

## KARANLIK ALAN MİKROSKOBİSİ İLE SUBGİNGİVAL FLORANIN İNCELENMESİ\*

Gönen ÖZCAN\*\* Mehmet YALIM\*\*\* Koksal BALOŞ\*\*\*\* Belgin BAL\*\*\*\*\*

### GİRİŞ

Periodontal hastalıkların, etyolojisinde ve gelişmesinde bakteri plağının rolü insanlar ve hayvanlar üzerinde yapılan çeşitli klinik ve bakteriyolojik çalışmalarla ortaya konmuştur (3, 5, 7, 21, 22, 26, 32, 35, 42, 44, 46, 48, 49).

Genelde, gingivitisin periodontitise, kronik iltihabi periodontal hastalığın, aktif periodontal yıkıma dönüşmesi, temelde iki hipoteze dayandırılmaktadır (44). Bu hipotezlerden birincisi, konakçının immunopatolojik sürecinin aktivasyonu, ikincisi ise, supragingival bakteriyal komponentin daha alt sınırlara ilerlemesi veya yeni patojenik türlerin ortaya çıkmasıyla ilgilidir (44).

Yapılan anaerobik kültür teknikleri, aktif periodontal hastalığın subgingival numunelerinde Selenomonas, Camplobakter, Bacteroides Asoccharolyticus, Fusobacterium Nucleatum, Actinobacillus Actinomycetem comitans ve diğer bacteroid türde bakterilerin mevcudiyetini göstermiştir. Sağlıklı sulkusta ise Actinomyces ve streptococcus varlığı belirtilmiştir (44, 47).

Mikroskobik çalışmalarla, gingivitis ve periodontitiste, Gr (-) ve hareketli bakterilerin, spiroketlerin, sağlıkta ise Gr (+) bakterilerin, özellikle kokların floraya hakim olduğu

- ( \* ) A.Ü. Diş Hek. Fak. 1. Bilimsel Kongresinde tebliğ edilmiştir. Milli Kütüphane, Ankara, 6-11 Mayıs 1985.  
( \*\* ) G.Ü. Dişhek. Fak. Öğr. Üyesi, Yrd. Doç. Dr.  
( \*\*\* ) G.Ü. Dişhek. Fak. Arşt. Gör., Dt.  
( \*\*\*\* ) G.Ü. Dişhek. Fak. Öğr. Üyesi, Prof. Dr.  
( \*\*\*•\*) G.Ü. Dişhek. Fak. Arşt. Gör., Dt.

#### KARANLIK ALAN MİKROSKOBİSİ

ortaya konmuştur. Listgarten, çekilmiş dişlerin interproksimal yüzeyleri üzerinde yaptığı ışık ve elektron mikroskopik çalışmalarla, periodontal hastalık ve sağlık arasında olduğu gibi, supra ve subgingival plak arasında da bir farklılığın olduğunu göstermiştir (27).

Yapılan diğer mikroskopik çalışmalarda, periodontal hastalığın ilerlemesi ile hareketli yapılar ve spiroketlerin sayısı arasında bir korelasyonun olduğunu ortaya koymuştur. Ayrıca bu yapıların azalmasının ve kok tipindeki artışın ise periodontal iyileşmeyi işaret ettiği bulgulanmıştır (3, 5, 28, 29, 31, 39).

Günümüzde, rutin olarak, kronik gingivitisin ve periodontitisin teşhisinde, klinik ve radyolojik verilerden istifade edilmektedir. Oysaki, klinik veriler plağın sadece kantitatif özelliğini ortaya koyabilmektedir. Hastalıktan sorumlu tutulan organizmaların kalitatif özelliklerinin tanımlanabilmesinin periodontal hastalıkların tedavisi ve prognozuna yardımcı olacağı gibi hasta motivasyonunda da kullanılabilmesi belirtilmektedir (3, 10, 43). Başlık altında oluşturulan bu derleme, bu amacın önemini belirtmek için yapılmıştır.

