

## Correlación entre la profundidad de sondaje de la bolsa y el recuento de neutrófilos en la placa dental, saliva y fluido crevicular gingival

Smruti Jayprakash Barbechad, MDS<sup>a</sup>, Anirudh Balakrishna Acharya, MDS<sup>b</sup>, y Srinath Thakur, MDS<sup>b</sup>

**Objetivo:** Los neutrófilos juegan un papel esencial en la respuesta innata inmunitaria. No existe ningún estudio que haya correlacionado los neutrófilos de la placa, saliva, y fluido crevicular gingival (FCG) con la profundidad de sondaje de la bolsa (PSB) y entre ellos en sujetos con periodonto sano y sujetos con enfermedad periodontal. El propósito de este estudio fue valorar y correlacionar los niveles de neutrófilos en la placa dental, saliva y FCG en sujetos con periodonto sano y con enfermedad periodontal.

**Material y métodos:** Se reclutaron cuarenta y cinco sujetos, que se dividieron en tres grupos en función de su Índice Gingival (IG) e Índice Periodontal de Russell (IP): sujetos clínicamente sanos (Grupo 1), sujetos con gingivitis (Grupo 2), y sujetos con periodontitis crónica generalizada (Grupo 3). Las muestras de saliva y FCG se obtuvieron mediante filtros Durapore, y las de placa mediante curetas subgingivales específicas de área. El recuento de neutrófilos se obtuvo con una cámara Neubauer mejorada.

**Resultados:** Se hallaron neutrófilos en las tres muestras de placa, saliva y FCG de todos los grupos. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre

el número de neutrófilos y la severidad de la enfermedad periodontal. La mayor fuerza de asociación se encontró entre la PSB y los neutrófilos de la placa.

**Conclusión:** Existe una correlación positiva entre los neutrófilos de la placa dental y la PSB en sujetos con periodonto sano y con enfermedad periodontal.

(*Quintessence Int.* 2012;43(2):111-7)

La enfermedad periodontal se define como una reacción inflamatoria que se produce como respuesta a una infección microbiana asociada a la placa dental y que termina produciendo pérdida de tejido. Los neutrófilos o leucocitos polimorfonucleares (PMNs) juegan un papel fundamental como parte de la respuesta inmunitaria innata, puesto que actúan como primera línea de defensa frente a los agentes invasores<sup>1</sup>. La presencia de leucocitos en la cavidad oral ha despertado el interés de los científicos desde hace bastantes años. Calonius comparó el número de leucocitos salivares en pacientes con encía sana, pacientes con encía inflamada y pacientes edéntulos. Encontró que los pacientes edéntulos tenían los niveles leucocitarios más bajos y los pacientes con gingivitis los más altos, lo que sugirió que el acceso de los leucocitos a la saliva tenía lugar a través del surco gingival<sup>2</sup>. Schiott y Loe confirmaron estos hallazgos<sup>3</sup>.

En el periodonto sano de humanos y de animales de experimentación, los PMNs migran hacia el epitelio sulcular y epitelio de unión o residen en ellos y se encuentran también en el tejido conectivo subyacente<sup>4</sup>. La acumulación de placa y el desarrollo de inflamación clínica producen un aumento del número de leucocitos presentes en la lesión<sup>5-7</sup>. La localización de los PMNs en la inter-

<sup>a</sup>Periodoncista consultor. Departamento de Periodoncia e Implantes Orales. Facultad de Ciencias Dentales y Hospital Sri Dharmasthala Manjunatheswara. Dharwad, Karnataka, India.

<sup>b</sup>Profesor. Departamento de Periodoncia e Implantes Orales. Facultad de Ciencias Dentales y Hospital Sri Dharmasthala Manjunatheswara. Dharwad, Karnataka, India.

