

Los probióticos y su relación en la odontología preventiva.

Orellana-Centeno JE,¹ Morales-Castillo V,²

¹Universidad de la Sierra Sur, Instituto de Investigación Sobre Salud Pública. Oaxaca, México.
²Unidad de Medicina Familiar No. 9, Hospital General de Zona. Instituto Mexicano del Seguro Social. San Luis Potosí, México.

Correspondencia

José Eduardo Orellana Centeno

Universidad de la Sierra Sur
Instituto de Investigación
Sobre Salud Pública
Guillermo Rojas Mijangos
s/n, esq. Av. Universidad C.P.
70800
jeorellana@unsis.edu.mx
Miahuatlán de Porfirio Díaz,
Oaxaca, México.

Resumen

Las enfermedades a nivel odontológico son enfermedades con causas multifactoriales que afecta a más de la mitad de la población a nivel mundial, según cifras presentadas por la Organización Mundial de la Salud, siendo la población infantil una de las más afectadas. Se han intentado desarrollar nuevas herramientas biotecnológicas, entre las que se encuentran los probióticos, cuya finalidad es el control selectivo de los agentes etiológicos de la caries, método de prevención y de mantenimiento de la cavidad oral.

Al conocer las enfermedades de la cavidad bucal son una disbiosis de la microbiota oral, ha replanteado el desarrollo de estrategias para el control de esta enfermedad. En salud oral, los resultados obtenidos en una gran diversidad de estudios con probióticos son prometedores, aunque son pocos los que presentan resultados claros a nivel clínico. La comprensión de las características que deberían tener los probióticos para la cavidad oral permitirá seleccionar las cepas más idóneas para este fin.

Palabras claves: Odontología, Prevención, Probióticos, Salud Pública.

The probiotics and their relationship in preventive dentistry.

Abstract

Odontologic Diseases are diseases with multifactorial etiologies that affect more than a half of the world's population, according to figures presented by the World Health Organization (WHO), with the child population being one of the most affected. Attempts have been made to develop new biotechnological tools, among which are probiotics, whose purpose is the selective control of caries etiological agents, a prevention method and oral cavity maintenance.

Knowing the oral cavity diseases are a dysbiosis of the oral microbiota, the development of strategies for the control of this disease has been rethought. In oral health, the results obtained in a great diversity of studies with probiotics are promising, although few show clear results at the clinical level. Understanding the characteristics that probiotics should have for the oral cavity will allow selecting the most suitable strains for this purpose.

Keywords: Dentistry, Prevention and Control, Probiotics, Public Health.

Introducción

Las enfermedades a nivel odontológico son enfermedades con causas multifactoriales que afecta a más de la mitad de la población a nivel mundial, según cifras presentadas por la Organización Mundial de la Salud, siendo la población infantil una de las más afectadas.¹

El papel de los microorganismos en el proceso infeccioso de las enfermedades en la cavidad bucal ha sido presentado por primera vez por Miller, quien propuso la teoría "Químico parasitaria de la caries"; él proponía que existían microorganismos en la cavidad oral que eran capaces de metabolizar carbohidratos y posteriormente crear ácidos

tan fuertes como para producir una desmineralización de los tejidos dentales.

A la postre, en el año de 1960, Paul H. Keyes propuso la tríada de Keyes, la cual era una explicación de los factores causales involucrados en la caries, englobaba microorganismos-huésped-sustrato, demostró que no eran factores aislados y que el desequilibrio de alguno de ellos podría producir la enfermedad.²

A partir de 1989, la Organización Mundial de la Salud (OMS), recomienda la promoción de la salud bucal como parte integral de la salud pública. A pesar de los esfuerzos realizados para el control de las enfermedades orales, como la caries den-



tal, esta es considerada una de las enfermedades crónicas más prevalentes.¹ La caries dental llega a afectar funciones básicas como la alimentación y la nutrición, e influyen en la vida psicosocial de las personas. La pérdida de piezas dentales es considerada una amputación o la muerte de la misma pieza dental, razón por la cual se debería considerar como tal y prestar más atención a las medidas preventivas de la cavidad bucal.

