

Donkerveld- of fasencontrastmicroscopie*

Bruikbaarheid in de parodontologie

Samenvatting. Microscopisch onderzoek van een plaquemoster is moeilijk aangezien bacteriën bijna niet te onderscheiden zijn van de verdunningsvloeistof (zelfde brekingsindex). Twee typen van microscopische analyses trachten dit probleem op verschillende wijze te omzeilen. Bij een donkerveldmicroscopie wordt het object belicht door schuin invallende lichtbundels, die dan verstrooid of afgebogen worden en in het objectief binnenvallen. Aldus ontstaat een lichtend beeld ten opzichte van een donkere achtergrond. De fasencontrastmicroscopie steunt op principes uit de geometrie (de golflengte en amplitude) om toch een beeld van de belichte cellen te krijgen.

CALLENS A. Donkerveld- of fasencontrastmicroscopie. Bruikbaarheid in de parodontologie. Ned Tijdschr Tandheelkd 1992; 99: 381-4.

1 Inleiding

Alhoewel de eerste microscopen reeds dateren van het einde van de 15e eeuw, zijn de principes van donkerveldmicroscopie en vooral van fasencontrastmicroscopie relatief jong. De eerste donkerveldmicroscopie werd ontwikkeld door de Engelsman Wenhams in 1850. Een eeuw later werd de fasencontrastmicroscopie ontworpen door de Nederlander F. Zernike, Nobelprijswinnaar natuurkunde in 1953. Deze meer gespecialiseerde microscopen bieden vele voordelen bij de analyse van levende cellen, bacteriën of weefsels. Deze objecten zijn immers gekenmerkt door hun transparante karakter en door het feit dat hun samenstellende delen slechts zeer weinig in brekingsindex van elkaar verschillen. Aangezien een lichtmicroscopie voornamelijk differentieert op basisverschillen in transparantie (d.i. lichtabsorptie) en verschillen in lichtbreking, zijn deze objecten voor de klassieke microscopie moeilijk waarneembaar.

De donkerveld- en fasencontrastmicroscopie worden behalve in de parodontologie ook toegepast in andere disciplines, zoals de toxicologie (opsporing van toxische metalen in weefselcoups), de nefrologie (diagnose van hematurie), de hematologie (telling van bloedplaatjes en de bestudering van hun volume), de dermatologie (diagnose van dermatomycose), de gynaecologie (*in vitro* bestudering van kunstmatige inseminatie) en de fysiologie (fagocytose).

Via donkerveld- en fasencontrastmicroscopie kan men alleen een vrij rudimentaire indeling maken van de bacteriën op basis van de vorm, de grootte en de beweeglijkheid. De bacterie identificeren, zoals bij een kweekmethode, is onmogelijk. Op het eerste gezicht lijkt dit een groot nadeel. Laten we echter niet vergeten dat tot op heden nog steeds 15% van de bacteriën uit de tandplaque niet kan worden geïdentifi-

ceerd, dat voor sommige bacteriën een kweek vrijwel onmogelijk is en dat kweekmethoden extreem tijdrovend en kostbaar zijn.

2 Donkerveldmicroscopie

In de donkerveldmicroscopie wordt het object belicht met lichtbundels die onder een grote hoek invallen zodat ze onmogelijk rechtstreeks het objectief kunnen binnendringen (afb. 1). Indien er geen preparaat onder de microscoop ligt, blijft het gezichtsveld dus donker. Bevindt zich een object op het draagglasje, dan zullen de lichtstralen door dit object verstrooid worden (door weerkaatsing en ombuiging van de stralen, dit laatste ten gevolge van de breking van de lichtbundel wanneer deze door het object heen loopt). Door deze verstrooiing zullen nu toch lichtstralen in het objectief binnenvallen en krijgt men zo een lichtend beeld van het object tegen een donkere achtergrond. Deze werking is te

A. Callens, LTH

*Naar een voordracht gehouden door Prof. Dr. M. Quirijnen tijdens de bijeenkomst van de Nederlandse Vereniging voor Biologie van de mond d.d. 12 oktober 1990.

