

Wędrowska Ewelina, Simińska Edyta, Wandtke Tomasz, Wędrowski Mateusz, Piskorska Elżbieta. Potencjał diagnostyczny śliny w screeningu chorób wirusowych = Diagnostic potential of saliva in the screening of viral diseases. *Journal of Education, Health and Sport*. 2016;6(1):147-156. eISSN 2391-8306. DOI <http://dx.doi.org/10.5281/zenodo.45142>  
<http://ojs.ukw.edu.pl/index.php/johs/article/view/45142>  
<https://pbn.nauka.gov.pl/works/704038>

The journal has had 7 points in Ministry of Science and Higher Education parametric evaluation. Part B item 755 (23.12.2015).  
755 Journal of Education, Health and Sport eISSN 2391-8306 7

© The Author (s) 2016;

This article is published with open access at Licensee Open Journal Systems of Kazimierz Wielki University in Bydgoszcz, Poland

Open Access. This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Noncommercial License which permits any noncommercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author(s) and source are credited. This is an open access article licensed under the terms of the Creative Commons Attribution Non Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) which permits unrestricted, non commercial use, distribution and reproduction in any medium, provided the work is properly cited.

This is an open access article licensed under the terms of the Creative Commons Attribution Non Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) which permits unrestricted, non commercial use, distribution and reproduction in any medium, provided the work is properly cited.

The authors declare that there is no conflict of interests regarding the publication of this paper.

Received: 15.12.2015. Revised 12.01.2016. Accepted: 20.01.2016.

# Potencjał diagnostyczny śliny w screeningu chorób wirusowych

## Diagnostic potential of saliva in the screening of viral diseases

Ewelina Wędrowska<sup>1</sup>, Edyta Simińska<sup>2</sup>, Tomasz Wandtke<sup>1</sup>, Mateusz Wędrowski<sup>3</sup>,  
Elżbieta Piskorska<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Zakład Genoterapii, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, Collegium Medicum im. L. Rydygiera w Bydgoszczy

<sup>2</sup>Katedra i Zakład Toksykologii, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, Collegium Medicum im. L. Rydygiera w Bydgoszczy

<sup>3</sup>Zakład Pozytonowej Tomografii Emisyjnej i Diagnostyki Molekularnej, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, Collegium Medicum im. L. Rydygiera w Bydgoszczy

<sup>4</sup>Katedra Patobiochemii i Chemii Klinicznej, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, Collegium Medicum im. L. Rydygiera w Bydgoszczy

<sup>1</sup>Department of Gene Therapy, Faculty of Medicine, Nicolaus Copernicus University Collegium Medicum, Bydgoszcz, Poland

<sup>2</sup>Department of Toxicology, Nicolaus Copernicus University Collegium Medicum, Bydgoszcz, Poland

<sup>3</sup>Department of Positron Emission Tomography and Molecular Diagnostics, Nicolaus Copernicus University Collegium Medicum, Bydgoszcz, Poland

<sup>4</sup>Department of Pathobiochemistry and Clinical Chemistry, Nicolaus Copernicus University Collegium Medicum, Bydgoszcz, Poland

### Streszczenie

Wprowadzenie:

W ostatnich latach potwierdzono, że większość substancji znajdujących się w surowicy krwi, obecnych jest również w ślinie. Wykazano także korelację pomiędzy poziomem substancji występujących w ślinie, ze zmianami zachodzącymi w surowicy krwi. Coraz bardziej podkreśla się liczne zalety śliny jako materiału do badań diagnostycznych, w porównaniu z innymi płynami ustrojowymi. W ostatnich dekadach wskaźniki zachorowalności i umieralności z powodu chorób wirusowych uległy znaczącej poprawie. Jednakże zbyt późna wykrywalność zakażeń wirusowych jest nadal poważnym problemem.

Cel pracy:

Celem pracy jest przedstawienie możliwości wykorzystania śliny w screeningowych badaniach chorób wirusowych.