La caries dental es una enfermedad producida por el rompimiento del equilibrio del pH, lo cual trae como consecuencia principal el establecimiento de una biopelícula compuesta principalmente por una microflora cariogénica. El desequilibrio o la disbiosis de la microflora bucal hacen de esta enfermedad una infección endógena, y no transmisible.

A partir de estos conocimientos se han intentado desarrollar nuevas herramientas biotecnológicas, entre las que se encuentran los probióticos, cuya finalidad es el control selectivo de los agentes etiológicos de la caries, método de prevención y de mantenimiento de la cavidad oral. La definición de los probióticos, aceptada por la OMS y la Organización para la Alimentación y Agricultura (FAO) es, “microorganismos vivos, principalmente bacterias, que son seguros para el consumo humano y cuando son ingeridos en suficiente cantidad, tienen efectos benéficos en la salud humana”.³

Microorganismos en la cavidad oral

La cavidad oral sana, está caracterizada por presentar una microflora nativa conformada por microorganismos como phylum Firmicutes (género *Streptococcus*, familia Veillonellaceae, género *Granulicatella*), Proteobacteria (género *Neisseria*, *Haemophilus*), Actinobacteria (género *Corynebacterium*, *Rothia*, *Actinomyces*), Bacteroidetes (género *Prevotella*, *Capnocytophaga*, *Porphyromona*) y Fusobacteria (género *Fusobacterium*).⁴

Los hallazgos de una comunidad microbiana relacionada o nativa con un estatus no cariogénico apoyan la idea de usar microorganismos asociadas a un estado de salud bucal adecuado. Es por ello, que se han considerado a los probióticos, para prevenir las enfer-

medades orales.⁵ Gracias a los avances en técnicas de biología molecular, como las técnicas de Reacción de Cadena Polimerasa (PCR), la pirosecuenciación y la secuenciación del ARNr 16S; así como, el establecimiento de bases de datos genómicas como Human Oral Microbiome Data base (HOMD) y OSU CORE data base, han sido una gran herramienta para aumentar nuestros conocimientos etiológicos de la odontología, ya que se tiene mayor información sobre los microorganismos que están implicados en el desarrollo de la caries dental.⁶

Probióticos

Los probióticos han sido ampliamente estudiados y utilizados para problemas gastrointestinales, como diarrea secundaria al consumo de antibióticos, infección por *Helicobacter pylori*, manejo de la intolerancia a la lactosa, síndrome de colon irritable y colitis, así como para enfermedades alérgicas y urogenitales, entre otras. Dentro de este grupo, se considera que los probióticos más estudiados para cuidar la salud en la cavidad oral son cepas microbianas aisladas, principalmente del tracto digestivo, como las que pertenecen al género *Lactobacillus* (*L. rhamnosus*, *L. reuteri*, *L. casei*, *L. brevis*, *L. paracasei*, *L. acidophilus*, *L. plantarum*) y *Bifidobacterium* (*B. bifidum*, *B. longum*, *B. lactis*, *B. animalis*, *B. infantis*).^{7,8}

Una de las bacterias probióticas más estudiadas en la cavidad oral fue aislada por Gorbach y Godin en 1983, a partir de tracto digestivo de un adulto sano. Fue nombrada *Lactobacillus rhamnosus* y se caracteriza por inhibir, por medio de bacteriocinas, una gran variedad de bacterias patógenas humanas, entre las que están *S. mutans*, *S. sobrinus*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* y *Prevotella intermedia*. Además, estas bacterias se establecen principalmente en la saliva, y no tiene efecto cariogénico.^{9,10}

Clasificación de probióticos para la cavidad oral

Los probióticos se dividen principalmente en tres grupos, lactobacilos, bifidobacterias y estreptococos, siendo más utilizados los del grupo de los lactobacilos:

1. Lactobacilos: Son bacterias Gram (+) no esporuladas, en forma de bastón, o cocobacilos con

DETALLES DEL ARTÍCULO

Recibido: 1-Noviembre-2019

Aceptado: 20-Diciembre-2019

Cómo citar este artículo:

Orellana-Centeno JE, Morales-Castillo V. Los probióticos y su relación en la odontología preventiva. *Avan C Salud Med* 2019; 6 (4):116-121.