Correspondencia: S.J. Bhadbhade. Department of Periodontics and Oral Implantology. Sri Dharmasthala Manjunatheswara College of Dental Sciences and Hospital. PB Road. Dharwad, Karnataka, India 580009. Correo electrónico: smrutibhadbhade@gmail.com

fase de la placa, su actividad fagocítica, y los signos de liberación de enzimas lisosomales; aportan evidencia morfológica de que estas células parecen proteger a los tejidos frente a los ataques bacteriológicos y, al mismo tiempo, inducen daño tisular y aumento de la inflamación mediante la liberación de enzimas lisosomales. Por todo ello, un número elevado de leucocitos subgingivales puede ser indicativo de lesión periodontal activa<sup>8</sup>. De esta manera, el recuento leucocitario subgingival puede resultar muy útil para identificar puntos de enfermedad periodontal activa. Para comprobarlo hay que establecer si existe una correlación entre la profundidad de sondaje de la bolsa (PSB) y los neutrófilos de la placa.

La fase activa de la enfermedad periodontal es un periodo de exacerbación de la enfermedad que cursa con pérdida ósea, pérdida de tejido conectivo, y respuesta inflamatoria. Esta actividad ha sido evaluada por diversos métodos, como la actividad enzimática y las pruebas microbiológicas, pero todos ellos resultan complicados por lo que tienen una escasa aplicación clínica. Los esfuerzos por encontrar otros métodos más sencillos y fáciles han resultado infructuosos<sup>9</sup>.

Raeste y Aura fueron los primeros en proponer la cuantificación neutrofílica para evaluar la actividad de la enfermedad periodontal y medir la efectividad terapéutica<sup>10</sup>. Parece ser que la detección de neutrófilos en las muestras de placa reflejaría la respuesta del huésped a todos los periodontopatógenos. Esta superioridad del recuento de neutrófilos como herramienta diagnóstica para la enfermedad periodontal puede transferirse al marco clínico. Hay estudios que han relacionado los neutrófilos salivares con la salud gingival y los neutrófilos del fluido crevicular gingival (FCG) con la salud periodontal<sup>4,11-15</sup>. Existe muy poca literatura sobre evaluación de neutrófilos en la placa<sup>16</sup>. No existen estudios que hayan abordado la relación entre los niveles de neutrófilos en la placa, la saliva, y el FCG y su correlación con parámetros clínicos como la PSB. Por ello, la finalidad de esta investigación fue valorar la correlación de los niveles de neutrófilos en la placa salivar y el FCG en sujetos con periodonto sano y enfermo, así como su correlación con la PSB.

### Material y métodos

El estudio se llevó a cabo en el Departamento de Periodoncia e Implantes Orales de la Facultad de Ciencias Dentales y Hospital Sri Dharmasthala Manjunatheswara, Dharwad, Karnataka, India, en abril a junio del 2010. Se reclutaron cuarenta y cinco sujetos (25 mujeres y 20 hombres) de entre 20 y 65 años de edad. Todos ellos firma-

ron el consentimiento informado. El comité de ética de la institución aportó la consiguiente autorización. Se diseñaron tres grupos de 15 sujetos cada uno: grupo 1 (clínicamente sanos), grupo 2 (gingivitis), y grupo 3 (periodontitis crónica generalizada) (basándose en el Índice Gingival [IG] y el Índice Periodontal de Russell [IP]<sup>17,18</sup>).

Los criterios de inclusión fueron: (1) grados variables de enfermedad periodontal (salud, gingivitis, y periodontitis crónica generalizada); (2) salud sistémica; y (3) ausencia de tratamiento periodontal invasivo en los últimos 6 meses. Los criterios de exclusión fueron: (1) enfermedades sistémicas como diabetes mellitus; (2) embarazo; (3) tabaco y alcoholismo; (4) existencia de cualquier enfermedad con posible repercusión en el sistema inmunitario como las infecciones crónicas y cáncer; (5) tratamiento con fármacos que pueden alterar el número o la función de los PMNs; (6) uso de cualquier antibiótico durante el estudio o en el pasado reciente e historia de tratamiento periodontal no invasivo; y (7) presencia de lesiones de caries o de cualquier tipo de ulceración en la mucosa.

