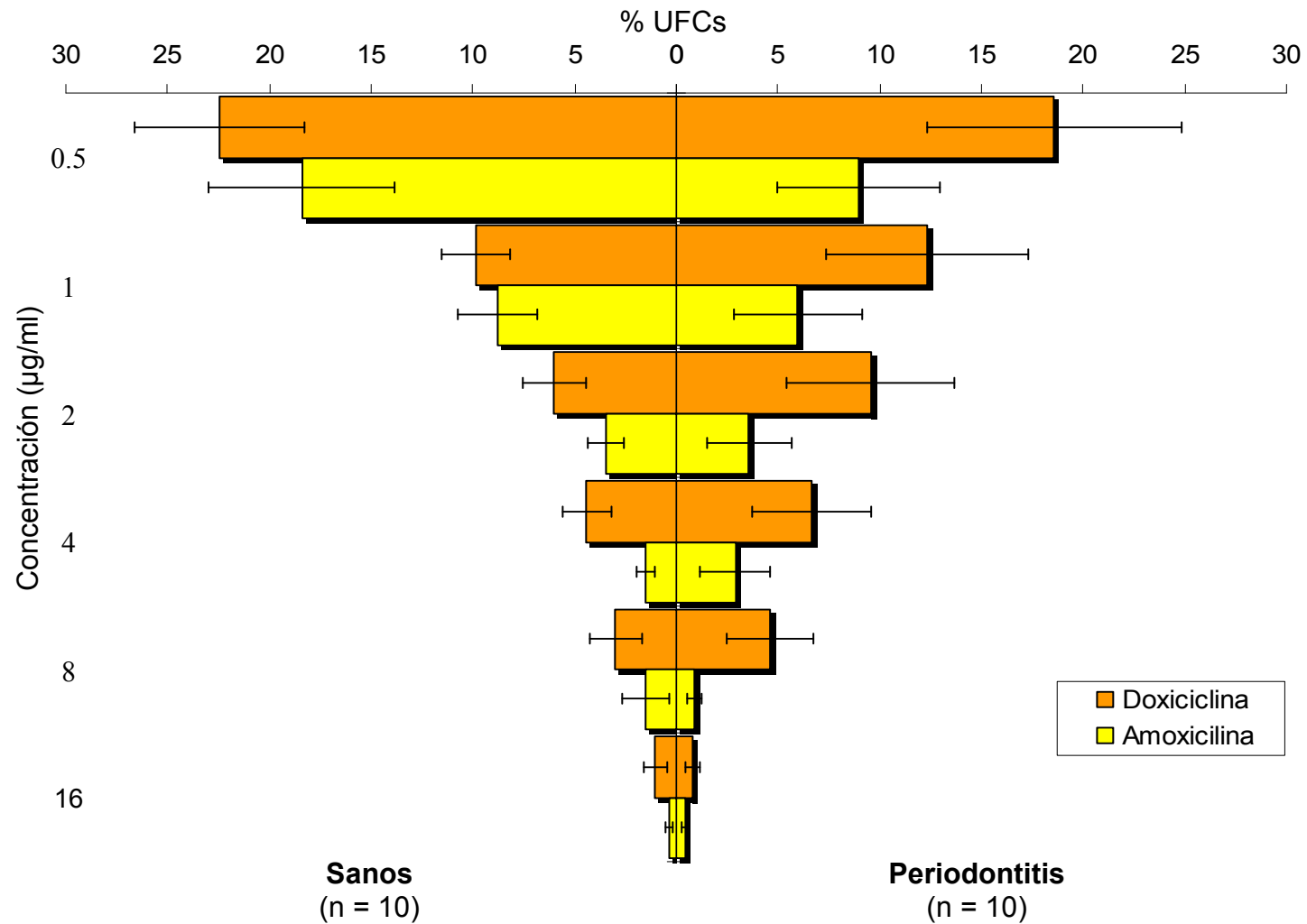


FIGURA 3. Porcentaje promedio (\pm EEM) de UFCs provenientes de muestras de placa dentobacteriana subgingival de sujetos Mexicanos periodontalmente sanos y con periodontitis crónica que mostraron crecimiento en presencia de 6 concentraciones de amoxicilina y doxiciclina. Las diferencias entre los porcentajes de crecimiento de UFCs entre sujetos sanos y con enfermedad periodontal no fueron estadísticamente significativas para ninguno de los dos antibióticos utilizando la prueba U de Mann-Whitney.

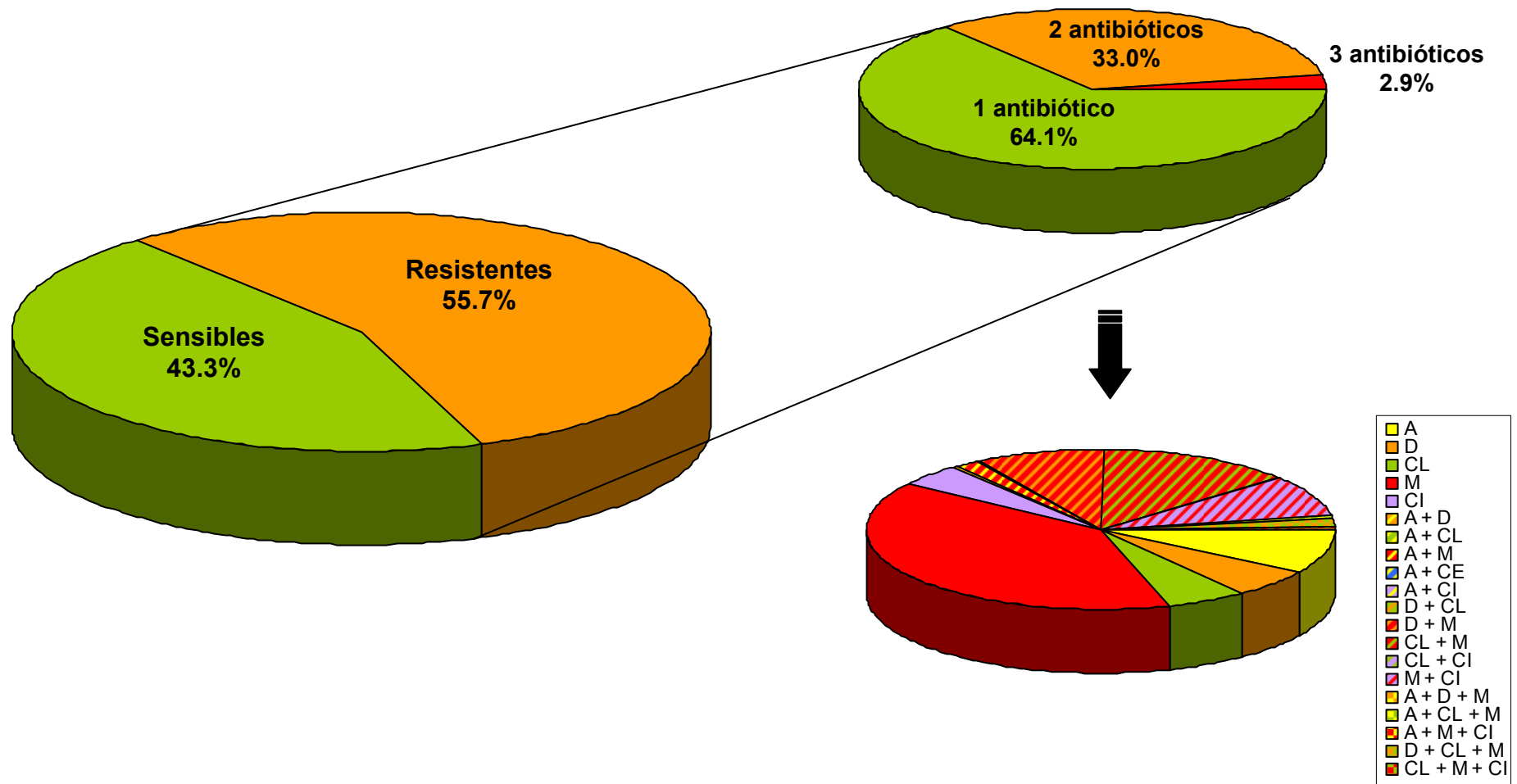


FIGURA 4. Proporción de cepas sensibles, resistentes y multi-resistentes (n= 1,679) aisladas a partir de muestras de placa dentobacteriana subgingival de sujetos Mexicanos (N=20). La resistencia fue determinada en base a los siguientes puntos de corte ($\mu\text{g/ml}$): ciprofloxacina y clindamicina 4, amoxicilina y doxiciclina 8, metronidazol 16 y cefotaxima 32.