Ancak, subgingival bakterilerin kültüre edilip tanınmaları için zamana, özel tekniğe, malzemeye ve bu konuda uzman kişilere ihtiyaç olduğu aşikardir (3). Bu tekniklerin anlatılması uzun zaman gerektireceğinden, sadece son yıllarda büyük önem ve kullanım alanı kazanan karanlık alan mikroskopisinin, bu konudaki yeri ve sonuçlarını açıklamaya çalışacağız.

#### KARANLIK ALAN MİKROSKOBİSİ

Karanlık alan mikroskopisinin çalışma prensibi, konsantre oblik ışıklandırma altında, çıplak gözle göremeyeceğimiz büyüklükteki yapıların renginin ve parlaklıklarının, buldukları ortamla kontrast yaratılarak morfolojik yapılarına göre tanımlama esasına dayanır (8, 12, 15, 38, 40).

Bu etki karanlık bir orada, küçük bir delikten gelen güneş ışığı demetindeki toz zerreciklerinin veya kuvvetli ışık altında havada uçuşan sigara dumanı partiküllerinin görüntüsüne benzetilebilir (38).

Karanlık alanın ışıklandırılması için özel bir karanlık alan kondansatörüne ve oldukça kuvvetli ışık kaynağına ihtiyaç vardır. Işık kaybını önlemek amacıyla kondansatörle lam arasına immersiyon yağı konulmalıdır (8). Yine bu işlem için değişik büyütmede iris diyaframlı immersiyon yağı objektiflerine ihtiyaç vardır. Eğer elde bu tip bir objektif yok ise iris diyaframı yerine, objektif açıklığından daha küçük çaplı ve objektif boyutunda ince bir tüp aynı amaca yönelik olarak kullanılabilir. Bu şekilde 1000 A (0,1 mm) çapında yapıların tespit edilmesi mümkün olabilmektedir (15).

Bakterilerin morfolojik yapılarını ve hareketliliğini gösteren karanlık alan mikroskopisi ile ilgili bilinmesi gereken kurallar şunlardır.

1 — Oldukça kuvvetli diffüz olmayan bir ışık kaynağı olması. (100 veya 200 Watt'lık coil filament lamba veya karbon ark lambası)

2 — Karanlık alan ışıklandırılması önce düşük büyütmeli objektife daha sonrada 40 x veya immersiyon yağı objektifine göre yapılmalıdır.

3 — Numunenin incelenmesi için kullanılacak lam ve lamelin kalınlığı ince olmalıdır. Bunun 1,15 veya 1,25 mm arasında olması uygundur.

4 — Lam, lamel kontrasttaki herhangi bir azalmayı engellemek amacıyla tamamiyle temiz, toz ve kirden arındırılmış olmalıdır.

5 — Karanlık alan incelenmesinde kullanılacak preparatın kalınlığı ışığın saçılmasını önlemek amacıyla mümkün olduğunca ince tutulmalıdır.

6 — Numunede ve immersiyon yağında hava kabarcığı bulunmamalıdır.

7 — Numune kırılma indisi havadan daha yüksek olan bir ortama yerleştirilmelidir.

8 — İmmersiyon yağı objektifi kullanıldığında, karanlık alan kondansatörü ile lam arasına optimal görüntünün alma-

#### KARANLIK ALAN MİKROSKOBİSİ

bilmesi ve ışık kırılma gücünün önlenmesi amacıyla bir damla yağ tatbik edilmelidir.

9 — Karanlık alan kondansatörünün ve objektifin odak noktaları aynı düzlem üzerinde olmalıdır. Bu kondansatör üzerindeki ayarlama vidaları yardımıyla yapılabilir (38).