Se recopiló la historia dental y médica de todos los participantes, y se sometió a todos ellos a una exploración oral, que incluyó la valoración de caries. Se obtuvieron las puntuaciones del IG e IP de Russell para cada sujeto. La recopilación de datos y las exploraciones fueron llevadas a cabo por un mismo investigador.

### Recogida de saliva

Se pidió a los participantes que se abstuvieran de escupir media hora antes de la obtención de saliva para la estimación de neutrófilos. La saliva total no estimulada se obtuvo del suelo de la boca. Para ello se emplearon filtros de membrana hidrofílica de 0,22 µm de difluoruro de polivinilo (Durapore, Millipore; Pall India Pvt, lot no. 0910ISOO 64). Para recoger las muestras de saliva se utilizaron tiras de 2 × 7 mm (fig. 1). Las tiras se colocaron en el suelo de la boca durante 10 s (fig. 2).

### Recogida del FCG

Un minuto antes de la recogida de muestras se secaron las encías con aire y bolitas de algodón, y se aisló el área con rollitos de algodón. Antes de obtener la muestra de FCG se retiró el cálculo supragingival mediante una cureta estéril. Se colocó una tira de 7 × 2 mm en la entrada del surco y se dejó durante 10 s (fig. 3). Se recogió el FCG de los sujetos sanos y de los sujetos con gingivi-



Figura 1. Material utilizado en el estudio.



Figura 2. Obtención de saliva del suelo de la boca con la tira Durapore.



Figura 3. Obtención del FCG mediante la tira Durapore.



Figura 4. Obtención de placa mediante una cureta específica de área.

tis, mientras en los sujetos con periodontitis, las muestras se tomaron de los lugares con inflamación severa y mayor PSB. Se excluyeron las zonas sin FCG y se desecharon las tiras Millipore contaminadas con sangre y saliva.

#### Recogida de la placa dental

Para la toma de muestras de placa dental se utilizó una cureta Gracey estéril específica de área. En los pacientes con gingivitis, se obtuvo la placa subgingival de las zonas que presentaban máxima inflamación. En el grupo de periodontitis, la placa se obtuvo de los sitios con mayor PSB. Se puso mucho cuidado en prevenir la contaminación (fig. 4).

#### Determinación de neutrófilos

Se insertaron las tiras de saliva y las muestras de FCG, y se suspendieron las muestras de placa en tubos de po-

lipropileno siliconizados de plástico (Sigma) con 40  $\mu$ l de suero salino tamponado con fosfato sin calcio, ácido etilendiaminetetraacético (EDTA) 3 mM, y 1% de albúmina sérica bovina (ASB); y se agitaron con vórtex durante 30 s (fig. 5). Se mezclaron veinte ml de esta suspensión con 10 ml de solución Turks durante 10 min. A continuación se calcularon los neutrófilos con una cámara Neubauer mejorada (Reichert Technologies) (fig. 6).

#### Evaluación estadística

Se introdujeron los datos en Microsoft Excel, y se realizaron los análisis estadísticos usando GraphPad Prism 5.03 (GraphPad Software). Para valorar las diferencias entre los grupos se utilizó el análisis de la varianza de un factor (ANOVA). Se realizó el test de Mann-Whitney para la comparación intergrupal de las cifras de neutrófilos en la placa, saliva y FCG; y para determinar qué pareja era significativa con un intervalo de confianza al 5%. La correlación entre los índices clínicos y los neutrófi-



Figura 5. Suspensión de la tira Durapore en suero salino tamponado con fosfato previa a la agitación con vórtex.