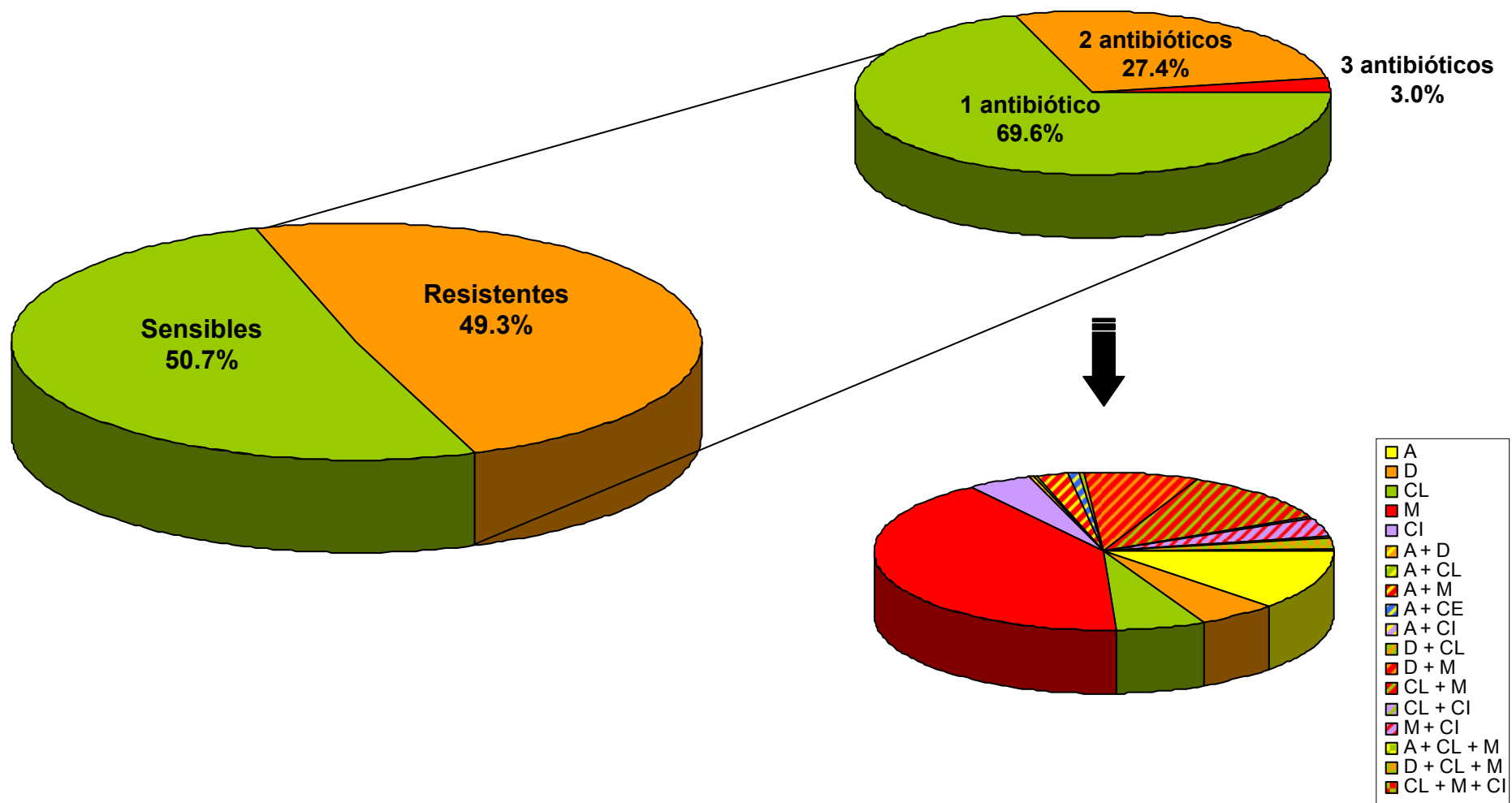


FIGURA 5. Proporción de cepas identificadas (n= 948) sensibles, resistentes y multi-resistentes aisladas a partir de muestras de placa dentobacteriana subgingival de sujetos Mexicanos (N=20). La resistencia fue determinada en base a los siguientes puntos de corte ($\mu\text{g/ml}$): ciprofloxacina y clindamicina 4, amoxicilina y doxiciclina 8, metronidazol 16 y cefotaxima 32.

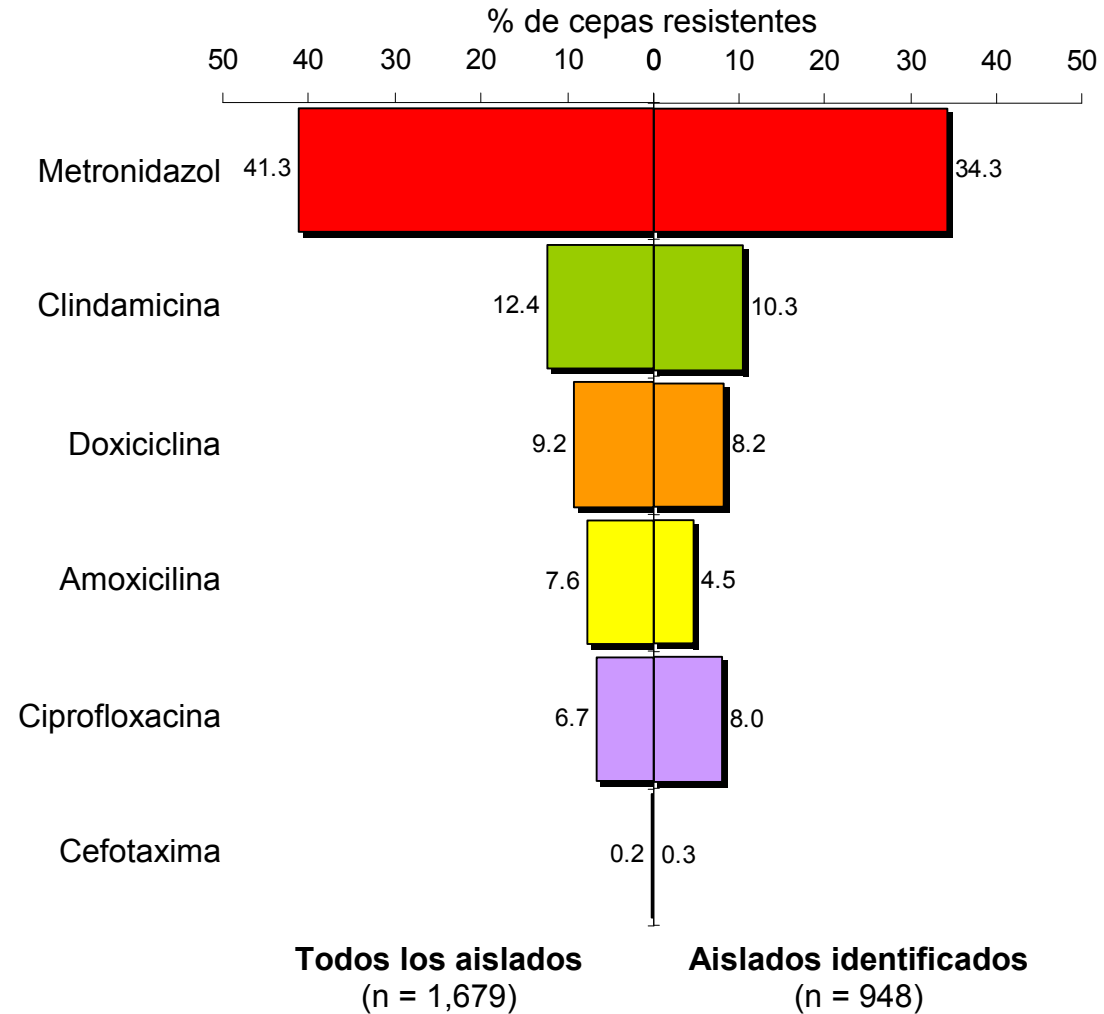


FIGURA 6. Porcentaje promedio (\pm EEM) del total de cepas aisladas (n= 1,679) y total de cepas identificadas (n= 948) resistentes a 6 antibióticos, provenientes de muestras de placa dentobacteriana subgingival. El porcentaje promedio de cepas resistentes fue determinado en base al total de cepas evaluadas en cada caso. La resistencia fue determinada en base a los siguientes puntos de corte (μ g/ml): ciprofloxacina y clindamicina 4, amoxicilina y doxiciclina 8, metronidazol 16 y cefotaxima 32.