Bu kurallara uygun şekilde kullanılan karanlık alan mikroskopisi gözle görülemeyecek derece küçük, hatta ışık dalga boyundan daha küçük chylomikrone benzeri transparan objelerin görülebilmesinde oldukça avantajlıdır (12).

Böylece, periodontal hastalıkların akut ve şiddetli safhalarında, etkili patojen bakterilerin tanınmasında yardımcı olabilir.

Buna ilaveten, aynı amaçla kullanılan faz - kontrast mikroskopisinde gözle objektif arasına, bir optik disk yerleştirilerek, karanlık alan mikroskopisinden farklı olarak hücre organellerinin incelenmesi mümkün olabilmektedir (18, 19, 43, 51).

#### KARANLIK ALAN MİKROSKOBİSİNİN PERİODONTOLOJİDEKİ YERİ VE ÖNEMİ

Özellikle, sağlıklı ve periodontal hastalıklı alanların mikrobiyal yapılarının ve özelliklerinin tanınmasında son yıllarda karanlık alan ve faz - kontrast (objektifle göz arasına optik disk yerleştirilerek kırılma gücüne bağlı olarak hücre organellerinin incelenmesi metodu) mikroskopisinin kullanıldığı izlenilmektedir (3, 5, 6, 13, 26, 28, 39).

Bu çalışmaların sonuçlarına göre hastalığın şiddetindeki artışla doğru orantılı olarak hareketli çubuklarla, spiroketlerin sayısında bir azalma gözlenmiştir (3, 5, 28, 29, 31, 39).

Listgarten 1982 yılında yaptığı çalışmada hastalık ilerledikçe mikrobiyal kolonizasyona uygun ortam sağlayacak şekilde subgingival florada hacimsel bir artışın olduğunu bulmuştur (31).

Çeşitli tedavi edici işlemlerin subgingival mikrobiyal flora etkilerinin karanlık alan mikroskopisi ile değerlendirilme-

sı ile ilgili bazı çalışmalar mevcuttur (1, 2, 20, 24, 25, 30, 31, 33, 35, 41, 44).

Yapılan literatür incelemelerinde gerek sağlıklı ve hastalıklı bölgelerin, gerekse uygulanan tedavinin etkinliğinin saptanmasıyla ilgili çalışmalarda, subgingival floradaki bakterilerin morfolojik yapılarının karanlık alan mikroskopisi ile tanımlanmasında Listgarten ve Hellden'nin 1978 yılında yapmış oldukları çalışma referans olarak kullanılmaktadır (28).

Listgarten ve Hellden bu çalışmalarında bakteriyal numunenin elde edilmesini ve mikroskopik değerlendirilmesini şu şekilde yapmışlardır (28).

#### BAKTERİYAL NUMUNENİN ELDE EDİLiŞİ

Mevcut supragingival mikrobiyal akümülyasyon iyice temizlendikten sonra temiz bir periodontal küretille sulkus veya cep tabanına atravmatik olarak dikkatlice girerek küretin ucu ile bakteriyal içerik dışarı çıkartılır. Bu işlem yeterli numune elde edilinceye kadar birkaç kez tekrarlanabilmektedir. Daha sonra elde edilen numuneler 0,1-0,3 ml. % 1 jelatinli % 0,85'lik NaCl solüsyonu içeren tüpler içerisine aktarılır. Numuneyi içeren bu solüsyon steril bir enjektörle birkaç defa aspire edilip bırakılarak homojen hale getirilir. Daha sonra bu homojen numunenin bir damlası lam üzerine hava kabarcığı kalmayacak şekilde dikkatlice konarak 1200x veya 1000 x büyütmede incelenir. Numunelerdeki bakteriyal kümelenmeyi ve bakteriler hareketliliklerindeki kaybın önüne geçilebilmesi amacıyla lamenin etrafı parafin veya pratik olarak tırnak cilası ile kapatılıp havayla teması kesilmelidir. Bu işlemi takiben, maksimal 1 - 2 saat içerisinde numunelerin değerlendirilmesi yapılmalıdır. Eğer yapılan incelemede numunenin yoğunluğu çok fazla ise bir miktar solüsyon eklenebilir.