un contenido de G + C. Son estrictamente fermentativos, aerobios o anaerobios, acidúricos o acidófilos y tienen un requerimiento nutricional complejo (carbohidratos, aminoácidos, péptidos, ésteres ácidos grasos, sales, derivados de ácidos nucleicos, y vitaminas).^{11,12}

2. Bifidobacterias: Se caracterizan por ser Gram positivas, no esporuladas, inmóviles y catalasa-negativas. Son pleomórficas, incluyendo las formas de bacilos cortos, curvados, con forma de porra y con forma de Y.^{13,14}
3. Estreptococos: Es un grupo formado por diversos cocos gram (+) que normalmente se disponen en cadenas o en pares (diplococos). La mayoría de las especies son anaerobios facultativos y algunos crecen únicamente en una atmósfera enriquecida con CO₂. Sus exigencias nutricionales son complejas y su aislamiento requiere el uso de medios enriquecidos con sangre o suero. Son capaces de fermentar carbohidratos y son catalasa negativos.^{15,16}

Dentro de los lactobacilos que es uno de los microorganismos que son habitantes normales de la cavidad bucal, uno de los más estudiados es el *Lactobacillus reuteri*, se encuentra habitualmente en el tracto gastrointestinal humano. Se caracteriza por producir bacteriocinas que inhiben bacterias Gram positivas como *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* y *Listeria monocitogenes* y bacterias Gram negativas como *E. coli*, *Yersinia enterocolitica* y *Pseudomonas fluorescens*.^{17,18}

Estos lactobacilos presentaron características apropiadas para la colonización y el mantenimiento del pH en cavidad oral. Han demostrado que en condiciones *in vitro* las cepas mantienen un pH de 7, en presencia de glucosa y arginina. Tiene mayor potencial para colonizar, por su capacidad de adhesión y formación de biopelícula.^{19,20}

Otro de los microorganismos probióticos que se han estudiado y que se encuentra presente en la cavidad oral son *Streptococcus dentisani*. Esta es perteneciente al grupo mitis, pero se agrupó dentro de una nueva ramificación filogenética, esto identificado gracias al análisis de características metabólicas y genómicas, confirmaron que pertenecían a una nueva especie del género *Streptococcus*. Como características de probiótico, *S.*

dentisani presenta actividad antimicrobiana frente a *S. mutans* en condiciones *in vitro*, y produce amonio mediante el metabolismo de la arginina, permitiendo un control del pH de la cavidad oral y evitando así el asentamiento de cepas relacionadas con el desarrollo de caries.^{21,22}

Para identificar bacterias con características probióticas, se han analizado algunas cepas bacterianas de *Lactobacillus salivarius* con actividad antagonista frente a *S. mutans*. De 64 cepas estudiadas, encontraron dos, K35 y K43, que inhibían significativamente la formación de biopelícula de *S. mutans*. Posteriores estudios *in vitro* confirmaron que tenían una fuerte actividad bactericida frente a *S. mutans*.^{23,24}

De manera general, los probióticos promueven la salud alterando el balance ecológico mediante la exclusión competitiva de bacterias patógenas. Estudios *in vivo* e *in vitro*, utilizando diferentes cepas de *Lactobacillus*, han demostrado dicha competencia, mecanismo conocido como "inhibición competitiva".^{25,26}

Los probióticos ejercen su acción a través de múltiples mecanismos, entre los cuales se destacan: a) promoción de la fagocitosis; b) inhibición del crecimiento bacteriano; c) modulación local de la respuesta inmune; d) inhibición competitiva.²⁷

Caries dental

Se han realizado diferentes estudios con respecto a la reducción del *S. mutans*, en la cavidad oral se han estudiado lactobacilos como el *L. rhamnosus*, *L. casei*, *L. reuteri*, los cuales han demostrado una reducción significativa en el recuento de *S. mutans*. Presentando una disminución significativa del recuento de *S. mutans* después de 14 días consumiendo yogurt con *L. reuteri*.²⁸

La utilización de los probióticos para la reducción de las afecciones orales puede ser una alternativa interesante en la nueva generación de la prevención, la terapia probiótica ha demostrado ser segura para disminuir el recuento de bacterias patógenas en la cavidad oral, además establece un ecosistema oral sano disminuyendo la caries dental, afecciones periodontales y halitosis, los resultados son alentadores. Sin embargo, se requiere una mayor cantidad de estudios para



poder establecer un protocolo de utilización de probióticos como estrategia preventiva.²⁹