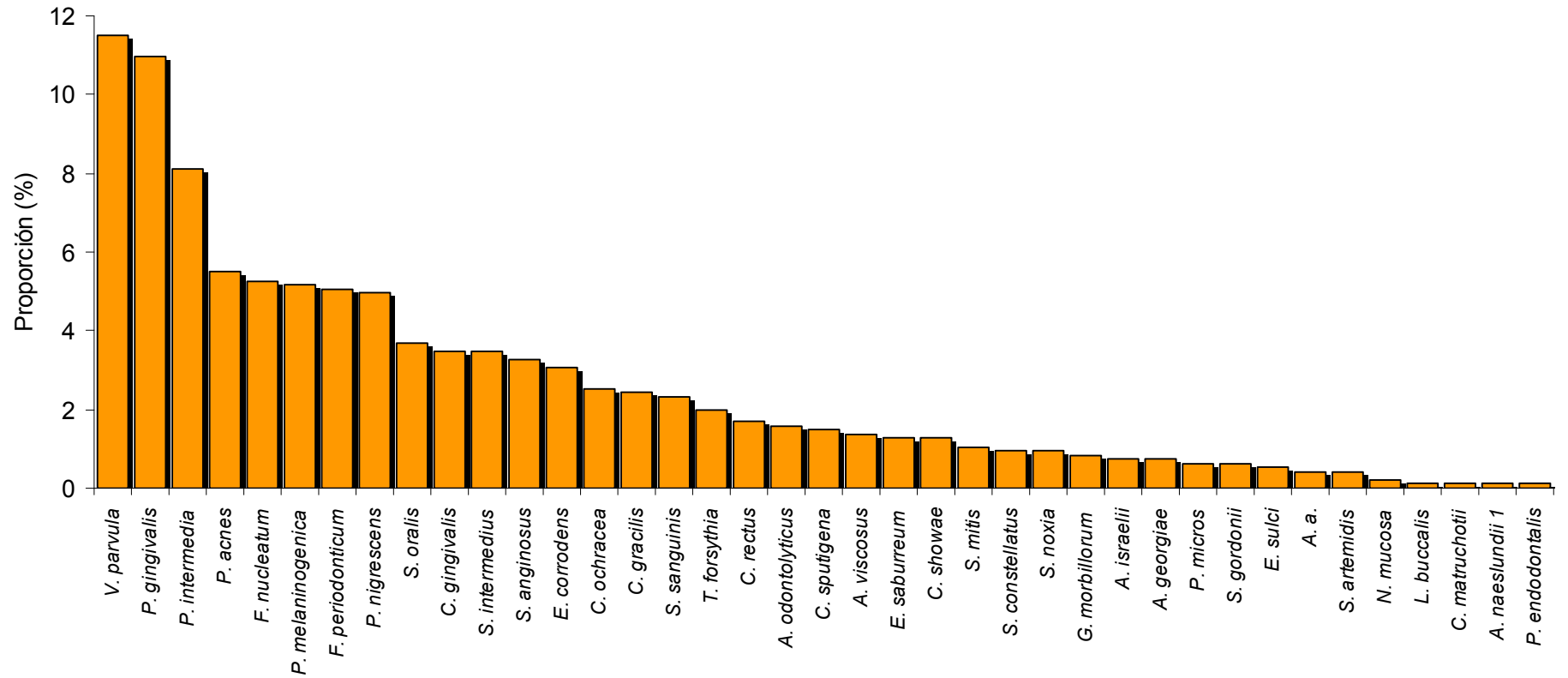


FIGURA 7. Proporción de especies bacterianas identificadas mediante la técnica de “checkerboard” para hibridaciones DNA-DNA a partir de 948 aislados provenientes de placa dentobacteriana subgingival de sujetos Mexicanos (N= 20).

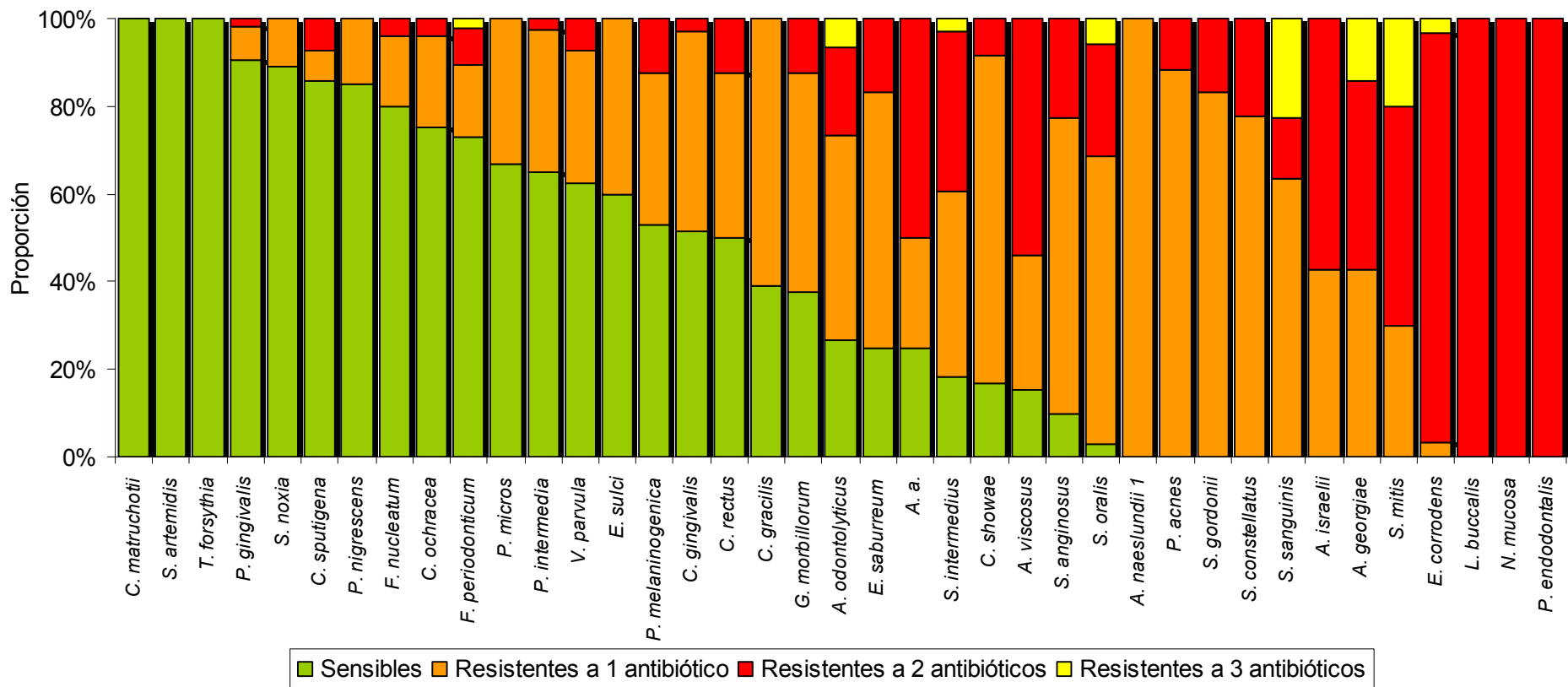


FIGURA 8. Proporción de 39 especies bacterianas que mostraron susceptibilidad, resistencia y multiresistencia en cepas aisladas a partir de muestras de placa dentobacteriana subgingival (n=948).