Skrócony opis stanu wiedzy:

W pracy przytoczono rezultaty badań, do których włączono pacjentów z wirusem RSV, HIV, HAV, HBV, HCV. Potwierdzają one obecność markerów diagnostycznych poszczególnych

zakażeń w ślinie, wskazując tym samym na możliwość wykorzystania śliny w diagnostyce chorób wirusowych.

Podsumowanie:

Wysoka czułość, dokładność, silna korelacja ze stopniem zaawansowania choroby, to bez wątpienia cechy, jakie wykazują badania wykonywane w surowicy krwi. Wymagają one jednak zaawansowanej aparatury, są kosztowne, dość inwazyjne, trudne w przechowywaniu. Ważne jest zatem, aby poszukiwać nowych metod, możliwych do wykorzystania w badaniach screeningowych. Badania takie powinny łączyć technologie szybkiego wykrywania z zastosowaniem łatwego do pobrania materiału. Coraz częściej podkreśla się potencjał śliny, jako materiału diagnostycznego do tego rodzaju badań.

**Słowa kluczowe:** ślina, wirusy, diagnostyka, infekcje.

## Summary

Introduction:

Results in recent years have confirmed that most of substances contained in the blood serum also exist in the saliva. Significant correlations were found between salivary and serum levels. Saliva as a diagnostic test material in compare to other body fluids has many advantages and its importance is growing. During the last decades viral diseases morbidity and mortality rates improved. However late detection of viral infections is still the most

Aim of the study:

The aim of the study is to present the possibilities of using saliva in the screening of viral diseases.

Short description of state of knowledge:

The study presents results of studies which included patients with RSV, HIV, HAV, HBV, HCV. These confirms the presence of the diagnostic markers in saliva, indicating the possibility of using saliva in the diagnosis of viral diseases.

Summation:

Analysis made in the blood serum display characteristics such as high sensitivity, precision and a strong correlation with stadium of disease. However, they require the advanced apparatus, are expensive, very invasive, difficult to store. It is important to looking for a new methods that can be used in screening test which should connect rapid detection technology with using easy-to-sample collection. Increasingly, emphasizes potential of saliva as a diagnostic material for this kind of research.

**Key words:** saliva, viruses, diagnostics, infection.

## **Wprowadzenie**

Niski koszt, trwałość materiału, nieinwazyjne, bezbolesne, a także bezproblemowe pobranie, od dzieci, osób starszych oraz niepełnosprawnych to niewątpliwe zalety wykorzystania śliny, jako materiału diagnostycznego. Wymienione zalety stanowią główną determinantę decydującą o wzrastającym zainteresowaniu diagnostów medycznych i lekarzy wykorzystaniem śliny w badaniach nad licznymi jednostkami chorobowymi i opracowywaniem nowych metod ich diagnozy oraz monitorowania terapii. Objętość wydzielanej śliny, a także jej skład wykazują zmiany ze względu na wiek, płeć, stan zdrowia czy rodzaj czynnika pobudzającego [1,2]. Ślina pełni wiele funkcji, które wynikają z jej cech i składu. Spośród najistotniejszych wymienić należy wstępne trawienie węglowodanów, ochrona jamy ustnej, działanie przeciwbakteryjne i przeciwwirusowe, ułatwienie przeżuwania i połykania, czy tworzenie płytki nazębnej. Poza licznymi funkcjami niezbędnymi dla utrzymania homeostazy organizmu, ślina może również pełnić rolę materiału diagnostycznego [3,4,5].

