

Manual de prácticas de laboratorio

Pruebas de identificación de factores de riesgo a caries



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

Leonor Sánchez Pérez



RECTOR GENERAL
Dr. Salvador Vega y León
SECRETARIO GENERAL
M. en C. Q. Norberto Manjarrez Álvarez

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA-XOCHIMILCO

RECTORA
Dra. Patricia E. Alfaro Moctezuma
SECRETARIO
Lic. G. Joaquín Jiménez Mercado

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

DIRECTOR
Mtro. Rafael Díaz García
SECRETARIA ACADÉMICA
Dra. Leonor Sánchez Pérez
JEFA DEL PROGRAMA EDITORIAL
Lic. Zyanya Patricia Ruiz Chapoy

COMITÉ EDITORIAL
Esp. Marco Antonio Díaz Franco
Dr. Román Espinosa Cervantes
Dr. Jordan Golubov Figueroa
Dra. María Angélica Gutiérrez Nava
M. en C. Alejandro Meléndez Herrada
M. en C. Dorys Primavera Orea Coria
Dra. Norma Ramos Ibáñez
Dr. Ernesto Sánchez Mendoza

“MANUAL DE PRÁCTICAS DE LABORATORIO. PRUEBAS DE IDENTIFICACIÓN DE
FACTORES DE RIESGO A CARIES”
Primera edición: 2016
ISBN: 978-607-28-0880-5

D.R. © UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
Unidad Xochimilco
Calzada Del Hueso 1100, Col. Villa Quietud, Del. Coyoacán, C.P. 04960, Ciudad de México,
Tel.: 5483 7000 ext. 3783.

Hecho en México

Manual de prácticas de laboratorio.

Pruebas de identificación de factores de riesgo a caries

Leonor Sánchez Pérez



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

Índice

Objetivos	7
Introducción	8
Desarrollo teórico para realizar la práctica # 1	9
Factor de riesgo	9
Factores de riesgo intrínsecos	9
Factores de riesgo clínicos	10
Practica # 1. Factores de riesgo clínicos de la lesión de caries	14
Desarrollo teórico para realizar la práctica # 2	17
Métodos clínicos y epidemiológicos para el diagnóstico de la lesión inicial de la caries	17
Índices de caries dental	19
CEO y CPO sugeridos por la OMS	
Sistema internacional de detección y registro de caries (ICDAS)	22
Método de codificación ICDAS de dos dígitos.	28
Práctica # 2. Diagnóstico de caries utilizando criterios epidemiológicos	30
Desarrollo teórico para realizar la práctica # 3	32
Generalidades sobre el flujo salival	32
Determinación del flujo salival	33
Métodos para la obtención de saliva sin estímulo o reposo	34
Método 1. Prueba o test de saliva global (TSG)	34
Método 2. Prueba de obtención de saliva en reposo escupiendo (spitting)	35
Método 3. Prueba del rollo de algodón	36
Métodos para la obtención de la saliva estimulada	38
Método 1. Estimulación por masticación de cera o parafina	38
Método 2. Estimulación con ácido cítrico	39

Práctica # 3. Determinación del volumen de secreción salival no estimulada y estimulada	40
Qué hacer ante un flujo salival disminuido	41
Desarrollo teórico para realizar la práctica # 4	43
La acción protectora de la saliva contra la caries	43
Dilución y eliminación de azúcares de la dieta diaria	43
Neutralización y amortiguación de ácidos (capacidad buffer)	44
Suministro de iones para la remineralización	45
Medición de la capacidad amortiguadora salival	46
Determinación de la capacidad amortiguadora por el sistema CRT Buffer	47
Práctica # 4. Determinación de la capacidad amortiguadora salival	49
Desarrollo teórico para realizar la práctica # 5	50
Prueba de la velocidad de acidificación salival	50
Prueba de Alban	54
Práctica # 5. Determinación de la velocidad de acidificación de la saliva con el medio de Snyder y/o la prueba de Albán	56
Desarrollo teórico para realizar la práctica # 6	58
Pruebas de laboratorio que utilizan saliva	58
Recuentos salivales de <i>S. mutans</i> en saliva utilizando la técnica MSB	59
Recuento de <i>Lactobacillus</i> utilizando la técnica de Rogosa SL	63
CRT bacteria para el grupo mutans (SM) y lactobacilos (LB)	66
Dentocult SM y Dentocult LB	70
Práctica # 6. Determinación de los niveles de infección de las bacterias asociadas a la lesión de caries.	71
Desarrollo teórico para realizar la práctica # 7	74
Tinciones	74
Tinción de Gram, bacterias Gram positivas	76
Tinción de Gram, bacterias Gram negativas	77

Práctica # 7. Identificación de las bacterias asociadas a la lesión de caries a través de la tinción de GRAM.	78
Material necesario para la realización de las prácticas y proporcionado por el laboratorio	79
Esquema de trabajo a seguir	81
Bibliografía	82
Cuestionario	86
Hoja de registro individual	89

Objetivos

Objetivo general

Considerando que el alumno tiene conocimiento previo para realizar las prácticas en el laboratorio instaurar una dinámica en la disciplina y ejecución en las actividades que realizaran los alumnos del cuarto trimestre durante su formación profesional y clínica, así como establecer una unificación en el llenado de la hoja de registro individual.

Objetivos específicos

1. Mostrar al alumno las diferentes pruebas de laboratorio que se realizan durante el cuarto trimestre en la licenciatura de Estomatología, en el módulo Salud Bucal, para utilizarla como herramienta didáctica, que le facilite la identificación, de algunos factores de riesgo para el desarrollo de la lesión de caries.
2. Que el alumno sea capaz de aplicar pruebas clínicas, salivales y bacteriológicas, y llenar el formato de registro individual en los pacientes, para determinar el riesgo de caries, en él mismo y posteriormente en sus pacientes.
3. Que el alumno conozca y emplee alguno de los métodos descritos para establecer los volúmenes del flujo salival en reposo y en estímulo y pueda verter dicha información en la hoja de registro individual.
4. Que el alumno conozca y emplee alguno de los métodos descritos para establecer la capacidad amortiguadora de la saliva.
5. Que el alumno use el procedimiento para establecer e interpretar la velocidad de acidificación de la saliva.
6. Que el alumno maneje la técnica para la recolección del flujo salival en estímulo, así como la siembra y cuantificación de *S. mutans* y *Lactobacillus* con la finalidad de identificar el riesgo de sus pacientes.

Introducción

Las lesiones de caries son detectadas fácilmente por medio de un examen clínico junto con radiografías interproximales, sin embargo este examen no predice la actividad de caries, ni nos indica la susceptibilidad de un paciente a sufrir esta enfermedad. Por lo que sería de gran utilidad disponer de una prueba fácil y sencilla que pudiera hacerlo. Entendiendo por prueba aquella que permite diferenciar una población en dos subgrupos: los que presentan una determinada característica, y los que no la presentan.

Actualmente en la licenciatura de Estomatología en el módulo Salud Bucal se tiene, la necesidad de que los alumnos puedan realizar las pruebas de actividad de caries, esto se debe fundamentalmente a las siguientes razones: del total de la población que acude a nuestras clínicas casi el 90% sufre del algún tipo de lesión de caries. Por lo que es indispensable establecer el tipo de necesidad y la extensión de medidas preventivas en cada individuo. Indicar el éxito de medidas preventivas y terapéuticas. Motivación y control de programas educativos relacionados con modificaciones dietéticas y de higiene bucal y le permitirán sugerir el tipo de tratamientos restauradores que requiere el paciente, según el control de sus factores de riesgo.

En el presente manual se realiza un desarrollo teórico que le da sustento a cada una de las prácticas que se presentan, indispensables para realizar la identificación del riesgo a desarrollar caries, estas prácticas las ejecuta el alumno en él mismo, se le enseña la forma más adecuada en el llenado de la hoja de registro individual que le permitirá posteriormente establecer el riesgo de sus pacientes y las medidas recomendadas para su atención en relación directa a los factores de riesgo identificados.

Desarrollo teórico para realizar la práctica # 1

El desarrollo científico ha evidenciado que la caries dental es una enfermedad infecciosa y transmisible causada por bacterias que se adhieren a la película adquirida del esmalte y así colonizan la superficie dentaria, básicamente un grupo de estreptococos y lactobacilos. El desarrollo de la lesión se inicia a partir de la ingestión de sacarosa en la dieta, cuando los microorganismos metabolizan glucosa y liberan ácidos orgánicos, como el láctico, propiónico y acético (entre otros), que ocasionan la disolución o desmineralización del esmalte, ocasionando una desorganización de los prismas de esta estructura. Procesos continuos de desmineralización acaban por destruir la fase inorgánica del esmalte. La evidencia clínica de la lesión cariosa se da por afectación y pérdida de los iones inorgánicos de los tejidos dentales duros, que avanza gradualmente y si no ocurre un proceso de remineralización se tiene como consecuencia la pérdida de estructura dentaria en cualquiera de sus superficies¹.

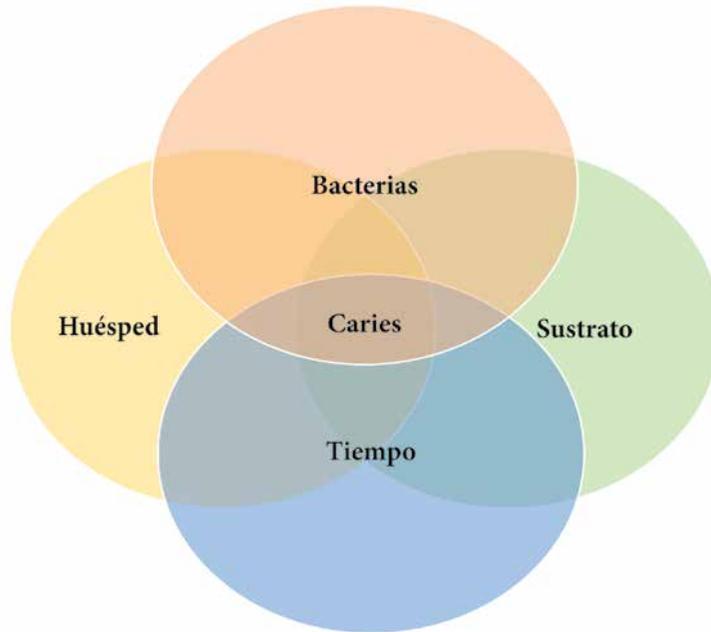
Factor de riesgo

Se define el riesgo como la probabilidad que tiene una persona a desarrollar una enfermedad en un período específico; la susceptibilidad es la condición que hace a un individuo candidato a enfermar, guardando relación con otros factores biológicos. En este sentido, un factor de riesgo es la característica o circunstancia que se puede detectar en el individuo y que se asocia con el aumento en la probabilidad de padecer, desarrollar o estar especialmente expuesto a una enfermedad. En odontología se describen dos tipos de factores de riesgo para desarrollar caries: los intrínsecos y los extrínsecos², para cada factor de riesgo existen indicadores.

Factores de riesgo intrínsecos. Estos los recordamos en la triada de Keyes, los cuales se relacionan con el huésped (diente, saliva), la microflora y el sustrato, que deben interactuar durante un periodo de tiempo¹, sobre el cual se han realizado algunas estimaciones sugiriendo que este proceso se desarrolla entre 3 y 18 meses, es decir, desde la lesión incipiente hasta probablemente una lesión cavitada. Los factores

de riesgo inherentes al huésped se relacionan con la resistencia del esmalte, a la disolución por ácidos (estructura o composición química), la permeabilidad del esmalte y factores salivales² (figura 1).

Figura 1. Modelo de Keyes modificado por Newbrun en 1978.



Factores de riesgo clínicos. La morfología de las fisuras y fosetas tanto de molares como premolares, la presencia de defectos estructurales que tienden a retener la biopelícula (definida como una población o comunidad de bacterias que viven en estructuras organizadas), el contenido de flúor (que da mayor resistencia al esmalte, además de ser bacteriostático) y la posición de los dientes en la arcada (ya que dientes con apiñamiento o giroversiones tienden a retener una mayor cantidad de biopelícula)¹.

Ahora bien, se ha demostrado que existe una relación entre el desarrollo de la lesión y la profundidad de las fisuras; las fisuras amplias (en forma de V o valle) desarrollan menos lesiones, mientras que las fisuras estrechas (en forma de I) y las extremadamente estrechas y asociadas a un espacio más ancho en la parte inferior (están en forma de Y invertida) son las más susceptibles a desarrollar caries^{3,4}. Las fisuras

oclusales tienen diversas formas que van desde unas llanas hasta más profundas y de menos o más irregulares. Nagano presentó una clasificación morfológica de las fisuras con su correspondiente distribución porcentual (o sea con probabilidad de encontrarlas en la población)^{3,4}.

En el siguiente cuadro (1) se presenta un esquema para establecer la morfología de las fisuras de los molares, donde se presentan esquematizadas los diferentes tipos de fisura.

Cuadro 1. Tipo de fisura por morfología oclusal.

Tipo de Fisura	Imagen	Morfología de las diferentes fisuras
V		Entrada amplia a la fisura que se estrecha en el fondo
U		Entrada y fondo del mismo diámetro
I (ó Y1)		Fisura de hendidura muy profunda
IK (ó Y2)		Fisura de entrada muy estrecha con forma de ampolla
Y invertida		Fisura cuyo fondo se bifurca a manera de una Y invertida.

La prevalencia de la distribución porcentual de las fisuras se describe en el cuadro 2 siendo la fisura de mayor prevalencia la fisura V.

Cuadro 2. Prevalencia del tipo de fisura.

Tipo	Prevalencia (%)	Morfología
V	34	Entrada amplia a la fisura que se estrecha en el fondo
U	14	Entrada y fondo del mismo diámetro
I (ó Y1)	19	Fisura de hendidura muy profunda
IK (ó Y2)	26	Fisura de entrada muy estrecha con forma de ampolla
Y invertida	7	Fisura cuyo fondo se bifurca a manera de una Y invertida.

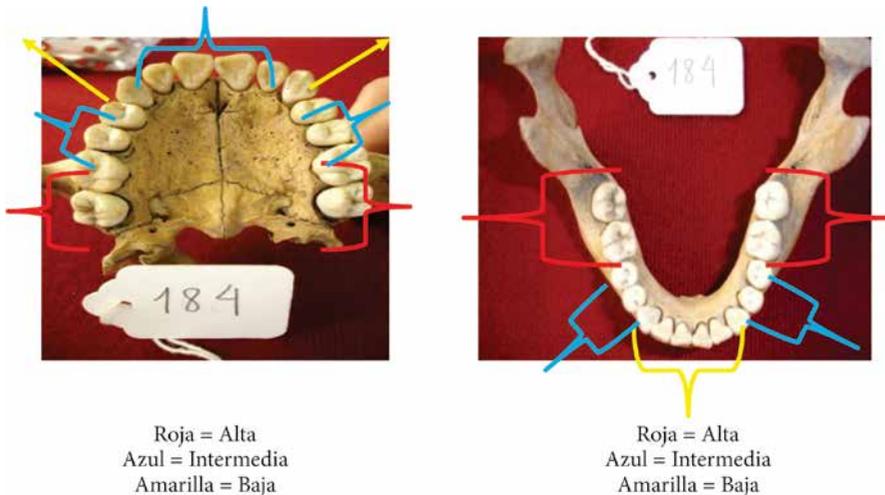
En un mismo diente, una fisura puede variar su trayecto, lo que se observa más frecuentemente es que la lesión de caries comienza en ambas paredes de la fisura y luego penetra perpendicularmente buscando el límite amelodentinario. Al igual que en las superficies lisas, pueden verse cambios macroscópicos como el aspecto opaco y la pigmentación. En la siguiente figura se observan ambos casos (figura 2). Al corte la lesión tiene forma de cono con base hacia la dentina.

Figura 2. Cambios macroscópicos de una lesión cariosa.



Las alteraciones macroscópicas de la caries incipiente de esmalte, preceden a la formación de la cavidad de caries y están presentes aun antes de que notemos la ruptura de la superficie del esmalte. Otro elemento es importante a destacar, es que no todos los dientes tienen el mismo riesgo a desarrollar lesiones cariosas. Los dientes con mayor susceptibilidad, figura 3 en orden de importancia, son los molares inferiores y superiores, los de susceptibilidad intermedia son premolares superiores, inferiores e incisivos superiores y los de susceptibilidad o riesgo bajo son incisivos inferiores y caninos superiores e inferiores.

Figura 3. Susceptibilidad relativa de los dientes, descrita con los colores por grupo de dientes.



Existe también una susceptibilidad relativa al área de los dientes, siendo las superficies oclusales de molares superiores e inferiores las de mayor vulnerabilidad, ya que por la sinuosidad de su forma permiten que las bacterias y los alimentos sean retenidos; a más profundidad de fisuras y fosetas, el ancho de la depresión del esmalte disminuye haciendo al diente más frágil. Las superficies de susceptibilidad media son la mesial y distal, mientras que las de bajo riesgo o vulnerabilidad relativa son las caras vestibulares y linguales, sobre todo de los caninos y centrales inferiores².