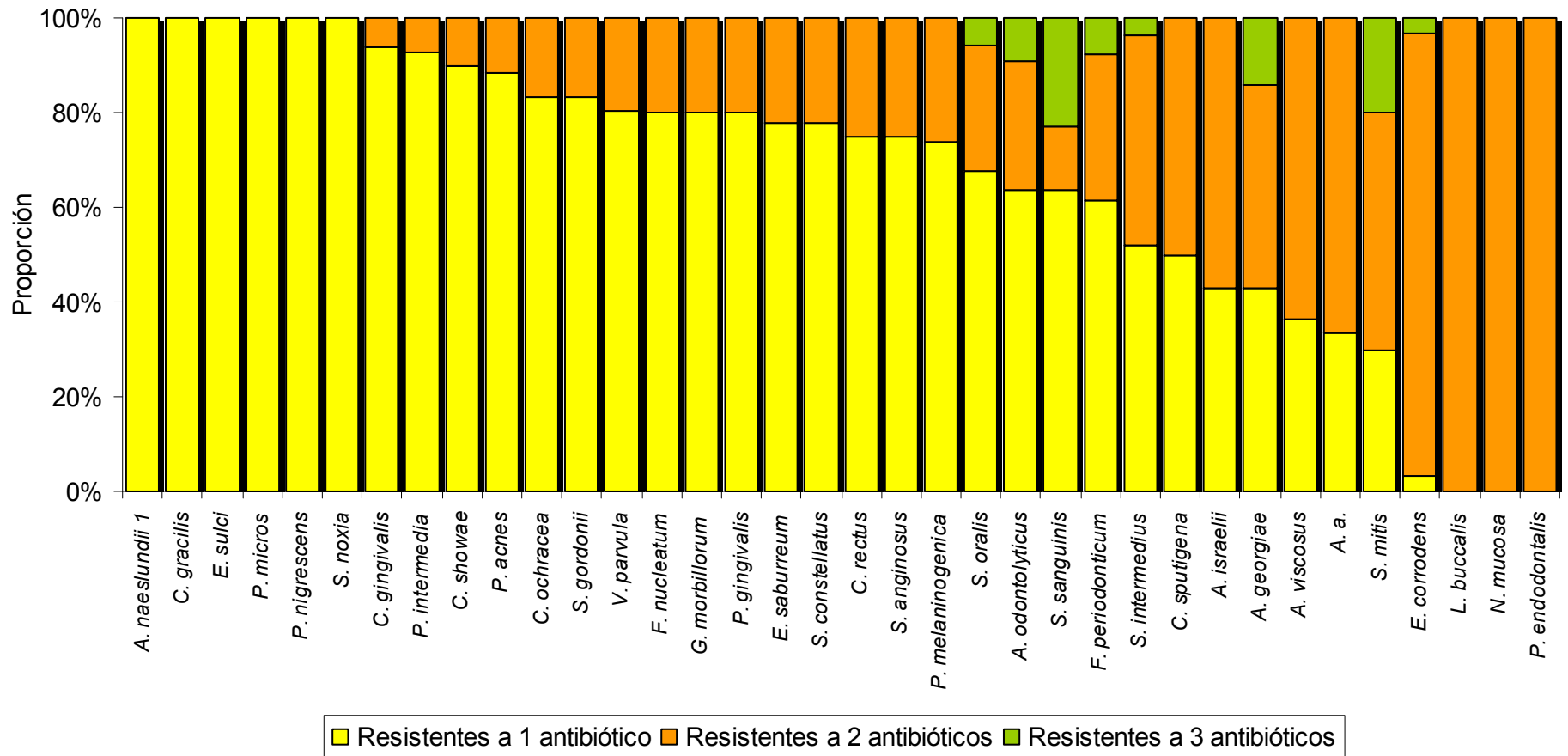


FIGURA 9. Proporción de resistencia y multiresistencia en 39 especies bacterianas aisladas a partir de muestras de placa dentobacteriana subgingival (n=467).

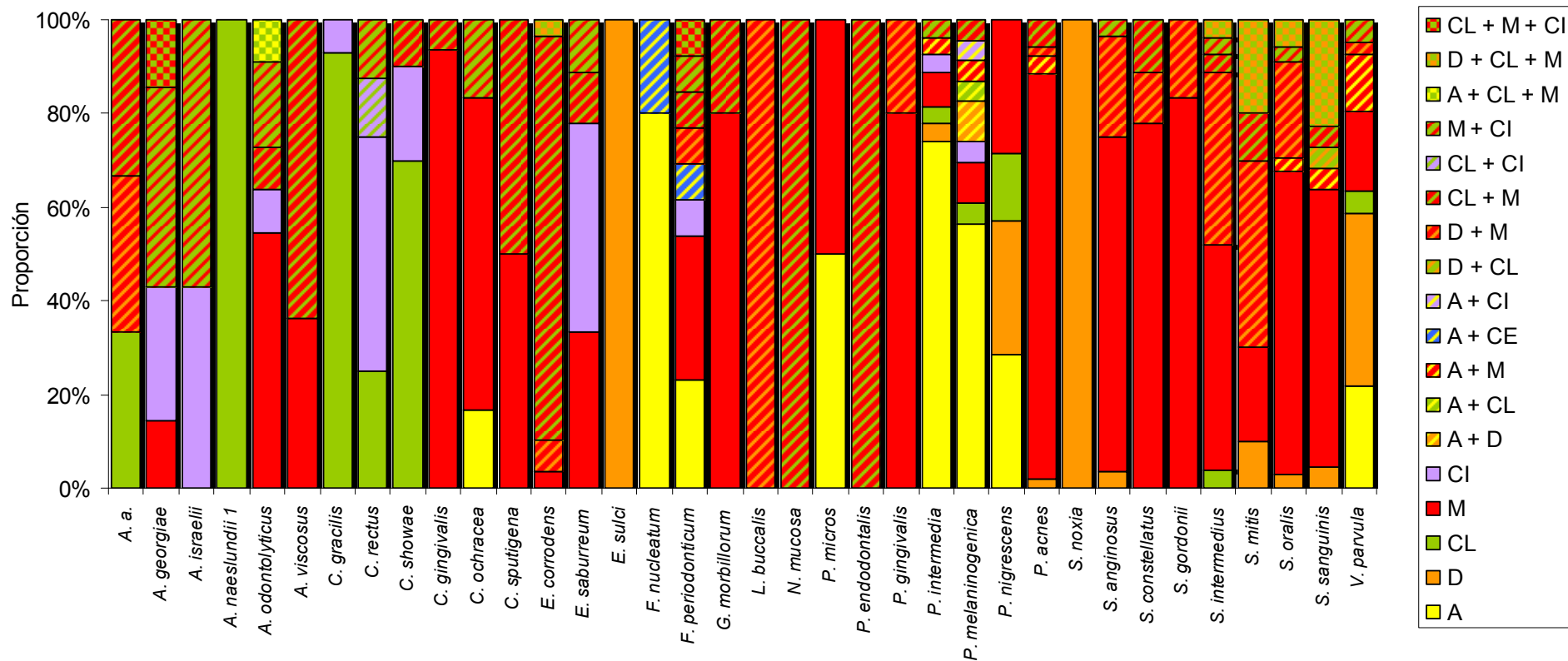


FIGURA 10. Proporción de resistencia a diferentes antibióticos en 36 especies bacterianas aisladas a partir de muestras de placa dentobacteriana subgingival. (n=467).

VIII. ANEXOS

A. EXPERIMENTOS PRELIMINARES

Con el fin de estandarizar la metodología utilizada en el presente estudio, se realizaron los siguientes experimentos para: a) determinar el período de actividad de los antibióticos una vez que son adicionados al medio de cultivo y durante el período de incubación anaeróbica, b) determinar las concentraciones inhibitorias mínimas (CMI) de 40 cepas de referencia utilizando diferentes antibióticos y, c) justificar el uso del agar *Mycoplasma* en este estudio, comparándolo con el agar *Brucella*, recomendado por el CLSI (antes llamado NCCLS) para la determinación de susceptibilidad antimicrobiana en bacterias anaeróbicas (NCCLS, 2001).

Determinación del periodo de actividad de los antibióticos dentro del agar

El experimento comprendió la utilización de 2 cepas de referencia adquiridas como cultivos liofilizados del American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA): *A. israelii* (12102) y *P. gingivalis* (33277). Las cepas se crecieron en placas con medio HK (agar base para *Mycoplasma* (Becton Dickinson, Microbiology Systems, BBL®, Sparks, MD, USA) suplementado con 5% de sangre de carnero defibrinada (Laboratorios Microlab S.A. de C.V., México, D.F.), 0.3 µg/ml de menadione (vitamina K, Sigma-Aldrich Química, S.A. de C.V., Toluca, México) y 5 µg/ml de hemina (Sigma) y fueron incubadas en una cámara de anaerobiosis con ambiente de 80% N₂, 10% CO₂ y 10% H₂ a 35°C durante 7 días. Una vez que se comprobó la pureza de los cultivos, se realizó la secuencia de las transferencias que se describe en la **Figura 1 (anexo A)**. Todas las transferencias se realizaron por

duplicado en placas con medio HK sin antibiótico y con 16 µg/ml de amoxicilina (Sigma) y 16 µg/ml de doxiciclina (Sigma) durante 28 días consecutivos inoculando cada placa con 100 µl de células suspendidas en caldo enriquecido (caldo base para *Mycoplasma* (Becton Dickinson), 5 µg/ml de hemina (Sigma) y 0.3 µg/ml de menadione (Sigma)) ajustadas a una densidad óptica (DO) = 1 a 600 nm en un espectrofotómetro. Cada día, a partir del día 22 hasta el fin del experimento, se llevó a cabo un registro detallado del crecimiento de cada cepa en las placas de agar adicionadas con amoxicilina o con doxiciclina.