Głównym składnikiem śliny jest woda. Wśród składników części stałej wymienić należy substancje białkowe (m.in. enzymy, mucyny), elektrolity, substancje antybakteryjne, hormony, cytokiny, witaminy, ale także immunoglobuliny [6]. Ich obecność w ślinie daje możliwość wykorzystywania tego materiału w diagnostyce m.in. chorób wirusowych. Element stały śliny, stanowiący w warunkach podstawowych do 6%, jest częścią która zmienia się pod wpływem licznych czynników. W ostatnich latach prowadzi się badania nad coraz szerszą gamą jednostek chorobowych w kontekście wykorzystania białek zawartych w tym materiale w diagnostyce lub prognozowaniu stanu pacjentów. Jednym z najważniejszych kryteriów podziału użyteczności diagnostycznej związków zawartych w ślinie jest lokalizacja ich wytwarzania. Związki produkowane w gruczołach ślinowych (wewnątrzgruczołowo) uważa się za posiadające mniejszy potencjał diagnostyczny (wyjątkiem jest sekrecyjna immunoglobulina A). Pozostałe syntetyzowane są zewnątrzgruczołowo, a następnie wewnątrz- lub zewnątrzkomórkowo transportowane z osocza do śliny. Uważa się, że substancje drugiej grupy wykazują większy potencjał diagnostyczny, ponieważ odzwierciedlają stan fizjologiczny organizmu [2].

Rutynowo stosowane testy diagnostyczne opierają się najczęściej o analizę składników krwi lub moczu. Wraz z postępowaniem nauki, poszerza się krąg możliwych do wykorzystania materiałów biologicznych o nowe, przede wszystkim łatwiejsze w pozyskiwaniu, trwalsze, tańsze w oznaczaniu oraz dające możliwość wielokrotnego pobierania w krótkim odstępie czasu. Dopiero określenie zakresu wartości referencyjnych dla

substancji występujących w ślinie dało możliwość, aby w tych kategoriach rozpatrywać także ten płyn biologiczny [7]. Badania z zastosowaniem śliny wykonywano już wiele lat temu. Jednak dopiero niedawno, gdy wykazano, że zmiany poziomu wielu substancji obecnych w ślinie korelują ze zmianami w surowicy krwi, a także wyróżniono jej zalety w porównaniu do surowicy, ponownie i na większą skalę zainteresowano się śliną, jako potencjalnym materiałem diagnostycznym [6,7].

## **Cel pracy**

Niniejsza praca ma na celu zaprezentować możliwości wykorzystania śliny w badaniach screeningowych chorób wirusowych.

## **Skrócony opis stanu wiedzy**

### **1. Możliwości wykorzystania śliny w diagnostyce chorób wirusowych**

Istotnym założeniem większości badań nad potencjalnym zastosowaniem śliny, jako materiału diagnostycznego jest fakt, że większość związków obecnych we krwi obecnych jest również w ślinie [3]. Wykryto w niej szereg markerów stanu zapalnego, jak interleukina-1 $\beta$ , -6, -8 (IL-1 $\beta$ , -6, -8), czy czynnik martwicy nowotworu  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), obecnych w schorzeniach jamy ustnej, jak i w chorobach ogólnoustrojowych [4,8,9,10,11]. W początkowej fazie badań nad potencjałem diagnostycznym śliny sądzono, że choć zawiera ona liczne substancje, oznaczane dotychczas w surowicy, to ich występowanie w niskim stężeniu, w porównaniu do poziomów obserwowanych we krwi, uniemożliwia jej kliniczne zastosowanie. Wraz z rozwojem nowych, bardzo czułych metod, udowodniono, że niskie stężenie analitów w ślinie nie jest ograniczeniem [8]. Aktualnie podkreśla się użyteczność śliny w diagnozowaniu chorób infekcyjnych, nowotworów, chorób endokrynologicznych, kardiologicznych oraz z autoagresji. Ślina pozwala również na analizę poziomu leków oraz obecności narkotyków w organizmie [12].