Bu şekilde hazırlanan numunelerin mikroskopik incelemesi, genellikle rastgele seçilen 100 - 200 bakterinin Listgarten ve Hellden'nin ortaya koydukları klasifikasyona göre yapılmaktadır (28).

#### KARANLIK ALAN MİKROSKOBİSİ

Bu klasifikasyonu oluşturan bakterileri şu şekilde sıralayabiliriz:

**KOKLAR :** Ortalama **0,5-11** mm çaplı parlak sınırlı, ortası karanlık hücrelerdir.

**DÜZ ÇUBUKLAR :** Parlak sınırlı ve karanlık bir iç yapıya sahiptirler. Büyüklüğü **0,5-1,5** mm olup, uçları kunt ve yuvarlak şekildedir. Uzunluğunun genişliğine oranı **1: 2** ve **1: 6** arasında değişiklik gösterir.

**FLAMENTLER :** Dış hattı parlak, içi karanlık olup **0,5 -1,5** mm büyüklüğündedir. Genişliğinin uzunluğuna oranı **1 : 6**'dan daha büyüktür. Düzensiz yapıda seyrek olarak dallanmış veya bölümlere ayrılmış şekilde gözlenebilmektedir.

**FUZİFORMLAR :** Ortalama **0,3-1** mm arasında değişen çaplardaki hücrelerdir. Parlak bir dış sınıra her zaman karanlık olmayan bir iç yapıya sahiptirler. Boyları ortalama **10** mm veya daha küçük olup, uçları sivri şekildedirler.

**EĞRİ ÇUBUKLAR :** Düz çubuklara benzerler yalnız yarım ay şeklindedirler. Flagellanın tesbit edilemediği veya bu organeli kaybettiği sanılan bu hücrelerin muhtemelen ölü, hareketli hücreler olduğu sanılmaktadır.

#### SPİROKETLER :

a — Küçük Spiroketler : Helikoidal hücrelerdir. **0,3-0,2** mm genişliğinde **10** mm uzunluğundadırlar. Dış konturu tek çizgi halindedir.

b — Orta büyüklükteki Spiroketler : **0,3 - 0,4** mm genişliğinde **15** mm uzunluğunda helikoidal hücrelerdir. Bunlarda dış konturları tek çizgi halinde görülür.

c — Büyük Spiroketler: **0,5** mm veya daha büyük genişlikte, **20** mm uzunlukta helikoidal hücrelerdir. Bunlarında dış konturları tek çizgiden çok, çift çizgi halinde görülür. Spiroketlerin büyüklerinin saptanmasında uzunluklarının yanısıra dış konturlarının tek veya çift çizgi şeklinde olup olmadığıda önemlidir.

**HAREKETLİ ÇUBUKLAR :** Bu kategoriye karanlık alanda hareketlilik gösteren spiroketler dışındaki tüm hücreler dahil edilmektedir. Bunlar genellikle düz ve eğri çubukları, bazende fuziform ve kokoid hücreleri içerirler. Bu gruba aynı zamanda inceleme anında hareketlilik göstermeseler bile flagella (kamçı) içeren hücrelerde dahil edilmelidir.

Bu şekilde mikroskopik tanımlanması yapılan numunenin cep ve sulkustan alınmasında uygulanan teknik konusunda değişik görüşlerde mevcuttur (34, 35, 37, 45).

Mousques ve arkadaşları 1980 yılında derin ceplerden küret yardımıyla alınan numune sonrası subgingival plağın yapısında değişikliğin meydana geldiğini, özellikle spiroket sayısında hemen bir azalmanın gerçekleştiğini ve başlangıç durumu na ancak bir haftada ulaştığını belirtmişlerdir (37).