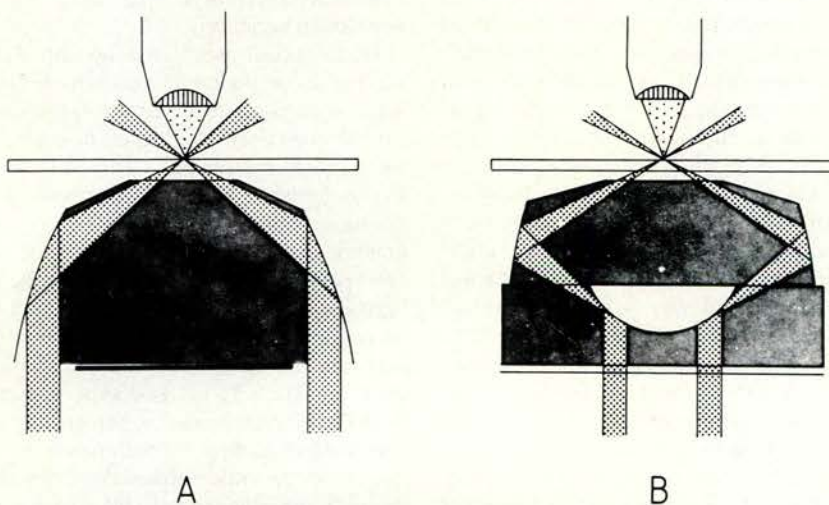
Uit de Eenheid Parodontologie van de Faculteit Geneeskunde te Leuven, België.

Trefwoorden: **Parodontologie** – Donkerveldmicroscopie – Fasencontrastmicroscopie

Adres: Mevr. A. Callens, Parodontologie, Capucijnenvoer 7, 3000 Leuven, België.

vergelijken met het zichtbaar worden van stofdeeltjes in een zonnestraal die een donkere kamer binnenvalt.

De lichtbundels met de grote openingshoek worden verkregen via een speciaal hiervoor ontworpen condensor. Momenteel worden twee typen condensoren gebruikt: de paraboloïd- en de kardioïdcondensor. De paraboloïdcondensor bestaat uit een massief glaslichaam met planparallele onder- en bovenvlakken, rondom parabolisch geslepen en verspiegeld. Het middendeel is afgedekt, zodat de van de microscopie afkomstige lichtstralen (die parallel moeten intreden) alleen op het parabolische spiegeloppervlak kunnen invallen en vandaar onder een grote hoek naar het object worden weerkaatst. De kardioïdcondensor bestaat uit een combinatie van twee glaslichamen met sferische spiegelvlakken, die elkaar corrigeren. De paraboloïdcondensor is niet te corrigeren voor afbeeldingsfouten en kan soms direct licht laten 'doorlekken'. Deze nadelen treffen men niet aan bij de kardioïdcondensor.