Analiza śliny w diagnostyce chorób wirusowych opiera się głównie na wykrywaniu obecności immunoglobulin klasy IgA, IgM i IgG. W diagnozowaniu niektórych chorób wirusowych, ślina wykorzystywana jest od dawna i istnieją gotowe testy do wykonywania takich oznaczeń (na przykład Saliva Diagnostics System, Vancouver, Wash). Przykładowo, już wiele lat temu wykazano, że specyficzna odpowiedź humoralna występująca u noworodków zakażonych okołoporodowo rotawirusami utrzymuje się w ślinie nie krócej niż 3 miesiące [11,13]. Ze względu na wspomniane już liczne zalety omawianego materiału biologicznego, zainteresowanie tym płynem ponownie wzrasta i przeprowadzane są liczne

badania nad jego potencjałem diagnostycznym w różnych jednostkach chorobowych, także w tych o etiologii wirusowej. Wśród najczęściej wykrywanych w ślinie przeciwciał wskazuje się przeciwciała przeciwko HAV, HBV, wirusowi świnki, odry, różyczki, EBV, HPV. Tego typu badania mogą więc odgrywać istotną rolę w monitorowaniu i kontroli chorób zakaźnych, być podstawą testów przesiewowych, służyć potwierdzeniu skuteczności szczepionek, czy wskazywać na konieczność podawania dawek przypominających [12,14].

Okiro i wsp. przeprowadzili badania weryfikujące możliwość wykorzystania śliny w diagnostyce zakażenia wirusem RSV wśród dzieci. Badano poziom przeciwciał z klasy IgG i IgA. Autorzy zauważyli istotny statystycznie wzrost poziomu przeciwciał IgG u dzieci zainfekowanych wirusem RSV w porównaniu z grupą kontrolną, a także wykazali korelację pomiędzy stężeniem przeciwciał w ślinie i surowicy krwi. Badacze wskazali tym samym na potencjalną użyteczność materiału w diagnostyce tego wirusa [15,16].

Amado i wsp. wykazali możliwość rutynowego wykrywania obecności antygenów i/lub przeciwciał stanowiących następstwo infekcji wirusem wywołującym zapalenie wątroby typu A, B i C w ślinie osób zakażonych [17]. Podobnie, Sosa-Jurado i wsp. przeprowadzili badanie, do którego włączono 45 pacjentów z czynnym zapaleniem wątroby typu C. Przedmiotem badań była weryfikacja metodą real-time PCR, obecności HCV RNA w ślinie osób, u których potwierdzono w surowicy krwi nieprawidłowy poziom aminotransferazy alaninowej (ALT), pozytywny wynik testu na obecność przeciwciał anti-HCV oraz HCV RNA. U 64,4% przebadanych wykryto obecność HCV RNA w ślinie. Badania te miały na celu ocenę możliwości wykorzystania śliny w diagnostyce WZW typu C, a także wyjaśnienie kontrowersyjnej kwestii, jaką jest możliwość zakażenia wirusem przez ślinę. Badacze odnotowali, że obecność HCV RNA w ślinie jest skorelowana ze stopniem wirēmii HCV w surowicy. Podobne rezultaty opublikowali także w odrębnych badaniach Suzuki i wsp. oraz Wang i wsp. [18,19,20]. Badania wykonane przez Santos i wsp., również obejmujące pacjentów z WZW typu C dotyczyły już nie tylko samego potwierdzenia obecności HCV RNA w ślinie, ale także oznaczania w niej miana wirēmii. W tym celu zbadano 70 pacjentów z przewlekłą infekcją WZW typu C. Obecność HCV RNA potwierdzono w ślinie 56 z 70 przebadanych (80%), natomiast w surowicy u 65 (92,85%). Wykazano średnio wyższą wirēmię w surowicy krwi ( $4.879 \log_{10}$ ) w porównaniu ze śliną ( $3.32 \log_{10}$ ). U części przebadanych wykazano wyższą wirēmię w ślinie niż w surowicy krwi [21]. Powstaje coraz więcej badań wskazujących na istnienie istotnych zależności pomiędzy poziomem wirēmii we krwi oraz ślinie osób zainfekowanych oraz możliwości detekcji materiału genetycznego wirusa HBV i HCV w tym materiale [22,23,24].