Skapski ve arkadaşları 1976 yılında kreviküler lökositlerin toplanmasında şırınga sistemini geliştirmişlerdir. «Yıkama Tekniği» olarak isimlendirilen bu teknik 1984 yılında Magnusson ve arkadaşları tarafından subgingival bakteriyal numune alınmasını için kullanılmıştır (45).

Bu işlem için bir enjektör ve ucu kesilerek küntleştirilmiş bir iğne kullanılmaktadır. İğne sulkus tabanına en yakın noktaya kadar yerleştirildikten sonra sulkus içerisine 10 ml. kadar % 1 jelatin içeren steril serum fizyolojik verilir ve hemen aspire edilir. Aspire edilen numune 70 ml'ye kadar sulandırılarak bir damlası mikroskopik inceleme için kullanılır (35).

Magnusson ve arkadaşları 1985 yılında 32 günlük bir çalışma periyodunda birkaç dakika içerisinde 9 kez aynı bölgeden alınan subgingival numuneler arasında bir farkın olmadığını belirtmişlerdir. Ayrıca aynı araştırmacı grubu gerek yıkama tekniği ile gerekse küretle alınan numuneler arasında, bakteriyal içerikleri açısından bir farkın bulunmadığını göstermişlerdir (34).

## KARANLIK ALAN MİKROSKOBİSİ

### KARANLIK ALAN MİKROSKOBİSİNİN HASTA MOTİVASYONUNUAKÎ YERİ VE ÖNEMİ

Hasta motivasyonunda, karanlık alan ve faz - kontrast mikroskobisinin kullanılması önemli bir yer tutmaktadır. Uygulanan tedavinin başarısının veya periodontal sağlık ve hastalığın mikroskobik olarak ekranda izlenmesinin bu konuda verilen aydınlatıcı bilgilere ek olarak yararlı olacağına inanmaktayız. Konuyla ilgili çalışmalar da bu tür bir mikroskobik değerlendirmenin, özellikle dental plağın bakteriyel tabiatlı olduğunun kanıtlanmasının, oral hijyenin düzeltilmesinde yol gösterici, yardımcı unsurlardan biri olduğu belirtilmiştir (10,43).

### SONUÇ

Karanlık alan mikroskobisinin sağlıklı ve hastalıklı alanlardaki floranın belirgin farklılığının ortaya konmasında, uygulanan tedavi şekillerinin etkinliğinin incelenmesinde kullanılabilecek komplike olmayan, elverişli bir metod olduğu belirtilmektedir (31). Konuyla ilgili yapılan çalışmalarda mekanik tedavilerin, lokal ve sistomik anti - mikrobiyal uygulamaların yapılan klinik ölçümlerde olduğu gibi, karanlık alan mikroskobisi ile değerlendirilen subgingival floradaki değişikliklerde, kayda değer bir düzelmeye oluşturabileceği gösterilmiştir (4, 9, 11, 14, 16, 17, 23, 36, 50).

Sonuç olarak tekniğin uygulanmasındaki kolaylığın hasta eğitiminde yararlı olabileceği aynı zamanda periodontal hastalıklı bireylerde daha komplike tedavi şekillerine gerek olup olmadığının saptanmasında da kullanılabileceği inancındayız.

### ÖZET

Karanlık alan mikroskobisi, sağlıklı ve hastalıklı alanlardaki floranın diagnostik olarak değerlendirilmesinde kullanılabilen bir metoddur.

Tekniğin tatbikindeki kolaylığı açısından, hasta motivasyonunda olduğu gibi periodontal hastalıklı bireylerde tedavi şeklinin yönlendirilmesinde de faydalı olabileceği inancındayız.



SUMMARY

THE STUDYING OF THE SUBGİNGİVAL FLORA  
BY DARK - FIELD MICROSCOPY

Darkfield microscopy is a useful method to diagnostically evaluate the flora of the healthy and diseased sites.

