

Trabajos Originales:

ESTUDIO DE LA SENSIBILIDAD A LOS ANTIMICROBIANOS DE PATÓGENOS PERIODONTALES

Recibido para arbitraje: 04/07/2007

Aceptado para publicación: 06/11/2007

• Testa M, Cárdenas IL

Cátedra de Microbiología y Parasitología. Facultad de Odontología. Universidad Nacional de Tucumán. Argentina.
mmtesta@uolsinectis.com.ar

RESUMEN

Considerando que las diversas fallas en la implementación de la terapia antimicrobiana para el tratamiento de las periodontitis conducen a la aparición de cepas resistentes a los mismos, el objetivo de este trabajo fue realizar un estudio preliminar del patrón de resistencia a los antimicrobianos de uso común en la clínica de cepas de *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* y *Fusobacterium nucleatum*. La prueba de sensibilidad a los antimicrobianos se realizó por el método de dilución en agar descrito por la NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards). Se probaron antimicrobianos seleccionados entre los más utilizados en la práctica clínica en nuestro medio: amoxicilina, clindamicina, doxiciclina, eritromicina, metronidazol y tetraciclina. Los resultados mostraron que el 100% de las cepas de *P. gingivalis* fueron resistentes a metronidazol y sensibles a tetraciclina, y un 33% sensibles a clindamicina. Las CIMs obtenidas para amoxicilina estuvieron entre 1 y 32 µg/ml, para doxiciclina entre 0,125 y 5 µg/ml y para eritromicina entre 8 y >32 µg/ml. En el caso de *P. intermedia*, se observó también un 100% de resistencia a metronidazol, un 67% de sensibilidad a tetraciclina y un 62,5% a clindamicina. Las CIMs para amoxicilina estuvieron entre 0,125 y 16 µg/ml, para doxiciclina entre 0,125 y 4 µg/ml, y para eritromicina entre 8 y >32 µg/ml. El 100% de las cepas de *F. nucleatum* resultaron sensibles a tetraciclina y resistentes a metronidazol, y el 25% fueron sensibles a clindamicina. En cuanto a amoxicilina, las CIMs estuvieron entre 0,125 y 16 µg/ml, para doxiciclina entre 0,125 y 4 µg/ml, y eritromicina entre 16 y >32 µg/ml. Los patrones de resistencia obtenidos con estas cepas mostraron en general mayores porcentajes de resistencia que lo reportado por otros autores, lo que podría deberse a la falta de políticas de control en el uso de antimicrobianos en nuestro país. Sin embargo, los valores de CIMs encontrados para el 50 y el 90% de las cepas coincide en general con lo reportado por la NCCLS, salvo en el caso de doxiciclina, donde nuestras CIMs son menores, y para la eritromicina, que son mayores en el caso de *P. gingivalis*.

Palabras Clave: antimicrobianos - patógenos periodontales - pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos

ABSTRACT

Taking into account that several failures in antibiotic treatments used in periodontitis are driving to the appearance of resistant strains, the aim of this work was to realize a preliminary study of the resistance pattern to commonly used antimicrobials of regional *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* and *Fusobacterium nucleatum* strains. Antibiotic susceptibility test was performed by NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards) agar dilution method. Proof antibiotics were selected among the most used in the clinical practice in our region: amoxicillin, clindamycin, doxycycline, erythromycin, metronidazole and tetracycline. The results showed that 100% of *P. gingivalis* strains were resistant to metronidazole and susceptible to tetracycline, and 33% susceptible to clindamycin. The MICs obtained for amoxicillin were between 1 and 32 µg/ml, for doxycycline between 0,125 and 5 µg/ml and for erythromycin between 8 and >32 µg/ml. In the case of *P. intermedia*, were also observed a 100% of resistance to metronidazole, 67% of susceptibility to tetracycline, and 62,5 % of susceptibility to clindamycin. The MICs for amoxicillin were between 0,125 y 16 µg/ml, for doxycycline between 0,125 and 4 µg/ml, and for erythromycin between 8 and >32 µg/ml. 100% of *F. nucleatum* strains were susceptible to tetracycline and resistant to metronidazole, and a 25% susceptible to clindamycin. MICs to amoxicillin were between 0,125 y 16 µg/ml, for doxycycline between 0,125 and 4 µg/ml, and to erythromycin between 16 and >32 µg/ml. Resistance patterns obtained with strains of our region showed higher percentages of resistance than those reported by other authors, which might owe to the lack of control politicise for the use of antimicrobials in our country. However, MICs values founded for the 50 and 90% of strains are similar to those reported by NCCLS, except in the case of doxycycline, where our MICs are lower, and for erythromycin that are higher with *P. gingivalis*.