Shirke oraz Umarji przeprowadzili badanie, w którym oceniono skuteczność zestawu do szybkiego wykrywania infekcji wirusem HIV w ślinie. Do analizy włączono 206 osób (131 seropozytywnych i 75 seronegatywnych). W tak niebezpiecznych zakażeniach, jak to powodowane wirusem HIV, szczególnie istotne jest, aby minimalizować liczbę osób mających kontakt z krwią osoby zakażonej. Wykonywanie badań za pomocą szybkich testów z użyciem śliny całkowicie redukuje ryzyko zawodowe personelu medycznego związane z zakłuciem igłą podczas pobierania materiału. Prawdopodobieństwo zakażenia wirusem HIV przez ślinę jest pomijalne [25]. Spośród 131 seropozytywnych pacjentów włączonych do badania, szybki test prawidłowo zidentyfikował przeciwciała anti-HIV w materiale pochodzącym od 125 z nich (6 wyników uznano jako „nierozstrzygające”). Test wskazał także wynik ujemny u 68 spośród 75 seronegatywnych pacjentów (6 wyników uznano jako „nierozstrzygające”). Połączenie technologii szybkiego wykrywania z zastosowaniem łatwego do pobrania i dostępnego materiału zapewnia, jak potwierdzono, skuteczną i dość dokładną alternatywę dla tradycyjnych metod diagnostycznych [26]. W ostatnich latach Federalna Komisja Leków i Żywności (FDA) w USA uznała test wykrywający przeciwciała HIV1/2 (OraQuick ADVANCER), jako metodę przesiewową do wykonywania w warunkach domowych. W rekomendacji określono warunek, iż wynik dodatni musi zostać potwierdzony specjalistycznym badaniem laboratoryjnym [27]. Pojawiają się już także na rynku komercyjne testy służące wykrywaniu materiału genetycznego wirusa HPV, czy przeciwciał anti-HCV w ślinie. Nie zostały one jednak zatwierdzone przez FDA [27].

Pewne znaczenie w badaniach nad chorobami wirusowymi może mieć także możliwość oznaczania w ślinie  $\beta$ 2-mikroglobuliny oraz rozpuszczalnego receptora czynnika martwicy nowotworu  $\alpha$  w celu pomiaru aktywności procesu zapalnego [2,28].

W ostatnich latach możliwości diagnozowania z wykorzystaniem śliny są przedmiotem badań w szczególności w przypadkach patogenów wysoce zakaźnych, również tych występujących głównie na obszarach endemicznych. Wirus Denga, Ebola, opryszczki (HSV), Epsteina-Barra (EBV), czy wirus cytomegalii (CMV), to tylko niektóre z bardzo licznej grupy wirusów stanowiących obecnie przedmiot szczególnych zainteresowań badaczy [27,29,30].

## 2. Możliwości zastosowania śliny w screeningu chorób wirusowych.

Sytuacja epidemiologiczna w zakresie chorób wirusowych powszechnie uważana jest za jeden z największych sukcesów współczesnej medycyny. Szczepienia, zaawansowana diagnostyka, wzrost higieny i wiele innych aspektów przyczyniło się do znacznej poprawy wskaźników zachorowalności i śmiertelności z powodu chorób wirusowych. Jednak Późna

wykrywalność, wiążąca się w sposób oczywisty z trudniejszą terapią i ograniczoną jej skutecznością, to nadal jeden z głównych problemów związanych z zakażeniami wirusowymi. Przykładowo, obecnie około 25% wszystkich zakażonych wirusem HIV nie wie o zakażeniu. Niezwykle istotnym jest zatem, aby wdrażyć metody screeningowe, umożliwiające wcześniejsze wykrywanie zakażeń wirusowych oraz zwiększających szanse na skuteczność terapii i na całkowite wyleczenie. Metody takie, aby spełniały swoją funkcję, powinny być przede wszystkim łatwo dostępne, nie wymagać zaawansowanej infrastruktury i skomplikowanej aparatury medycznej, dawać szybki wynik oraz być jak najmniej inwazyjne i bolesne, co z całą pewnością zwiększa odsetek osób, które decydują się na wykonanie badania. Koszt badania niewątpliwie oddziałuje na ogólnodostępność badań screeningowych, które, aby spełniały swoją rolę, powinny być powszechne i wykonywane na dużą skalę. Wszystkie wymienione cechy spełniają badania łączące technologie szybkiego wykrywania z zastosowaniem łatwego do pobrania i przechowywania materiału, jakim bez wątpienia jest ślina. Istotny jest również fakt uzyskania odpowiedniej jakości próbki, co jest znacznie trudniejsze w przypadku krwi (zrosty żył, wielokrotne pobieranie, brak odpowiednich systemów do pobierania i przechowywania próbek).