Práctica # 1

Factores de riesgo clínico de la lesión de caries

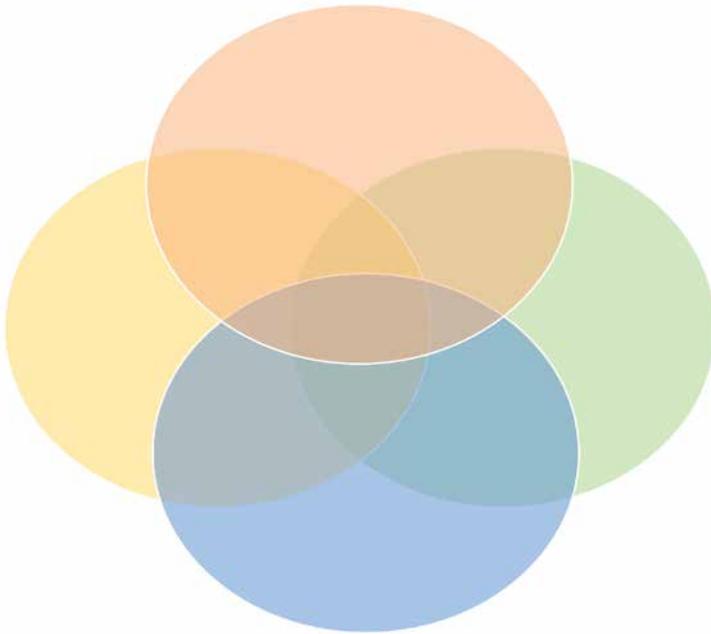
Instrucciones: el alumno anotará en la hoja de registro individual que se proporciona, en el tiempo de 15 minutos las respuestas a las preguntas que están en ella. Teniendo en cuenta que ya tienen los conocimientos teóricos impartidos en el módulo de Salud Bucal para su buen desarrollo.

Introducción: la caries dental es una enfermedad infecciosa y transmisible causada por bacterias que se adhieren a la película adquirida del esmalte y así colonizan la superficie dentaria. El desarrollo de la lesión es a partir de la ingestión azúcares carbohidratos en la dieta. Se responsabiliza también a los desechos de los microorganismos, los metabolizan la glucosa y liberan ácidos orgánicos, como el láctico, propiónico y acético (entre otros), los cuales producen la disolución o desmineralización del esmalte, ocasionando una desorganización de los prismas de esta estructura. Clínicamente la lesión cariosa se da por afectación y pérdida de los iones inorgánicos de los tejidos dentales duros, avanza gradualmente, y a consecuencia de la pérdida de estructura dentaria en cualquiera de sus superficies.

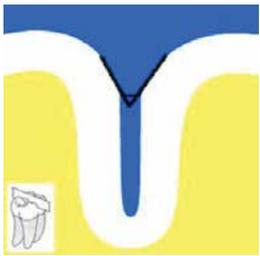
Materiales: hoja de registro, lápiz y pluma.

Procedimiento: actividades a desarrollar por el alumno.

1. En la traída de Keyes, que está en el recuadro. Coloca el nombre que le corresponde a cada círculo que interviene en el desarrollo de la caries dental, toma en cuenta que el riesgo es la probabilidad que tiene una persona a desarrollar una enfermedad en un período específico; la susceptibilidad, la relación con otros factores biológicos. Recuerda el factor de riesgo es la característica o circunstancia que se puede detectar en el individuo y que se asocia con el aumento en la probabilidad de padecer, desarrollar o estar especialmente expuesto a una enfermedad. Describe los tipos de factores de riesgo para desarrollar caries



2. Menciona cuáles son algunos de los factores de riesgo clínicos.
3. ¿Cual es la forma de la fisura de mayor riesgo?
4. De acuerdo al siguiente cuadro, coloca la letra que le corresponde a la forma de V o valle que son las superficies que desarrollan menos lesiones, mientras que las estrechas I y las extremadamente estrechas se asocian a un espacio más ancho en la parte inferior, Y invertida son las más susceptibles a desarrollar caries.

Imagen	Tipo de Morfología
	<input type="checkbox"/> Entrada de hendidura muy profunda
	<input type="checkbox"/> Entrada y fondo del mismo diámetro
	<input type="checkbox"/> Entrada cuyo fondo se bifurca a manera de una Y invertida.
	<input type="checkbox"/> Entrada muy estrecha con forma de ampolla
	<input type="checkbox"/> Entrada amplia a la fisura que se estrecha en el fondo

Evaluación: se le da valor a cada pregunta por ejemplo: a la 1 = 4 puntos, usted determina el valor o porcentaje, y se van sumando de tal forma que el alumno sepa su calificación.

Desarrollo teórico para realizar la práctica # 2

Métodos clínicos epidemiológicos para el diagnóstico de la lesión de la caries

Método visual. Este sigue siendo el método tradicional para el diagnóstico de una lesión, sin embargo, hay que tener en consideración que la inspección clínica depende de la evaluación de los cambios en la translucidez del esmalte, es decir, la pérdida del brillo o el aspecto opaco del esmalte. También podemos evaluar las pigmentaciones, la localización y la presencia o no de tejido blando, o los cambios en la textura del esmalte resultante del grado de desmineralización. Este último se ha señalado como el indicador más válido de caries activa⁵.

Las lesiones en las fosetas y fisuras son difíciles de detectar en un estadio temprano, debido a que histológicamente la desmineralización inicial se forma bilateralmente en las paredes que forman las fisuras, lo que hace difícil su detección. Se tiene que secar con aire, gasa o algodón la superficie oclusal para observar una opacidad alrededor de la fisura, una desmineralización y/o una pérdida de la translucidez normal en el esmalte, perdiendo brillo en esta zona y se aprecia ligeramente poroso. Las lesiones de caries interproximal a la inspección visual son difíciles de detectar por lo que se recomienda la toma de radiografías cuando se sospeche de este tipo de lesión⁵.

Las lesiones de caries en las superficies vestibulares, linguales o palatinas son más accesibles para su observación, especialmente de la primera alteración clínica visible producida por la caries: la mancha blanca, la cual tiene una forma oval, límites muy definidos, un aspecto opaco, con superficie más rugosa que el esmalte sano. La mancha blanca cambia a un color amarillento, amarillo pardusco y pardo negruzco a medida que la lesión de caries va progresando. Hay que tener mucho cuidado de no confundir las manchas blancas con defectos del desarrollo del esmalte del tipo de: amelogénesis, dentinogénesis imperfecta o fluorosis⁶.

La lesión de caries radicular puede presentarse con cavitación o sin ella, y existe una apariencia oscura, desteñida y una superficie reblandecida al tacto con explorador, hay que tener cuidado de no ejercer presión sobre ella para evitar provocar la cavitación de la lesión durante la exploración ya que la punta afilada del explorador podría crear defectos en las superficies que impedirían cualquier proceso de remineralización completa de la lesión, por eso se recomienda utilizar la sonda de la OMS que tiene una punta redonda⁶.

Recuerda que para las superficies lisas debes de:

1. Tratar de identificar si hay alguna lesión ubicada por vestibular en individuos susceptibles a la caries, este tipo de lesión se encuentra entre 1 y 1.5 mm del margen gingival y es una lesión paralela a éste margen.
2. La lesión que se observa en el esmalte tiene aspecto de tiza o lechoso (mancha blanca).
3. Al secar con aire, aumenta la visibilidad, se observa la superficie con pérdida de brillo.
4. No se recomienda uso del explorador debido a que fuerzas excesivas causan lesión de la superficie intacta.
5. Zona interproximal. Para tener una mejor visibilidad se recomienda, la separación de la papila con instrumento como el uso de separadores dentarios para mejorar y facilitar la observación.

Para las superficies oclusales:

1. La base de la fisura se ve normal y las paredes de la fisura con aspecto de tiza o lechoso, que en algunas ocasiones se puede observar a simple vista.
2. La base de la fisura oscura y paredes de la fisura con aspecto de tiza o lechoso.
3. Después de secar, se observa si la zona presenta cavidad o no.
4. No se recomienda uso del explorador, en caso de utilizarlo no se debe presionar el fondo de la fisura.
5. La lesión ubicada en el surco vestibular de molares superiores o inferiores considerada con una alta susceptibilidad a desarrollar caries.

Cuando un individuo ha desarrollado caries, éste es un elemento que se utiliza como criterio de factor de riesgo, ya que este indicador clínico sugiere que el individuo no logra mantener un equilibrio entre el proceso de remineralización y desmineralización del esmalte o el cemento⁷.

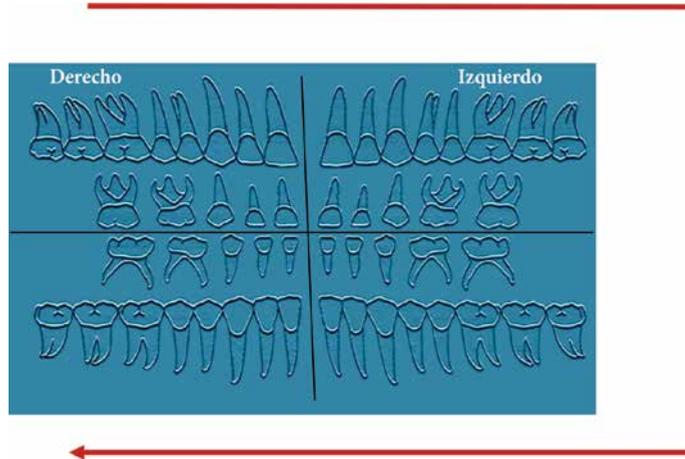
Se recomienda utilizar los índices *ceo* y *CPOD*⁸ para el registro de caries a nivel epidemiológico y el *ICDAS II* (International Caries Detection and Assessment System) que es un nuevo sistema de detección y diagnóstico de caries, consensuado en Baltimore, Maryland. EEUU en el año 2005, para la práctica clínica, la investigación y el desarrollo de programas de salud pública^{6,9}.

El llenado de la hoja de registro requiere del levantamiento de los índices epidemiológicos *ceo* y *CPO* para dentición temporal y permanente, en la determinación del promedio de lesiones de caries.

Índice *ceo* y *CPO*⁸. La experiencia de caries dental en un individuo se determina por medio de los índices *ceo* y *CPO*, sus consideraciones generales, así como el procedimiento a seguir se describe a continuación: realice el examen con el auxilio de una sonda tipo E o sonda periodontal de la Organización Mundial de la Salud y espejo bucal plano, inspeccione visualmente las caras oclusal, mesial, distal, vestibular, lingual o palatina de cada diente, en caso de duda en el diagnóstico utilice la sonda para corroborar. Adopte una rutina sistemática para el examen de caries, procediendo de manera organizada figura 4, la revisión deberá ser conducida de la siguiente forma:

- a. Iniciar el examen en el espacio correspondiente al segundo molar superior derecho (17) y proseguir hasta el incisivo central superior derecho (11).
- b. Continuar el examen por el incisivo central superior izquierdo (21) siguiendo hasta el espacio correspondiente al segundo molar superior izquierdo (27).
- c. Reiniciar el examen por el espacio correspondiente al segundo molar inferior izquierdo (37), siguiendo hasta el incisivo central inferior derecho (31).
- d. Finalmente examinar el último cuadrante, comenzando por el incisivo central inferior derecho (41) y seguir hasta el espacio correspondiente al segundo molar derecho (47).
- e. Para el registro del estado del diente permanente, usar código de números y para el de dientes temporales el código de letras.
- f. Para el registro de la dentición temporal se utiliza de la casilla 55 a la 51, 61 a la 65, 75 a la 71 y de la 81 a la 85 y se distinguen de los dientes permanentes por el uso de código de letras (véase hoja de registro individual).

Figura 4. Recorrido a seguir en la revisión dental.



A continuación en el cuadro 3 se describen los códigos, criterios y la descripción para los índices *ceo* y *CPO*.

Cuadro 3. Códigos, criterios y descripción para los índices *ceo* y *CPO*.

Código	Categoría	Descripción
0 (A)	Sano	Una corona o superficie se codifica como sana si no muestra evidencia de caries clínicas tratadas o sin tratar. Las etapas de caries que preceden a la cavitación, así como otras condiciones similares a las primeras etapas de la caries, se excluyen porque no pueden identificarse de manera confiable en la mayoría de las condiciones de campo en las que se realizan encuestas epidemiológicas. Por lo tanto debe codificarse como sana si se presentan manchas blancas o calcáreas, puntos descoloridos o ásperos que no son suaves al tacto con una sonda periodontal, manchas de esmalte, en fisuras o fosetas que no presenten cavitación, áreas oscuras, brillantes, duras y deshuesadas de esmalte en un diente que muestra signos de fluorosis moderada a severa del esmalte, lesiones que, en base a su distribución o historia, o al examen, parecen ser debidas a la abrasión.
1 (B)	Cariado	Se registra la presencia de caries cuando en una foseta o fisura o en una superficie dental se presenta una lesión blanda. La corona o superficie tiene una cavidad inconfundible, un esmalte socavado o un suelo o pared apreciablemente blanda. También debe incluirse en esta categoría un diente con una obturación temporal o que esté sellado pero también con caries. En los casos en que la corona ha sido destruida por la caries y sólo queda la raíz, se considera que la caries se originó en la corona y por lo tanto se califica como diente o superficie con caries. La sonda periodontal debe utilizarse para confirmar la evidencia visual de caries en la(s) superficie(s) del diente. En caso de duda, no debe registrarse el diente como cariado.

2 (C)	Obturado y cariado	Una corona se considera obturada con caries, cuando tiene una o más restauraciones permanentes y una o más áreas que están cariadas. No se hace distinción entre caries primaria y secundaria y el mismo código se aplica independientemente de si las lesiones cariosas están en contacto con la(s) restauración(s).
3 (D)	Obturado	Una corona se considera obturada sin caries, cuando hay una o más restauraciones permanentes están presentes y no hay presencia de caries en ninguna parte de la corona. Un diente que presenta una corona debido a una lesión de caries previa se registra en esta categoría. Un diente que presenta una corona por razones distintas de la caries como es mediante un pilar fijo de prótesis dental se debe codificar como 7 (G).
4 (E)	Ausente por caries	Este código se utiliza para los dientes permanentes o primarios que han sido extraídos por caries. Para los dientes primarios faltantes, este código debe usarse sólo si el sujeto está en una edad en la que la exfoliación normal no sería una explicación suficiente para la ausencia.
5	Ausente por otra razón	Este código se utiliza para dientes permanentes que se consideran ausentes congénitamente, o extraídos por razones ortodóncicas o por enfermedad periodontal o traumatismos, entre otros.
6 (F)	Sellador	Se aplica este código para los dientes en los que se ha colocado un sellador de fisuras en la superficie oclusal. También se utiliza este código cuando las fosas o dientes en los que se ha ampliado la fisura oclusal a una forma redondeada o “en forma de llama” y se ha colocado un material compuesto. Si el diente con sellador tiene caries, debe codificarse como 1 o B.
7 (G)	Soporte de puente, corona especial o funda	Este código se usa para indicar que un diente forma parte de un pilar fijo del puente. Este código también se puede utilizar para coronas colocadas por razones distintas de la caries y para fundas o carillas que cubren la superficie labial de un diente, en la que no hay evidencia de caries o una restauración. Nota. Los dientes perdidos, sustituidos por pilar de puente se codifican 4 o 5.
8	No erupcionado	Este código está restringido a los dientes permanentes y se utiliza sólo para un espacio dental en el que hay un diente permanente sin erupcionar, y en ausencia del diente primario. Los dientes con código 8 se excluyen de los cálculos relativos a la caries. Esta categoría no incluye los dientes ausentes congénitamente o los dientes perdidos como resultado de un traumatismo, etc. Para el diagnóstico diferencial entre los dientes ausentes y no erupcionados, ver descripción del código 5.
9	No registrado	Este código se utiliza para cualquier diente permanente erupcionado que por algún motivo no se puede examinar (por ejemplo, presencia de bandas ortodóncicas, hipoplasia intensa, etc.).

Estos índices epidemiológicos se pueden utilizar con cualquiera de las dos unidades de medida que la OMS⁸ propone: el diente o la superficie y se expresan: cuando utilizó como unidad de medida el diente como *ceod* y *CPOD* y cuando la unidad de medida es la superficie se expresa como *ceos* y *CPOS*.

Para calcular el índice de caries, en la dentición temporal *ceo*, el componente *c*=es la suma de dientes o superficies temporales cariadas (códigos A y C), el componente *e*=es la suma de dientes o superficies temporales perdidas por caries (código E) y el componente *o*=es la suma de dientes o superficies temporales obturadas por haber tenido una lesión de caries (código D). Para la detención permanente *CPO*, el componente *C*=es la suma de dientes o superficies cariadas permanentes (códigos 1 y 2), el componente *P*=es la suma de dientes o superficies permanentes perdidas por caries (código 4) y el componente *O*=es la suma de dientes o superficies permanentes obturadas por caries (código 3). El *ceo* o el *CPO* es la suma de los componentes *c+e+o* o *C+P+O*, eso da el índice para cada individuo. Si quiero saber cual es el índice para una comunidad es la suma de cada índice individual entre el número de individuos examinados.

Sistema internacional de detección y registro de caries. International caries detection and assessment system (ICDAS)^{9,10}.