Key words: antibiotics - periodontal pathogens - antibiotic susceptibility tests

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades periodontales abarcan un amplio rango de infecciones que involucran a los tejidos de sostén de los dientes y que se presentan en aquellos individuos que son más propensos a ellas, por ejemplo los diabéticos, inmunosuprimidos, fumadores, etc. (1). Existe así un acuerdo general en el sentido de que las enfermedades periodontales se desarrollan cuando una microbiota patógena presente en la placa subgingival actúa sobre un hospedador susceptible (2)(3)(4). Las bacterias consideradas como patógenos periodontales incluyen principalmente a bacilos gram-negativos anaerobios estrictos y a algunos anaerobios facultativos, la mayoría de estos formando parte integrante de la microbiota bucal suplementaria. Entre las numerosas especies que han sido estudiadas a lo largo de los años, las principalmente implicadas son *Aggregatibacter (Actinobacillus) actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythensis*, *Prevotella intermedia/nigrescens*, *Fusobacterium nucleatum* y *Treponema denticola*.

Tomada la enfermedad periodontal como una enfermedad infecciosa donde patógenos específicos actúan sobre un hospedador susceptible y donde una respuesta inmune adversa contribuye a la pérdida de inserción dentaria, podrían proponerse tres objetivos principales del tratamiento: 1) remoción o eliminación de los patógenos, 2) alteración de la respuesta del hospedador y 3) alteración de la sensibilidad del hospedador (5).

Esencialmente, el plan de tratamiento estándar en la actualidad está dirigido a la remoción o eliminación de la placa dental junto con la identificación y control de los factores de riesgo conocidos. Así, diversos estudios clínicos han llegado a la conclusión de que luego de la aplicación tanto de la técnica quirúrgica como la no quirúrgica para el tratamiento de la periodontitis pueden obtener los resultados deseados, es decir, reducir/eliminar las bolsas profundas y mantener, durante varios años, el hueso y los valores de inserción inalterados (1)(6)(7).

En la enfermedad periodontal establecida, las bacterias implicadas se encuentran principalmente en el lumen de la bolsa, sobre la superficie de la raíz y sobre el epitelio de la bolsa. Pero diversos estudios han revelado que estos microorganismos pueden también penetrar los tejidos blandos a una limitada profundidad (8), y dentro de los túbulos dentinarios a una considerable distancia (9). Más aún, existen otros sitios orales donde se pueden encontrar patógenos periodontales, especialmente en las amígdalas y la lengua, además de la saliva (10)(11)(12). Considerando esto, la distribución oral de las bacterias periodontopáticas podría limitar la eficacia de la terapia quirúrgica y más aún de la no quirúrgica, y sugiere la posibilidad de reinfección del periodonto después de un raspado de la superficie radicular con resultados exitosos (5).

De acuerdo con estas evidencias, sumadas al conocimiento de la existencia de pacientes que no responden a la terapia convencional (13), el uso de antimicrobianos sistémicos como terapia complementaria constituye una propuesta atractiva. Sin embargo, existen pocos datos disponibles sobre la sensibilidad de estas bacterias y no están establecidos fehacientemente los puntos de corte de resistencia por el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) (14). Por otra parte, la mayoría de los estudios se están llevando a cabo en Estados Unidos y Europa (15)(16)(17), y prácticamente no existen informes sobre el estado actual en nuestro país, menos aún en nuestra provincia.