The technic is easily applicable and can be used to motivate the patients as well as to direct the periodontal treatment of the diseased sites.

KAYNAKLAR

1. Addy, M., Alam, L., Rawle, L. : Simple Bacteriological Methods to Assesn Changes in Subgingival Microflora Produced by Metronidazole - Containing Acrylic Strips Placed into Periodontal Pockets. J. Cli. Perio., 11 : 467-474, 1984.
2. Addy, M., Langereudi, M. : Comparasion of the immediate Effects on the Sabgingival microflora of Acrylic Strips Containing 40 % Chlorhexidine, Metronidazole or Tetracycline. J. Cli. Perio., 11 : 379-386, 1984.
3. Addy, M., Newman, H., Langereudi, M., Gho, J.G.L. : Dark-field Microscopy of the Microflora of plaque. Br. Dent. J., 155 : 269-273, 1983.
4. Addy, M., Rawle, L., Handly, R., Newman, H.N., Covertry, J.F. : The Development and in Vitro Evaluation of Acrylic Strips and Dialysis Tubing for Local Drug Delivery. J. Perio., 53 (11), 693-699, 1982.
5. Africa, C.N., Parker, J.R., Reddy, J. : Bacteriological Studies of Subgingival Plaque, in a Periodontitis-Resistant Population. 1. Darkfield Microscopic Studies. J. Perio. Res., 20 : 1-7, 1985.
6. Armitage, G.C., Dickenson, W.R., Jenderseck, R.S., Levine, S.M., Chamberg, D.W. : Relationship Between the Percentage of Subgingival Spirochetes and the Severity of Periodontal Disease. J. Perio., 53 : 550-556, 1982.
7. Axelsson, P. : The Effect of Plaque Control Procedures on Gingivitis, Periodontitis and Dental Caries. Thesis, University of Göteborg, 1978.

8. Burrows, W. : Textbook of Microbiology. The Physical and Chemical Structure of Microorganisms (Chap 1), W.B. Saunders Comp., 20th. Ed., Philadelphia, 1973.
9. Clark, D.C., Shenker, S., Stulginski, P., Schwartz, S. : Effectiveness of Routine Periodontal Treatment With and Without Adjunctive Metronidazole Therapy in a Sample of Mentally Retarded Adolescents. *J. Perio.*, 54 (11), 658-665, 1983.
10. Cole, A.M., Newcomb, G.M., Nixon, K.C. : Dark-field Microscopy and Patient Education. *Aust. Dent. J.*, 29 (6), 394-397, 1984.
11. Coventry, J., Newman, H. : Experimental use of a slow Release Device Employing Chlorhexidine Gluconate In Areas of Acute Periodontal Inflammation. *J. Cli. Perio.*, 9 : 129-133, 1982.
12. Emmanuel, V.M., Covdry, E.V. : Laboratory Technique in Biology and Medicine. p. 114-115, The Williams and Wilkins Comp., 4<sup>th</sup> Ed., Baltimore, 1964.
13. Evian, C.I., Rosenberg, E.S., Listgarten, M.A. : Bacterial variability within Diseased Periodontal Sites. *J. Perio.*, 53 : 595-598, 1982.
14. Goodson, J.M., Haffjee, A., Socransky, S.S. : Periodontal Therapy by the Local Delivery of Tetracycline. *J. Cli. Perio.*, 6 : 83-92, 1979.
15. Gray, P. : The Encyclopedia of Microscopy and Microtechnic. Optical Microscop. Van Nostrand Reinhold Comp. Philadelphia, pp. 388-389, 1983.
16. Greenwel, H., Bissade, N.F., Maybury, J.E., Marco, J.J. : Clinical and Microbiologic Effectiveness of Keyes' Method of Oral Hygiene on Human Periodontitis Treated with and without Surgery. *JADA.*, 106 : April, 457-461, 1983.
17. Heijl, I., Lindhe, J. : The Effect of Metronidazole on the Development of Plaque and Gingivitis in the Beagle Dog. *J. Cli. Perio.*, 6 : 197-209, 1979.
18. Keyes, P.H., Wright, W.E., Howard, S.A. : The use of Phase-Contrast Microscopy and Chemotherapy in the Diagnosis and Treatment of Periodontal Lesions-an Initial Report. (I) *Quint. Inter.* 1 : 1-6, 1978.
19. Keyes, P.H., Wright, W.E., Howard, S.A. : The use of Phase-Contrast Microscopy and Chemotherapy in the Diagnosis and Treatment of Periodontal Lesions. (II) *Quint. Inter.* 2 : 69-77, 1978.
20. Lekovic, V., Kenney, E.B., Carranza, F.A.Jr., Endres, B. : The Effect of Metronidazole on Human Periodontal Disease. A clinical and Bacteriological Study. *J. Perio.*, 54 (8), 476-480, 1983.
21. Lindhe, J., Hamp, A.E., Löe, H. : Experimental periodontitis in the Beagle Dog. *J. Perio. Res.*, 8 : 1-10, 1973.
22. Lindhe, J., Hamp, A.E., Löe, H. : Plaque Induced Periodontal Disease in Beagle Dogs. A 4 - year Clinical, Roentgenographical and Histometrical Study. *J. Perio. Res.*, 10 : 243, 1975.