Durante los días de incubación (días 15 a 28 experimentales), no existió crecimiento de alguna de las dos cepas de referencia (*A. israelii* y *P. gingivalis*) sembradas en medio de cultivo adicionado con 16 µg/ml de amoxicilina o doxiciclina preparado de 1 a 14 días previos a su inoculación. Por el contrario, las mismas cepas sembradas en placas control, que no contenían antibiótico, mostraron abundante crecimiento (**Tabla1, anexo A**). Estos resultados demuestran que la actividad antimicrobiana de los dos antibióticos analizados se mantiene por lo menos durante 14 días, una vez que son adicionados al medio de cultivo.

Determinación de concentraciones mínimas inhibitorias de cepas de referencia

En la **Tabla 2 (anexo A)** se presenta la lista de las 40 cepas de referencia del ATCC que fueron utilizadas para determinar las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) a los siguientes antibióticos: amoxicilina, ciprofloxacina, clindamicina, doxiciclina, eritromicina y metronidazol (Sigma).

Todas las cepas fueron sembradas sobre placas de agar enriquecido NHK (agar base para *Mycoplasma* suplementado con 5% de sangre de carnero defibrinada, 10 µg/ml de ácido N-acetilmurámico (Sigma), 0.3 µg/ml de menadione y 5 µg/ml de hemina e incubadas en condiciones anaeróbicas a 35°C. Las cepas fueron suspendidas en tubos individuales con caldo enriquecido y diluidas hasta obtener una DO = 1 a 600 nm en un espectrofotómetro. Posteriormente, 100 µl de cada suspensión fueron transferidos por duplicado a placas con agar enriquecido sin antibiótico, con 7 diferentes concentraciones de amoxicilina, ciprofloxacina, clindamicina, doxiciclina y eritromicina (0.5, 1, 2, 4, 8, 16 y 32 µg/ml) y 9 diferentes concentraciones metronidazol (0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64 y 128 µg/ml). Las placas fueron incubadas a 35°C por 7 días en condiciones anaeróbicas e inspeccionadas visualmente para determinar crecimiento o inhibición de cada cepa en las diferentes concentraciones de los antibióticos.

La **Tabla 3 (anexo A)** resume los resultados obtenidos al analizar las 40 cepas de referencia. La resistencia fue determinada tomando en consideración los siguientes puntos de corte sugeridos por el CLSI (NCCLS, 2001), amoxicilina (8 µg/ml), clindamicina (4 µg/ml), doxiciclina (8 µg/ml), eritromicina (4 µg/ml) y metronidazol (16 µg/ml) y ciprofloxacina (4 µg/ml) (Snydman, et al., 2000).

Seis de las 40 cepas de referencia (15%) fueron sensibles a todos los antimicrobianos (*C. rectus*, *C. ochracea*, *E. sulci*, *P. gingivalis*, *P. intermedia* y *P. nigrescens*). El 42.5% de las cepas fueron resistentes a un solo antibiótico incluyendo *A. viscosus*, *C. gingivalis*, *C. sputigena*, *Eubacterium saburreum*, *F. nucleatum* ss *nucleatum*, *F. nucleatum* ss *polymorphum*, *Gemella morbillorum*, *P.*

melaninogenica, *P. acnes*, *S. anginosus*, *S. gordonii*, *S. intermedius*, *S. mitis*, *S. oralis*, *S. sanguinis*, *T. forsythia* y *V. parvula*. 17 cepas de referencia (42.5%) fueron multi-resistentes; de las cuales, *A. actinomycetemcomitans* a, *A. israelii*, *A. naeslundii* 1, *A. odontolyticus*, *C. gracilis*, *C. showae*, *C. matruchotii*, *F. nucleatum* ss *vincentii*, *F. periodonticum*, *L. buccalis*, *P. micros*, *S. noxia* y *S. constellatus* mostraron resistencia a diferentes combinaciones de dos antibióticos, mientras que *A. actinomycetemcomitans* b, *E. corrodens*, *N. mucosa* y *P. endodontalis* presentaron resistencia a tres antimicrobianos que en todos los casos fueron clindamicina, eritromicina y metronidazol. Ninguna de las cepas de referencia evaluadas mostró resistencia a 4 o más antibióticos simultáneamente.

Comparación de dos medios de cultivo para la determinación de concentraciones mínimas inhibitorias en especies bacterianas anaeróbicas

Este experimento se realizó con el propósito de comparar la efectividad de los antibióticos en dos diferentes medios de cultivo, agar *Brucella* recomendado por el CLSI (NCCLS, 2001) y agar *Mycoplasma* utilizado en este estudio. En la **Tabla 4 (anexo A)** se presenta la lista de las cepas de referencia del ATCC y de las cepas bacterianas aisladas a partir de muestras de placa dentobacteriana subgingival de los sujetos de estudio que fueron utilizadas para determinar y comparar las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) en presencia de clindamicina y metronidazol en medio de agar enriquecido (agar *Mycoplasma* y agar *Brucella*).

Todas las cepas fueron sembradas sobre placas de agar enriquecido (agar *Mycoplasma* y agar *Brucella* (Becton Dickinson) suplementado con 5% de sangre de

carnero desfibrinada (Laboratorios Microlab), 10 µg/ml de ácido N-acetilmurámico (Sigma), 0.3 µg/ml de menadione (vitamina K, Sigma) y 5 µg/ml de hemina (Sigma)) e incubadas en condiciones anaeróbicas a 35°C. Las cepas fueron suspendidas en tubos individuales con caldo enriquecido y diluidas hasta obtener una DO = 1 a 600 nm en un espectrofotómetro. 100 µl de cada suspensión fueron transferidos por duplicado a placas con agar enriquecido de *Mycoplasma* y *Brucella* sin antibiótico y con 7 diferentes concentraciones de clindamicina (0.5, 1, 2, 4, 8, 16 y 32 µg/ml) y 9 diferentes concentraciones metronidazol (0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64 y 128 µg/ml). Las placas fueron incubadas a 35°C por 7 días en condiciones anaeróbicas e inspeccionadas visualmente para determinar crecimiento o inhibición de cada cepa en las diferentes concentraciones de los antibióticos.

La **Tabla 5 (Anexo A)** resume los resultados obtenidos en este experimento. Todas las cepas analizadas mostraron crecimiento normal en las placas control (sin antibiótico) de agar *Mycoplasma* y agar *Brucella*. En ambos medios de cultivo las CMI's obtenidas con en las cepas de referencia fueron menores comparadas con la misma especie pero obtenida de aislados clínicos. Por ejemplo, *A. actinomycetemcomitans* serotipo b (ATCC 43718) tuvo una CMI de <0.5 µg/ml en presencia tanto de clindamicina como de metronidazol en ambos medios de cultivo, mientras que el aislado clínico de *A. actinomycetemcomitans* (A15a-23) tuvo una CMI de 32 y 4 µg/ml en presencia de clindamicina y metronidazol, respectivamente en agar *Mycoplasma*, mientras que en presencia de clindamicina o metronidazol en agar *Brucella* fue de 32 y 8 µg/ml, respectivamente. Otras cepas de referencia evaluadas fueron *P. endodontalis*, *S. noxia* y *T. forsythia*, así como un aislado clínico de *C.*

rectus, las CMI's obtenidas en estas cepas fueron prácticamente las mismas cuando fueron comparados ambos medios de cultivo.

Estos resultados justifican el uso del agar *Mycoplasma* utilizado en la realización del presente proyecto para la determinación de susceptibilidad/resistencia antimicrobiana en bacterias anaeróbicas.