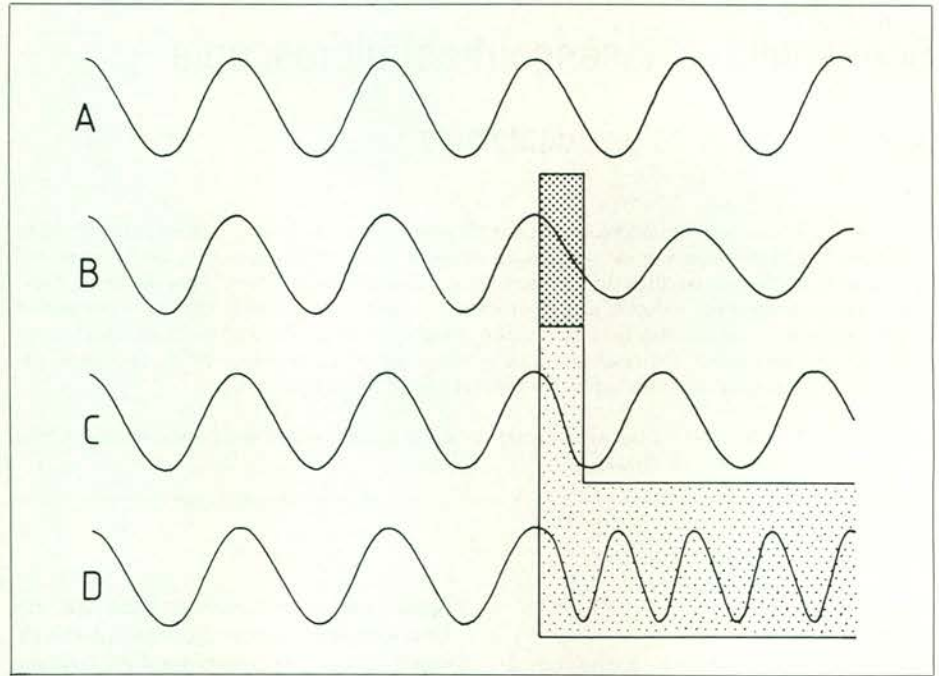


Afb. 1. Stralenbuiging bij het gebruik van een paraboloïd- (A) en een kardioïdcondensor (B).

3 Fasencontrastmicroscopie

Alvorens de werking van de fasencontrastmicroscop te beschrijven, lijkt het raadzaam enkele begrippen uit de geometrie duidelijk te maken. Licht plant zich voort via een golfbeweging. Aan elke golfbeweging kan men enkele primaire kenmerken toeschrijven: de golflengte, de amplitude (de hoogte van de golf), de fase (de stand van de golfbeweging op een bepaalde plaats en tijd) en de snelheid waarmee de golf zich voortplant (dit is in een homogeen medium het produkt van de golflengte en de trillingsfrequentie). Wanneer een lichtbundel een object bereikt, kunnen zich drie fenomenen samen of afzonderlijk voordoen: absorptie (hierbij wordt de energie van de lichtbundel overgedragen op het object) weerkaatsing (hierbij wordt de lichtbundel teruggekaatst) en transmissie (hierbij loopt de lichtbundel door het object heen maar wordt in zijn verloop van richting veranderd, met andere woorden afgebogen). De verandering in richting van een lichtstraal die door een object heen dringt, de breking genoemd, is afhankelijk van de dichtheid van dit object. Wanneer de lichtbundel vanuit de lucht invalt op een glazen plaat (dus een medium bereikt met hogere dichtheid) dan kantelt deze bundel in de richting van de loodrechte op het gegeven oppervlak. Verlaat deze straal de glazen plaat om terug in de lucht te komen (minder dichtheid), dan kantelt deze straal weg van de loodrechte. Bij een glazen plaat met perfect evenwijdige oppervlakken (dekglasje) zullen beide kantelbewegingen dusdanig zijn dat de uittrekkende straal terug evenwijdig wordt aan zijn oorspronkelijke richting, met echter een lichte verschuiving.

In afbeelding 2 worden de basisbegrippen waarop de fasencontrastmicroscopie is gebouwd, verduidelijkt. Er wordt hierbij uitgegaan van drie lichtgolven die volledig identiek zijn (zelfde golflengte, amplitude en fase). Straal A ontmoet geen obstakels en blijft onveranderd. Straal B dringt door een lichtabsorberende materie met dezelfde dichtheid als het eerste medium. Het effect na passage is een vermindering in amplitude, doch de fase, golflengte en trillingsfrequentie zijn identiek aan straal A. Straal C loopt in een volkomen transparante materie (geen absorptie) doch met een hogere brekingsindex (dus dichter). Hierbij verandert niet de amplitude, maar wel de golflengte en dus ook de voortplantingssnelheid. De trillingsfrequentie blijft echter identiek. Bij het verlaten van deze materie komt de oude golflengte en dus ook de voortplantingssnelheid terug, maar de golf is nu, in vergelijking tot A uit de pas (faseverschil). Een verandering in amplitude (B) geeft voor het oog een licht-donker verandering, terwijl een zuivere verschuiving in fase (C) voor het oog, primair niet



Afb. 2. Verloop van een golf: veranderingen in amplitude, fase en golflengte. Golf A doorkruist geen materie. Golf B doorkruist een lichtabsorberende materie met gelijke brekingsindex als het eerste medium. Golf C doorkruist een transparante materie met hogere brekingsindex. Golf D doorkruist een transparante materie met hogere brekingsindex en blijft in deze materie.

waarneembaar is.

