

# Slina kao ogledalo sistemnog zdravlja

## ULOGA SLINE U DIJAGNOSTICI SISTEMNIH BOLESTI

Matej Par<sup>1</sup>

doc.dr.sc. Vanja Vučićević-Boras<sup>2</sup>

[1] Student 5. godine

[2] Zavod za oralnu medicinu, Stomatološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu

Slina je tjelesna tekućina složenog sastava koja obavlja raznolike funkcije. Razlikujemo slinu iz slinovnica i ukupnu slinu.

Slina iz slinovnica je lučevina velikih i malih žlijezda slinovnica čijim lučenjem upravlja autonomni živčani sustav. Proizvodnja počinje u acinusima, gdje se izlučuju anorganski (elektroliti) i organski (glikoproteini – mucini, proteini) sastojci. U acinusima joj je elektrolitski sastav identičan onom u krvnoj plazmi, a protjecanjem kroz izvodne kanaliće se mijenja:  $\text{Na}^+$  i  $\text{Cl}^-$  se reapsorbiraju pa se njihova koncentracija smanjuje, a  $\text{K}^+$  i  $\text{HCO}_3^-$  se aktivno secerniraju (ili antiport sustavom zamjenjuju za  $\text{Na}^+$  i  $\text{Cl}^-$ ), pa se njihova koncentracija povećava. Udio mucina razlikuje se između pojedinih žlijezda – naj-

veći je u slini malih žlijezda, manji je kod sublingvalnih i submandibularnih, a u slini iz parotide ga gotovo ni nema. Sekrecija sline iz slinovnica mijenja se tijekom dana, a razlikuje se bazalna i stimulirana sekrecija. Bazalna prije svega ovisi o stanju hidratacije organizma, a stimulirana o različitim mirisnim, okusnim, mehaničkim i psihološkim podražajima (1).

Ukupna slina nastaje miješanjem sline iz slinovnica s ostalim tekućinama i materijalima koji dospiju u usnu šupljinu, a to su (2):

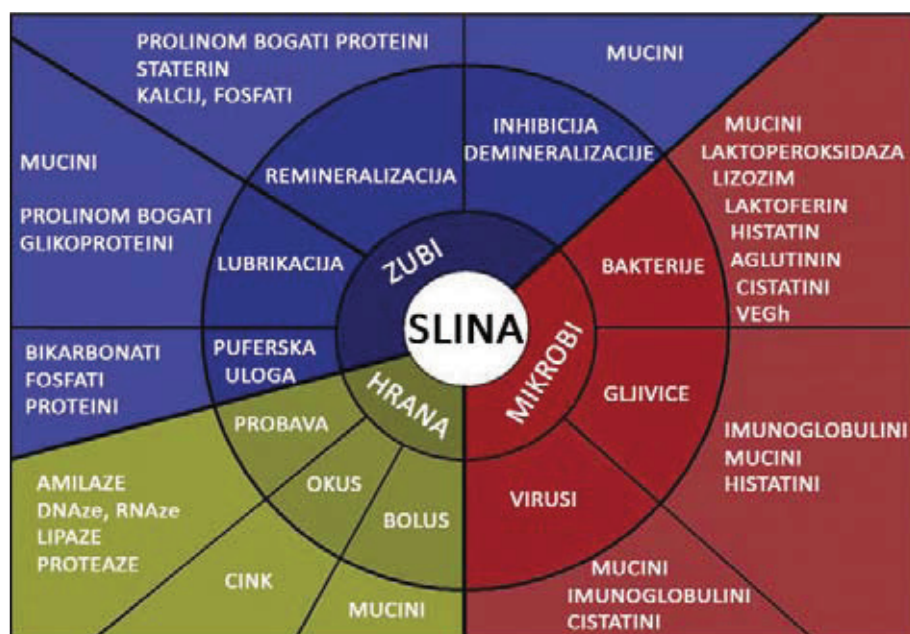
- sulkusna tekućina
- sekreti iz dišnih putova koji cilijarnim transportom ili iskašljavanjem stižu u usta
- bakterije i njihovi metaboliti, virusi, gljivice

- odljuštene epitelne stanice
- sastojci krvi koji u usnu šupljinu ulaze kroz ozljede sluznice
- ostaci hrane

Ukupna slina složena je tekućina sastavljena od mnoštva organskih i anorganskih sastojaka. Funkcija sastojaka ukupne sline pregledno je prikazana na slici 1, a udjeli pojedinih sastojaka ukupne sline na slici 2. Vidljivo je da slina iz slinovnica zajedno sa sulkusnom tekućinom čini 98% ukupno izlučene ukupne sline.