Por este motivo, el objetivo de este trabajo fue realizar un estudio preliminar con cepas aisladas en la ciudad de San Miguel de Tucumán de *P. gingivalis*, *P. intermedia* y *F. nucleatum* frente a antimicrobianos de uso común en la clínica en nuestro medio (amoxicilina, clindamicina, doxiciclina, metronidazol y tetraciclina), y comparar estos resultados con los informes de otros autores en diferentes lugares del mundo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas probadas:

Se seleccionaron 15 cepas de patógenos periodontales del cepario de la Cátedra de Microbiología de la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional de Tucumán, provenientes de pacientes con periodontitis, infección pulpar y sanos, atendidos en la misma facultad, de las cuales ocho correspondían a *P. intermedia*, tres de *P. gingivalis* y cuatro de *F. nucleatum*. Estas cepas fueron aisladas e identificadas de acuerdo con el Wadsworth Anaerobic Bacteriology Manual, 5th Ed., y conservadas en medio leche descremada al 20% a -70°C hasta su utilización.

Prueba de sensibilidad a los antimicrobianos

Los antimicrobianos de prueba se seleccionaron entre los más utilizados en la práctica clínica en nuestro medio: amoxicilina, clindamicina, doxiciclina, eritromicina, metronidazol y tetraciclina (Sigma).

Las CIMs fueron determinadas bajo condiciones anaeróbicas a 37°C mediante el método de dilución en agar descrito por la NCCLS (14), usando agar Brucella suplementado con 5 µg/ml de hemina, 1 µg/ml de vitamina K y 5% de sangre laceda.

Se prepararon soluciones stock de cada uno de los antimicrobianos a probar en una concentración de 10 mg/ml, utilizando el solvente recomendado en cada caso y posterior dilución con agua destilada estéril. Se fraccionaron en alícuotas y se conservaron hasta su utilización a -70°C. A partir de estas soluciones se realizaron diluciones según el esquema propuesto por la NCCLS, abarcando el rango de concentraciones entre 1,25 a 320 µg/ml, con agua destilada estéril.

Las cepas fueron activadas cultivándolas en agar Brucella con 5 µg/ml de hemina, 1 µg/ml de vitamina K y 5% de sangre lacada, durante 48 o 72 horas, según el crecimiento observado, en condiciones anaeróbicas. Posteriormente se subcultivaron en caldo Schaedler con 1 µg/ml de vitamina K durante 48 horas y a partir de allí se prepararon los inóculos de cada cepa, ajustando su turbidez al tubo 0,5 de la escala de Mc Farland (aproximadamente 105 bacterias/ml). Se emplearon como controles las cepas propuestas por la NCCLS: *Bacteroides fragilis* ATCC 25285 y *Bacteroides thetaiotaomicron* ATCC 29741, las que fueron procesadas juntamente con las cepas problema. Se sembraron las placas y se leyeron a las 48 h. La CIM fue definida como la menor concentración antimicrobiana que inhibió el crecimiento visible de las bacterias.

RESULTADOS

En la Tabla N° 1 se exponen las CIMs obtenidas en este estudio con las cepas probadas. En la Tabla N° 2 se observan las categorías interpretativas o puntos de corte establecidos por la NCCLS para algunos de los antimicrobianos probados, así como los valores de CIM reportados para el 50 y el 90% de las cepas. Podemos observar que en el caso de amoxicilina, clindamicina, doxiciclina y tetraciclina, los valores de CIM obtenidos en este trabajo para el 50 y el 90% de las cepas se corresponden con los reportados. En el caso de eritromicina el valor de CIM para el 90% de las cepas de *P. intermedia* es >32 µg/ml; *P. gingivalis* mostró valores >32 µg/ml tanto para el 50 como para el 90% de las cepas. Los valores de CIM para el metronidazol sólo son equivalentes los obtenidos con *F. nucleatum*, ya que en el caso de *P. intermedia* obtuvimos >16 µg/ml para el 50% y >32 µg/ml para el 90%, y con *P. gingivalis* las CIMs tanto del 50 como del 90% de las cepas fueron >32 µg/ml.