Een ander verschijnsel in de geometrie is dat twee golfbewegingen elkaar kunnen uitdoven of versterken (interferentie) op voorwaarde dat zij eenzelfde trillingsfrequentie hebben. Door de extreem hoge trillingsfrequentie van licht (10^{15} cycles/sec.) is een volledig gelijk trillingsgetal alleen te bereiken, indien dergelijke golven afkomstig zijn van eenzelfde punt van een lichtbron.

Bij microscopisch onderzoek van levende cellen, bacteriën of weefsels via objecten met een dikte van bijvoorbeeld $5\mu\text{m}$ leidt dit tot verschillen in fase van $\frac{1}{4}$ tot $\frac{1}{2}$ van de golflengte en tot minimale verschillen in amplitude (weinig absorptie). In de fasencontrastmicroscop worden deze geringe verschillen versterkt.

De fasencontrastmicroscop (afb. 3) bestaat uit twee speciale elementen, de fasering (in de condensor) en het fassenplaatje (in het objectief). Dankzij de fasering (= ringvormig diafragma), zal het object slechts belicht worden via een holle cilindervormige stralenbundel. In het objectief bevindt zich een transparant plaatje met een speciale ring, een ring waarop de onvervormde (dus directe) stralenbundel van de condensor in focus wordt gebracht. De ring verschilt van de rest van het plaatje in twee aspecten: 1. het is dikker, zodat de lichtstraal die hier passeert een grotere verschuiving in de fase zal ondergaan ten opzichte van de stralen buiten deze ring (afb. 2c en 3), meestal een verschil in fase van $\frac{1}{4}$; 2. het is bedekt met een absorberend materiaal (opgedampt) zodat het licht dat deze

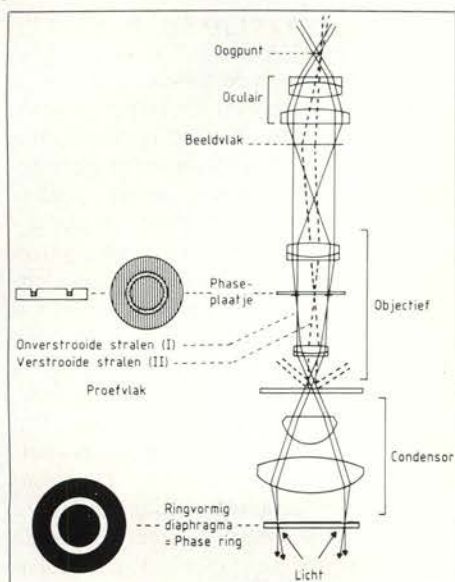
ring passeert ook nog in amplitude (dus intensiteit) wordt verminderd (afb. 2b).

Wanneer nu een parallelle lichtbundel een puntje uit een object raakt, zal een deel van deze bundel zonder richtingsverandering doorlopen, terwijl een ander deel wordt verstrooid (afb. 3).

Het onveranderde deel (I) passeert de fasering zodat de amplitude vermindert (minder licht) en de fase verandert ($\frac{1}{4}$ faseverschuiving). Het andere deel van de bundel (II), dat breking ondergaat ten gevolge van de brekingsindex van het object, wordt van richting veranderd en ondergaat een fasenverandering van $\frac{1}{4}$ tot $\frac{1}{2}$. Aangezien deze straal werd afgebogen, zal ze niet meer door de ring van het fassenplaatje verlopen. Op ons netvlies komen de twee stralen (de directe en de verstrooide) weer samen en treedt interferentie (versterking of doving) op. Via deze interferentie ontstaat een reeks heldere en donkere vlekken.