23. Lindhe, J., Heijl, L., Goodson, J.M., Socransky, S.S. : Local Tetracycline Delivery Using Hollow Fibre Devices in Periodontal Therapy, *J. Cli. Perio.*, 6 : 141-149, 1979.
24. Lindhe, J., Liljenberg, B., Adielson, B., Börjesson, I. : The Effect of Metronidazole Therapy on Human Periodontal Disease. *J. Perio. Res.*, 17 : 534-536, 1982.
25. Lindhe, J., Liljenberg, B., Adielson, B., Börjesson, I. : Use of Metronidazole as a Probe in the Study of Human Periodontal Disease. *J. Cli. Perio.*, 10 : 100-112, 1983.
26. Lindhe, J., Liljenberg, B., Listgarten, M. : Some Microbiological and Histopathological Features of Periodontal Disease in Man. *J. Perio.*, 51 : 264-269, 1980.
27. Listgarten, M.A. : Structure of the Microbial flora Associated with Periodontal Health and Disease in Man. *J. Perio.*, 47 : 1, 1976.
28. Listgarten, M.A., Hellden, L. : Relative Distttribution of Bacteria at Clinically Healthy and Periodontal Diseased Sites in Humans. *J. Cli. Perio.*, 5 : 115-132, 1978.
29. Listgarten, M.A., Levin, S. : Positive Correlation Between the Proportions of Subgingival Spirochetes and Motile Bacteria and Susceptibility of Human Subjects to Periodontal Deterioation.
30. Lisgarten, M.A., Lindhe, J., Hellden, L. : The effect of Tetracycline and/or Scaling on Human Periodontal Disease-Clinical, Microbiological and Histological Observations. *J. Cli. Perio.*, 5 : 246-271, 1978.
31. Lisgarten, M.A., Schifter, C. : Differential Dark-field Microscopy of Subgingival Bacteria as an Aid in Selecting Recall Intervals : Results after 18 Months. *J. Cli. Perio.*, 9 : 305-316, 1982.
32. Loe, H., Theilade, E., Jensen, S.B., Schiott, C.R. : Experimental Gingivitis in Man (III). The Influence of Antibiotics on Gingival Plaque Development. *J. Perio. Res.*, 2 : 282, 1967.
33. Lundström, A., Johanson, L.A., Hamp, S.E. : Effect of Combined Systemic Antimicrobial Therapy and Mechanical Plaque Control in Patients with Recurrent Periodontal Disease. *J. Cli. Perio.*, 11 : 321-330, 1984.
34. Magnusson, I., Lillenberg, B., Yoneyama, T., Blomqvist, N. : Sampling of Subgingival Microbiota for Dark-field Microscopy. *J. Cli. Perio.*, 12 : 209-215, 1985.
35. Magnusson, I., Lindhe, J., Yonoyama, T., Liljenberg, B. : Recolonization of a Subgingival Microbiota following Scaling in Deep Pockets. *J. Cli. Perio.*, 11 : 193-207, 1984.
36. Marshall, K.F. : A Microbiologically Monitored to Periodontal Therapy. *Dent. Pract.*, 22 : 14, July 19, 1984.
37. Mousques, T, Lisgarten, M.A., Stoller, N.H. : Effect of Sampling on the Composition of the Human Subgingival Microbial Flora. *J. Perio. Res.*, 15 : 137-143, 1980.