El ICDAS permite la detección temprana de las lesiones de caries, su valor radica en que nos permite contrarlar el proceso ya que este se puede detener a través de terapias de remineralización, evitando de esta manera tratamientos de costo elevado asociados a procedimientos restaurativos. Se considera que la lesión incipiente de caries es un área que favorece la retención de biopelícula, ha perdido su brillo y es rugosa a la exploración, elementos que sugieren que es una lesión activa de caries. Las observaciones clínicas que se deben de tener siempre en consideración al evaluar la actividad de caries se sustentan en el aspecto visual y la sensación táctil. Son esenciales las siguientes condiciones con el fin de utilizar los criterios del ICDAS en la práctica clínica debido a que permiten a los examinadores evaluar cada uno de los códigos de caries con una mayor precisión: iluminar el campo operatorio, remover la biopelícula de la superficies lisas y oclusales por medio de un cepillo dental y lavar la zona con jeringa triple, pe-

dirle al paciente que retire de su boca las prótesis removibles, en caso de que fuese portador de ésta, remover las manchas superficiales y el cálculo dental de las superficies dentarias¹⁰. *Apreciación global.* Los códigos para la detección de caries coronal mediante ICDAS van del 0 al 6 dependiendo de la severidad de la lesión (Cuadro 4).

Existen variaciones menores entre las señales visuales asociadas con cada código dependiendo del número de factores incluso de las características de la superficie (fosetas y fisuras vs. las superficies lisas), si hay dientes adyacentes (superficies mesial y distal) y si hay o no caries asociada con una restauración o sellador^{9,10}.

Cuadro 4. Códigos para la detección de caries inicial en la corona.

Código	Categoría	Descripción
0	Sano.	No debe de haber ninguna evidencia de caries (ningún cambio cuestionable en la translucidez del esmalte después del secado prolongado (5 segundos). Las superficies con defectos de desarrollo como hipoplasias del esmalte; fluorosis; desgaste dental (atrición, abrasión y erosión), y manchas extrínsecas o intrínsecas se registrarán como sanas.
1	Primer cambio evidente en el Esmalte	Cuando el diente tiene saliva y no hay ninguna evidencia de cambio en el color atribuible a la actividad del caries, pero después del secado aéreo prolongado (se sugieren 5 segundos para deshidratar adecuadamente una lesión cariosa en el esmalte) es visible una opacidad por caries o decoloración (lesión blanca o café) y no corresponde con la apariencia clínica de esmalte sano. O cuando hay un cambio de color debido a caries que no corresponde con la apariencia clínica de esmalte sano y se circunscribe a fosa y fisura (se ve mojada o seca). La apariencia de estas áreas cariosas no corresponden con manchas en fosas y fisuras definidas en el código 0.

2	Apreciación visual de cambio en el Esmalte.	El diente debe verse mojado. Cuando está mojado hay una (a) opacidad de caries (lesión de mancha blanca) y/o (b) decoloración cariosa café la cual que es más ancha que la fosa/fisura natural que no corresponde con la apariencia clínica de esmalte sano (Nota: la lesión debe ser visible cuando esté seca).
3	Cavitación de esmalte localizada debido a caries sin dentina visible o sombreado subyacente	El diente mojado puede tener una opacidad clara de caries (lesión de mancha blanca) y/o decoloración café de caries, la cual es más ancha que la fosa/fisura natural que no corresponde con la apariencia clínica de esmalte sano. Una vez secado durante 5 segundos se ve pérdida de estructura del diente por caries a la entrada, o dentro del hoyo o fisura/fosa. Esto al verse evidencia de desmineralización (opaca [blanca], café o con paredes café oscuras) a la entrada o dentro de la fosa o fisura, y aunque la fosa o fisura puedan aparecer substancialmente y antinaturalmente más ancha que lo normal, la dentina no es visible en las paredes o en la base de la cavidad/discontinuidad.
4	Sombra oscura subyacente proveniente de la Dentina.	Esta lesión aparece como una sombra descolorida visible de la dentina a través de la superficie de esmalte aparentemente intacta que puede o no puede mostrar signos de cavitación localizada (pérdida de continuidad de la superficie que no está mostrando la dentina). La apariencia de la sombra se ve a menudo más fácilmente cuando el diente está mojado. El área oscurecida es una sombra intrínseca que puede aparecer como gris, azul o color café. La sombra representa caries que inició en la superficie del diente. Si en la opinión del examinador, la lesión cariosa comenzó en una superficie adyacente y allí no hay ninguna evidencia de caries, se codificará esa superficie con código "0."

5	Cavitación evidente con dentina visible	El diente mojado puede mostrar oscureciendo de la dentina a través del esmalte. Una vez seco durante 5 segundos hay evidencia visual de pérdida de estructura del diente a la entrada o dentro del hoyo o hendidura-franca cavitación. Hay evidencia visual de desmineralización (opaca [blanca], café o paredes café oscuras) a la entrada a dentro del hoyo o hendidura y a juicio del examinador con exposición dentinaria. La sonda de WHO/CPI/PSR puede usarse para confirmar la presencia de una cavidad al parecer en la dentina. Esto se logra deslizando la esfera a lo largo del hoyo o hendidura sospechoso y si una cavidad dentinaria se descubre, la esfera entra en la apertura de la cavidad y en la opinión del examinador la base está en al dentina. (En hoyos o hendiduras el espesor del esmalte es entre 0.5 y 1.0 mm. Recordar que la profundidad de la dentina y de la pulpa no debe sondearse)
6	Cavidad extensa evidente en la dentina	La pérdida obvia de estructura del diente, y la extensión de la cavidad puede ser en lo profundo como en lo extenso y la dentina es claramente visible en las paredes y a la base. Una cavidad extensa involucra por lo menos la mitad de la superficie del diente o ha involucrado posiblemente la pulpa.

Los criterios del ICDAS son aplicables a fosetas y fisuras; a superficies lisas (mesial o distal); superficies lisas libres y la asociación de caries con restauraciones y selladores (CARS)⁹. Sin embargo, siendo la base de los códigos esencialmente las mismas, (cuadro 5).

Cuadro 5 Códigos de Caries Asociada con Restauraciones y Selladores (CARS).

Código	Categoría	Descripción
0	Superficie dental sana con restauración o sellador	Una superficie dental sana adyacente a una restauración/sellador marginal. No debe de haber ninguna evidencia de caries (ningún cambio cuestionable en la translucidez de esmalte después del secar durante 5 segundos). Las superficies con defectos marginales menores a 0.5mm de ancho (o sea que no admita toda la esfera de la Sonda CPI), defectos de desarrollo como hipoplasias de esmalte; fluorosis; desgaste del diente (atrición, abrasión y erosión), y manchas extrínsecas o intrínsecas se registran como sano. Los márgenes con manchas debidas a hábitos (por bebida frecuente de té) y que no muestre signos de desmineralización debe anotarse como sano.
1	Primer cambio visual en el esmalte	Cuando se vea mojado sin evidencia de cualquier cambio de color atribuible a la actividad cariosa, pero después del secado (durante aproximadamente 5 segundos) una opacidad o decoloración con desmineralización es visible pero no es consistente con la apariencia clínica de esmalte sano.
2	Cambio evidente en el esmalte/dentina adyacente al margen de una restauración/sellador	Si el margen de la restauración está en el esmalte el diente debe verse mojado. Cuando se moja hay una opacidad consistente con desmineralización o decoloración que no es consistente con la apariencia clínica de esmalte sano (Nota: la lesión todavía es visible cuando se seca). Si el margen de la restauración está en la dentina: Se aplica código 2 a la decoloración que no es consistente con la apariencia clínica de la dentina sana o del cemento.

3	Defectos Cariosos de <0.5 mm con los signos del código 2	Cavitación al margen de la restauración/sellador de menos de 0.5mm, además de una opacidad o decoloración consistente con desmineralización que no es consistente con la apariencia clínica de esmalte sano o con una sombra de dentina decolorada.
4	Caries marginal en el esmalte/dentina/cemento adyacente a una restauración/sellador con una sombra oscura subyacente de la dentina	La superficie del diente puede tener características del código 2 y puede tener una sombra de dentina decolorada que es visible a través de una superficie de esmalte aparentemente intacta o con cavitación localizada en el esmalte pero sin dentina visible. Esta apariencia se ve a menudo más fácilmente cuando el diente está mojado y es un oscurecimiento y sombra intrínseca que puede ser de color gris, azul, anaranjada, o café. Nota: ver el diente mojado y luego seco. Esta lesión debe distinguirse del sombreado por la amalgama.
5	Cavidad adyacente a restauración/sellador	Cavidad adyacente a restauración/sellador con dentina visible en el espacio interfacial con signos de caries descrita en el código 4, además de un hueco >0.5mm de ancho. O en esos casos donde los márgenes no son visibles, hay evidencia de discontinuidad al margen de la restauración/sellador y sustancia dentinaria detectada a 0.5mm del final de la esfera de la sonda que corre a lo largo del margen de la restauración/sellador.
6	Cavidad extensa con dentina visible	Pérdida obvia de estructura dental, la extensión de la cavidad puede ser profunda o ancha y la dentina se ve claramente en las paredes y en la base.

Método de codificación ICDAS de dos dígitos.

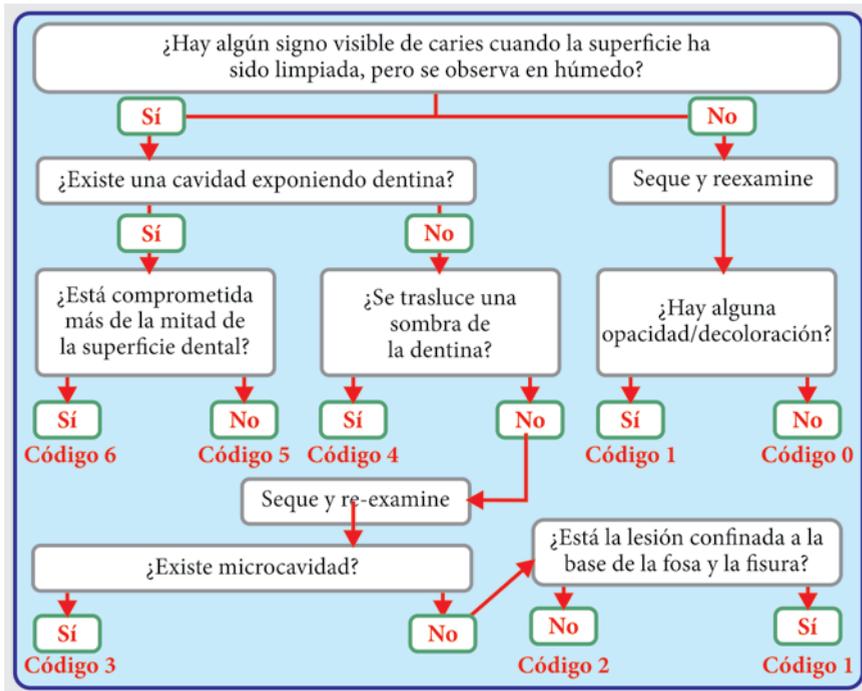
Un sistema de codificación de dos dígitos se sugiere para identificar restauraciones/selladores con el primer dígito, seguido por el apropiado código de caries, por ejemplo un diente restaurado con amalgama que también tiene una cavidad extensa con dentina visible se codificaría 4 (para una restauración de amalgama) 6 (cavidad distinta), un diente sin restauración con una cavidad distinta sería 06. El sistema de codificación sugerido para restauración/sellador es como sigue:

- 0= sano: es decir la superficie no restaurada o sellada (usar códigos para la caries primaria)
- 1= Sellado, parcial,
- 2= Sellado, completo,
- 3= Diente coloreado por la restauración
- 4= Restauración de amalgama
- 5= Corona de acero cromo
- 6= Corona de porcelana, oro, PFM o chapa
- 7= Pérdida o rotura de restauración
- 8= Restauración temporal
- 9= Usar para las siguientes condiciones
- 96= Superficie dental que no se puede examinar: superficie excluida
- 97= Diente perdido por caries (las superficies del diente se codificarán 97)
- 98= Diente perdido por las razones que no sea por caries (todas las superficies se codificarán 98)
- 99= No erupcionado (las superficies del diente se codificarán 99)

Figura 5. Ejemplo de una hoja de registro del ICDAS II.

The image shows a detailed ICDAS II registration form. It includes fields for patient name, address, and dental office information. A dental chart is provided with tooth numbers 1-32 and a shaded area indicating the teeth being examined. To the right, there are sections for 'Optional Charting: Restorations, Sealants and Caries Codes (ICDAS)', 'RESTORATION AND SEALANT CODES', and 'CARIES CODES'. The form also includes a 'Detailed Dental Assessment of Clean Dry Teeth' section and a 'Total Number of teeth present' field.

Figura 6. Resumen del árbol diagnóstico para caries de esmalte y dentina utilizando el ICDAS II¹¹.



Fuente: Tomado de la página de la fundación ICDAS. <https://www.icdas.org/>

Procedimientos: iniciar por el cuadrante superior derecho, número de diente 17, 16 , 15... con la ayuda de un espejo y de una sonda de exploración tipo OMS. Observando primero las superficies lisas del diente que se examina (mesial, distal e interproximales) y luego la superficie oclusal colocando en cada recuadro el valor que le corresponde a cada diente según los criterios presentados en el cuadro 3.

Actividades a desarrollar por el alumno: calcular el índice CEO y CPO que le corresponde al individuo examinado, este cálculo se realiza sumando los dientes código 1 y 2 para el componente de dientes cariados, código 3 para conformar el componente de dientes obturados y código 4 para el componente de dientes perdidos por caries.

Recuerda que en el caso de que tu paciente tenga dientes temporales su usas letras en vez de números. Ejemplo en vez de 1 y 2 pondrás B y C y corresponde al componente de diente cariado, D para el componente de dientes obturados y E para conformar el componente de dientes perdidos por caries.

Si quieres hacerlo por número de lesiones de caries deberás contabilizar el número de superficies afectadas por la enfermedad y lo describes como CEOS o CPOS.

Desarrollo teórico para realizar la práctica # 3

Métodos clínicos para el registro del volumen del flujo salival

Generalidades sobre el flujo salival

La saliva es una mezcla de fluidos que se originan en las glándulas salivales (mayores y menores) y de algunas fuentes no glandulares como el fluido crevicular, su composición inicial es agua, iones orgánicos e inorgánicos y cuando llega a la cavidad oral incorpora microorganismos y células epiteliales. La consistencia de la saliva puede ser acuosa, espesa, pegajosa o espumosa dependiendo de su composición.

La saliva es secretada en respuesta a estímulos de neurotransmisores, que durante la mayor parte del día son bajos, estables y producen una secreción salival basal o un flujo salival no estimulado o en reposo, cuya función es la humectación de las mucosas orales y vías aéreas superiores. Una de las principales funciones de protección de la saliva, es la de dilución de ácidos y la de limpieza de la cavidad oral, que sirve como una defensa del huésped, y permite el intercambio de iones con el esmalte dental, ciertas características salivales fuera del intervalo de valores de normalidad pueden contribuir con el desarrollo de la lesión de caries. Durante el consumo de alimentos, debido a los estímulos del gusto y de la masticación, hay un aumento marcado en la actividad neurotransmisora lo cual aumenta la secreción salival, y se le conoce como flujo salival estimulado, cuya función es la de formación del bolo alimenticio, la deglución y el inicio de la digestión a través de enzimas que degradan el alimento^{12,13}.

La cantidad de saliva que se produce está sujeta a un ritmo circadiano (variaciones durante el día) que tiene su máximo pico alrededor de mediodía y que depende del nivel de hidratación del individuo. Hay que recordar también que el flujo salival estimulado, aumenta conforme la edad (5 a 12 años), que es ligeramente mayor en los hom-

bres que en las mujeres y que además, es más abundante en los climas fríos¹³. Otros factores que también pueden determinar la cantidad de saliva que se produce son: la temperatura, la estación del año y la salud general del individuo (medicamentos que se estén tomando). Debido a lo cual, se sugiere medir este parámetro al menos 2 veces al año en nuestros pacientes. La secreción salival diaria oscila entre 500 y 700 mL^{14, 15}. Por sus conocidas variaciones son importantes las condiciones de estandarización de estas pruebas de susceptibilidad o riesgo.

En individuos sanos, el promedio en los niveles de flujo salival no estimulado oscila entre 0.3 a 0.4 mL/min, mientras que el promedio de los niveles de flujo salival estimulado con el método de la cera con parafina es de 1 a 2 mL/min. El hallazgo más importante de todos los estudios es la marcada diferencia entre ambos niveles de flujo salival. El flujo no estimulado puede variar entre 0.08 y 1.83 mL/min mientras que el flujo salival estimulado puede medirse entre 0.2 y 5.7 mL/min, ello implica que los individuos funcionan dentro de una amplia gama de volúmenes de producción salival¹⁶.

Hay una serie de medicamentos (antihistamínicos, anticolinérgicos, antiparkinsonianos, antidepresivos) y algunos estados patológicos (diabetes mellitus, sarcoidosis, ansiedad, estrés, drogadicción) y tratamientos de radioterapia en cabeza y cuello que conllevan una disminución del flujo salival, que es importante conocer, ya que estos pacientes son de alto riesgo de caries porque presentan en la mayoría de los casos hiposalivación y/o xerostomía¹⁷.