Beide technieken zijn zeer geschikt voor de bestudering van levende cellen, zoals bacteriën, en voor de analyse van de inhoud van leukocyten en andere somatische cellen. De donkerveldmicroscop, die duidelijke uitwendige details toont, zoals onder andere flagellen, wordt dan ook frequent gebruikt om *Treponema pallidum* (verwekker van syfilis) op te sporen in het vocht van de chancre.

De fasencontrastmicroscop verdient de voorkeur bij de analyse van structuren met slechts geringe verschillen in brekingsindex zoals de inwendige structuren van micro-organismen of cellen. Deze laatste ver-



Afb. 3. Een fasencontrastmicroscop. Basisprincipes van de belichting.

schillen slechts weinig in brekingsindex van het protoplasma. De fasencontrastmicroscop wordt bovendien veelvuldig aangewend bij cinemicrografie.

4 Methodologie

4.1 Voorkómen van contaminatie

Contaminatie van het subgingivale plaque-monster kan optreden via het speeksel, via de supragingivale plaque en zelfs via de coronale lagen van de subgingivale plaque. Om contaminatie vanuit het speeksel te voorkomen, wordt het gebruik van wattenrollen, buccaal en oraal, aangeraden. De supragingivale plaque, met een duidelijk verschillende samenstelling, wordt voor de monsterneming verwijderd met een scaler of met een wattenstaafje. Sommige auteurs stellen zelfs voor de tand vooraf te drogen met de luchtspuit.¹ In hoeverre dit laatste echter geen invloed heeft op de subgingivale plaque blijft onduidelijk. Ten slotte dient er op gewezen dat de samenstelling van de subgingivale plaque wijzigt naarmate het monster meer apicaalwaarts wordt genomen. Omar en medewerkers vonden dat apicaalwaarts, binnen eenzelfde pocket, de concentratie aan kokken verminderde terwijl deze aan spirocheten vermeerderde.² Bij onderzoek van diepe pockets lijkt het raadzaam, voor de monsterneming, de coronale helft van de subgingivale plaque te verwijderen.

4.2 Techniek van monsterneming

De drie meest beschreven technieken van monsterneming zijn: de scaling, de pocket-spoeling en het gebruik maken van een paperpoint. Tussen deze technieken be-

staan echter belangrijke verschillen. Voor de scaler en de capillaire tube lijkt het vrijwel onmogelijk de bodem van de pocket te bereiken hetgeen leidt tot een selectieve monsterneming. Ook de hoeveelheid plaque, die door middel van deze technieken uit de pocket kan worden opgenomen, verschilt. Tanner en Goodson concludeerden dat bij monsterneming met een scaler 70% van de plaque verwijderd wordt uit de pocket, bij spoeling 25% en met een paperpoint slechts 10%.³

Het is dan ook niet verwonderlijk dat de samenstelling van de plaque varieert naar gelang de techniek van monsterneming. De paperpoint selecteert eerder de zwak aan de weefsels gebonden of 'zwevende' bacteriën.³ Kiel en Lang,⁴ en Tanner en Goodson,³ vonden bijvoorbeeld procentueel hogere concentraties *Bacteroides* bij gebruik van een paperpoint dan bij monsterneming met een curette. Moore en medewerkers daarentegen vonden geen verschil tussen beide technieken in de concentratie aan *Haemophilus actinomycetemcomitans*.⁵ Een vergelijkend donkerveldmicroscopisch onderzoek tussen een monsterneming met een curette of via een spoeling toonde een significant lagere concentratie aan spirocheten en beweeglijke staafjes indien een spoelmethode werd aangewend.⁶

Het blijft echter de vraag hoe een van bovenvermelde technieken de bacteriën kan bereiken die het worteloppervlak of het omringende weke weefsel binnendringen.