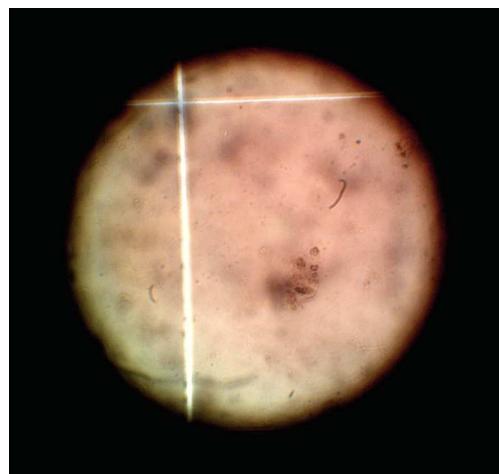


Figura 6. Neutrófilos a 40x aumentos.

los se midió mediante el análisis de correlación de Pearson y pruebas de significación estadística. La fuerza de asociación entre los neutrófilos y la PSB se calculó mediante el análisis de regresión lineal. Se consideraron estadísticamente significativos los valores con una  $p < 0,05$ .

## Resultados

Se encontraron neutrófilos en todas las muestras. Los valores más altos para placa, saliva, y FCG se hallaron en el grupo 3, mientras que los valores más bajos se encontraron en el grupo 1. En la tabla 1 pueden verse los valores de neutrófilos de cada grupo en placa, saliva y FCG. Como puede observarse en la tabla 2, se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el ANOVA univariante, en el número medio de neutrófilos en placa, saliva y FCG entre los grupos. Los resultados del test de Mann-Whitney mostraron diferencias estadísticamente significativas y sugirieron que el número de neutrófilos en la placa, saliva y FCG aumentaba según se avanzaba de periodonto sano a gingivitis y a periodontitis en todas las muestras (tablas 3 a 5). Se halló una correlación positiva entre los índices clínicos y las cifras de neutrófilos (tabla 6). Basándose en el análisis de regresión lineal, la mayor asociación entre la PSB y las cifras de neutrófilos se encontró en la placa. Se encontró una asociación similar entre los neutrófilos del FCG obtenidos intracrevicularmente y los de la placa. Esta asociación fue más débil en los neutrófilos obtenidos extracrevicularmente, y no se halló ninguna asociación entre los neutrófilos salivales y la PSB (tabla 7).

## Discusión

La principal fuente de neutrófilos de la cavidad oral es la migración de estos a partir del surco gingival<sup>2</sup>. Los resultados de este estudio muestran que el número de PMNs en la saliva y el FCG, así como en la placa, aumenta conforme se incrementa la severidad de la enfermedad periodontal. Esto pudo verificarse por la correlación positiva hallada entre el IG e IP de Russell, y las cifras de neutrófilos. La razón puede encontrarse en el aumento de la superficie de epitelio ulcerado, lo que incrementa la migración de PMNs a través del mismo<sup>12</sup>. El empleo

Tabla 1. Cifra media de neutrófilos en la placa, saliva y FCG de periodonto sano y enfermo (en cada grupo,  $n = 15$ )

|        | Grupo | Media $\pm$ DE     |
|--------|-------|--------------------|
| Placa  | 1     | 15.33 $\pm$ 5.61   |
|        | 2     | 52.67 $\pm$ 14.14  |
|        | 3     | 171.20 $\pm$ 84.81 |
| Saliva | 1     | 10.17 $\pm$ 3.97   |
|        | 2     | 18.08 $\pm$ 3.65   |
|        | 3     | 24.42 $\pm$ 6.48   |
| FCG    | 1     | 17.67 $\pm$ 6.66   |
|        | 2     | 59.42 $\pm$ 20.55  |
|        | 3     | 70.08 $\pm$ 17.54  |

DE: desviación estándar; FCG: fluido crevicular gingival.  
Ver el texto para la explicación de los grupos.

Tabla 2. ANOVA univariante para valorar el significado de las diferencias entre grupos

| Neutrófilos | Suma de cuadrados | Media de cuadrados | Valor de <i>p</i> |
|-------------|-------------------|--------------------|-------------------|
| Placa       | 158.900           | 79.440             | 0,000             |
| Saliva      | 1.223             | 612                | 0,007             |
| FCG         | 18.420            | 9.209              | 0,000             |

FCG: fluido crevicular gingival.