Determinación del flujo salival

Fundamento:

La saliva basal, no estimulada o en reposo se produce continuamente para lubricar y humectar las mucosas durante el día y corresponde al 90% de la producción total de saliva. En individuos sanos, el promedio en los niveles de flujo salival no estimulado oscila normalmente entre 0.2 a 0.4 mL/min.

Método para la obtención de saliva sin estímulo o en reposo

Se describirán tres formas de obtención de éste flujo salival. La prueba que se describe a continuación está especialmente indicada en aquellos pacientes que tienen síntomas de xerostomía: el paciente manifiesta sequedad de boca, tiene los labios resecos y, a la exploración, no acumulan saliva en el piso de la boca. En condiciones normales no puede considerarse como prueba de actividad de caries, solo como un factor de riesgo.

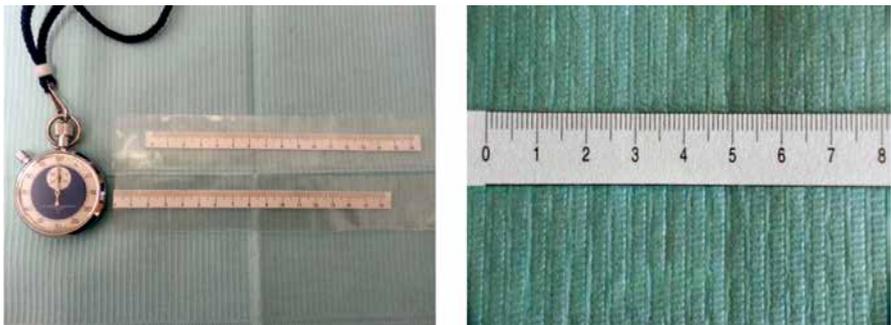
Método 1. Prueba de saliva global

La medición de la producción salival en reposo se realizará mediante el test de saliva global (TSG) por sus siglas en inglés, de acuerdo con la metodología descrita por López-Jornet, *et al.*¹⁸, el TSG es un método cuantitativo para medir la producción de saliva total.

Materiales necesarios

- Tira de papel filtro Whatman del número 41, de 1 cm de ancho por 16 cm de largo milimetrado, la cual está dentro de una bolsa de polietileno. (Ver figura)
- Cronómetro.

Figura 8. Materiales necesarios para la obtención del flujo salival en reposo utilizando la técnica de la prueba de saliva global.



Procedimiento

Se le pide al paciente que trague saliva que tiene en boca. Se toma la tira de papel filtro Whatman, doblando los 2.5 mm de papel del extremo que no está impreso, y se introduce directamente a la zona sublingual, a la altura de la carúncula de la glándula submaxilar,

estando el paciente sentado, en posición de cochero (dejando caer el tronco en forma curva hacia delante, con la cabeza ligeramente agachada y con las manos en reposo sobre las rodillas) y los ojos cerrados. (Figura 9) La tira se deja durante 5 minutos, después de los cuales se retira y se registra la extensión de la humedad en cm.

Figura 9. Obtención del flujo salival en reposo utilizando la técnica de la prueba de saliva global.



El volumen salival se obtiene en cm^2 se transforma a mililitros dividiendo los centímetros obtenidos con la prueba entre los 5 minutos que dura la misma y se multiplica por 0.227 para expresar el volumen de secreción en mL/ min. Dato que se calculó través de la siguiente formula: $V = E \times A \times L$; E es el espesor del papel Whatman; A es el área (que es la Base por el espesor) y L que son los mm de saliva que se humectaron. Cada mm equivale a 0.0236 mL. Es decir si obtuve 8.5 cm^2 (que son 85mm) los multiplico por 0.0236 y lo divido entre 5 que es tiempo de duración de la prueba y obtengo los mL/minuto de producción salival.

Método 2. Prueba de obtención de saliva en reposo escupiendo (spitting)

La determinación de saliva no estimulada o en reposo tiene importancia ya que se relaciona también con el tiempo de aclaramiento de azúcar y ácidos de la boca.

Materiales necesarios:

- Tubo de ensaye milimetrado.
- Cono de plástico o papel.
- Cronómetro.
- Báscula digital

Figura 10. Materiales utilizados para la obtención de saliva no estimulada.



Procedimiento

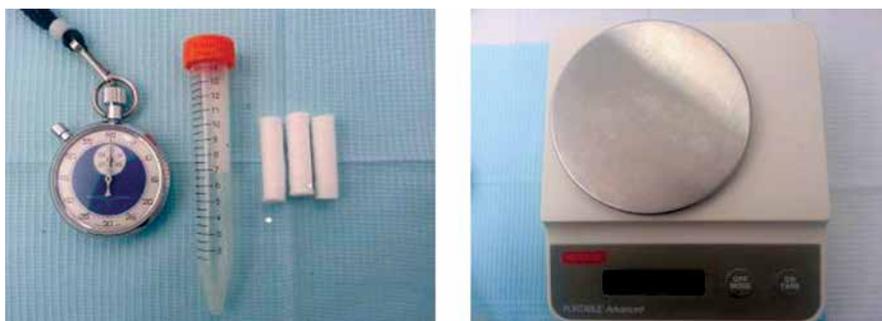
Su recolección se realiza con el paciente sentado en posición relajada, con los antebrazos apoyados sobre las piernas. Se le pide al paciente que trague la saliva que tiene en la boca para iniciar la prueba. Se debe evitar cualquier movimiento de las mejillas o de la mandíbula; la lengua se apoya en las superficies linguales de los incisivos superiores. En esta posición, con los labios cerrados, el paciente inclina la cabeza hacia delante y va escupir en el cono de plástico cuando se le dé la indicación al final de cada minuto, durante los cinco minutos que dura la prueba. La saliva se recoge en un tubo graduado. Los resultados se expresan en mL/min, existiendo amplias variaciones entre las personas.

Método 3. Prueba del rollo de algodón

Materiales necesarios:

- Tubo de ensaye.
- 3 Rollos de algodón.
- Cronómetro.
- Bascula digital

Figura 11. Materiales necesarios para el desarrollo de la prueba.



Procedimiento

La recolección se realiza con el paciente sentado en posición relajada, con los antebrazos apoyados sobre las piernas. Se le pide al paciente que trague la saliva que tiene en la boca para iniciar la prueba, se le pide al paciente que abra la boca para la colocación de los tres rollos de algodón de 0.2 x 0.6 cm., previamente pesados. Uno de los rollos debe de quedar colocado cerca de la carúncula orificio de drenado sublingual y submaxilar y los otros dos en la región vestibular superior a cada lado de la salida de drenaje de las glándulas parótidas. Durante los cinco minutos que dura la prueba. Al finalizar la prueba se retiran los rollos de algodón y se pesan inmediatamente. La diferencia entre el peso inicial y final de los tres rollos son los mililitros producidos de saliva.

Esta cifra se divide entre el tiempo de duración de la prueba (5 minutos) y los resultados se expresan en mL/min.

Cuadro 6. Evaluación de tasa de secreción salival en reposo.

mL/ minuto	Criterio
>0.25-0.35	normal
0.1-0.25	baja

Las evidencias de varios estudios científicos han demostrado que las técnicas de recolección salival cuando están estandarizadas, tienen un alto grado de correlación, aunque el volumen medido tiene menos confiabilidad.

Métodos para la obtención de la saliva estimulada.

Fundamento: La principal función de la saliva estimulada es la conformación del bolo alimenticio y ayuda a la digestión inicial de los alimentos mediante los componentes enzimáticos como son la amilasa y las proteasas, a la deglución y a la sensación del gusto.

Método 1. Estimulación por masticación de cera o parafina

Materiales necesarios.

- Tubo de ensaye colector de saliva graduado en mililitros.
- Embudo para escupir en el tubo o cono de papel.
- Pastilla de cera o parafina.
- Cronómetro.
- Báscula digital.

Procedimiento.

El paciente debe masticar una pastilla de cera o de parafina estéril de entre 0.7 a 1.0 gr. (se empleará parafina con un punto de fusión de 42-44 °C), y se recoge toda la saliva que se segrega en un tubo graduado durante 5 minutos. Como la saliva estimulada se colecta muchas veces con fines bacteriológicos, se sugiere desechar la saliva producida en los 2 primeros minutos y empezar a contar a partir de ese momento; de esta forma se arrastran restos residuales que hay en boca.

Para la recolección salival, el paciente se sentará derecho en una silla con respaldo, con la cabeza ligeramente inclinada hacia delante y en relajación por 5 minutos antes de la estimulación. Se le introduce al paciente la pastilla en la boca y al inicio de la prueba se le pedirá que mantenga la pastilla debajo de la lengua (30 segundos) para que adquiera la temperatura corporal, y que trague la saliva producida durante dicho lapso. Posteriormente se le indicará que mastique la pastilla de la manera usual en que mastica un chicle (bilateralmente) y que la saliva producida la deposite en un embudo que deja fluir la saliva a un tubo graduado milimétrico de polipropileno. La pastilla se mastica durante 5 minutos y se escupe la saliva acumulada en el tubo de manera periódica (cada treinta segundos) para ser medida posteriormente.

El flujo salival corresponde a la cantidad en mL/ min de saliva obtenida en el tubo y dividida entre 5, (el procedimiento de obtención del volumen total es igual al descrito en la saliva en reposo) con lo cual obtenemos el flujo salival por minuto.

Figura 12. Materiales necesarios y procedimiento de recolección de la saliva estimulada.



Método 2. Estimulación con ácido cítrico

Materiales necesarios

- Tubo de ensaye colector de saliva graduado en mililitros.
- Embudo para escupir en el tubo.
- Solución de ácido cítrico al 2% (elaborado en cualquier farmacia).
- Hisopo.
- Bascula Digital.

Procedimiento

El paciente se sienta cómodamente en la silla y se dan las siguientes instrucciones: Tragar saliva antes de iniciar la prueba. Se coloca la solución de ácido cítrico al 2% sobre el dorso de la lengua con un hisopo (cada 30 segundos durante un período de 5 minutos). Escupir periódicamente la saliva acumulada en el tubo de medición.

El paciente debe escupir de forma periódica la saliva acumulada en el tubo graduado de medición. Una vez que se cierra el tubo, este se pesa en una báscula digital de laboratorio o de cocina en su caso. El procedimiento para realizar el peso de la saliva es, pesar el tubo o recipiente donde se recolectará la saliva antes de realizar la prueba, se tara la báscula (restar el peso del recipiente) y se pesa el recipiente nuevamente la diferencia entre el peso inicial y el peso final son los mililitros de saliva producidos. Los resultados se expresan en mL/min, en este tipo de saliva también existen amplias variaciones entre las personas.

Cuadro 7. Evaluación de tasa de secreción salival estimulada.

mL/ minuto	Criterio
>0.70	normal
<0.70	baja

Práctica # 3.

Determinación del volumen de secreción salival no estimulada y estimulada

Instrucciones: el alumno debe de registrar en la hoja de práctica que se le proporciona, el volumen de secreción salival en reposo o no estimulada a través de dos técnicas (el Test de Saliva Global TSG y la prueba de saliva en reposo escupiendo, con el fin de poder hacer comparaciones entre ambas técnicas. Y de saliva estimulada con cera o parafina. Teniendo en cuenta que ya tienen los conocimientos teóricos impartidos en los módulos para el buen desarrollo, de esta práctica.

Después de que realices el examen clínico compara tus resultados con los parámetros de normalidad que se presentan en los cuadros 6 y 7.

Materiales: cronómetro, tubo de ensaye milimétrico, conos o embudos de plástico, báscula, pastillas de cera o parafina, hoja de registro y algodón.

Procedimientos: para el TSG: toma la tira de papel filtro Whatman, doblando los 2.5 mm de papel del extremo que no está impreso, levanta la lengua, e introdúcela directamente a la zona sublingual, debes estar, en posición de cochero y los ojos cerrados. Después de los 5 minutos, retira la tira y registra la extensión de la humedad en cm.

Para la prueba de saliva no estimulada escupiendo, sentado en posición relajada, con los antebrazos apoyados sobre las piernas. Traga la saliva que tienes en la boca para iniciar la prueba, la lengua la debes apoyar en las superficies linguales de los incisivos superiores. En esta posición, con los labios cerrados, inclina la cabeza hacia delante y escupe en el cono de plástico cuando se te dé la indicación al final de cada minuto, durante los cinco minutos que dura la prueba. La saliva se recoge en un tubo graduado.

Para la prueba de saliva estimulada por cera o parafina, siéntate derecho, con la cabeza ligeramente inclinada hacia delante y en relajación. Cuando se te indique introduce la pastilla en la boca y mantenla debajo de la lengua por (30 segundos) para que adquiera la temperatura corporal, traga la saliva y mastica la pastilla de manera bilateral, la saliva que vayas produciendo se te indicará cada 30 segundos que la deposites en el cono de plástico que deja fluir la saliva al tubo graduado de polipropileno. La pastilla se mastica durante 5 minutos. Cuando se te indique escupirás por última vez en el cono y depositarás la pastilla en el mismo.

Actividades a desarrollar por el alumno: calcular el volumen de producción salival no estimulada con las dos técnicas y el volumen de secreción salival estimulada y comparar los resultados obtenidos con los parámetros descritos.

Consideraciones

Conforme aumenta la edad se incrementa el volumen de secreción saliva. No existen datos en niños de edad preescolar. Debido a la heterogeneidad de su producción, es difícil estimar la condición del flujo salival de un paciente realizando una sola medición del flujo salival. Si los odontólogos midiésemos el flujo salival de todos nuestros pacientes de rutina, podríamos establecer el nivel de flujo salival “normal” de cada paciente y a partir de ello reconocer cualquier disminución importante de manera individualizada. Esto permitiría intervenir a tiempo para prevenir consecuencias en algunas ocasiones lamentables para la cavidad bucal.

Qué hacer cuando hay un flujo salival disminuido

Si se diagnóstica que la disminución del volumen de flujo salival es funcional y no hay lesión estructural de las glándulas salivales, es posible estimular el flujo salival masticando chicle sin sabor entre 10 y 25 minutos cada hora o administrando pilocarpina.

Cloruro de pilocarpina0.3 gr.
 Agua destilada 15 ml.

Ingerir 5 gotas tres veces al día al comienzo de las comidas, y aumentar la dosis 1 gota por día hasta entre 8-10 gotas por dosis. También se

puede utilizar una solución acuosa al 0.2% de pilocarpina oftálmica. Hay que tener cuidado debido a que la pilocarpina produce sudoración y en ocasiones un aumento de la motilidad gástrica (diarrea).

Si la disminución de la secreción salival se debe a atrofia de las glándulas es difícil estimular el flujo salival, en estos casos los pacientes pueden enjuagarse la boca frecuentemente con agua, agua con glicerina o agua con bicarbonato sódico (1 cucharadita de té por litro). También se ha propuesto la utilización de sustitutos de la saliva (los cuales se venden en los depósitos dentales), así como goma de mascar sin sabor que alivia los síntomas de resequeidad en estos pacientes.

Los pacientes que de forma permanente tienen el volumen de flujo salival disminuido deben de esforzarse para proteger los dientes mediante el control de la biopelícula, el control de dieta y el uso diario de flúor y en ocasiones el uso semestral de clorhexidina, este último siempre bajo supervisión del dentista.

Desarrollo teórico para realizar la práctica # 4

Métodos clínicos para la determinación de la capacidad amortiguadora salival

La acción protectora de la saliva contra la caries dental

Se sabe que la saliva tiene propiedades protectoras contra la caries dental. La evidencia más directa de ello es el desarrollo de caries rampante en pacientes que sufren de xerostomía al ser tratados con radioterapia de cabeza y cuello. El desarrollo de lesiones de caries en estos pacientes es tan agresivo que en pocas semanas las superficies dentales menos susceptibles son desmineralizadas llegando inclusive a la pérdida de la porción coronal del diente. Las principales propiedades de la saliva que protegen al diente contra el proceso de desmineralización son:

- La dilución y lavado de los azúcares en la dieta.
- La neutralización y amortiguación de los ácidos de la biopelícula.
- La provisión de iones para el proceso de remineralización^{19,20,21}.

Dilución y eliminación de azúcares en la dieta

Los estudios de la eliminación de los azúcares de la cavidad bucal fueron iniciados en la década de los 50 y se descubrió que luego de consumir carbohidratos sólidos en las comidas, la concentración de azúcares caía de manera exponencial en el tiempo. Otras investigaciones mostraron que el azúcar en solución era eliminada de la boca en dos etapas, la dilución rápida se llevaba a cabo en los primeros 6 minutos y la más lenta luego de esto, y era proporcional al volumen de producción de saliva²¹.

La eliminación de otras sustancias también debe ser considerada, debido a que los mismos factores que inciden en la rápida eliminación de los azúcares, pueden hacerlo sobre agentes que pueden ser beneficiosos tales como los fluoruros²⁰.

Ahora bien, si consideramos que la eliminación del flúor es más lenta, que la de los azúcares debido a que el flúor es capaz de unirse con más facilidad a los tejidos duros (esmalte) y a la biopelícula, de los cuales, es eliminado lentamente. Este mecanismo de eliminación lenta está considerado como uno de los factores de mayor importancia en el efecto anticariostático, en especial de las pastas dentales. La acción principal del flúor, es la de mantener el balance entre el proceso de desmineralización y remineralización a favor de la segunda. Esto se logra en bajas concentraciones, por lo cual, aunque su eliminación se acelere, se supone que el flúor es retenido y lentamente disuelto en la biopelícula y en los tejidos duros del diente, se recarga con el próximo cepillado dental con pasta por parte del paciente.