Slina iz slinovnica je proizvod specijaliziranih sekretornih stanica i u svom sastavu pretežno sadrži vodu, elektrolite, enzime i glikoproteine. Uz to može sadržavati i različite druge tvari prisutne u plazmi, koje mogu biti endogenog (npr. hormoni) ili egzogenog porijekla (npr. lijekovi). Nasuprot slini iz slinovnica, koju proizvode specijalizirane stanice i koja uz to prolazi dodatnu obradu u izvodnim kanalićima, sulkusna tekućina je svojim sastavom puno sličnija krvnoj plazmi. Ona je transudat koji nastaje ultrafiltracijom iz kapilarnog pleksusa u području sulkusa, ili eksudat – u slučaju jače upale i posljedične povećane permeabilnosti kapilara. Zbog stalno prisutne mikrobiološke flore u području sulkusa, uvijek postoji određeni stupanj „fiziološke“ upale, tako da je propusnost kapilara trajno povećana. Ovisno o intenzitetu upalne reakcije, sulkusna tekućina će sadržavati više ili manje proteina krvne plazme (3). Pritom treba napomenuti da intenzitet upalne reakcije puno više ovisi o individualnim svojstvima organizma domaćina nego o kvaliteti i kvantiteti mikrobiološke flore (4).

Dakle, slina iz slinovnica, kao i sulkusna tekućina su derivati krvne plazme. Zbog



Slika 1. Funkcije sline. Učinci pojedinih sastojaka na zube, mikrobe i hranu. (preuzeto i prilagođeno iz 33)

svojem porijekla, obje tekućine u većoj ili manjoj mjeri sadržavaju komponente krvne plazme – elektrolite, hormone, proteine plazme, imunoglobuline, citokine te različite ksenobiotike – lijekove i droge. Najveći dio komponenata plazme u slinu dospjeje putem sulkusne tekućine, jer su kapilare u sulkusu za njih puno propusnije nego stanice acinusa. Međutim, neki sastojci plazme se mogu lučiti i putem slinovnica. Mogući mehanizmi kojima sastojci plazme ulaze kroz stanice acinusa u slinu prikazani su na slici 3.

### Dijagnostika

Zbog svog sastava, ukupna slina je pogodna tekućina za cijeli niz dijagnostičkih postupaka. Činjenica da se u slini nalaze komponente plazme omogućuje njihovu detekciju i kvantifikaciju iz uzoraka sline. Istovremeno, na izluštenim stanicama sluznice usta i dišnog sustava moguće je uočiti eventualne promjene, npr. displaziju ili malignu alteraciju.

Nadalje, uzorci sline se mogu prilično jednostavno i atraumatski prikupiti, prikupljanje je jeftinije od uzimanja uzorka krvi te nije potrebno posebno educirano osoblje i oprema. Zato je u posljednjih dvadesetak godina izuzetno poraslo zanimanje za uporabu sline kao dijagnostičke tekućine. Nove spoznaje i metode s podržaja molekularne biologije omogućile su primjenu sline u dijagnostičke svrhe. Neke od njih se već koriste, zasebno ili kao nadopuna krvnim pretragama, a velik broj je u fazi istraživanja koja bi trebala procijeniti njihovu kliničku vrijednost i upotrebljivost u praktičnom radu. U ovom tekstu će ukratko biti prikazane široke mogućnosti primjene sline u dijagnostici različitih bolesti i stanja. Za identifikaciju i detekciju markera pojedinih bolesti koriste se različite metode molekularne biologije i imunologije. Budući da njihovi detalji nadilaze opseg ovog sažetog pregleda, one ovdje neće biti posebno opisane, a eventualno nadobudnog čitatelja se upućuje u prikladnu literaturu (5).

### Maligne bolesti

Detekcija tumorskih markera u slini može doprinijeti ranoj dijagnostici različitih zloćudnih tumora. Primjerice, p53 je važan tumor-supresorski gen, čiji pro-



Slika 2. Sastav ukupne sline

tein funkcionira kao negativni regulator („kočnica“) staničnog ciklusa i tako onemogućava dijeljenje stanice s nestabilnim genomom. Mutacije p53 pronađene su u mnogim zloćudnim tumorima. Kao produkt mutiranog gena p53 nastaje defektni protein koji ne može obavljati svoju funkciju, a budući da se on ponaša kao „strani“ protein, protiv njega se usmjerava imunska reakcija i proizvode anti-p53 antitijela (6). Ta antitijela je moguće detektirati u serumu i slini, što ih čini pogodnim markerom za različite maligne bolesti. Anti-p53 antitijela nađena su kod pacijenata s različitim karcinomima – pluća, gušterače, mokraćnog mjehura, dojke, štitnjače i prostate (7). Testovi koji dokazuju anti-p53 imaju prilično skromnu osjetljivost (u najboljem slučaju 25%), a i ne omogućuju razlikovanje pojedinih tumora.