38. Perlman, P. : Basic Microscope Techniques. Methods of Illuminating and Using the Microscope (Chap 2), Chemical Pub. Comp., Newyork, pp. 47-51, 1971.
39. Pihlstrom, B.L., Liljemark, W.F., Schaffer, E.M., Wolff, L.F., Smith, J.A., Bandt, C.L. : The Relationship of Probing Depth and Total Microscopic Counts to Differential Subgingival Plaque Morphology. J. Perio. Res., 20 : 106-112, 1985.
40. Raphael, S.S. : Lynch's Medical Laboratory Technology. Basic Principles of Laboratory Technology. Basic Principles of Laboratory Work (Chap. 2), 4th Ed., W.B. Saunders Comp., Philadelphia, p. 36, 1983.
41. Rosenberg, E.S., Evian, C.I., Lisgarten, M.A. : The Composition of Subgingival Microbiota After Periodontal Therapy. J. Perio., 52 : 435-41, 1981.
42. Rosling, B. : Plaque Control. A Determining factor in the Treatment of Periodontal Disease. Thesis, University of Göteborg, 1976.
43. Schulman, J. : Clinical Evaluation of the Phase Contrast Microscope as a Motivational Aid in Oral Hygiene. J.A.D.A. 92 : 759-765, 1976.
44. Singletary, M.M., Cravford, J.J., Simpson, D.M. : Dark-field Microscopic Monitoring of Subgingival Bacteria During Periodontal Therapy. J. Perio., 53 (11), 671-681, 1982.
45. Skapski, H., Lehner, T. : A crevicular Washing Method for Investigating Immune Components of Crevicular Fluid in Man. J. Perio. Res, 11 : 19-24, 1976.
46. Socransky, S.S. : Microbiology of Periodontal Disease : Present Status and future Considerations. J. Perio., 48 : 497, 1977.
47. Socransky, S.S. : Statistical Analysis of Microbial Counts of Dental Plaque. J. Perio. Res., 18 : 187-199, 1983.
48. Theilade, E., Theilade, J. : Role of Plaque in the Etiology of Periodontal Disease and Caries. Oral Sciences Rev., 9 : 23, 1976.
49. Theilade, E., Wright, W.H., Jensen, S.B., Løe, H. : Experimental Gingivitis in Man (11). A Longitudinal Clinical and Bacteriological Investigation. J. Perio. Res., 1 : 1, 1966.
50. West, T., King, W.J. : Tooth Brushing with Hydrogen Peroxide-Sodium Bicarbonate Compared to Toothpowder and Water in Reducing Periodontal Pocket Suppuration and Darkfield Bacterial Counts. J. Perio., 54 (6), 339-346, 1983.
51. Wolff, L.F., Bandt, C, Pihlstrom, B., Brayer, L. : Phase Contrast Microscopic Evaluation of Subgingival Plaque in Combination with Either Conventional or Antimicrobial Home Treatment of Patients With Periodontal Inflammation. J. Perio. Res., 17 : 537-540, 1982.