La eliminación de azúcares es menos rápida en ciertas zonas que en otras, por ejemplo, en la región del vestíbulo superior en comparación con la región del vestíbulo inferior. Esto puede explicar parcialmente una distribución diferente de lesiones caries en las diferentes zonas de la boca en individuos normales y la de individuos con caries rampante en situaciones de hipofunción salival.

Neutralización y amortiguación de ácidos (capacidad buffer)

Aunque los elementos antes descritos de la saliva explican parcialmente su función en reducir la formación de la biopelícula, y por lo tanto de la caries dental, vemos efectos adversos que dependen de la propiedad de neutralización y amortiguación de ácidos de la saliva. Estas propiedades se deben principalmente al sistema bicarbonato. Este sistema es bajo en la saliva no estimulada y aumenta a medida que la saliva es estimulada. Junto a ello, el pH y la capacidad amortiguadora aumentan de manera importante. En la saliva secretamos urea de manera constante, existiendo microorganismos de la biopelícula, que la descomponen en productos nitrogenados, amoníaco y dióxido de carbono. Este amoníaco también actúa como un amortiguador de los ácidos¹⁹.

El comer hidratos de carbono causa una disminución del pH en la biopelícula. Sin embargo, si luego de que tomamos azúcares estimulamos el flujo salival masticando cera, parafina o queso, hay una inmediata e importante incremento en el pH y una baja en los niveles de ácido láctico en la biopelícula. Efectos similares han sido observa-

dos con gomas de mascar sin azúcar e incluso con las que contienen azúcar (siempre y cuando se mastiquen más allá del tiempo en que el azúcar se disuelve por completo del chicle).

La biopelícula de pacientes que son resistentes a la caries y pacientes susceptibles a caries responden de maneras similares al cambio en cuando se consumen azúcares; pero el nivel de estas respuestas es distinto. En la biopelícula del individuo resistente a caries, el pH antes del azúcar es mayor y luego del azúcar si bien el pH disminuye, es mayor que en los pacientes susceptibles al desarrollo de caries. Algunos estudios han demostrado además que la capacidad de amortiguación de los ácidos en individuos resistentes a caries es mayor que en los individuos susceptibles a la enfermedad.

Suministro de iones para la remineralización

Nuestros dientes no se disuelven en la saliva debido a que la saliva se encuentra sobresaturada con iones de calcio, de fosfato y de carbonatos, entre otros iones inorgánicos, además de la presencia de iones hidroxilos, estos iones son los componentes minerales del diente. Los niveles de sobresaturación son aún mayores en la biopelícula, sobre todo en la fase fluida extracelular, la cual está en contacto directo con la superficie dental. En el equilibrio dinámico del proceso de caries, la sobresaturación de la saliva provee una barrera contra la desmineralización y un estímulo para la remineralización. El equilibrio se encuentra afectado por la presencia de iones de fluoruro, los cuales, también influyen sobre estos procesos²¹.

La saliva estimulada está aún más sobresaturada que la no estimulada, por ello se dice que la primera es una excelente solución remineralizadora. Esto ha sido comprobado en estudios experimentales en los cuales a los sujetos de estudio se les colocaron trozos de esmalte dental con lesiones artificiales de caries en sus bocas y se le pidió que masticaran goma de mascar sin azúcar luego de las comidas durante 3 semanas. Después de ese periodo, se les colocó nuevos trozos de esmalte con lesiones artificiales de caries pero ésta vez, los individuos no masticaron goma de mascar luego de las comidas. Con este ensayo se demostró que los primeros trozos de esmalte se remineralizaron el doble que los trozos colocados cuando no se estimulaba el flujo salival con las gomas de mascar. Este experimento apoya de

manera importante la idea de que la saliva estimulada es, junto con el uso de fluoruros tópicos una excelente manera de prevenir la caries.

Medición de la capacidad amortiguadora de la saliva^{19,20}

Los sistemas amortiguadores salivales corrigen las variaciones de pH causadas por los cambios de concentración de iones ácidos o básicos producidos, debidos principalmente a la fermentación de los azúcares.

En la saliva, el amortiguamiento se lleva a cabo por el sistema ácido carbónico/bicarbonato, sistema fosfato y en menor medida por las proteínas salivales. Siendo el más importante, el sistema bicarbonato debido a que es el neutralizante de mayor importancia de la saliva.

Este sistema tampón se basa en el siguiente equilibrio:



1. CO_2 =Dióxido de carbono;
2. H_2CO_3 =Ácido carbónico;
3. HCO_3^- =Íon bicarbonato.

Aunque existen diversos métodos, la determinación de la capacidad tampón se realiza en la actualidad mediante algunos sistemas simplificados que se basan en el método de Ericsson que se describe a continuación: a 1 mL de saliva estimulada se le añaden 3 mL de HCL 0.005 M (ácido clorhídrico) junto con una gota de octanol (que impide la formación de espuma). La mezcla se coloca en un sistema de aireación que burbujea aire lentamente a través de la saliva; después de 20 minutos se mide el pH.

Los H^+ del HCL desvían la reacción a la izquierda formándose CO_2 que se libera casi totalmente debido a la aireación. El pH final es un fiel reflejo de la concentración original de HCO_3^- . De esta forma se obtienen valores que están relacionados con la capacidad tampón de ambos sistemas (bicarbonato y fosfato), ya que éstos actúan juntos.

El valor de la capacidad tampón es un parámetro que, aunque puede variar, es razonablemente estable, teniendo su mayor importancia clínica, en relación con el riesgo de caries, cuando los valores son inferiores a 5.5.

Determinación de la capacidad amortiguadora por el sistema CRT® buffer

Se basa en el método de Ericsson. La mayor diferencia con respecto a él estriba en que se suprime el paso de la corriente de aire y se obtienen casi los mismos resultados que con el método original.

El equipo consta de una tira de papel en cuyo extremo lleva una almohadilla impregnada con la solución ácida y con el indicador de pH, cápsulas de parafina y pipetas desechables.

Método:

1. Se utiliza saliva estimulada.
2. Se coloca una tira soporte en una superficie firme y absorbente con la almohadilla tratada hacia arriba.
3. Se pipetea una gota de saliva estimulada en la almohadilla. La gota debe ser lo suficientemente grande para cubrirla toda la almohadilla.
4. Se esperan 5 min de reacción antes de la lectura.

Figura 13. Estuche y contenido de la prueba CRT buffer.



Evaluación:

Se realiza comparando el color final de la almohadilla con una escala de colores de 3 valores diferentes.

Cuadro 8. Valores del sistema CRT® buffer.

Color	pH	Capacidad de amortiguamiento
Amarillento o marrón	<4	Bajo
Verde	4.5-5.5	Medio
Azul	>6	Alto

Puede ocurrir que el color no esté bien definido, o bien aparezcan varios colores; en este caso se debe interpretar la capacidad buffer por su valor inferior.

Esta reacción en forma de manchas sobre la almohadilla puede deberse a que la mucina salival impide una buena impregnación de ésta. Los pacientes con valores muy bajos son considerados pacientes de alto riesgo de caries. No hay documentación clínica que nos permita aclarar el posible efecto protector en aquellos casos con una alta capacidad tampón.

Figura 14. Sistema CRT® buffer.



Práctica # 4.

Determinación de la capacidad amortiguadora salival

Instrucciones: el alumno debe de registrar en la hoja de práctica que se le proporciona, la capacidad amortiguadora de su saliva a través de la técnica CTR buffer. Teniendo en cuenta que ya tienen los conocimientos teóricos impartidos en los módulos para el buen desarrollo, de esta práctica.

Después de que realices el examen clínico compara tus resultados con los parámetros de normalidad que se presentan en el cuadro 8.

Materiales: cronómetro, tubo de ensaye milimétrico, conos o embudos de plástico, pastillas de cera o parafina sistema CRT buffer, hoja de registro y algodón.

Procedimientos: con la saliva estimulada que obtuviste con la técnica de cera o parafina, coloca la tira reactiva de soporte en una superficie firme y absorbente con la almohadilla tratada hacia arriba, con la pipetea provista en el estuche toma absorbe saliva y coloca una gota de tu saliva en la almohadilla. La gota debe ser lo suficientemente grande para cubrirla toda la almohadilla, cronometra 5 min y compara el color obtenido con el esquema que provee el fabricante.

Actividades a desarrollar por el alumno: comparar los resultados obtenidos con los parámetros descritos y anotarlos en tu hoja de registro.

Desarrollo teórico para realizar la práctica # 5

Métodos clínicos para la determinación de la acidez salival

Pruebas de velocidad de acidificación salival

Fundamentos de la prueba

La prueba de la velocidad de acidificación de la saliva se basa en la capacidad que tiene ésta de producir ácido cuando una muestra de saliva estimulada es inoculada en el medio de Snyder, este medio es rico en glucosa, y contiene además agar y verde de bromocresol como indicador de pH, entre otros componentes a un pH final de 4.7²².

Los microorganismos contenidos en la saliva metabolizan la glucosa produciendo ácido, lo cual origina un descenso de pH del medio que modifica el color verde original que cambia al amarillo.

El indicador, verde de bromocresol, tiene un rango útil de azul-verdoso a un pH de 5.4 a amarillo a un pH de 3.8. En el punto medio, el pH es de 4.6 dando una tonalidad en color de un verde puro, el cual se pierde cuando se convierte en un amarillo dominante a un pH 4.2. Estos cambios se califican de la siguiente manera: Los cambios negativos o ligeros después de 72 horas, el pH final se debe encontrar entre 5.0 y 4.4. Positivo cuando el verde ya no es el color dominante, o un cambio casi completo o cambio completo de color amarillo antes de las 72 horas el pH final se debe encontrar entre 4.2 y 3.8²².

Preparación del medio:

Medio	1 litro
Proteosa Peptona	20 gr.
Dextrosa	20 gr
Cloruro de sodio	5 gr.
Bacto agar	20 gr.
Verde de bromocresol	0.02 gr.

Para la preparación del medio se pueden comprar los reactivos por separado o una fórmula premezclada (DIFCO o BBL). Para el primer caso, se disuelven los ingredientes en 1 litro de agua destilada. Para el segundo caso de una fórmula premezclada se suspenden 62 gr del medio en un litro de agua destilada, y se calienta la suspensión hasta la ebullición, cuidando de no quemar ésta. Una vez preparado el medio se distribuye 5 mililitros (mL) en cada tubo de ensayo (16mm x 100) y se esteriliza en autoclave a 15 libras de presión por 15 minutos, se dejan enfriar y se almacenan en el refrigerador hasta su utilización²³.

Procedimiento

El muestreo clínico se inicia con la recolección de saliva total estimulada con cera, parafina, dique de hule estéril o bandas de goma estériles, masticándolas entre 3 y 5 minutos (120 minutos después de haber ingerido alimentos o antes del almuerzo y sin cepillar los dientes), la cual se deposita en tubos de ensayo o recipientes estériles. El agar de Snyder se debe poner a baño María a 40 °C para su transformación de agar a solución. La saliva se agita en Vórtex o vigorosamente con la mano por 30 segundos con el fin de disgregar la saliva y obtener una suspensión homogénea. Con una pipeta estéril se toman 0.2 µL de saliva del tubo de ensayo o recipiente y se inocula el medio, se cierra el tubo y se agita nuevamente de manera vigorosa o en Vortex durante 30 segundos más para su incorporación con el agar. La tapa de rosca del tubo se debe dejar un cuarto de vuelta abierto con el fin de que la producción ácida no rompa el tubo (ocasionalmente). Se dejan reposar los medios 30 minutos a temperatura ambiente. Todos los tubos inoculados y un tubo control se incuban a 37 °C de 24 a 72 horas observando las modificaciones en el color cada 24 horas. En caso de no contar con una incubadora, los tubos se pueden dejar en una caja de cartón o plástico con un foco prendido durante el tiempo indicado.

Figura 15. Prueba de Snyder para registrar la velocidad de acidez salival.



Nota: En la figura se observa la variedad de tonalidades que puede adquirir la prueba en 24 horas

Evaluación de la prueba

Los tubos se examinan cada 24 horas durante 3 días, registrando cualquier cambio de color lo cual se facilita por comparación a contra luz con el tubo control de la prueba. El color puede cambiar gradualmente desde el verde azulado al amarillo en correspondencia con la disminución en los valores del pH.

La lectura de los tubos se realiza según los siguientes criterios: Negativo: Sin cambio de color o uno ligero pero el verde domina y se registra como 0 a +; Positivo: Cambio de color cuando el color verde no es el dominante y se registra como ++ a +++

Cuadro 9. Interpretación de la velocidad de acidificación salival.

Velocidad de Acidificación salival	Horas de Incubación		
	24	48	72
Marcada	positiva	-	-
Moderada	negativa	positiva	-
Ligera	negativa	negativa	positiva
Negativa	negativa	negativa	negativa

Aunque una prueba positiva indica riesgo de caries, las modificaciones en el pH del medio pueden deberse a alguno de los siguientes factores: elevada ingesta de hidratos de carbono, lesiones de caries cavitada, sin obturar y cúmulo de biopelícula, entre otros. Sin embargo hay que considerar que, esto no siempre es así; por el contrario, una prueba negativa con lesiones de caries sin obturar nos sugiere un desafío diagnóstico mayor.

La interpretación de los datos de laboratorio dados anteriormente con la actividad clínica de la lesión cariosa depende de la experiencia y comprensión de varios factores:

- La información obtenida nos indica que está pasando en la boca de nuestro paciente sólo en el momento de la toma de la muestra.
- Se requiere al menos de dos datos recolectados entre 2 y 7 días para establecer un punto de referencia adecuado para el paciente.
- Sólo cuando se cuenta con más de dos muestras cultivadas se puede tener confiabilidad para realizar la predicción del riesgo de un paciente.

Esta prueba es muy útil para:

1. Valorar los progresos conseguidos en programas de control de biopelícula y dieta.
2. Como ayuda para facilitar la motivación del paciente, ya que éste puede observar su progreso, observando las modificaciones que se van presentando en los tubos.

Prueba de Albán

La prueba de Albán (es una simplificación de la prueba de Snyder) el sustento teórico de la prueba de Albán es similar a lo descrito en la prueba de Snyder y se basa en la capacidad de la saliva de producir ácido cuando una muestra de saliva estimulada es inoculada en el medio. Este medio, contiene los mismos reactivos que los descritos para el medio de Snyder, la diferencia es en los cuatro gramos menos de agar, lo que facilita la difusión de los ácidos el medio por ser más blando. El medio debe tener al finalizar su preparación también un pH 4.7.

Preparación del medio:

Medio	1 litro
Proteosa Peptona	20 gr.
Dextrosa	20 gr
Cloruro de sodio	5 gr.
Bacto agar	16 gr.
Verde de bromocresol	0.02 gr.

Se disuelven los ingredientes o 58 gr del medio premezclado en 1 litro de agua estéril y se calienta hasta la ebullición. Una vez preparado el medio se distribuye 5 mL en cada tubo de ensaye (16mm x 100) y se esteriliza en autoclave a 15 libras de presión por 15 minutos, se dejan enfriar y se almacenan en el refrigerador hasta su utilización.

Procedimiento

Se retira el tubo de refrigeración antes de realizar la prueba para que estén a temperatura ambiente en el momento de su uso. Se deposita saliva estimulada en el tubo de ensaye con la ayuda de un cono de papel o plástico estéril en una cantidad suficiente de saliva para que se cubra el medio. En caso de que no se cubra toda la superficie del agar se puede recurrir a inocularla con saliva en reposo o si es difícil recolectarla, con un hisopo de algodón estéril este se pasa sobre la lengua, las mejillas o las superficies dentales y se deposita justo sobre la superficie del agar. Se cierra el tubo con tapón de rosca. Se incuba en estufa a 37 °C durante 96 horas o 4 días. Se registra todos los días los cambios de color.

Figura 16. Prueba de Albán para registrar la velocidad de acidez salival.



Evaluación de la prueba

Se realiza en base al cambio de color de verde a amarillo y a diferencia de la técnica de Snyder original, en la prueba de Albán también se considera la profundidad del cambio de color en el tubo. La lectura se realiza a las 24, 48, 72 y 96 horas, anotándose alguno de los siguientes posibles resultados.

Cuadro 10. Criterios de evaluación de la prueba de Albán.

Código	Criterio	Horas de incubación			
		24	48	72	96
0	No hay cambio de color en el tubo	Negativa	Negativa	Negativa	Negativa
1	Cambio 1/4 del tubo de ensaye	Positiva	Positiva	Positiva	Ligera
2	El cambio de color abarca 1/2 tubo	Positiva	Positiva	Positiva	Moderada
3	Cambio de color abarca hasta 3/4 del tubo	Positiva	Positiva	Moderada	
4	Cambia de color todo el tubo	Positiva	Marcada		

Un cambio de color rápido en el tiempo (24 horas) establece un pronóstico más reservado que si éste se realiza lentamente (72 horas).