Mientras que existe una disminución del número de *S. Mutans* con un tratamiento probiótico, existe un aumento de *Lactobacillus* (LB) tras la administración de probióticos. Este grupo de investigación llega a la conclusión de que la administración de probióticos no tiene un efecto positivo en el tratamiento de la caries, sin embargo, la reducción de *S. Mutans* podría suponer una disminución de probabilidades de la aparición de nuevas lesiones cariosas.³¹

Enfermedad Periodontal

La periodontitis crónica, es la segunda enfermedad estomatológica de mayor prevalencia y según recientes estudios a través de la utilización de probióticos, con base en el mismo mecanismo de acción, se puede combatir de manera eficaz.³²

La presencia de patógenos periodontales puede ser regulada por medio de acciones antagónicas, se ha observado una disminución del sangrado gingival y de la gingivitis por la utilización de *Lactobacillus reuteri*. Así como también se sabe, que la flora de lactobacilos residente inhibe el crecimiento de *Porphyromona gingivalis* y *Prevotella intermedia* en 82 y 65%, respectivamente.³³

Se ha demostrado que determinadas cepas de *Lactobacillus*, inhiben el crecimiento de microorganismos responsables de la aparición de gingivitis, como pueden ser *Treponema Denticola*, *Tannerella Forsythia* o *A. Actinomycetemcomitans*. Por este motivo la administración de probióticos puede tener un rol importante en el ecosistema oral.^{34,35}

Halitosis

Las responsables de la producción de la halitosis en el ser humano son las bacterias anaerobias, que se producen durante la degradación de determinadas proteínas, compuestas por aminoácidos sulfurados. Se ha relacionado en estudios, que el uso de probióticos como *S. Salivarius*, re-

ducen los parámetros del mal olor oral. Además, se mostró una disminución de la población bacteriana anaerobia, unido a una reducción del mal olor en cavidad bucal.³⁶

Por otra parte, también se ha observado una disminución de las bacterias más odoríferas, *F. Nucleatum*, tras la ingesta de *Weissella Cibarica*. Este efecto podría deberse a la producción de peróxido de hidrógeno por parte de este microorganismo probiótico.³⁷

Conclusiones

El entendimiento de que las enfermedades en la cavidad bucal son una disbiosis de la microbiota oral, ha replanteado el desarrollo de estrategias para el control de esta enfermedad. Una de las estrategias de tipo biotecnológico es la utilización de probióticos, cuyo objetivo principal es el establecimiento de microorganismos benéficos para contribuir a la homeostasis de la cavidad oral. En salud oral, los resultados obtenidos en una gran diversidad de estudios con probióticos son prometedores, aunque son pocos los que presentan resultados claros a nivel clínico. La comprensión de las características que deberían tener los probióticos para la cavidad oral permitirá seleccionar las cepas más idóneas para este fin. Teniendo como prioridad la seguridad en su utilización y la ubicación en cavidad oral.

Recomendaciones

Los probióticos podrían utilizarse como tratamiento preventivo para la caries; sin embargo, en algunos países no existen productos desarrollados específicamente para el control de esta enfermedad. Esto invita a realizar estudios con bacterias que cumplan las características ideales para cavidad oral y demuestren si realmente son eficaces. Se han desarrollado estudios a nivel básico del tema, pero aún falta aumentar el número de estudios clínicos para corroborar su efectividad y con ello desarrollar productos en el mercado y probablemente una medida de salud pública.