Los resultados mostraron que en el caso de *P. gingivalis*, la totalidad de las cepas resultaron resistentes a metronidazol y sensibles a tetraciclina, y un 33% sensibles a clindamicina (Fig. N° 1). Para los antimicrobianos que no poseen categorías aprobadas por la NCCLS, las CIMs obtenidas fueron: amoxicilina entre 1 y 32 µg/ml doxiciclina entre 0.125 y 5 µg/ml y eritromicina entre 8 y mayor de 32 µg/ml. En el caso de *P. intermedia*, se observó un 100% de resistencia a metronidazol, un 67% de sensibilidad a tetraciclina y un 62,5% a clindamicina. Las CIMs para amoxicilina estuvieron entre 0,125 y 16 µg/ml, para doxiciclina entre 0.125 y 4 µg/ml, y para eritromicina entre 8 y mayor a 32 µg/ml. El 100% de las cepas de *F. nucleatum* resultaron sensibles a tetraciclina y resistentes a metronidazol, y el 25% sensibles a clindamicina. En cuanto a amoxicilina, las CIMs estuvieron entre 0,125 y 16 µg/ml, para doxiciclina entre 0.125 y 4 µg/ml y para eritromicina entre 16 y mayor de 32 µg/ml. Comparando estos resultados con los publicados por la NCCLS para los antimicrobianos sin punto de corte determinado, vemos que hay una correspondencia general en los valores de CIMs, siendo menores las CIMs obtenidas para doxiciclina en el caso de *P. intermedia*, tanto considerando el 50 como el 90% de las cepas, mientras que los valores de CIM para eritromicina en el caso de *P. gingivalis* son mayores en ambos casos (Tabla N° 3).

En la Tabla N° 4 se comparan los porcentajes de resistencia encontrados en este trabajo con los reportados por el Wadsworth Anaerobe Laboratory. Se observan grandes diferencias en el caso de metronidazol (95% a 0% en todos los casos) y clindamicina (95% a 63, 85-95 a 33%, 95 a 25%, para *Prevotella spp.*, *Porphyromonas spp.* y *Fusobacterium spp.*, respectivamente), aunque debemos considerar que este laboratorio informa sensibilidad a nivel de géneros y no de especies particulares.

Tabla N° 1:
Valores de CIM de las cepas en estudio (µg/ml)

	Amoxicilina	Clindamicina	Doxiciclina	Eritromicina	Metronidazol	Tetraciclina
<i>F. nucleatum</i> J29	0.5	> 32	1	> 32	16	1
<i>F. nucleatum</i> S4	0.125	0.125	0.125	16	> 32	1
<i>F. nucleatum spp.</i> J20	0.25	> 32	4	> 32	> 32	2
<i>F. nucleatum</i> I81	16	4	2	> 32	16	-
<i>P. intermedia</i> J48	0.5	2	1	8	> 32	-
<i>P. intermedia</i> I83	0.125	16	1	8	16	-
<i>P. intermedia</i> E64	0.25	0.125	4	8	16	2
<i>P. intermedia</i> J5	1	> 32	2	> 32	> 32	4
<i>P. intermedia</i> J45	16	> 32	1	> 32	> 32	4
<i>P. intermedia</i> cepa Pi	0.5	0.125	0.125	8	16	2
<i>P. intermedia</i> S3	0.125	0.125	1	8	> 32	2
<i>P. intermedia</i> J47	16	1	2	> 32	> 32	2
<i>P. gingivalis</i> I(7)	32	4	5	> 32	> 32	-
<i>P. gingivalis</i> R2	1	0.125	0.125	8	> 32	1
<i>P. gingivalis</i> R5	2	> 32	1	> 32	> 32	1

Tabla N° 2:
Valores de CIM reportados por NCCLS para el 50 y el 90% de las cepas y puntos de corte establecidos para algunos de los antimicrobianos probados.