Tal como se sugiere para la prueba de Snyder, la prueba de Albán debe realizarse en más de una ocasión, ya que cambios de color o en modificaciones en la profundidad del tubo, en relación a la prueba inicial significan que el paciente está mejorando, mientras que un cambio de coloración más rápido o a mayor profundidad del tubo comparado con la prueba inicial significan que el paciente no ha modificado sus hábitos alimenticios o su higiene oral y por lo tanto tendrá un peor pronóstico. Cuando no hay cambios entre una prueba inicial y una prueba subsecuente habrá que reforzar las estrategias preventivas recomendadas al paciente

Práctica # 5.

Determinación de la velocidad de acidificación de la saliva con el medio de Snyder y/o la prueba de Albán

Instrucciones: el alumno debe de registrar en la hoja de práctica que se le proporciona, la velocidad de acidificación salival a través de dos técnicas (la prueba de Snyder y la prueba de Alban con el fin de poder hacer comparaciones entre ambas técnicas). Teniendo en cuenta que ya tienen los conocimientos teóricos impartidos en los módulos para el buen desarrollo, de esta práctica.

Después de que realices la práctica clínica compara tus resultados con los parámetros que se presentan en los cuadros 9 y 10.

Materiales: saliva estimulada, prueba de Snyder, prueba de Albán, pipetas, vortex, mechero y hoja de registro.

Procedimientos: esta prueba se realiza utilizando saliva estimulada por cera o parafina, cuya obtención ha sido descrito previamente, el prueba de Snyder y/o la prueba de Albán, se mantienen en refrigeración, el día que van a ser utilizados se colocan en baño María a 45 °C, cuando el medio se encuentra líquido (prueba de Snyder) poner en el vortex por 30s, se abre el tubo de ensaye se flamea al mechero y con la pipeta ajustada previamente se toman 200 µL de saliva y se inocula el medio, se flamea la boca del tubo de ensaye al mechero, se cierra el tubo y se vuelve a agitar por 30s más. Antes de ponerlo en la rejilla para su incubación se abre el tubo de ensaye un cuarto de vuelta. Se

deja reposar durante 30m antes de meter a la incubadora. Se revisa el medio cada 24h anotándose el cambio de color, el mismo procedimiento se realiza con la prueba de Albán.

Actividades a desarrollar por el alumno: realizar el procedimiento descrito y revisar el tubo de ensaye cada 24h para establecer la velocidad de acidificación de la saliva. La lectura de los tubos se realiza según los siguientes criterios comprando contra el tubo control:

Negativo o saliva poco ácida: sin cambio de color uno ligero pero el verde domina y se registró como 0 a las 72h;

Positivo o acidez ligera: una ligera modificación al color pero el verde domina y el cambio se registró entre las 48 y las 72h, pero este no se modifica de haberse presentado a los 48h;

Positivo y acidez moderada: modificación al color de verde a amarillo en diversas tonalidades, el cambio se registró a las 48h;

Positivo y acidez marcada: modificación al color de verde a amarillo en diversas tonalidades de éste, el cambio se registró a las 24h.

Establecer la velocidad de acidez de la saliva y comparar los resultados obtenidos con los parámetros descritos, anotar los resultados en la hoja de registro.

Desarrollo teórico para realizar la práctica # 6

Métodos de laboratorio para la determinación de los niveles de infección de las bacterias asociadas a la lesión de caries

Pruebas de laboratorio que utilizan saliva

Con una muestra salival obtenida en el consultorio podemos determinar los niveles de infección que tiene nuestro paciente de las bacterias asociadas con caries que son los *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) y los *Lactobacillus*.

El número de microorganismos en la saliva varía según la hora del día. Debido a ello las muestras deben ser tomadas, en lo posible durante horas similares siempre una hora después de haber ingerido alimentos, para que se estabilicen las masas microbianas. Los niveles más altos de microorganismos se consiguen por lo general en las mañanas, justo después de despertar y antes de cepillarse los dientes (durante el sueño disminuye el flujo salival y aumenta la concentración de microorganismos). Durante el día, los niveles se mantienen relativamente estables. Se recomienda no tomar las muestras luego del cepillado dental o justo después de la comida.

La mayoría de los laboratorios microbiológicos cultivan de rutina *S. mutans* y *Lactobacillus* (también por lo general los laboratorios de grandes Universidades). Para enviar las muestras se requiere de un tubo de ensayo con un medio de transporte. El procedimiento es el siguiente:

1. La secreción salival se estimula utilizando cera o parafina, esta primera saliva se debe tragar debido a que por lo general contiene restos alimenticios.
2. El paciente deposita la saliva que se está produciendo por masticación en un recipiente limpio y estéril que puede ser un tubo de ensayo.
3. Se transfiere saliva del recipiente al medio de transporte con una pipeta o jeringa graduada en la cantidad que el laboratorio sugiera.

4. Se enrosca la tapa del tubo de transporte y se agita para mezclar la saliva con el medio de transporte.
5. La muestra debe ser enviada lo antes posible al laboratorio durante el mismo día, en el caso contrario debe refrigerarse.

En el laboratorio: la muestra es homogeneizada, diluida y se inocular en un medio selectivo para *S. mutans* como es el agar de mitis salivarius con sacarosa y bacitracina (MSB) para ser cultivada. Los *Lactobacillus* son cultivados en agar de Rogosa o agar SL. El número de colonias es contado y luego es multiplicado por el factor de dilución. Esto da como resultado el número de *S. mutans* y *Lactobacillus* respectivamente por cada mililitro de saliva.

Recuentos salivales de *S. mutans* en saliva técnica MSB

Fundamento de la prueba

El grupo *mutans* son un grupo de bacterias muy exigente que requiere de condiciones particulares para su crecimiento y desarrollo. Un gran número de estudios reportan que un medio totalmente selectivo para el grupo *mutans* es el agar MSB y que este medio debe de tener como suplemento el 40% de sacarosa. Sin embargo, la selección de este agente que ha sido usado como el seleccionador nato del *mutans*, no inhibe completamente el desarrollo de otros microorganismos, o en ocasiones llega a inhibir parcialmente el desarrollo del mismo grupo bacteriano. Por lo que se le agrega a este medio selectivo bacitracina. La relativa resistencia del grupo *mutans* a altas concentraciones de sacarosa ha sido reportada junto a las demostraciones de su fuerte resistencia a la bacitracina hasta de 5u/mL. El 79% de otros estreptococos desaparecen ante una prueba similar. En el agar MSB las colonias de *mutans* se reconocen fácilmente por ser desprendibles, brillantes y tomar el color azul del medio²⁴⁻²⁶.

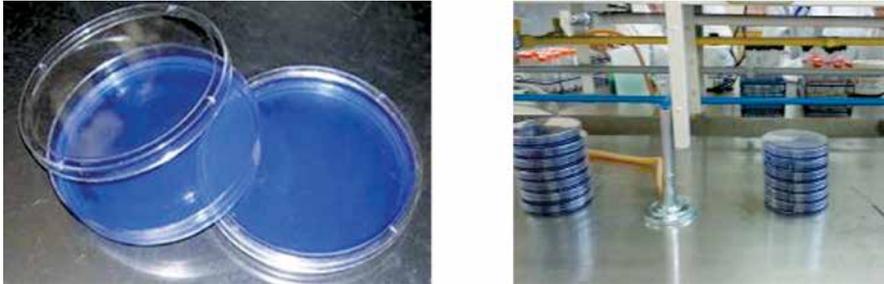
Preparación del medio

Composición del medio agar MSB	1 litro
Bacto triptose	10 gr.
Bacto Proteose Peptone No. 3	5 gr.
Bacto Proteose Peptone	5 gr.
Bacto Dextrosa	1 gr.
Bacto Saccharosa	50 gr.
Fosfato Dipotásico	4 gr.
Azul de Tripan	0.075 gr.
Bacto Cristal Violeta	0.0008 gr.
Bacto Agar	15 gr.
Suplementar	
Sacarosa	150 gr.
Inhibidores	
Telurito de potasio al 1%	1 ml
Bacitracina desde 0.6 y hasta 2 unidades/mL	2000 u/L

Procedimientos

Para la preparación del medio se pueden comprar los reactivos por separado o una fórmula premezclada (DIFCO o BBL)²³. Para el primer caso, se hidratan y disuelven los ingredientes en un litro de agua destilada. Para el segundo caso de una fórmula premezclada se suspenden 90 gr del medio en un litro de agua destilada, y se calienta la suspensión hasta que el medio clarifique, hay que tener cuidado que en ningún momento el medio debe hervir. Se esteriliza entre 121 °-124 °C durante 15 minutos a 15 libras de presión. Se enfría a 50°-55 °C y se le agregan los 150g de sacarosa, que se han disuelto en agua bidestilada y estéril. Cuando el medio se encuentra a 40 °C justo antes de dispensar a las placas Petri se le agregan los agentes inhibidores 1mL de solución estéril de telurito de potasio (Bacto Chapman Tellurite) y la bacitracina (Sigma, Aldrich) disuelta también en agua destilada y estéril. El pH final del medio debe ser de 7 ± 0.2 a 25 °C. Se mantienen las cajas de petri un día a temperatura ambiente y se meten a refrigeración, el medio tiene una vigencia de 1 semana.

Figura 17. Medio de cultivo mitis salivarius con bacitracina.



Muestras

Se obtiene una muestra de saliva total estimulada con parafina por 5 minutos, que se deposita en tubo de ensaye estéril. Cualquier muestra de saliva debe ser procesada antes de haber transcurrido 2 horas de su recolección, de no ser así, la muestra de saliva se coloca en hielo a 4 °C.

La saliva debe de agitarse en vortex o manualmente por 30 segundos, con el fin de disgregar la saliva y obtener una suspensión homogénea. Se sugiere hacer diluciones seriadas de 10^{-1} a 10^{-3} , las diluciones se elaboran con 0.05% de extracto de agua de levadura, solución isotónica de cloruro de sodio al 5% o cualquier otra solución buffer.

El medio debe estar al menos 3 horas antes de su utilización a temperatura ambiente, se toman entre 25 y 100 microlitros de la dilución seleccionada, se rocían sobre la caja de Petri y se dispersa el inóculo. Se incuban en una atmósfera al 95% de nitrógeno y 5% de dióxido de carbono ó en su caso en jarras con candela dando una atmósfera de anaerobiósis parcial, durante 72 horas a 37 °C^{25, 26}.

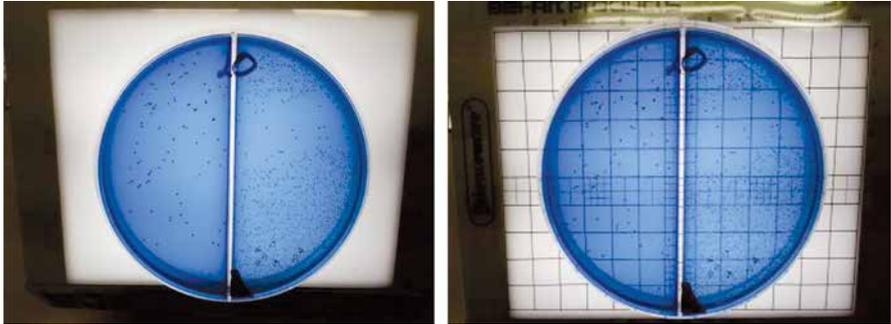
Figura 18. Procedimiento: inoculación, dispersión del inóculo jarras con candela para la incubación.



Evaluación

Después de la incubación, las cajas deben permanecer a temperatura ambiente durante 24 horas más. El total del conteo del grupo *mutans* se determina a través de contar cuantas unidades formadoras de colonias (UFC) crecieron en la caja. Las UFC que se forman en los platos se multiplica por el factor de dilución salival y ese será el número de UFC del individuo examinado, la información se anota en la historia clínica del paciente. Se considera que más de 100,000 UFC del grupo *mutans* se pueden considerar de riesgo a desarrollar caries.

Figura 19. Medio MSB donde se aprecia el crecimiento bacteriano de *S. mutans* y método de cuantificación.



Cuadro 11. Interpretación de los conteos microbianos de *S. mutans*.

Conteos microbianos	Expresión de bacterias por mL	Nivel de infección
≤1,000	10 ³	Leve
10,000	10 ⁴	Moderado
100,000	10 ⁵	Alto
≥1,000,000	10 ⁶	Muy Alto

Cuadro 12. Interpretación con los nuevos criterios de riesgo.

Niveles altos	Niveles bajos
>1,000,000 <i>S. mutans</i> por ml de saliva	< 100,000 <i>S. mutans</i> por ml de saliva

Recuentos salivales de lactobacillus utilizando la técnica de Rogosa SL**Fundamento**

Existe literatura implicando al número de lactobacilos presentes en la biopelícula o en la saliva en el desarrollo de la lesión de caries. Una estimación del número de lactobacilos en saliva, se puede obtener con el uso de medios selectivos, que al asociarse con la incidencia de caries, han permitido que sean utilizados como indicadores del riesgo cariogénico. Actualmente estas pruebas se usan como monitoreo dietético, ya que algunos ensayos han demostrado, que recuentos altos de lactobacilos correlacionan en forma positiva con la ingesta de carbohidratos y por lo tanto, con el potencial ácido de la biopelícula.

Preparación del Medio

Medio	1 litro
Bacto Rogosa SL	75 gr.
Trypticase	10g
Extracto de levadura	5g
KH ₂ PO ₄	6g
Citrato de amonio	2g
Glucosa	20g
Monoleato de Sorbitan	1g
Acetato de sodio	25g
Bacto agar	15g
Suplementar	
Solución de sal	5mL
MgSO ₄ 7H ₂ O	11.5g
MnSO ₄ 2H ₂ O	2.4g
FeSO ₄ 7H ₂ O	0.68g
Dispensar H ₂ O en	100mL
Ácido Glacial Acético	1.32 mL

Procedimiento

Para la preparación del medio se pueden comprar una fórmula premezclada (DIFCO o BBL)²³ o comprar los reactivos por separado. Para el primer caso de una fórmula premezclada se suspenden 75 gr del medio en un litro de agua destilada, y se calienta la suspensión hasta que el medio hierva durante 3 minutos a 100 °C. Este medio no se esteriliza. Para el segundo caso, se prepara primero la solución de sal enriquecida con la solución de monoleato de sorbitan 0.1g x mL. Disolver el agar en 400 mL de agua bidestilada hirviendo.

Disolver los demás componentes en 400mL de agua destilada y desionizada agregar la solución de sal enriquecida con el monoleato de sorbitan y después del calentamiento, mezclar con la solución caliente de agar. Se ajusta el volumen a 1000 mL y se coloca en la autoclave por 10 minutos a 115 °C.

Figura 20. Medio de cultivo Rogosa LB para *Lactobacillus*.



Muestras

Se obtiene una muestra de saliva total estimulada con parafina por 5 minutos, que se deposita en tubo de ensaye estéril. Cualquier muestra de saliva debe ser procesada antes de haber transcurrido 2 horas de su recolección, de no ser así, la muestra de saliva se coloca en hielo a 4 °C, para ser transportada al laboratorio.

La saliva debe de agitarse en vortex o manualmente por 30 segundos, con el fin de disgregar la saliva y obtener una suspensión homogénea.

Se sugiere hacer diluciones seriadas de 10^{-1} a 10^{-3} , las diluciones se elaboran con 0.05% de extracto de agua de levadura, solución isotónica de cloruro de sodio al 5% o cualquier otra solución buffer.

Se toman entre 25 y 100 microlitros de la dilución seleccionada y se rocían sobre la caja de Petri, el medio debe estar al menos 3 horas antes de su utilización a temperatura ambiente y se dispersa él inóculo. Se incuban en una atmósfera de aerobia, aunque se reporta que los lactobacilos también crecen de manera adecuada en atmósferas de anaerobiosis total o parcial en jarras con candela, durante 72 horas a $37\text{ }^{\circ}\text{C}^{26-28}$.

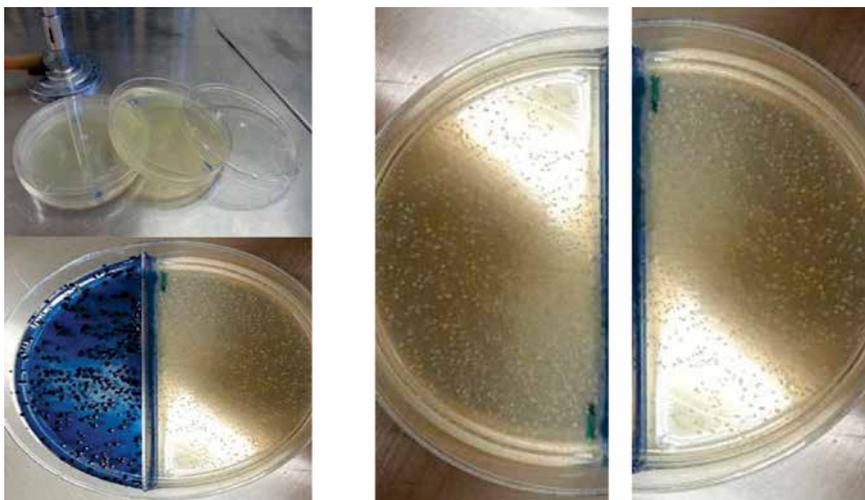
Evaluación

Después de la incubación, las cajas deben permanecer a temperatura ambiente durante 24 horas más. El total del conteo de lactobacilos se determina a través de contar cuantas UFC crecieron en la caja. Las UFC que se forman en los platos se multiplica por el factor de dilución salival y ese será el número de UFC del individuo examinado, la información se anota en la historia clínica epidemiológica del paciente.