Referencias bibliográficas

- World Health Organization. Oral health: priority action areas [Internet]. [Consultado el 20 de octubre de 2015] Disponible en: http://www.who.int/oral_health/action/information/surveillance/en/
- Laleman I, Detailleur V, Slot DE, Slomka V, Quirynen M, Teughels W. Probiotics reduce mutans streptococci counts in humans: a systematic review and meta-analysis. *Clin Oral Investig* 2014; 18(6): 1539-1552
- Mark Welch J, Rossetti B, Rieken C, Dewhirst F, Borisy G. Biogeography of a human oral microbiome at the micron scale. *PNAS* 2016; 113(6): 791-800.
- Duran-Pinedo AE, Frias-Lopez J. Beyond microbial community composition: functional activities of the oral microbiome in health and disease. *Microbes Infect* 2015; 17(7): 505-516.
- Belstrøm D, Fiehn NE, Nielsen CH, Holmstrup P, Kirkby N, Klepac-Ceraj V et al. Altered bacterial profiles in saliva from adults with caries lesions: a case-cohort study. *Caries Res* 2014; 48(5): 368-375
- Vieira-Colombo AP, Magalhães CB, Hartenbach FA, Martins-do-Souto R, Maciel-da-Silva-Boghossian C. Periodontal-disease-associated biofilm: A reservoir for pathogens of medical importance. *Microb Pathog* 2016; 94: 27-34.
- Kianoush N, Adler CJ, Nguyen KA, Browne GV, Simonian M, Hunter N. Bacterial profile of dentine caries and the impact of pH on bacterial population diversity. *PLoS One* 2014; 9(3): 92-94.
- Hedayati-Hajikand T, Lundberg U, Eldh C, Twetman S. Effect of probiotic chewing tablets on early childhood caries-a randomized controlled trial. *BMC Oral Health* 2015; 15(1): 112.
- Toiviainen A, Jalasvuori H, Lahti E, Gursøy U, Salminen S, Fontana M et al. Impact of orally administered lozenges with *Lactobacillus rhamnosus* GG and *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 on the number of salivary mutans streptococci, amount of plaque, gingival inflammation and the oral microbiome in healthy adults. *Clin Oral Investig* 2015; 19(1): 77-83.
- Campus G, Cocco F, Carta G, Cagetti MG, Simmark-Mattson C, Strohmenger L, et al. Effect of a daily dose of *Lactobacillus brevis* CD2 lozenges in high caries risk schoolchildren. *Clin Oral Investig* 2014; 18(2): 555-561.
- Nishihara T, Suzuki N, Yoneda M, Hirofuji T. Effects of *Lactobacillus salivarius*-containing tablets on caries risk factors: a randomized open-label clinical trial. *BMC Oral Health* 2014; 14(1): 110.
- Hasslöf P, West CE, Videhult FK, Brandelius C, Stecksén-Blicks C. Early intervention with probiotic *Lactobacillus paracasei* F19 has no long-term effect on caries experience. *Caries Res* 2013; 47(6): 559-565.
- Baca-Castañón ML, De la Garza-Ramos MA, Alcázar-Pizaña AG, Grondin Y, Coronado-Mendoza A, Sánchez-Najera RI et al. Antimicrobial effect of *Lactobacillus reuteri* on cariogenic bacteria *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus mutans*, and periodontal diseases *Actinomyces naeslundii* and *Tannerella forsythia*. *Probiotics Antimicrob Proteins* 2015; 7(1): 1-8.
- Huang SC, Burne RA, Chen YY. The pH-dependent expression of the urease operon in *Streptococcus salivarius* is mediated by CodY. *Appl Environ Microbiol* 2014; 80(17): 5386-5393.
- Camelo-Castillo A, Benítez-Páez A, Belda-Ferre P, Cabrera-Rubio R, Mira A. *Streptococcus dentisani* sp., a novel member of the mitis group. *Int J Syst Evol Microbiol* 2014; 64(1): 60-65.
- Wu CC, Lin CT, Wu CY, Peng WS, Lee MJ, Tsai YC. Inhibitory effect of *Lactobacillus salivarius* on *Streptococcus mutans* biofilm formation. *Mol Oral Microbiol* 2015; 30(1): 16-26.
- Terai T, Okumura T, Imai S, Nakao M, Yamaji K, Ito M et al. Screening of probiotic candidates in human oral bacteria for the prevention of dental disease. *PLoS One* 2015; 10(6): e0128657.
- Samot J, Badet C. Antibacterial activity of probiotic candidates for oral health. *Anaerobe* 2013; 19(1): 34-38.
- Suárez JE. Microbiota autóctona, probióticos y prebióticos. *Nutr Hosp* 2013; 28 (1): 38-41.
- Martinez RCR, Bedani R, Saad SMI. Scientific evidence for health effects attributed to the consumption of probiotics and prebiotics: an update for current perspectives and future challenges. *Br J Nutr*. 2015; 1-23
- Gruner D, Paris S, Schwendicke F. Probiotics for managing caries and periodontitis: Systematic review and meta-analysis. *J Dent*. 2016; 48: 16-25
- Romani Vestman N, Hasslöf P, Keller MK. *Lactobacillus reuteri* influences regrowth of mutans streptococci after full-mouth disinfection: a double-blind, randomised controlled trial. *Caries Res*. 2013; 47(4): 338-345.
- Taipale T, Pienihäkkinen K, Alanen P, Jokela J, Söderling E. Administration of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 in early childhood: a post-trial effect on caries occurrence at four years of age. *Caries Res*. 2013; 47(5): 364-372
- Burton JP, Drummond BK, Chilcott CN, et al. Influence of the probiotic *Streptococcus salivarius* strain M18 on indices of dental health in children: a randomized double-blind, placebo-controlled trial. *J Med Microbiol*. 2013; 62(6): 875-884.
- Hasslöf P, West CE, Videhult FK, Brandelius C, Stecksén-Blicks C. Early intervention with probiotic *Lactobacillus paracasei* F19 has no long-term effect on caries experience. *Caries Res*. 2013; 47(6): 559-565.
- Yadav M, Poornima P, Roshan NM, Prachi N, Veena M, Neena IE. Evaluation of probiotic milk on salivary mutans streptococci count: an in vivo microbiological study. *J Clin Pediatr Dent*. 2014; 39(1): 23-26.
- Teanpaisan R, Piwat S. *Lactobacillus para-*