4.3 Voorbereiding tot analyse

Na de monsterneming – vooral bij gebruik van een curette of van een paperpoint – moet de plaque homogeen verdund en/of opgelost worden in een verdunningsvloeistof. De meest gebruikte verdunningsvloeistoffen zijn de Ringer-oplossing, een NaCl-oplossing in water, of dezelfde oplossing maar met een toevoeging van gelatine. Omar en Newman toonden aan dat deze vloeistoffen op zichzelf reeds aanleiding kunnen geven tot artefacten. De contaminatie is het minst bij gebruik van een verse 0,85% zoutoplossing in water, is matig bij gebruik van de Ringer-oplossing of een oude oplossing van zout en is het meest frequent bij een 0,85% oplossing van zout met 1% gelatine.

Om in de verdunningsvloeistof een homogene verdeling van de plaque te verkrijgen kan men gebruik maken van sonische apparatuur of van een tuberculespuitje waarmee de plaque herhaaldelijk wordt opgezogen en uitgespoten. Niet alle bacteriën zijn echter even ongevoelig voor deze technieken. Zo blijken Gram-positieve bacteriën de sonische apparatuur beter te tolereren dan Gram-negatieve bacteriën en zijn vooral spirocheten extreem gevoelig.⁷

Bij gebruik van een tuberculespuitje speelt de frequentie van handelen een belangrijke rol. Omar en Newman stelden vast dat wanneer de plaque met de vloeistof slechts zevenmaal opgezogen en uitgespoten wordt, dit tot een niet-homogene verdeling leidt.¹ Zij stelden daarom voor om deze handeling tienmaal uit te voeren. Sommige bacteriën zijn echter ook voor deze techniek van verdeling gevoelig, vooral wanneer de handeling bijvoorbeeld 15 maal herhaald wordt (bijv. de spirocheten, *Camphylobacteriën* en *Vibria species*).

4.4 Het aanbrengen van het monster op het draagglasje

Voor een analyse via donkerveld- of fasencontrastmicroscopie dient het preparaat zo dun mogelijk te zijn (monolayer van bacteriën). Daarom zal men slechts een kleine hoeveelheid van het in oplossing gebrachte monster aanbrengen op het draagglasje. Het dekglasje wordt onder een hoek aangebracht en traag verder gekanteld zodat de vloeistof zich homogeen onder het volledig dekglasje verspreidt; aldus wordt insluiting van luchtbellens voorkomen. Om de overtollige vloeistof te verwijderen, wordt het draagglasje omgekeerd, op een vezelvrij papier geplaatst en wordt een zachte druk uitgeoefend. Ook in deze procedure kunnen verschillende fouten aanleiding geven tot artefacten. Zo dient veel aandacht te worden besteed aan het voorkomen van stofdeeltjes of papiervezeltjes op het draag- of dekglasje. Het afvegen van het draagglasje met een vezelvrij lensdoekje is aan te raden.¹

4.5 Analyse

De analyse van een plaquemoster beoogt een indeling van de aanwezige bacteriën op basis van vorm, grootte en beweeglijkheid. Voor de analyse van een plaquemoster kan de volgende indeling gebruikt worden:⁸

- kokken: ronde bacteriën met een diameter van 0,5 μm tot 1,0 μm (met inbegrip van kokkobacillen, bacteriën die in lengte niet langer zijn dan tweemaal de breedte);
- rechte staafjes: niet van flagellen voorziene bacteriën met een breedte van 0,5 μm tot 1,5 μm , met een lengte-breedte verhouding van $\frac{1}{2}$ tot $\frac{1}{16}$, met afgeronde uiteinden;
- filamenten: bacteriën met een breedte van 0,5 μm tot 1,5 μm en een lengte van meer dan zesmaal de breedte. Deze bacteriën vertonen dikwijls vertakkingen;
- fusiformen: bacteriën met een breedte van 0,3 μm tot 1,0 μm , een lengte van circa 10 μm en puntige uiteinden;
- kromme staafjes: halve maanvormige

bacteriën met de afmetingen van de rechte staafjes. Dit zijn waarschijnlijk dode, beweeglijke staafjes;

- spirocheten: kurkotrekkervormige bacteriën. Men onderscheidt kleine (0,2 μm - 0,3 μm breed, 10 μm lang), medium (0,3 μm - 0,4 μm breed, 15 μm lang), en grote spirocheten (0,5 μm of meer breed, lengte tot 20 μm);
- beweeglijke staafjes; alle bacteriën, met uitzondering van de spirocheten, die een beweging vertonen. Een onderscheid dient te worden gemaakt tussen een echte beweging en de Brownse bewegingen (beweging van kleine partikels in oplossing ten gevolge van botsingen met watermoleculen) of een beweging ten gevolge van de stroming van de verdunningsvloeistof.