Enumeración e identificación

Las UFC que se forman en los platos se contabilizan con contador de colonias como se describe en para el *S. mutans* y se multiplican por el factor de dilución salival.

Figura 21. Imágenes de cajas Petri con lactobacilos.



Cuadro 13. Interpretación de las cuentas bacterianas de *Lactobacillus*.

Conteos microbianos	Expresión de bacterias por mL	Nivel de infección
≤1,000	10 ³	Leve
10,000	10 ⁴	Moderado
100,000	10 ⁵	Alto
≥1,000,000	10 ⁶	Muy Alto

Cuadro 14. Interpretación con los nuevos criterios de riesgo.

Niveles altos	Niveles bajos
>100,000 <i>Lactobacillus</i> por ml de saliva	< 10.000 <i>Lactobacillus</i> por ml de saliva

Como se pudo observar las técnicas especificadas previamente, son complejas. Para hacer accesibles estas pruebas en la clínica odontológica se han desarrollado sistemas más sencillos que se pueden emplear en el consultorio y se correlacionan bien con las técnicas convencionales en agar que se han descrito anteriormente. Se describe a continuación el CRT® bacteria.

CRT® bacteria Caries Risk Treatment para el grupo mutans (SM) y lactobacilos (LB) (Vivadent, Schaan, Liechtenstein)

Este sistema consta de una laminilla porta agares de plástico recubierta por ambos lados por medios selectivos, conectados a un tapón de rosca el cual cierra un tubo transparente, quedando el dispositivo seguro para su almacenamiento e incubación, conservándose estéril y húmedo. Una de las superficies de la laminilla está cubierta por agar Mitis Salivarius con Bacitracina para recuentos del grupo mutans (color azul oscuro) y en la otra cara con agar Rogosa, para recuentos de lactobacilos (color verde). El estuche completo de CRT incorpora cápsulas de parafina para estimular la saliva, pipetas desechables, tabletas de NaHCO₃ (bicarbonato de sodio) para dar una atmosfera parcialmente anaerobia al medio y etiquetas de identificar cada tubo.

Figura 22. CRT® bacteria; el agar azul, para la determinación de los estreptococos *mutans* y el agar claro, para la determinación de los lactobacilos.



Procedimientos

Se recoge saliva estimulada como ya se describió anteriormente. Abrir el tubo de prueba desenroscando el tapón y extraer el porta agar del interior del tubo.

En este momento se coloca una tableta de NaHCO_3 en la base del tubo. Se retira con cuidado las láminas de plástico protectoras de ambas superficies del porta agar agar, teniendo cuidado de no tocar el mismo. Se toma con la pipeta de plástico que viene incluida en el estuche la saliva, se rocía esta con cuidado sobre cada una de las dos superficies del agar, se debe de tener cuidado de no arañar con la pipeta los medios de cultivo y de que ambos agares quedan bien humedecidos con la saliva. Durante esta operación se mantiene la laminilla porta agares en posición inclinada y se debe de dejar gotear la saliva sobrante.

Se eliminan las últimas gotas de saliva dejando escurrir el porta agares en un ángulo hacia el borde inferior de la laminilla porta agares sobre un papel absorbente limpio y se enrosca el tapón en el tubo y se cierra bien. Se identifica el tubo con una etiqueta adhesiva (incluida en el estuche) y se incuba a 36 ± 1 °C durante 48 horas en posición vertical, en una estufa que puede ser también de la misma marca.

Figura 23. Estufa de cultivo para el consultorio.



Esta prueba también se puede utilizar con una muestra de biopelícula, la cual se toma con un cepillo para uso interproximal, un cotonete o hasta con un palillo de dientes, se recolecta biopelícula de las superficies dentales y se arrastra sobre el medio de cultivo. En el espacio disponible de la laminilla porta agar se hacen cuatro inóculos, como se observa en el diagrama. Se deposita una gota de agua sobre la pastilla de bicarbonato de sodio (NaHCO_3). Este procedimiento está recomendado para niños pequeños, que todavía no dominan el procedimiento de recolección de saliva estimulada, así como para los pacientes con xerostomía y los pacientes que tienen dificultad para masticar.

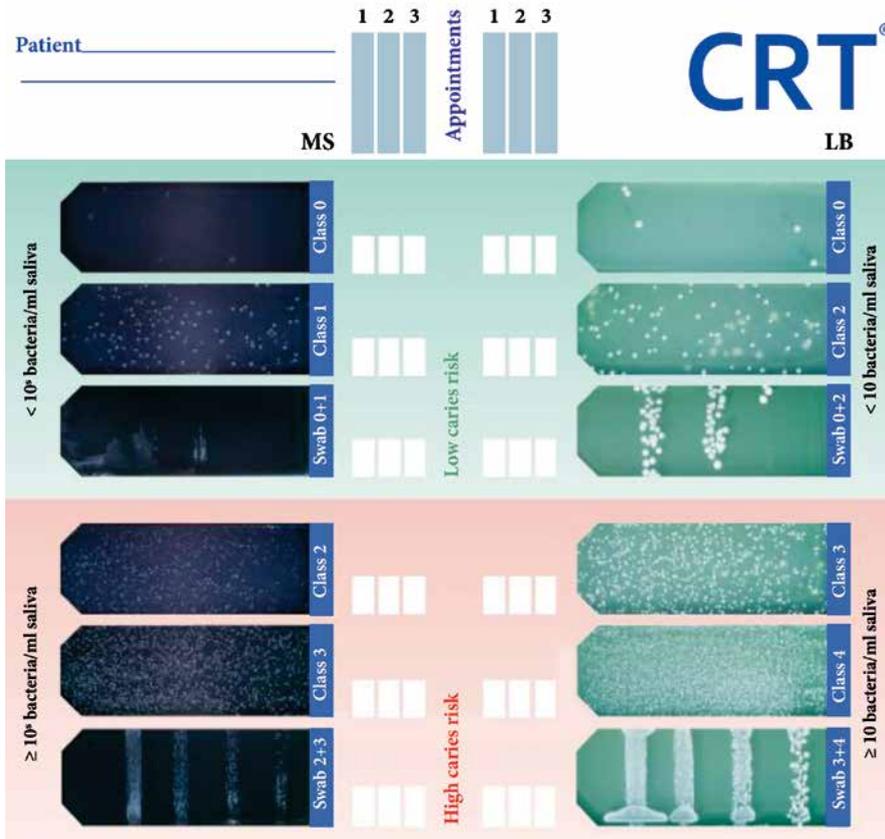
Este mismo procedimiento también se recomienda para los recuentos de lactobacilos en placa. Esta medida también está indicada, para vigilar los bordes alrededor de los soportes en los pacientes de ortodoncia o los márgenes de las restauraciones, como las áreas ásperas o un sello marginal subóptimo que representan nichos ideales de retención bacteriana.

Evaluación

La lectura de los resultados se realiza comparando la densidad de crecimiento de colonias de estreptococos del grupo *mutans* y de *Lactobacillus* de las laminillas del porta agar con el diagrama de densidad ya establecido del fabricante, (ver figura 24). Las colonias de estreptococos del grupo *mutans* son de color azul oscuro casi negras y las de

los *Lactobacillus.ssp* son blanquecinas o transparentes. Los resultados se interpretan como UFC/mL. La lectura de la prueba es más fácil si se examina bajo luz reflejada. Debemos comparar la densidad de crecimiento y no el área de las colonias ya que nos podemos encontrar pocas colonias pero muy grandes.

Figura 24. Esquema de evaluación del CRT® bacteria.



Cuadro 14. Corte de riesgo para la prueba CRT® bacteria.

Comparación	Significado	Criterio
Clase 0 y 1	<math>< 100\ 000</math> ufc/mL saliva	Bajo riesgo a caries
Clase 2 y 3	>math>> 100\ 000</math> ufc/mL saliva	Alto riesgo a caries

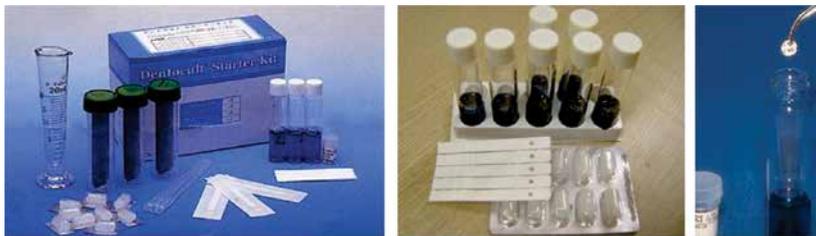
Interpretación

Los recuentos altos de estreptococos del grupo *mutans* indican un riesgo microbiológico alto de caries. Los recuentos altos de *Lactobacillus* indican un número elevado de lesiones de caries abiertas o de obturaciones CARS (caries adyacente a restauraciones y selladores). Si se procede a realizar las obturaciones de las lesiones y los valores se mantienen elevados, indica elevada frecuencia en el consumo de hidratos de carbono. Esta prueba tiene utilidad para evaluar programas de control de biopelícula y de dieta.

Se sugiere no realizar estas pruebas durante la duración de tratamientos con antibióticos (se debe esperar al menos 14 días, posteriores al término del tratamiento), y si se utilizan enjuagues antimicrobianos se debe esperar 12 horas. Al desecharlos no se debe olvidar que son cultivos microbianos que deben ser manejados con los cuidados necesarios, ya que son desechos biológicos.

Existe en el mercado también otro estuche de pruebas denominado Dentocult SM y para *S. mutans* y Dentocult LB para *Lactobacillus*. Tienen en común el que todos se basan en métodos de cultivo tradicionales. La saliva estimulada con cera o parafina se pone en contacto con el medio de cultivo. Tras la incubación a 37 °C, se procede a la evaluación del número de bacterias comparando con los correspondientes diagramas del fabricante.

Figura 25. Dentocult SM y Dentocult LB.



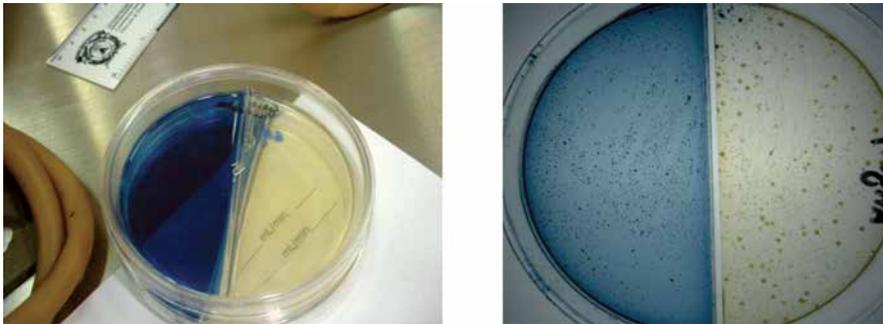
www.denfoline.co.kr y www.mah.se

Práctica # 6.

Determinación de los niveles de infección de las bacterias asociadas a la lesión de caries

Instrucciones: teniendo en cuenta que ya tienen los conocimientos teóricos impartidos en los módulos para el buen desarrollo, de esta práctica. El alumno debe de agitar la saliva estimulada durante 30s e inocular con 25 μ L cada medio de cultivo que se les proporcionará y sembrarlo, siguiendo los procedimientos descritos anteriormente.

Figura 26. Medios de cultivo que se les suministrara.



Materiales: saliva estimulada, medio MSB para el crecimiento de *S. mutans* y medio de Rogosa SL para el crecimiento de lactobacilos, vortex, mechero, asa bacteriológica, jarras con candela, estufa de incubación y hoja de registro.

Procedimientos: esta prueba se realiza utilizando saliva estimulada por cera o parafina, cuya obtención ha sido descrito previamente, poner en el vortex por 30s el tubo de ensaye que contiene la saliva, se abre el mismo se flamea al mechero y con la pipeta ajustada previamente se toman 25 μ L de saliva y se inocula el medio, se flamea la boca del tubo de ensaye al mechero y se cierra el tubo. Dispersar el inóculo con un asa bacteriológica esterilizada al fuego. Se deja reposar la caja con el medio de cultivo durante 15m antes de meter a la incubadora. Las cajas Petri serán colocadas en jarras con candela e incubadas a 37 °C por 72h, después de que realices la lectura de tu caja compara tus resultados con los parámetros que se presentan en los cuadros 11 y 14 y anótalo en tu hoja de registro.

Actividades a desarrollar por el alumno: realizar el procedimiento descrito y revisar la caja correspondiente. La lectura de la caja se realiza según los siguientes criterios comparando contra el esquema de evaluación que se te proporcionará, igual al de la siguiente figura.

Mutans Streptococci (CFU/ml saliva)



Lactobacilli (CFU/ml saliva)



Establecer los niveles de infección y comparar los resultados obtenidos con los parámetros descritos, anotar los resultados en la hoja de registro.

Indicadores de riesgo

Los indicadores mas utilizados en la identificación de los factores de riesgo son:

1. La profundidad de las fisuras y fosetas oclusales.
2. La experiencia previa de caries, hay una gran diferencia entre aquellos que han presentado la enfermedad durante la niñez y los que no. Este indicador sugiere que aquel individuo que tuvo caries no logra establecer el equilibrio entre los procesos de desmineralización ácida producto de las bacterias careogénicas y el proceso de remineralización dependiente de la presencia de iones de calcio y fosfato salival.
3. Los volúmenes de producción salival en estímulo y en reposo.
4. La capacidad amortiguadora de la saliva que está ligada a la producción de bicarbonatos por las glándulas salivales y de manera directa afecta el pH salival.
5. Los niveles de infección de aquellas bacterias consideradas como cariogénicas, que son un grupo de estreptococos, básicamente el grupo mutans *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) y varios tipos de lactobacilos denominados de manera genérica como *Lactobacillus sp.*
6. El consumo de alimentos, el cual se obtiene a través del historial clínico, donde se debe registrar la cantidad, frecuencia y adhesividad de los hidratos de carbono que se consumen diariamente.

Desarrollo teórico para realizar la práctica # 7

Métodos de tinción para identificar bacterias

Tinciones

Ahora bien, ya tenemos nuestros cultivos de *S. mutans* y de *Lactobacillus*, con el objeto de estudiar estos organismos, se necesita el uso de tinciones, puesto que estos son incoloros y refringentes de tal manera que sería muy difícil observarlos al microscopio de luz.

Los colorantes además de tener la propiedad de impartir color deben ser resistentes a la luz o al lavado, así como también deben tener la propiedad de unirse a un material por medio de una reacción química o depositarse sobre dicho material; todos los colorantes son de naturaleza orgánica, principalmente aromáticos.

La técnica de tinción se Gram, fue introducida en 1884 por el danés, Hans Cristian Gram y aún en la actualidad nos permite identificar de manera taxonómica a las bacterias. Se utiliza tanto para poder referirse a la morfología celular bacteriana como para poder realizar una primera aproximación a la diferenciación bacteriana, se consideran bacterias Gram positivas aquellas que se observan al microscopio de color moradas o azul-violeta y bacterias Gram negativas a las que se ven de color rosa o grosella.

La diferencia en la coloración se debe a las diferencias de las estructuras de la pared celular, la bacteria Gram positiva tiene una pared gruesa formada por capas de peptidoglicano (entre el 80 y 90%) y un poco de ácido teitoico, así como menos lípidos. Una pared celular gruesa es poco permeable a los disolventes, ya que al deshidratarse la pared celular cierra los poros y el colorante queda dentro de la pared celular (color morado complejo cristal violeta/iodo).

La pared de las bacterias Gram negativas tienen una capa más delgada (entre el 10 y 20%) de peptidoglicano y ésta se encuentra rodeada de una membrana exterior cuya composición es de fosfolípidos, lipopolisacáridos, y lipoproteínas (color rojo). Ambos tipos de bacterias

se tiñen diferencialmente debido a estas diferencias constitutivas de su pared celular.

Debemos hacer notar que la tinción de Gram puede fallar debido a: exceso de agua en el portaobjetos, el tiempo que se debe de estar cada reactivo, cultivos viejos, entre los más importantes.

Esta técnica consta de 3 pasos: fijación del frotis, tinción y lectura al microscopio.

Fijación del frotis

- Con la ayuda de un mechero, flamear un asa bacteriológica y esperar que enfríe un poco o enfriar en una zona de la caja Petri que esté libre de colonias (generalmente en un extremo).
- En un portaobjetos limpio, depositar una gota de agua estéril.
- Con el asa (previamente flameada) tomar una colonia de la muestra.
- Una vez obtenida la muestra (con el asa), hacer que ésta tenga contacto con el portaobjetos, y depositar la muestra contenida en el asa.
- Con el asa (conteniendo la muestra) sobre el portaobjetos, proceder a realizar la dispersión de la muestra en el portaobjetos mediante movimientos giratorios (dar vueltas con el asa) sobre el portaobjetos.
- Esperar que seque al aire libre o ayudarse con la llama de un mechero para fijar la muestra, teniendo en cuenta que el calor no debe ser directo (sólo se pasa por la llama), puesto que el calor excesivo puede cambiar la morfología celular de las bacterias a observar.