- casei SD1, a novel probiotic, reduces mutans streptococci in human volunteers: a randomized placebo-controlled trial. *Clin Oral Investig.* 2014; 18(3): 857-862.
28. Nishihara T, Suzuki N, Yoneda M, Hiro-fuji T. Effects of *Lactobacillus salivarius*-containing tablets on caries risk factors: a randomized open-label clinical trial. *BMC Oral Health.* 2014; 14: 110.
 29. Pinto GS, Cenci MS, Azevedo MS, Epifanio M, Jones MH. Effect of yogurt containing *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* DN-173010 probiotic on dental plaque and saliva in orthodontic patients. *Caries Res.* 2014; 48(1): 63-68.
 30. Keller MK, Nøhr Larsen I, Karlsson I, Twetman S. Effect of tablets containing probiotic bacteria (*Lactobacillus reuteri*) on early caries lesions in adolescents: a pilot study. *Benef Microbes.* 2014; 5(4): 403-407.
 31. Rodríguez G, Ruiz B, Faleiros S. Probiotic Compared with Standard Milk for High-caries Children: A Cluster Randomized Trial. *J Dent Res.* 2016; 95(4): 402-407
 32. Suzuki N, Yoneda M, Tanabe K. *Lactobacillus salivarius* WB21--containing tablets for the treatment of oral malodor: a double-blind, randomized, placebo-controlled crossover trial. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 2014; 117(4): 462-470.
 33. Marchetti E, Tecco S, Santonico M. Multi-Sensor Approach for the Monitoring of Halitosis Treatment via *Lactobacillus brevis* (CD2)-Containing Lozenges-A Randomized, Double-Blind Placebo-Controlled Clinical Trial. *Sensors (Basel).* 2015; 15(8): 19583-19596
 34. HajiFattahi F, Hesari M, Zojaji H, Sarlati F. Relationship of Halitosis with Gastric *Helicobacter Pylori* Infection. *J Dent (Tehran).* 2015; 12(3):200-205.
 35. Adler I, Muiño A, Aguas S, et al. *Helicobacter pylori* and oral pathology: Relationship with the gastric infection. *World J Gastroenterol.* 2014; 20(29): 9922-9935.
 36. Stensson M, Koch G, Coric S. Oral administration of *Lactobacillus reuteri* during the first year of life reduces caries prevalence in the primary dentition at 9 years of age. *Caries Res.* 2014; 48(2): 111-117.
 37. Cortés-Dorantes N, Ruiz-Rodríguez MS, Karakowsky-Kleiman L, Garrocho-Rangel JA, Sánchez-Vargas LO, Pozos-Guillén AJ. Probiotics and their effect on oral bacteria count in children: a pilot study. *Eur J Paediatr Dent.* 2015; 16(1): 56-60.