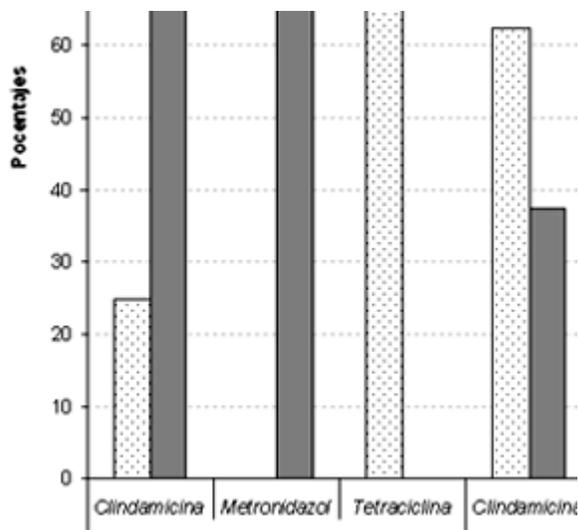
	Puntos de corte	<i>F. nucleatum</i>		<i>P. intermedia</i>		<i>P. gingivalis</i>	
		50%	90%	50%	90%	50%	90%
Amoxicilina	NA*	≤ 0,25	≤ 0,5	≤ 0,5	≤ 16	≤ 2	≤ 32
Clindamicina	< 2	≤ 4	> 32	≤ 2	≤ 32	≤ 4	≤ 32
Doxiciclina	NA	≤ 2	≤ 4	≤ 2	≤ 4	≤ 1	≤ 2
Eritromicina	NA	> 32	> 32	8	< 32	8	< 32
Metronidazol	≤ 8	16	> 32	16	< 32	≤ 32	< 32
Tetraciclina	≤ 4	1	2	≤ 2	≤ 4	1	1

*NA: no determinado

Tabla N° 3:
Comparación de valores de CIM para el 50 y el 90% de las cepas entre los reportado por la NCCLS y este trabajo.

	<i>F. nucleatum</i>				<i>P. intermedia</i>				<i>P. gingivalis</i>			
	50%		90%		50%		90%		50%		90%	
	NCCLS	ESTE TRABAJO	NCCLS	ESTE TRABAJO	NCCLS	ESTE TRABAJO	NCCLS	ESTE TRABAJO	NCCLS	ESTE TRABAJO	NCCLS	ESTE TRABAJO
Amoxicilina	≤ 0,25	≤ 0,25	≤ 0,5	≤ 0,5	≤ 0,5	≤ 0,5	≤ 16	≤ 16	≤ 2	≤ 2	≤ 32	≤ 2
Doxiciclina	< 2	< 1	< 4	< 4	≤ 2	< 1	< 4	< 2	< 1	< 1	< 2	< 1
Eritromicina	> 32	> 32	> 32	> 32	8	8	< 32	< 32	8	> 32	< 32	> 32

Fig. N° 1:
Porcentajes de cepas sensibles, intermedias y resistentes para los antimicrobianos con puntos de corte aprobados por NCCLS.



[Haga clic aquí para ver la imagen ampliada](#)

Tabla N° 4:
Comparación entre los resultados reportados por el Wadsworth Anaerobe Laboratory y el presente trabajo respecto a la sensibilidad antibiótica. (µg/ml)

Géneros	Agente Antimicrobiano	Wadsworth	Este trabajo
<i>Prevotella spp.</i>	Clindamicina	> 95%	63%
	Metronidazol	> 95%	0%
	Tetraciclina	50-69%	67%
<i>Porphyromonas spp.</i>	Clindamicina	85-95%	33%
	Metronidazol	> 95%	0%
	Tetraciclina	50-69%	100%
<i>Fusobacterium spp.</i>	Clindamicina	70-84%	25%
	Metronidazol	> 95%	0%
	Tetraciclina	70-84%	100%
	Tetraciclina	> 95%	100%