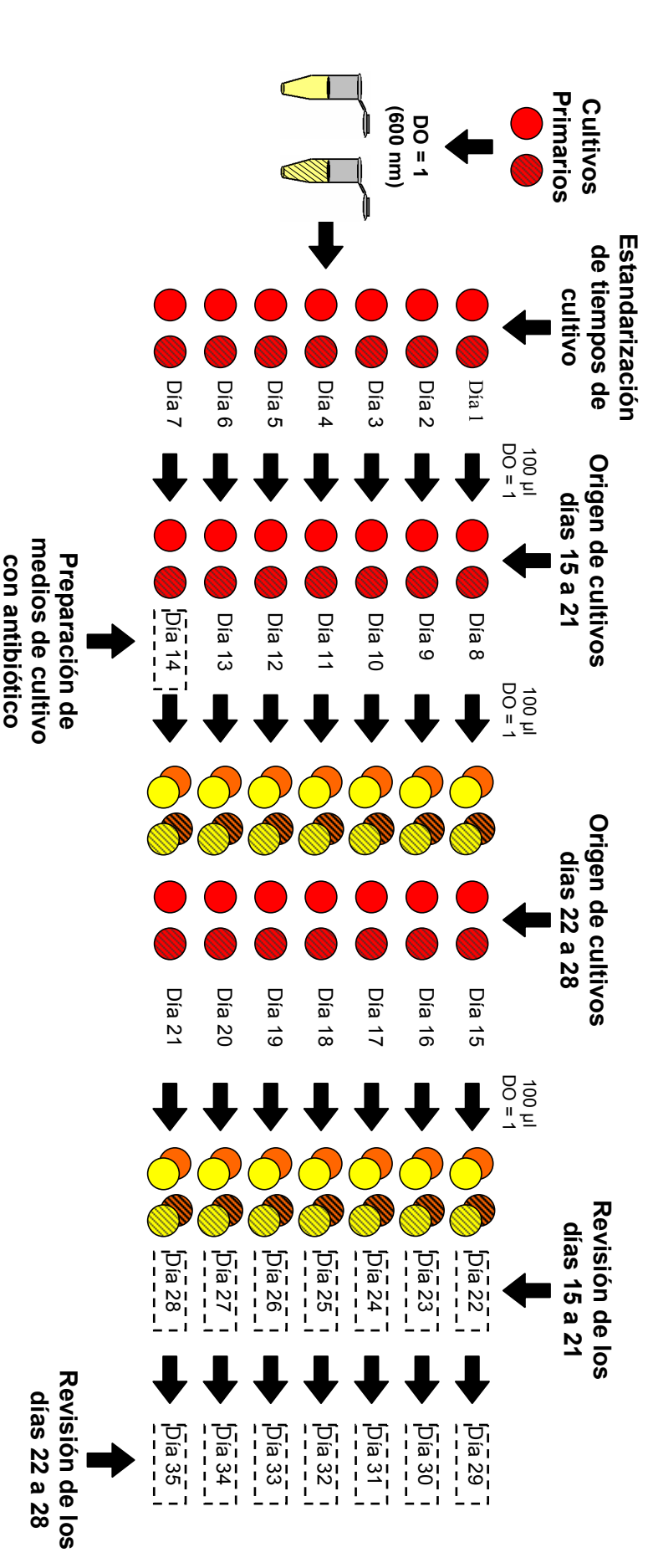


FIGURA 1 (anexo A). Diseño y secuencia de experimento para determinar el período de actividad de la amoxicilina y doxiciclina dentro del agar. Todas las transferencias en medio de cultivo con antibiótico fueron realizadas por duplicado.

TABLA 1 (anexo A). Período de actividad de los antibióticos.

Cepa*	Día	Amox (16µl) [†]	Dox (16µl) [†]	Control [†]	Día	Amox (16µl) [†]	Dox (16µl) [†]	Control [†]	Crecimiento	
									Crecimiento	
<i>P. gingivalis</i>	15	-	-	+	22	-	-	+	Crecimiento	
<i>A. israelii</i>		-	-	+		-	-	+		
<i>P. gingivalis</i>	16	-	-	+	23	-	-	+	Crecimiento	
<i>A. israelii</i>		-	-	+		-	-	+		
<i>P. gingivalis</i>	17	-	-	+	24	-	-	+	Crecimiento	
<i>A. israelii</i>		-	-	+		-	-	+		
<i>P. gingivalis</i>	18	-	-	+	25	-	-	+	Crecimiento	
<i>A. israelii</i>		-	-	+		-	-	+		
<i>P. gingivalis</i>	19	-	-	+	26	-	-	+	Crecimiento	
<i>A. israelii</i>		-	-	+		-	-	+		
<i>P. gingivalis</i>	20	-	-	+	27	-	-	+	Crecimiento	
<i>A. israelii</i>		-	-	+		-	-	+		
<i>P. gingivalis</i>	21	-	-	+	28	-	-	+	Crecimiento	
<i>A. israelii</i>		-	-	+		-	-	+		

* Número de referencia del American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA); *Porphyromonas gingivalis* (33277); *Actinomyces israelii* (12102).

[†] Todas las placas se hicieron por duplicado.

TABLA 2 (anexo A). Cepas de referencia utilizadas para la determinación de CMLs.

Cepa	Ref.*	Cepa	Ref.*
<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i> serotipo a	43717	<i>Gemella morbillorum</i>	27824
<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i> serotipo b	43718	<i>Leptotrichia buccalis</i>	14201
<i>Actinomyces israelii</i>	12102	<i>Peptostreptococcus micros</i>	33270
<i>Actinomyces naeslundii</i> serotipo 1	12104	<i>Neisseria mucosa</i>	19696
<i>Actinomyces odontolyticus</i>	17929	<i>Porphyromonas endodontalis</i>	35406
<i>Actinomyces viscosus</i>	43146	<i>Porphyromonas gingivalis</i>	33277
<i>Campylobacter gracilis</i>	33236	<i>Prevotella intermedia</i>	25611
<i>Campylobacter rectus</i>	33238	<i>Prevotella melaninogenica</i>	25845
<i>Campylobacter showae</i>	51146	<i>Prevotella nigrescens</i>	33563
<i>Capnocytophaga gingivalis</i>	33624	<i>Propionibacterium acnes</i>	6919
<i>Capnocytophaga ochracea</i>	27872	<i>Selenomonas noxia</i>	43541
<i>Capnocytophaga sputigena</i>	33612	<i>Streptococcus anginosus</i>	33397
<i>Corynebacterium matruchotii</i>	14266	<i>Streptococcus constellatus</i>	27823
<i>Eikenella corrodens</i>	23834	<i>Streptococcus gordonii</i>	10558
<i>Eubacterium saburreum</i>	33271	<i>Streptococcus intermedius</i>	27335
<i>Eubacterium sulci</i>	35585	<i>Streptococcus mitis</i>	49456
<i>Fusobacterium nucleatum</i> ss <i>nucleatum</i>	25586	<i>Streptococcus oralis</i>	35037
<i>Fusobacterium nucleatum</i> ss <i>polymorphum</i>	10953	<i>Streptococcus sanguinis</i>	10556
<i>Fusobacterium nucleatum</i> ss <i>vincentii</i>	49256	<i>Tannerella forsythia</i>	43037
<i>Fusobacterium periodonticum</i>	33693	<i>Veillonella parvula</i>	10790

* Número de referencia del American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA).

TABLA 3 (anexo A). Concentraciones mínimas inhibitorias de 40 cepas de referencia a 6 antibióticos.