Tabla 4. Comparación de los niveles de neutrófilos en saliva en los tres grupos mediante el test de Mann-Whitney

| Grupos comparados | Valor de <i>p</i> |
|-------------------|-------------------|
| 1 con 2           | 0,0002            |
| 1 con 3           | 0,0001            |
| 2 con 1           | 0,0002            |
| 2 con 3           | 0,0036            |
| 3 con 1           | 0,0001            |
| 3 con 2           | 0,0036            |

del recuento de neutrófilos en el FCG para evaluar la actividad de la enfermedad periodontal se ha usado en otros estudios y en ellos se ha observado una correlación positiva con la PSB. Existen numerosas formas de obtener el FCG para la determinación de neutrófilos. Las tiras de Styroflex (BASF) no suelen dar resultados fiables porque las células tienden a agruparse<sup>4</sup>. El método de lavado de Skapski y Lehner y Salonen y Paunio presenta un inconveniente: no se puede precisar el factor de dilución, y por ello no es un buen método<sup>19,20</sup>. El método empleado en este estudio es el más recomendable para la estimación de PMN<sup>15</sup>. Se necesitan filtros Millipore especiales para analizar los PMNs recogidos del FCG. Los estudios previos empleaban exclusivamente

Tabla 3. Comparación de los niveles de neutrófilos en placa en los tres grupos mediante el test de Mann-Whitney

| Grupos comparados | Valor de <i>p</i> |
|-------------------|-------------------|
| 1 con 2           | 0,0000            |
| 1 con 3           | 0,0000            |
| 2 con 1           | 0,0000            |
| 2 con 3           | 0,0001            |
| 3 con 1           | 0,0000            |
| 3 con 2           | 0,0001            |

Tabla 5. Comparación de los niveles de neutrófilos en FCG en los tres grupos mediante el test de Mann-Whitney

| Grupos comparados | Valor de <i>p</i> |
|-------------------|-------------------|
| 1 con 2           | 0,0000            |
| 1 con 3           | 0,0000            |
| 2 con 1           | 0,0000            |
| 2 con 3           | 0,0024            |
| 3 con 1           | 0,0000            |
| 3 con 2           | 0,0024            |

FCG: fluido crevicular gingival.

Tabla 6. Relación de neutrófilos en placa, saliva y FCG con los índices clínicos utilizando el coeficiente de correlación de Pearson

|               | Placa  | Saliva | FCG    |
|---------------|--------|--------|--------|
| IG            | 0,5843 | 0,7258 | 0,8362 |
| IP de Russell | 0,8625 | 0,6902 | 0,618  |

FCG: líquido crevicular gingival; IG: índice gingival; IP: índice periodontal.

Tabla 7. Fuerza de asociación entre la PSB y las cifras de neutrófilos en placa, saliva, y FCG (intracrevicular y extracrevicular) utilizando el análisis de regresión lineal

| Placa             | FCG intracrevicular | FCG extracrevicular | Saliva            |
|-------------------|---------------------|---------------------|-------------------|
| 0,9446            | 0,9394              | 0,6485              | 0,09207           |
| <i>p</i> < 0,0001 | <i>p</i> < 0,001    | <i>p</i> = 0,0226   | <i>p</i> = 0,7760 |

LCG, líquido crevicular gingival; PSB: profundidad de sondaje de la bolsa.