In de meeste studies wordt deze indeling vereenvoudigd van negen tot vier typen: de kokken, de beweeglijken, de spirocheten en de anderen. Listgarten, de grondlegger van de fasencontrastmicroscopie, stelt voor 100 bacteriën te tellen alvorens de relatieve percentages te berekenen. Omar en Newman vonden echter dat de intra-onderzoekerreproduceerbaarheid duidelijk verbeterde indien 200 bacteriën werden geteld.¹ Zij stelden bovendien vast dat het voordelen biedt om verschillende regio's van het preparaat te bekijken in plaats van zich te beperken tot een of twee zones.

Ook de tijdspanne tussen monsterneming en verwerking kan de analyse beïnvloeden. Ideaal moet een monster altijd onderzocht worden binnen het uur na de monsterneming. Indien men wacht met het maken van de verdunningsprocedure of met het analyseren van het preparaat, dan zal er een duidelijke daling (tot 50%) optreden in de concentratie van beweeglijke bacteriën.¹

4.6 Reproduceerbaarheid

Wanneer twee monsters direct na elkaar worden genomen uit eenzelfde pocket is de reproduceerbaarheid vrij hoog. Noch Goodson en medewerkers,⁹ noch Strand en medewerkers,⁶ konden significante verschillen aantonen tussen herhaalde monsterneming (zelfde pocket, zelfde dag) voor zowel een monsterneming met curette als met de spoelmethode. De reproduceerbaarheid van de paperpoint werd in kweekstudies bewezen door Christersson en medewerkers.¹⁰ Moore en medewerkers vonden in een kweekstudie ook geen verschillen tussen twee plaquemonters met curette uit eenzelfde pocket.¹¹

Bedraagt de tijd tussen twee duplicaatregistraties een week of meer dan kunnen wel verschillen optreden. Bij gebruik van de curette of van de spoelmethode vonden Strand en medewerkers een 50% reductie in de concentratie aan spirocheten bij een

herhaalde meting na twee weken.⁶ Dit is in overeenstemming met observaties van Mousques en medewerkers, ook al gaven zij aan dat deze verschillen zouden verdwijnen na zeven dagen.¹² Voor een monsterneming met een paperpoint konden Mombelli en medewerkers echter geen verschillen vinden tussen herhaalde metingen binnen zeven tot tien dagen.

5 Bruikbaarheid in de parodontologie

Van alle gekende diagnostische parameters in de parodontologie is er geen enkele die als goede predictor voor verdere botafbraak beschouwd kan worden. Het klinisch belang van de fasencontrastmicroscopie is vooral bekeken vanuit het standpunt de mogelijke pathogenen voor de parodontitis te identificeren. Verschillende auteurs zagen correlaties tussen een verhoogd aantal spirocheten en beweeglijke vormen, en hun

activiteit binnen een pocket. Anderen zagen geen enkel verband, ook niet met de klinische status van de patiënt.

Listgarten vindt echter waarden voor de sensitiviteit van 80% wanneer er een toename van 20% is aan spirocheten en beweeglijke vormen binnen een pocket. Anderzijds trachtte men aan de hand van plaque-analyse met de fasencontrastmicroscopie de recalldata voor de patiënten te bepalen. Een aldus rationeel behandelen van de patiënt resulteerde in dezelfde waarden voor plaque- en gingivitisindices, vergeleken met een vast getimede controlebehandeling waarbij, ongeacht de samenstelling van de pocket van de patiënt, de nodige pocketbehandeling uitgevoerd werd.¹⁵ De fasencontrastmicroscopie blijft een goedkope en snelle methode, vergeleken met het maken van kweekculturen. Door het visueel maken van de pathogene bacteriën wordt bovendien een motivatie van de patiënt in de hand gewerkt.