Cepa	Amoxicilina		Ciprofloxacina		Clindamicina		Doxiciclina		Eritromicina		Metronidazol	
	CMiE	S/R§	CMiE	S/R§	CMiE	S/R§	CMiE	S/R§	CMiE	S/R§	CMiE	S/R§
<i>A. actinomycetemcomitans a</i>	2	S	0.5	S	>32	R	8	S	>32	R	8	S
<i>A. actinomycetemcomitans b</i>	4	S	0.5	S	>32	R	4	S	>32	R	64	R
<i>A. israelii</i>	0.5	S	32	R	4	S	0.5	S	1	S	128	R
<i>A. naeslundii</i>	0.5	S	4	S	8	R	0.5	S	0.5	S	128	R
<i>A. odontolyticus</i>	0.5	S	32	R	2	S	1	S	0.5	S	>128	R
<i>A. viscosus</i>	0.5	S	2	S	2	S	0.5	S	0.5	S	>128	R
<i>C. gracilis</i>	1	S	0.5	S	16	R	2	S	16	R	2	S
<i>C. rectus</i>	1	S	0.5	S	2	S	0.5	S	2	S	2	S
<i>C. showae</i>	0.5	S	0.5	S	8	R	0.5	S	4	S	>128	R
<i>C. gingivalis</i>	0.5	S	0.5	S	0.5	S	0.5	S	0.5	S	32	R
<i>C. ochracea</i>	1	S	0.5	S	0.5	S	0.5	S	4	S	8	S
<i>C. sputigena</i>	1	S	0.5	S	0.5	S	0.5	S	2	S	32	R
<i>C. matruchotii</i>	0.5	S	0.5	S	8	R	0.5	S	0.5	S	>128	R
<i>E. corrodens</i>	2	S	0.5	S	>32	R	1	S	16	R	>128	R
<i>E. saburreum</i>	0.5	S	32	R	0.5	S	0.5	S	1	S	0.5	S
<i>E. sulci</i>	0.5	S	1	S	0.5	S	0.5	S	4	S	1	S
<i>F. nucleatum ss nucleatum</i>	0.5	S	1	S	1	S	0.5	S	32	R	0.5	S
<i>F. nucleatum ss polymorphum</i>	0.5	S	2	S	0.5	S	0.5	S	32	R	0.5	S
<i>F. nucleatum ss vincentii</i>	16	R	2	S	0.5	S	0.5	S	32	R	0.5	S
<i>F. periodonticum</i>	32	R	2	S	0.5	S	0.5	S	32	R	0.5	S
<i>G. morbillorum</i>	0.5	S	0.5	S	0.5	S	0.5	S	1	S	>128	R
<i>L. buccalis</i>	0.5	S	16	R	0.5	S	0.5	S	>32	R	1	S
<i>M. micros</i>	0.5	S	1	S	2	S	0.5	S	16	R	>128	R

(Continúa en la siguiente página)

TABLA 3 (anexo A). (Continuación).

Cepa	Amoxicilina		Ciprofloxacina		Clindamicina		Doxiciclina		Eritromicina		Metronidazol	
	CMi£	S/R§	CMi£	S/R§	CMi£	S/R§	CMi£	S/R§	CMi£	S/R§	CMi£	S/R§
<i>N. mucosa</i>	2	S	0.5	S	>32	R	0.5	S	8	R	>128	R
<i>P. gingivalis</i>	0.5	S	0.5	S	0.5	S	0.5	S	4	S	0.5	S
<i>P. endodontalis</i>	4	S	0.5	S	>32	R	4	S	>32	R	64	R
<i>P. intermedia</i>	0.5	S	1	S	0.5	S	0.5	S	1	S	0.5	S
<i>P. melaninogenica</i>	0.5	S	1	S	0.5	S	0.5	S	>32	R	0.5	S
<i>P. nigrescens</i>	0.5	S	1	S	0.5	S	0.5	S	2	S	1	S
<i>P. acnes</i>	0.5	S	0.5	S	0.5	S	0.5	S	1	S	>128	R
<i>S. noxia</i>	0.5	S	1	S	0.5	S	0.5	S	>32	R	>128	R
<i>S. anginosus</i>	0.5	S	4	S	2	S	2	S	1	S	>128	R
<i>S. constellatus</i>	0.5	S	1	S	2	S	32	R	1	S	>128	R
<i>S. gordonii</i>	0.5	S	2	S	2	S	0.5	S	1	S	64	R
<i>S. intermedius</i>	1	S	2	S	2	S	0.5	S	1	S	>128	R
<i>S. mitis</i>	0.5	S	4	S	2	S	0.5	S	2	S	>128	R
<i>S. oralis</i>	0.5	S	4	S	1	S	0.5	S	2	S	>128	R
<i>S. sanguinis</i>	1	S	4	S	2	S	0.5	S	1	S	>128	R
<i>T. forsythia</i>	8	S	0.5	S	2	S	0.5	S	4	S	>128	R
<i>V. parvula</i>	0.5	S	1	S	0.5	S	1	S	>32	R	16	S

£ µg/ml. § S: sensible, R: resistente; en base a los siguientes puntos de corte (µg/ml): amoxicilina 8, ciprofloxacina 4, clindamicina 4, doxiciclina 8, eritromicina 4 y metronidazol 16.

TABLA 4 (anexo A). Cepas de referencia y aislados clínicos utilizados para la comparación de dos medios de cultivo en la determinación de CMI.

Cepa	Referencia
<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i> serotipo b	43718 *
<i>Campylobacter showae</i>	51146 *
<i>Eikenella corrodens</i>	23834 *
<i>Porphyromonas endodontalis</i>	35406 *
<i>Selenomonas noxia</i>	43541 *
<i>Tannerella forsythia</i>	43037 *
<i>Eikenella corrodens</i>	A8a-1 §
<i>Campylobacter showae</i>	A13b-16 §
<i>Campylobacter rectus</i>	A14a-31 §
<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i>	A15a-23 §
<i>Campylobacter showae</i>	A22b-38 §

* Número de referencia del American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA).

§ Código de aislado clínico.

TABLA 5 (anexo A). Comparación de dos medios de cultivo en la determinación de CMI.

Cepa	<i>Mycoplasma</i> agar [¶]			<i>Brucella</i> agar [¶]		
	Clindamicina (µg/ml)	Metronidazol (µg/ml)	Control	Clindamicina (µg/ml)	Metronidazol (µg/ml)	Control
<i>A. actinomycetemcomitans</i> b *	<0.5	<0.5	+	<0.5	<0.5	+
<i>C. showae</i> *	<0.5	<0.5	+	<0.5	<0.5	+
<i>E. corrodens</i> *	>32	64	+	16	64	+
<i>P. endodontalis</i> *	>32	>128	+	>32	>128	+
<i>S. noxia</i> *	<0.5	8	+	<0.5	8	+
<i>T. forsythia</i> *	>32	>128	+	16	>128	+
<i>A. actinomycetemcomitans</i> §	32	4	+	32	8	+
<i>C. showae</i> §	<0.5	2	+	<0.5	2	+
<i>C. showae</i> §	32	>128	+	32	>128	+
<i>E. corrodens</i> §	>32	>128	+	>32	>128	+
<i>C. rectus</i> §	<0.5	<0.5	+	<0.5	<0.5	+

* Cepas de referencia del American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA).

§ Aislado clínico.

¶ Todas las placas se hicieron por duplicado

B. FORMATO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Investigador Responsable: Dra. Laurie Ann Ximénez-Fyvie.

Clínicos Responsables: Dra. Velia Jacobo-Soto.

Dra. Argelia Almaguer-Flores.

Institución: Laboratorio de Genética Molecular

División de Estudios de Posgrado e Investigación

Facultad de Odontología, UNAM

Teléfonos: 5622-5565 (horas y días hábiles)

04455-2699-7530 (emergencias)

Título de los Proyectos:

Factores microbiológicos y genéticos relacionados con las enfermedades periodontales en México.

(CONACYT # J-34909-M)

Influencia de niveles creviculares de citocinas sobre las enfermedades periodontales en México.

(DGAPA # IN205402)

Espiroquetas periodontales cultivables y no cultivables.

(NIH # DE-10374, NIDCR)

INVITACIÓN A PARTICIPAR: Usted está invitado a participar en cualquiera de tres estudios de investigación que analizan las bacterias de la boca así como las características genéticas y de defensa de las personas que padecen enfermedades de las encías. El primer estudio investiga la relación de algunas bacterias y de la resistencia que tienen las mismas a diferentes antibióticos con las enfermedades de las encías, así como las características genéticas de las personas que padecen

dichas enfermedades. El segundo estudio investiga la relación entre algunas características del sistema de defensa de las personas y el estado de salud de las encías. El tercer estudio investiga el papel que juegan algunas bacterias específicas en las enfermedades de las encías.

PROPÓSITO: Usted debe entender que los objetivos del primer estudio son determinar la presencia y cantidad de bacterias que se encuentran en la boca de personas con diferentes tipos de enfermedades de las encías, determinar la resistencia que tienen dichas bacterias a varios antibióticos y comparar las características genéticas entre personas con y sin enfermedades de las encías. El segundo estudio tiene por objetivo comparar la magnitud de la respuesta del sistema de defensa entre personas con y sin enfermedades de las encías y el tercer estudio tiene por objetivo determinar si los tipos de unas bacterias llamadas espiroquetas son diferentes entre personas con y sin enfermedades de las encías.