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

En los tratamientos periodontales surge la necesidad de administrar terapias antimicrobianas sistémicas a pacientes con enfermedades periodontales, ya sea por la agresividad de las mismas, por enfermedades de base que presenta el propio paciente, o debido a una pobre respuesta al tratamiento clínico. Debido a que existe en la literatura suficiente evidencia sobre el aumento de la resistencia a los antimicrobianos de uso habitual por parte de los patógenos periodontales clásicos, surge la necesidad de averiguar los perfiles de sensibilidad que presentan las cepas prevalentes en cada lugar geográfico con la finalidad de optimizar el tratamiento y de evitar el uso indiscriminado de sustancias con actividad antimicrobiana.

Los resultados encontrados en el presente trabajo, si bien no pueden considerarse definitivos ni lo suficientemente esclarecedores de la situación local respecto a la resistencia presentada por estas bacterias, principalmente debido al bajo número de cepas probadas, puede sin embargo considerarse como indicativas de la tendencia general. Así podemos decir que las cepas estudiadas mostraron un alto grado de sensibilidad a la tetraciclina, uno de los antimicrobianos más utilizados en nuestro medio. Esto no ocurre en el caso del metronidazol, el antimicrobiano más utilizado en nuestro medio, para el cual todas las cepas probadas de las tres especies resultaron resistentes. En el caso de la clindamicina, se encontró un alto porcentaje de resistencia entre las cepas de *Fusobacterium spp.* y *P. gingivalis* (75 y 67%, respectivamente), no así para *Prevotella* (37,5%). Los tres microorganismos muestran ser resistentes a eritromicina.

Por otra parte, si comparamos los resultados de este estudio con lo reportado por la NCCLS como valores de CIM que presentan el 50 y el 90% de las cepas estudiadas, vemos coincidencia para la mayoría de los antimicrobianos probados (amoxicilina, clindamicina, doxicilina y tetraciclina) con excepción de eritromicina y metronidazol; aún en el caso de este último, observamos que *Fusobacterium nucleatum* tiene un comportamiento similar al descrito por la NCCLS, lo que no ocurre con *Porphyromonas* y *Prevotella*.

Si tenemos en cuenta los valores de CIM para los antimicrobianos sin punto de corte establecido, vemos que en el caso de doxicilina *P. intermedia* presenta valores menores que los reportados por la NCCLS. Lo contrario ocurre con *P. gingivalis* en el caso de la eritromicina, donde vemos que los valores de CIM encontrados en este trabajo son mayores.

En la comparación de los resultados de este trabajo con los reportados por el Wadsworth Laboratory, podemos observar que existen grandes diferencias en el caso de clindamicina y metronidazol para todas las cepas aisladas de nuestra región. Debemos tener en cuenta que Wadsworth informa los resultados para el nivel de género, no discriminando las especies, lo que puede distorsionar los resultados. Sin embargo, parte de estas diferencias estarían influenciadas por el escaso número de cepas estudiadas, pero debe tenerse en cuenta que estas diferencias también pueden deberse a la falta de políticas de control sobre la administración de antimicrobianos que existe en nuestro país. Así, no existen normas ni controles en cuanto a la compra y consumo de antimicrobianos en forma libre por parte de los pacientes, cuando el problema de la resistencia microbiana concierne a la sociedad en su conjunto por la amplia difusión que la misma alcanza entre las cepas bacterianas.

Por otro lado, y esto es especialmente cierto en el caso de la práctica odontológica, la mayoría de las indicaciones de antimicrobianos por parte de los profesionales se realiza en forma empírica, y en muchos casos sin ni siquiera corroborar la identidad de la o las especies involucradas en el proceso infeccioso por medio de un cultivo bacteriano (18)(19).

Sería importante que se tomara realmente conciencia de las implicancias no solamente de lo que el fracaso en la terapia representa para el paciente en particular, sino de la gravedad del problema de la resistencia bacteriana para la población en general.