para la obtención de LCG, el método extracrevicular, y encontraban una buena correlación entre la PSB y el número de neutrófilos del FCG en las bolsas superficiales, pero no en las bolsas más profundas<sup>15</sup>. En este estudio se utilizaron métodos de recogida ex tracreviculares e intracreviculares, ya que el empleo único del FCG extracrevicular puede no reflejar la actividad de enfermedad en la base de la bolsa. En este estudio se encontró una fuerza de asociación similar entre los neutrófilos del FCG y los de la placa. Para tomar muestras de FCG se necesitan filtros Millipore especializados. Sin embargo, las muestras de placa pueden obtenerse mediante curetas subgingivales, por lo que en el marco clínico habitual es más fácil su empleo. El análisis de regresión lineal del estudio mostró una fuerte asociación entre la PSB y el número de PMN de la placa, y la fuerza de correlación fue equiparable a la encontrada entre el número de PMN del FCG cuando se obtuvo la muestra intracrevicularmente de la zona con profundidad de sondaje mayor. La asociación fue más débil cuando los niveles de PMN y la PSB se obtuvieron mediante un método de recolección extracrevicular. Esto apoya los resultados del otro estudio<sup>15</sup>. No se encontró ninguna correlación entre los niveles de PMN salivales y la PSB; lo que sugiere que la muestra de saliva no es útil cuando se busca un diagnóstico periodontal específico de área.

A pesar del enorme desarrollo que han experimentado los marcadores diagnósticos microbiológicos e inmunológicos, la mayoría de ellos no tienen aplicación clínica. Con los marcadores microbiológicos existen numerosas dificultades técnicas, sobre todo para el cultivo de periodontopatógenos anaerobios; por otro lado, se necesita bastante tiempo para obtener los resultados. La biopsia gingival para marcadores inmunológicos tiene sus propias limitaciones<sup>16</sup>. Sin embargo, el examen microscópico, en el mismo sillón dental, de la estimación cuantitativa de PMN no se ve afectado por todas estas limitaciones.

Actualmente, la herramienta diagnóstica más utilizada es el sondaje periodontal, pero supone una medida unidimensional de un espacio tridimensional. Por otra parte, un error de tan solo 1 mm puede arrojar lecturas erróneas de hasta el 50%. No obstante, este método permite una gran velocidad de ejecución y su interpretación es inmediata en comparación con la de otros métodos microbiológicos e inmunológicos. El sondaje periodontal aporta información clínica de la profundidad de la bolsa y de su configuración. Sin embargo, las bolsas periodontales atraviesan períodos de exacerbación y de quiescencia. Estos últimos se caracterizan por una respuesta in-

flamatoria disminuida, una menor pérdida ósea y muy poca o ninguna pérdida de tejido óseo y de tejido conectivo adyacente; lo contrario de lo que ocurre en los períodos de actividad. Por consiguiente, es imprescindible conocer la actividad de la enfermedad actual, puesto que ello resulta determinante para establecer las opciones terapéuticas. Estas consideraciones muestran que las ventajas del sondaje, a pesar de resultar aceptable e irremplazable en la práctica periodontal rutinaria, resultan inútiles cuando se quiere evaluar la actividad de la enfermedad. De ahí que se puedan usar medidas alternativas, basadas en indicadores del proceso inflamatorio, para valorar la actividad de la enfermedad periodontal<sup>16</sup>. Los neutrófilos de la placa podrían usarse para valorar la actividad de la enfermedad siempre y cuando pudieran correlacionarse con la PSB. Este artículo es el primero de este tipo, y muestra una correlación positiva entre la PSB y los neutrófilos de la placa; abriendo de este modo un nuevo horizonte para un estudio longitudinal que investigue la relación entre los cambios de la PSB y los neutrófilos de la placa, y que los convierta en primera elección como marcadores de la actividad de enfermedad.

Estudios posteriores pueden dirigirse hacia el desarrollo de agentes que cambien de color y que puedan emplearse en el sillón dental, de forma similar a los agentes de revelado de la placa que tiñen los neutrófilos de la placa y que permitieran identificar y monitorizar a los sujetos con periodontitis. Se pueden utilizar los neutrófilos de la placa, en clínica, para controlar la actividad de la enfermedad en sujetos con tratamiento periodontal de soporte. Posteriormente, esto se podría desarrollar todavía más para el cribado de sujetos con periodontitis agresivas que cursan con anomalía cuantitativa en los neutrófilos.