## **Podsumowanie**

W większości zakażeń badania wykonywane w surowicy krwi są bardziej czułe i silniej korelują z poziomem zaawansowania choroby. Niestety, urządzenia do wykonywania tych oznaczeń nie są ogólnodostępne, a badania są w pewnym zakresie inwazyjne i zazwyczaj kosztowne [27,28,31]. Istnieje zatem pilna potrzeba tworzenia metod, które pozwolą poprawić wskaźniki wczesnej wykrywalności, dotrzeć do jak największej liczby osób zakażonych i kierować je na bardziej specjalistyczne badania mogące potwierdzić diagnozę i ocenić stan zaawansowania choroby. Opracowanie testów szybkiego wykrywania z zastosowaniem śliny, dla najczęściej występujących chorób wirusowych, wydaje się być najlepszym krokiem do poprawy sytuacji epidemiologicznej w zakresie chorób wirusowych.

## **References**

1. Devic I, Shi M, Schubert MM et al. Proteomic Analysis of Saliva from Patients with Oral Chronic Graft-Versus-Host Disease, *Biol Blood Marrow Transplant*. 2014; 20: 1048-1055.

2. Szydłarska D, Grzesiuk W, Kupstas A, Bar-Andziak E. Ślina jako materiał diagnostyczny, *Via Medica*. 2008; 2(6): 454-464.
3. Spielmann N, Wong DT. Saliva: diagnostics and therapeutic perspectives, *Oral Diseases*. 2011; 17: 345–354.
4. Rathnayake N, Akerman S, Klinge B et al. Salivary Biomarkers for Detection of Systemic Diseases. *PLOS ONE*. 2013; 8(4).
5. Lee YH, Wong DT. Saliva: an emerging biofluid for early detection of diseases. *Am J Dent*. 2009; 22: 241-248.
6. Slavkin HC. Toward molecularly based diagnostics for the oral cavity, *J Am Dent Assoc*. 1998; 129: 1138-1143.
7. Klichowska Palonka M, Bachanek T. Możliwości wykorzystania śliny w diagnostyce i leczeniu wybranych stanów patologicznych - przegląd piśmiennictwa. *Przegląd lekarski*. 2011; 68(2): 114-117.
8. Lee Y-H, Wong DT. Saliva: An emerging biofluid for early detection of diseases. *Am J Dent*. 2009; 22(4): 241-248.
9. Seymour G.J., Gemmell E., Cytokines in periodontal disease: where to from here?, *Acta Odontol Scand* , (2001), 59: 167–173.
10. Kaufman E, Lamster IB. The diagnostic applications of saliva-a review. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2002; 13: 197-212.
11. Miller CS, King CP, Langub MC et al. Salivary biomarkers of existing periodontal disease: a cross-sectional study. *J Am Dent Assoc*. 2006; 137: 322-329.
12. Kowalczyk P, Manda A, Kościelniak B i wsp. Nietypowe materiały biologiczne pobierane w sposób nieinwazyjny w diagnostyce laboratoryjnej. *J Diagn Lab*. 2014; 50(3): 255-262.
13. Jayashree S, Bhan MK, Kumar R et al. Serum and salivary antibodies as indicators of rotavirus infection in neonates. *J. Infect. Dis*. 1988; 158: 1117.
14. Madar R, Straka S, Baska T. Detection of antibodies in saliva--an effective auxiliary method in surveillance of infectious diseases. *Bratisl Lek Listy*. 2002; 103: 38-41.
15. Okiro EA, Sande C, Mutunga M. et al. Identifying infections with respiratory syncytial virus by using specific immunoglobulin G (IgG) and IgA enzymelinked immunosorbent assays with oral-fluid samples. *J. Clin. Microbiol*. 2008; 46: 1659-1662.
16. Jaguś P, Chorostowska-Wynimko J, Roży A. Diagnostics of selected respiratory virus infections. *Pneumonol. Alergol. Pol*. 2010; 78(1): 47-53.