Agradecimientos: agradecemos especialmente a la Dra. Litterio del Hospital Garrahan de la ciudad de Buenos Aires por habernos suministrado las cepas control utilizadas en este estudio.

Bibliografía:

1. Serino G, Rosling B, Ramberg P, Hellström MK, Socransky SS y Lindhe J. El efecto de los antimicrobianos sistémicos en el tratamiento de pacientes con periodontitis recurrente. *Acta Dent Int.* (2001); 2(6): 366-374.
2. Socransky SS. Microbiology of periodontal disease; present status and future considerations. *J. Periodontol.* (1977); 48:497-504.
3. Haffajee AD, Socransky SS. Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. *Periodontol.* 2000. (1994); 5:78-111.
4. Moore WEC, Moore LVH. The bacteria of periodontal diseases. *Periodontol* 2000. (1994).5:66-77.
5. Addy M, Martin MV. Systemic antimicrobials in the treatment of chronic periodontal diseases: a dilemma. *Oral Dis* (2003); 9 (Suppl. I):38-44
6. Cobb C. Non-surgical pocket therapy: mechanical. *Periodontol* (1996); 1: 443-490.
7. Palcanis K. Surgical pocket therapy. *Ann Periodontol* (1996); 1:589-516.
8. Christersson LA, Wikesjo UME, Albin B et al.. Tissue localization of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontitis. *J. Periodontol* (1987); 58:540-545.
9. Adriaens PA, DeBoever JA, Loesche WJ. Bacterial invasión in root, cementum and radicular dentine of periodontally diseased teeth in humans. A reservoir of periodontopathic bacteria. *J. Periodontol* (1988); 59:222-230.
10. Mombelli AW, van Winkelhoff AJ. The systemic use of antibiotics in periodontal therapy. In: Lang NP, Karring T, Lindhe J, eds. *Proceedings of the 2nd European Workshop on Periodontology.* Quintessence: Berlin (1997); pp. 38-77
11. Testa M, Ruiz de Valladares R, Benito de Cárdenas IL. Correlation between bacterial counts in saliva and subgingival plaque. *Rev. Acta Odontológica Latinoamericana* (1999); 12(2): 64-74.
12. Umeda M, Contreras A, Chen C, Bakker I, and Slots J. The Utility of Whole Saliva to Detect the Oral Presence of Periodontopathic Bacteria. *J.Periodontol.* (1998); 69(7):828-833.
13. Slots, J., and T. E. Rams. Antibiotics in periodontal therapy: advantages and disadvantages. *J. Clin. Periodontol.* (1990); 17:479-493.
14. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1997. *Methods for antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria*, 4th ed. Approved standard M11-A4. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa.
15. Andres MT, Chung WO, Roberts M and Fierro JF. Antimicrobial Susceptibilities of *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, and *Prevotella nigrescens* spp. Isolated in Spain. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Nov. 1998, p. 3022-3023.
16. Walker, C. B., and L. C. Bueno. Antibiotic resistance in an oral isolate of *Prevotella intermedia*.

Clin. Infect. Dis. (1997); 25(Suppl. 2):S281-S283.

17. Jacobus, NV, Immermann FW, Gupte JM, and Testa RT. Susceptibility of anaerobes in phase 3 clinical studies of piperacillin/tazobactam. Clin. Infect. Dis. (1993); 16(Suppl. 4):S344-S348.
18. Maestre JR, Bascones A, Sánchez P, Matesanz P, Aguilar L, Giménez MJ, Pérez-Balcabao I, Granizo JJ, Prieto J. Odontogenic bacteria in periodontal disease and resistance patterns to common antibiotics used as treatment and prophylaxis in odontology in Spain. Rev Esp Quimioter. 2007 Mar; 20(1):61-7.
19. Buchmann R, Müller RF, Van Dyke TE, Lange DE. Change of antibiotic susceptibility following periodontal therapy. A pilot study in aggressive periodontal disease. J Clin Periodontol. 2003 Mar; 30(3):222-9.