### Conclusión

El número de neutrófilos hallados en la placa, saliva y FCG aumenta con la severidad de la enfermedad periodontal, lo que refleja la naturaleza inflamatoria de la enfermedad. Existe una correlación positiva entre los neutrófilos de la placa y la PSB.

### Agradecimientos

Los autores agradecen su ayuda en el estudio al Dr. Arvind Yeri (patólogo clínico) y el Dr. Shwetha Acharya (patólogo oral), SDM College of Dental Sciences and Hospital, Dharwad, India, así como a todos los participantes.

**Bibliografía**

1. Van Dyke TE, Vaikuntam J. Neutrophil function and dysfunction in periodontal disease. *Curr Opin Periodontol* 1994;28:19-27.
2. Calonius PEB. The leukocyte count in saliva. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1958;11:43-46.
3. Schiott CR, Loe H. The origin and variation of number of leukocytes in human saliva. *J Periodontal Res* 1970;5:36-41.
4. Attstrom R. Presence of leukocytes in crevices of healthy and chronically inflamed gingivae. *J Periodontal Res* 1970;5:42-47.
5. Shroeder HE, Graf-de Beer M, Attstrom R. Initial gingivitis in dogs. *J Periodontal Res* 1975;10:128-142.
6. Lindhe J, Rylander H. Experimental gingivitis in young dogs. *Scand J Dent Res* 1975;83:314-326.
7. Payne WA, Page RC, Ogilvie AC, Hall WB. Histopathologic features of the initial and early stages of experimental gingivitis in man. *J Periodontal Res* 1975;10:51-64.
8. Miller DR, Lamster IB, Chasens AI. Role of the polymorphonuclear leukocyte in periodontal health and disease. *J Clin Periodontol* 1984; 11:1-15.
9. Carranza FA, Camargo PM. The periodontal pocket. In: Newman MG, Takei HH, Klokkevold PR, Carranza FA (eds). Carranza's Clinical Periodontology, ed 10. St Louis: Elsevier, 2006: 444-445.
10. Raeste AM, Aura A. Rate of migration of oral leucocytes in subjects with periodontitis. *Scand J Dent Res* 1978;86:43-51.
11. Klinkhamer JM, Zimmerman S. Function and reliability of orogranulocyte migratory rate as a measure of oral health. *J Dent Res* 1969;48:709-715.
12. Skougaard MR, Bay I, Klinkhamer JM. Correlation between gingivitis and orogranulocyte migratory rate. *J Dent Res* 1969;48:716-718.
13. Bender JS, Thang H, Glogauer M. Novel rinse assay for the quantification of oral neutrophils and the monitoring of chronic periodontal disease. *J Periodontal Res* 2006;41:214-220.
14. Claffey N, Magnusson I, Crigger M, Garrett S, Kiger RD, Egelberg J. Subgingival spirochete and leukocyte counts as indicators for response to therapy. *J Clin Periodontol* 1985;12:639-647.
15. Andersen PE, Cimasoni G. A rapid and simple method for counting crevicular polymorphonuclear leucocytes. *J Clin Periodontol* 1993; 20:651-655.
16. Aspey DJ, Kaciroti N, Loesche WJ. The diagnosis of periodontal disease in private practice. *J Periodontol* 2006;77:1572-1581.
17. Loe H, Silness J. Periodontal disease in pregnancy. I. Prevalence and severity. *Acta Odontol Scand* 1963;21:533-551.
18. Beck JD, Arbes JA Jr. Epidemiology of gingival and periodontal diseases. In: Newman MG, Takei HH, Klokkevold PR, Carranza FA (eds). Carranza's Clinical Periodontology, ed 10. St Louis: Elsevier, 2006:120.
19. Skapski H, Lehrer T. A crevicular washing method for investigating immune components of crevicular fluid in man. *J Periodontal Res* 1976;11:19-24.
20. Salonen JI, Paunio KU. An intracrevicular washing method for collection of crevicular contents. *Scand J Dent Res* 1991;99:406-412.