17. Amado LA, Villar LM, de Paula VS et al. Detection of hepatitis A, B, and C virus-specific antibodies using oral fluid for epidemiological studies. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 2006; 101: 149-155.
18. Sosa-Jurado F, Hernández-Galindo VL, Meléndez-Mena D et al. Detection of hepatitis C virus RNA in saliva of patients with active infection not associated with periodontal or liver disease severity. *BMC Infect Dis.* 2014; 14: 72.
19. Suzuki T, Omata K, Satoh T et al. Quantitative detection of hepatitis C virus (HCV) RNA in saliva and gingival crevicular fluid of HCV-infected patients. *J Clin Microbiol.* 2005; 43(9): 4413-4417.
20. Wang CC, Morishima C, Chung M et al. High serum hepatitis C virus (HCV) RNA load predicts the presence of HCV RNA in saliva from individuals with chronic and acute HCV infection. *J Infect Dis.* 2006; 193(5): 672-676.
21. Xavier Santos RL, de Deus DM, de Almeida Lopes EP et al. Evaluation of viral load in saliva from patients with chronic hepatitis C infection. *J Infect Public Health.* 2015; 8(5): 474-480.
22. Chen L, Liu F, Fan X et al. Detection of hepatitis B surface antigen, hepatitis B core antigen, and hepatitis B virus DNA in parotid tissues. *Int. J. Infect. Dis.* 2009; 13: 20-23.
23. Goncalves PL, Cunha CB, Busek SCU et al. Detection of hepatitis C virus RNA in saliva samples from patients with seric anti-HCV antibodies. *Braz. J. Infect. Dis.* 2005; 9: 28-34.
24. Gonzalez V, Martro E, Folch C et al. Detection of hepatitis C virus antibodies in oral fluid specimens for prevalence studiem. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2008; 27:121-126.
25. Shugars DC, Sweet SP, Malamud D et al. Saliva and inhibition of HIV-1 infection: molecular mechanisms. *Oral Dis.* 2002; 8: 169-175.
26. Shirke PD, Umarji HR. Evaluation of a rapid testing kit utilising saliva to detect HIV infection: An Indian perspective. *HIV & AIDS Review* 14 2015; 14(4): 109-113.
27. Corstjens PL, Abrams WR, Malamud D. Detecting viruses by using salivary diagnostics. *J Am Dent Assoc.* 2012; 143: 12S-8S.
28. Yoshizawa JM, Schafer ChA, Schafer JJ et al. Salivary Biomarkers: Toward Future Clinical and Diagnostic Utilities. *Clin Microbiol.* 2013; 26(4): 781-791.
29. Estevez P, Satoguina J, Nwakanma D et al. Human saliva as a source of anti-malarial antibodies to examine population exposure to *Plasmodium falciparum*. *Malar. J.* 2011; 10: 104.

30. Campsmith ML, Rhodes PH, Hall HI, Green TA. Undiagnosed HIV prevalence among adults and adolescents in the United States at the end of 2006. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 2010; 53: 619-624.
31. Castagnola M, Picciotti PM, Messina I et al. Potential applications of human saliva as diagnostic fluid. *Acta Otorhinolaryngol Ital.* 2011; 31: 347-357.