Summary

THE USE OF THE DARKFIELD AND PHASE CONTRAST MICROSCOPY IN THE EXAMINATION OF DENTAL PLAQUE

Key words: Periodontology – Darkfield microscopy – Microbiology

Microscopic evaluation of a dental plaque sample is not very useful, since the bacteria are difficult to be distinguished from the diluent (same refractive index). Two types of microscopic analyses try to solve this problem in a different way. Using a darkfield microscope, the object is illuminated by slanting rays of light, that are then dispersed or bended away and enter the object. In this way a shining image on a dark background is formed. The phase contrast microscope uses two principles of the geometry (wave length and amplitude) to create an image of the illuminated cells. Methodologically the next aspects are important, since they strongly influence the outcome of the analysis: contamination of the sample, technique of sampling and preparation of the sample. The reproducibility of the above mentioned techniques is high when a great number of parameters is kept constant. The analysis of the sample gives us some clinical relevant information.

Literatuur

- ¹OMAR AA, NEWMAN HN. False results associated with darkground microscopy of subgingival plaque. *J Clin Periodontol* 1986; 13: 814-24.
- ²OMAR AA, NEWMAN HN, BULMAN J, OSBORN J. Darkground microscopy of subgingival plaque from the top to the bottom of the periodontal pocket. *J Clin Periodontol* 1990; 17: 364-70.
- ³TANNER ACR, GOODSON JM. Sampling of the microorganisms associated with periodontal disease. *Oral Microbiol Immunol* 1986; 1: 15-20.
- ⁴KIEL RA, LANG NP. Effect of subgingival sampling techniques on periodontal microbiological culturing. *J Dent Res* 1983; 62: 247. Abstract.
- ⁵MOORE EC, HOLDEMAN LV, CATO EP, et al. Comparative bacteriology of juvenile periodontitis. *Infect Immun* 1985; 48: 507-19.
- ⁶STRAND P, PALMER RM, WILSON RF. A comparison of two methods using darkfield microscopy. *Oral Microbiol Immunol* 1987; 2: 142-4.
- ⁷OLSEN J, SOCRANSKY SS. Ultrasonic dispersion of pure cultures of plaque bacteria and plaque. *Scand J Dent Res* 1981; 89: 307-12.
- ⁸LISTGARTEN MA, HELDEN L. Relative distribution of bacteria at clinically healthy and periodontally diseased sites in humans. *J Clin Periodontol* 1978; 5: 115-32.
- ⁹GOODSON JM, OFFENBACHER S, FARR DH, HOGAN PE. Periodontal disease treatment by local drug delivery. *J Periodontol* 1985; 56: 265-72.
- ¹⁰CHRISTERSSON LA, SLOTS J, ROSLING BG, GENCO RJ. Microbiological and clinical effects of surgical treatment of localized juvenile periodontitis. *J Clin Periodontol* 1985; 12: 465-72.
- ¹¹MOORE EC, HOLDEMAN LV, CATO EP, et al. Variation in periodontal floras. *Infect Immun* 1984; 46: 720-6.
- ¹²MOUSQUES T, LISTGARTEN MA, STOLLER NH. Effect of sampling on the composition of the human subgingival microbial flora. *J Period Res* 1980; 15: 137-43.
- ¹³MOMBELLI A, MINDER CE, GUSBERTI FA, LANG NP. Reproducibility of microscopic and cultural data in repeated subgingival plaque samples. *J Clin Periodontol* 1989; 16: 434-42.
- ¹⁴LISTGARTEN MA. A perspective on periodontal diagnosis. *J Clin Periodontol* 1986; 13: 175-81.
- ¹⁵LISTGARTEN MA, LEVIN S, SCHIFTER CC, et al. Comparative longitudinal study of 2 methods of scheduling maintenance visits: 2-year data. *J Clin Periodontol* 1986; 13: 692-700.