Método

Una vez fijada la muestra:

- Agregar azul violeta (cristal violeta) y esperar 1 minuto. Todas las células Gram positivas y Gram negativas se tiñen de color azul-púrpura.
- Enjuagar con agua (nunca a chorro directo).
- Agregar lugol y esperar entre 1 minuto.
- Enjuagar con agua.
- Agregar alcohol-acetona y esperar de 8 a 15 segundos aproximadamente (parte crítica de la coloración).
- Enjuagar con agua.
- Agregar safranina o fucsina básica y esperar 45 segundos. Este tinte dejará de color rosado-rojizo las bacterias Gram negativas.
- Enjuagar

Para que no olvides la secuencia piensa que es la técnica de tinción ALAS, azul violeta, lugol, alcohol-cetona y safranina.

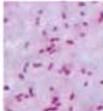
Para observar al microscopio óptico es conveniente hacerlo a 100x con aceite de inmersión.

Tinción GRAM: Bacterias Gram-Positivas (azules).

Tipos	Formas	Imagen
Cocos Gram-positivos	Racimos	 <p><i>Staphylococcus sp, como S. aureus</i></p>
	Cadenas	 <p><i>Streptococcus sp, como S. pneumoniae, Streptococcus grupo B</i></p>
	Tetradas	 <p><i>Micrococcus sp</i></p>
Bacilos Gram-positivos	Gruesos	 <p><i>Clostridium sp, como C. perfringens, C. septicum</i></p>
	Finos	 <p><i>Listeria sp</i></p>
	Ramificados	 <p><i>Actinomyces como A. israelii y Nocardia,</i></p>

http://www.microinmuno.qb.fcen.uba.ar/SeminarioTinciones_archivos/image033.jpg

Tinción GRAM: Bacterias Gram-Negativas (rojo o grosella).

Tipos	Formas	Imagen
Cocos Gram-negativos	Diplococos	  <p><i>Neiseria sp, como N. meningitidis</i> <i>Moraxella sp y Acinetobacter sp</i></p>
	Cocobacilos	  <p><i>Acinetobacter sp, que puede ser Gram-positivo o Gram-negativo</i></p>
Bacilos Gram-negativos	Bacilos finos	  <p><i>E. Coli</i></p>
	Cocobacilos	  <p><i>Haemophilus sp, como H. influenzae</i></p>
	Curvados	  <p><i>Vibrio sp, como V. cholerae, y Campylobacter sp, como C. jejuni</i></p>
	Aguja fina	  <p><i>Fusobacterium sp.</i></p>

http://www.microinmuno.qb.fcen.uba.ar/SeminarioTinciones_archivos/image033.jpg

Práctica # 7.

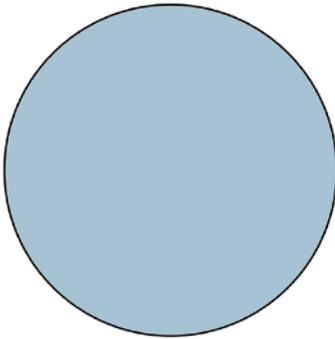
Identificación de las bacterias asociadas a la lesión de caries a través de la tinción de GRAM

Instrucciones: teniendo en cuenta que ya tienen los conocimientos teóricos impartidos en los módulos para el buen desarrollo de esta práctica. El alumno debe seguir los 3 pasos descritos fijación del frotis, tinción y lectura al microscopio.

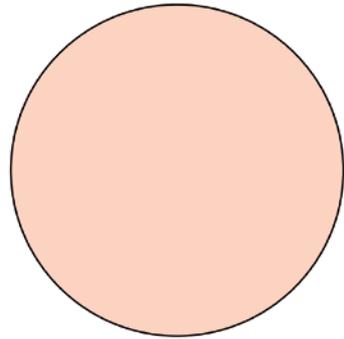
Materiales: portaobjetos, asa bacteriológica, mechero, azul violeta, lugol, alcohol-cetona y safranina, microscopio óptico

Procedimientos: seguir los pasos descritos previamente.

Actividades a desarrollar por el alumno: realizar el procedimiento descrito. Establecer la bacteria y dibujar en las siguientes formas la distribución de tu frotis.



Bacteria: _____



Bacteria: _____

Material necesario para la realización de las prácticas y proporcionado por el laboratorio.

- Cajas Petri
- Medios de cultivo MSB y Rogosa SL
- Microscopios
- Mecheros
- Encendedor
- Tubos de ensayo graduado y embudos de plástico para pruebas salivales
- Prueba de saliva global (TSG)
- Tubo de ensayo con medio de acidificación salival
- Cápsulas de parafina
- Vórtex
- Pipetas
- Puntas de pipetas
- Jarras con candela
- Estufas de laboratorio para incubación

Exploración bucal antes de las prácticas de laboratorio:

- Espejos y sondas de exploración.
- Pinzas estériles.
- Guantes.
- Cubrebocas

Material para prácticas en el laboratorio, que deberá ser comprado y entregado una semana antes de las prácticas por los alumnos.

- 1 pliegos de papel de estraza por alumno.
- 1 asa bacteriológica por alumno.
- 1 rotulador para escribir en vidrio o indeleble por alumno.
- 1 frasco de toallitas Lysol por cada 5 alumnos.
- 1 paquete de sanitas por cada 5 alumnos.

-
- 1 caja de gasa estéril por cada 5 alumnos.
 - 1 caja de portaobjetos por cada 10 alumnos
 - 1 caja de cubreobjetos por cada 10 alumnos.
 - 1 bolsa de jabón por cada 10 alumnos.

Esquema de trabajo a seguir # 7

El alumno realizará en primer lugar la determinación de los riesgos clínicos con su profesor de módulo y el profesor de prácticas de laboratorio: **caries dental y profundidad de la fisura**. Deberá anotar la información en su hoja de registro individual.

El segundo día se le hará una introducción a las prácticas.

El tercer día se debe realizar la determinación de los factores salivales de riesgo a caries: 2 pruebas de **flujo salival en reposo** durante 5 minutos cada uno. Se debe anotar la información en su hoja de registro individual.

En el cuarto día la práctica será, la determinación del **flujo salival estimulado**. Después de anotar los valores correspondientes, utilizará la saliva para realizar el resto de las siguientes pruebas de actividad de caries: **prueba de la velocidad de acidificación salival**, e inoculación de *Streptococcus mutans* y *Lactobacillus*, en los medios selectivos correspondientes. La lectura de los resultados se hará tras incubar el tiempo correspondiente (la prueba de velocidad de acidificación salival cada 24 horas y las pruebas bacteriológicas en la siguiente práctica). Los resultados se anotarán en la hoja correspondiente de registro individual, no olvidando indicar la fecha en que fueron realizadas.

En la quinta sesión el alumno estimará su número de bacterias presentes en boca del grupo mutans y de lactobacilos así como el resultado de la prueba de acidificación salival, realizará una tinción de Gram para la identificación de estas y analizará en conjunto la información recolectada.

En la sexta sesión se hará una sesión de cierre que incluye conceptos teóricos, análisis de resultados grupales e individuales, así como, esquemas de los tratamientos correspondientes según el riesgo a enfermar identificado.

Bibliografía

1. Newbrun E. Cariología. Ed. Limusa, 1ª reimpresión. México 1991. p. 40.
2. Beck JD. Risk revisited. *Community Dent Oral Epidemiol* 1998; 26:220-225.
3. Nagano T. Relation between the form of pit and Fissure and the primary lesion of caries. *Dent Abstr* 1961; 6:426.
4. Symons AL, Chu CY, Meyers IA. The effect of fissure morphology and pretreatment of the enamel surface on penetration and adhesion of fissure sealants. *J Oral Rehabil* 1996; 23:791-798
5. Katz S, Mac Donald JL, Stookey GK. *Odontología preventiva en acción*. 3ª ed. Buenos Aires: Panamericana; 1989.
6. Ismail AI, Sohn W, Tellez M, Amaya A, Sen A, Hasson H, Pitts NB. The International Caries Detection and Assessment System (ICDAS): an integrated system for measuring dental caries. *Community Dent Oral Epidemiol* 2007; 35:170-178.
7. Vanobbergen J, Martens L, Lesaffre E, Bogaerts K, Declerck D. The value of baseline caries risk assessment model in the primary dentition for the prediction of caries incidence in the permanent dentition. *Caries Res* 2001; 35: 442–450
8. World Health Organization. *Oral Health Surveys. Basic Methods*. WHO, Geneva, Switzerland. (2013)
9. Ismail AI, Tellez M, Sohn W, Sen A. Reliability of the International Caries Detection and Assessment System (ICDAS). *Community Dent Oral Epidemiol*, 2005.
10. Pitts NB. Modern concepts of caries measurement. *J Dent Res* 2004a; 83:43–47.
11. Criteria Manual International Caries Detection and Assessment System (ICDAS II) Workshop held in Baltimore, Maryland, March 12th-14th 2005 “*Decision tree for coronal caries detection*” Page 8
12. Pitts NB. Are we ready to move from operative to non-operative/preventive treatment of dental caries in clinical practice? *Caries Res* 2004:38, 294–304.

13. Dawes C. Salivary flow patterns and the health of hard and soft oral tissues. *J Am Dent Assoc* 2008; 139:18S-24S.
14. Fejerskov O and Kidd E. Dental caries. The disease and its clinical management. U. K. Blackwell Munksgaard Ed; 2003.
15. Bardow A, Lagerlöf F, Nauntofte B, Tenovou J. The role of saliva. In: Fejerskov O and Kidd E. Dental caries. The disease and its clinical management. U. K. Blackwell Munksgaard Ed; 2003.
16. Tenovou JO. Human saliva: Clinical, Chemistry and Microbiology. Boca Raton: CRC Press; 1989.
17. Larmas M. Saliva and dental caries: diagnostic tests for normal dental practice. *Int Dent J*. 1992;42:199-206.
18. López-Jornet P, Bermejo-Fenoll A, Bagan-Sebastian JV, Pascual-Gomez E. Comparison of a new test for the measurement of resting whole saliva with the draining and the swab techniques. *Braz Dent J* 1996; 7: 81-6.
19. Ericson D, Bratthall D. Simplified method to estimate salivary buffer capacity. *Scand J Dent Res* 1989; 97:405-7.
20. Seif T. Cariología: prevención, diagnóstico y tratamiento contemporáneo de la caries dental. Caracas: Actualidades Médico-Odontológicas Latinoamérica; 1997.
21. ten Cate JM, Larsen MJ, Pearce EIF, Fejerskov O. Chemical interactions between the tooth and oral fluids. In: Fejerskov O and Kidd E. Dental caries. The disease and its clinical management. U. K. Blackwell Munksgaard Ed; 2003.
22. Snyder ML. Laboratory methods in the clinical evaluation of caries activity. *J Am Dent Assoc* 1951; 42: 400-413.
23. Editors. Mary Jo Zimbardo, B.S., MT (ASCP). David A. Power, Ph.D. Sharon M. BD Difco™ & BBL™ Manual (Second Edition). Sparks, Maryland, USA. 2009.
24. Hamada S, Slade HD. Biology, immunology, and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. *Microbiol Rev*. 1980; 44(2):331-84. Review.
25. Loesche WJ. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. *Microbiol Rev*. 1986; 50(4):353-80

-
26. Bratthall D, Carlsson P. Clinical microbiology of saliva. In: Tenovou, J.O. (Ed), Human Saliva: Clinical Chemistry and Microbiology. Boca Raton FL, CRC Press. 1987. p.204-223.
 27. Rogosa M, Mitchell JA, Wiseman R. A selective medium for the isolation and enumeration of oral lactobacilli. J Dent Res 1951; 30:682-689.
 28. Rogosa M, Mitchel JA, Wiseman R. A selective medium for the isolation and enumeration of oral lactobacilli. J Dent Res 1951; 30:682-689.

Bibliografía Complementaria

- Batchelor P, Sheiham A. The limitations of a high-risk approach for the prevention of dental caries. Comm Dent Oral Epidemiol 2002; 30:302-312.
- Bratthall D. Dental caries. Markers of high and low risk groups and individuals. Cambridge (UK): Cambridge University Press; 1991, Chaper 13.
- Disney JA, Graves RC, Stamm JW, Bohannan HM, Abernathy Jr. The University of North Carolina caries risk assessment study. II Baseline caries prevalence. J Public Health Dent 1990; 50: 178-85.
- Disney JA, Graves RC, Stamm JW, Bohannan HM, Abernathy JR, Zack DD. The University of North Carolina caries risk assessment study: further developments in caries risk prediction. Community Dent Oral Epidemiol 1992; 20:64-75.
- Federation Dentaire International: Technical Report No. 31. Review of methods of Identification of high caries risk groups and individuals. Int Dent J 1988; 38: 177-89.
- Nagler RM. The enigmatic mechanism of irradiation-induced damage to the major salivary glands. Oral Dis 2002; 8:141-6.
- Nolte W. Microbiología odontológica. Ed. Interamericana, México, D. F., 1994, 5ª. ed.
- Sánchez-Pérez L, Acosta-Gío E, Méndez-Ramírez I. A cluster analysis model for caries risk assessment. Arch Oral Biol 2004; 49:719-725.
- Sánchez-Pérez L, Acosta-Gío E. Caries risk assessment from dental plaque and salivary Streptococcus mutans counts on two culture media. Arch Oral Biol 2001; 46:49-55.

- Sánchez-Pérez L, Golubov J, Irigoyen Camacho ME, Moctezuma PA, Acosta-Gío AE (2009) Clinical, salivary and bacterial markers for caries risk assessment in schoolchildren: a four year follow-up. *Int J Ped Dent* 19:186-192.
- Sánchez-Pérez L, Irigoyen-Camacho E, Sáenz-Martínez L, Zepeda Zepeda M, Acosta-Gío E, Méndez-Ramírez I. Stability of unstimulated and stimulated whole saliva flow rates in children. *Int J Paediatr Dent*. 2015 Oct 5. doi: 10.1111/ipd.12206.
- Slotz J, Taubman MA. *Contemporary Oral microbiology and immunology*. Edit. Mosby Yearbook Inc. 1992.
- Vanderas AP. Bacteriologic and non-bacteriologic criteria for identifying individuals at high risk of developing dental caries: a review. *J Public Health Dent* 1986; 46:106-113.

Cuestionario

1. Indicar al menos tres razones por las que tiene utilidad emplear pruebas de actividad de caries.

2. Describir cómo se realizan en clínica las siguientes pruebas:

- Experiencia previa de caries

- De que tipo es tu fisura

- Determinación de flujo salival (estimulado y no estimulado)

- Prueba de la velocidad de acidificación salival.

- Recuentos de estreptococos del grupo *mutans* y *Lactobacillus*.

3. Evaluar los resultados de dichas pruebas de actividad de caries.

4. Usar las pruebas de actividad de caries para ayudar a determinar el riesgo de ésta enfermedad en un compañero.

-
5. Estimar las medidas preventivas que crea pertinente instaurar en función de los resultados obtenidos.

6. Utilizar la tinción de Gram para identificar la forma y describir las bacterias cultivadas.

Hoja de registro individual

Nombre _____

Turno: Mat Vest N.L. ____ Edad _____ años _____ meses. _____

Trimestre: _____ Fecha de examen _____

Veces que se cepilla los dientes 1 , 2 , 3 , >3

Frecuencia de comidas al día 1 , 2 , 3 , 4 , 5 , 6 , >6

Cuantos refrescos toma al día _____, a la semana _____

Tipo de Fisura: ligera _____ media _____ profunda _____

Tomas algún medicamento Si No Cuales: _____

17	16	15	14	13	12	11	21	22	23	24	25	26	27
		55	54	53	52	51	61	62	63	64	65		
		85	84	83	82	81	71	72	73	74	75		
47	46	45	44	43	42	41	31	32	33	34	35	36	37

Código	Criterio	DP	No
0	Sano	TDT	
1	Cariado	TDP	
2	Obturado y cariado	Total	
3	Obturado	Lesiones	
4	Ausente por caries	Caras	Perm.
5	Ausente por otra razón	Oclusal	
6	Sellador	Vestibular	
7	Soporte de puente, corona especial o funda	Palatina	
8	No erupcionado	Lingual	
9	No registrado	Interproximal	

CD ____ PD ____ OD ____ CPOD ____ C ____ PS ____ OS ____ CPOS ____

Resultados salivales

TSG ___ cm ___ min. Conversión ___ cm/min.

Conversión a mL/min: _____

Saliva en reposo ___ mL ___ 5 ___ min.

Conversión a mL/min: _____

Saliva estimulada ___ mL ___ min.

Conversión a mL/min: _____

Prueba de velocidad de acidificación:

Marcada ___ Moderada ___ Ligera ___ Negativa ___

Resultados bacteriológicos

Recuento de *Streptococcus mutans* $<10^6$ ___ ó $>10^6$ ___

Recuentos de *Lactobacillus* ___ $<10^6$ ___ ó $>10^6$ ___

Tinción de Gram

S. mutans _____

Lactobacillus _____

FECHA _____ PROFESOR _____

FIRMA _____

Manual de prácticas de laboratorio.
Pruebas de identificación de factores de riesgo a caries
se terminó de editar en Septiembre de 2016.
Se emplearon los tipos Adobe Caslon Pro, en diferentes puntos.

Diseño y formación, Nathalie Guzón André
e-mail: nathalieguz@hotmail.com