PROCEDIMIENTOS: Usted debe entender que para participar en estos estudios debe haber nacido en la República Mexicana, debe encontrarse en buen estado general de salud, debe tener por lo menos 20 dientes naturales en la boca, no puede haber recibido ningún tipo de tratamiento periodontal en el pasado, no puede haber recibido una limpieza dental profesional en el último mes y no puede haber tomado ningún tipo de antibiótico en los últimos 3 meses. Asimismo, en el caso de ser mujer, no puede estar embarazada ni lactando.

Usted debe entender que su participación en estos estudios de investigación requiere uno o más de los siguientes procedimientos:

- La realización de una evaluación periodontal completa, la cual consistirá en medir la profundidad de las pequeñas “bolsas” que se encuentran entre sus dientes y sus encías. Estas medidas serán tomadas con un instrumento especial llamado sonda que será introducido en dichas “bolsas” en 6 lugares diferentes alrededor de cada diente de su boca. Este es un procedimiento de rutina ampliamente utilizado en la práctica dental. Además de lo anterior, se le realizará una evaluación general de la salud de sus encías para saber si sangran, si están inflamadas, si están enrojecidas, etc.
- La obtención de algunos de sus datos generales y médico, lo cual consistirá en el llenado de una historia clínica con preguntas que le serán leídas por el clínico que lo atienda y la medición de su peso, estatura, presión sanguínea, pulso y porcentaje de grasa corporal.
- La toma de un máximo de 36 muestras de placa dentobacteriana, lo cual se realizará tomando, con un instrumento dental, una muestra de la película blanquecina que se forma naturalmente sobre la superficie de sus dientes (placa dentobacteriana) de todos los dientes de su boca y en algunos casos, dos muestras de un mismo diente. Este procedimiento no es doloroso aunque en algunas ocasiones puede ser un poco molesto. Cada muestra de placa dentobacteriana será colocada dentro de un tubo.
- La toma de 1 muestra de 3 ml de sangre, lo cual se realizará siguiendo los mismos procedimientos que se llevan a cabo en laboratorios de diagnóstico clínico acreditados. Dicho procedimiento consiste en colocar una liga gruesa ligeramente apretada alrededor de su brazo para facilitar la visualización de

sus venas. Posteriormente, se introduce una aguja a una vena de alguno de sus brazos y se deposita la sangre en un tubo de vidrio conforme sale de la vena. La liga y aguja serán retiradas y el sitio de punción será cubierto con un curita una vez que el clínico determine que ha dejado de sangrar. Este procedimiento puede causarle dolor o molestias principalmente en el sitio de la punción.

- La toma de 4 muestras de fluido de sus encías, lo cual se realizará colocando una tira de papel en el espacio entre sus dientes y sus encías en 4 dientes de su boca. Este procedimiento no conlleva ninguna molestia. Cada muestra será medida en un aparato para determinar la cantidad de fluido y colocada en un tubo.

Usted debe entender que todos los procedimientos serán realizados en una sola visita que tendrá una duración máxima de 2 horas y que en estos estudios participarán aproximadamente 500 (quinientas) personas.

Usted debe entender que su participación en estos estudios no implica que será sometido a ningún tratamiento diferente o adicional a aquellos tratamientos que su clínico tratante considere necesarios para su caso.

RIESGOS: Usted debe entender que los riesgos que usted corre con su participación en estos estudios son mínimos. La evaluación periodontal que se le realizará es la misma que realiza cualquier dentista para determinar la salud de sus encías. Las muestras de placa se tomarán siguiendo procedimientos similares a los que se realizan durante una limpieza dental. Las muestras de fluido de sus encías no

conlleven ninguna molestia y la muestra de sangre puede causarle algunas molestias menores pero no duraderas en el sitio de la punción.

Debe entender que todos los procedimientos serán realizados por profesionales calificados y con experiencia, utilizando procedimientos de seguridad aceptados para la práctica clínica. Todo el personal que le atenderá utilizará guantes desechables, bata y cubrebocas para su propia protección y la de usted. Todos los materiales e instrumental que serán utilizados serán desechables y/o estarán esterilizados para su protección.

BENEFICIOS: Usted debe entender que su participación no le proporcionará ningún beneficio inmediato ni directo. Sin embargo, gracias a su participación, se obtendrá información nueva y más extensa sobre las causas y los factores que intervienen en las enfermedades de las encías en la población de México, lo cual podría ayudar en un futuro no sólo al mejor entendimiento de dichas enfermedades, sino también a la búsqueda y empleo de nuevos tratamientos para nuestra población.

COMPENSACIONES: Usted debe entender que no existe ninguna compensación monetaria por su participación pero que tampoco incurrirá en ningún gasto adicional.

CONFIDENCIALIDAD: Usted debe entender que toda la información que sea obtenida tanto en sus historiales clínicos como en el análisis de sus muestras será mantenida en estricta confidencialidad. Así mismo, si cualquier publicación resultara de estas investigaciones, no se le identificará jamás por nombre.

RENUNCIA/RETIRO: Usted debe saber que su participación en los estudios es totalmente voluntaria y que puede decidir no participar o retirarse del estudio en

cualquier momento, sin que esto represente algún perjuicio para su atención dental presente ni futura en las clínicas de la Facultad de Odontología de la UNAM. También debe entender que si cualquiera de los responsables de estos estudios decidieran no incluirle en las investigaciones, pueden hacerlo si así lo creyeran conveniente.

DERECHOS: Usted tiene el derecho de hacer preguntas y de que éstas le sean contestadas a su plena satisfacción. Puede hacer sus preguntas en este momento, antes de firmar la presente forma o en cualquier momento en el futuro. Si desea mayores informes acerca de su participación en estos estudios de investigación o sobre sus derechos como sujeto de estudio, puede contactar a cualquiera de los responsables llamando a los números de teléfono que se encuentran en la parte superior de la primera página de esta forma.

ACUERDO: Al firmar en los espacios provistos a continuación usted constata que ha leído y entendido esta forma de consentimiento y que está de acuerdo con su participación en estos estudios. Al terminar la visita recibirá una copia de esta forma.

_____ Nombre del Sujeto	_____ Firma del Sujeto	_____ Fecha (Día/mes/año)
_____ Nombre del Clínico Responsable	_____ Firma del Clínico Responsable	_____ Fecha (Día/mes/año)

C. ARTÍCULOS Y RESÚMENES PUBLICADOS

Artículos

Almaguer-Flores A, Moreno-Borjas JY, Salgado-Martínez A, Sánchez-Reyes MA, Alcántara-Maruri E, Ximénez-Fyvie LA. Proportion of antibiotic resistance in subgingival plaque samples from Mexican subjects. *J Clin Periodontol* 2006; 33 (10): 743-748.

Ximénez-Fyvie LA, **Almaguer-Flores A**, Jacobo-Soto V, Lara-Córdoba M, Sánchez-Vargas LO, Alcántara-Maruri E. Description of the subgingival microbiota of periodontally-untreated Mexican subjects. Chronic-periodontitis and periodontal health. *J Periodontol* 2006; 77 (3): 460-471.

Almaguer-Flores A, Jacobo-Soto V, Sánchez-Vargas LO, Lara-Córdoba M, Alcántara-Maruri E, Ximénez-Fyvie LA. Descripción de la microbiota subgingival de sujetos Mexicanos con periodontitis crónica. *Revista Odontológica Mexicana* 2005; 9 (1): 7-15.

Resúmenes

Almaguer-Flores A, Ximénez-Fyvie LA, Salgado-Martínez A, Moreno-Borjas Y. Antibiotic resistance in subgingival plaque samples of Mexican subjects. *J Dent Res* 2005; 84 special issue A: Abstract # 1137 (www.dentalresearch.org).

Almaguer-Flores A, Moreno-Borjas JY, Salgado-Martínez A, Sánchez-Reyes MA, Alcántara-Maruri E, Ximénez-Fyvie LA. Resistance to 6 antibiotics in subgingival isolates from Mexican subjects. *J Dent Res* 2006; 85 special issue A: Abstract # 1148 (www.dentalresearch.org).

Ximénez-Fyvie LA, **Almaguer-Flores A**, Jacobo-Soto V, Lara-Córdoba M, Alcántara-Maruri E. Subgingival microbiota of Mexican subjects with chronic- and aggressive-periodontitis. *J Dent Res* 2006; 85 special issue A: Abstract #1122 (www.dentalresearch.org).