U slini je moguće detektirati i mutirani p53 – u jednoj studiji (8) pronađena je mutacija p53 u 71% pacijenata oboljelih od planocelularnog karcinoma (PCC) u usnoj šupljini. Mutacija je tumor-specifična i može poslužiti kao marker za PCC usne šupljine i vrata.

Onkogen erb je pozitivni regulator staničnog ciklusa i njegova prekomjerna aktivacija uzrokuje nekontroliranu proliferaciju stanica. Njegov proteinski produkt pronađen je u povišenoj koncentraciji u slini bolesnika s karcinomom dojke (9). Također je zabilježena povišena razina CA15-3 (koji je membranski receptor za EGF). Stoga bi ova dva proteina mogla poslužiti kao markeri za karcinom dojke,

posebice za postoperativno praćenje pacijentica i ocjenu uspješnosti operacije.

EGF (Epidermal Growth Factor) je povišen kod primarnog karcinoma dojke, kao i kod rekurentnih oblika koji se javljaju nakon operacije. Najviše razine se prisutne upravo kod ponovne pojave karcinoma, pa bi EGF mogao biti koristan marker za postoperativno praćenje (10).

CA 125 je marker za karcinom jajnika koji se koristi za ranu dijagnostiku i uobičajeno se dokazuje u serumu. Može ga se dokazati i u uzorku sline, pri čemu je osjetljivost testa manja nego pri dokazivanju iz seruma (81% u slini, 94% u serumu), ali je zato specifičnost veća (88% u slini, 60% u serumu) (11).

Defenzini su mali peptidi koje proizvode neutrofilni i epitelne stanice, a djeluju antimikrobno i citotoksično. U slini imaju ulogu u nespecifičnoj imunosti, a razina im je povišena kod bolesnika s oralnim PCC (12), pa bi mogli služiti kao marker za taj karcinom.

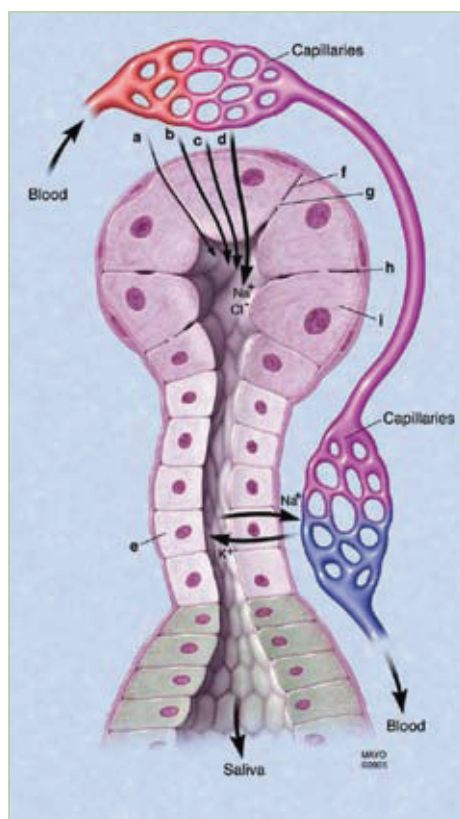
### Bakterijske infekcije

Infekcija s *Helicobacter pylori* povezuje se s povećanim rizikom za kronični gastritis, peptički ulkus i adenokarcinom želuca, iako njegova uloga u patogenezi nije posve razjašnjena. Pomoću PCR-a je moguće u slini detektirati DNA *H. pylori* i tako dokazati njegovu prisutnost u probavnom sustavu (13). Druga, novija metoda detektira IgG antitijela na *H. pylori* i pokazuje visoku osjetljivost (97%) i specifičnost (94%).

Kod šigeloze su u slini povišena antitijela protiv Shiga toksina i endotoksina lipopolisaharida. Postoje salivarni testovi kojima se mjeri titar tih antitijela, ali oni imaju veću važnosti za istraživanje imunosnih mehanizama nego praktičnu primjenu u dijagnostici (14).

Ugrizom krpelja može se prenijeti krpeljni meningoencefalitis i lajmska borelijoza. Pri ugrizu se razvijaju antitijela protiv određenih antigena krpelja koja se mogu dokazati u slini. Takvi testovi bi mogli biti korisni za skrining populacije u područjima nastanjenim krpeljima koja ima povećani rizik obolijevanja od navedenih bolesti (15).

Kod pneumokokne pneumonije u slini se pojavljuje polisaharid C koji je dio



**Slika 3.** Lučenje sline. Primarna sekrecija zbiva se u acinusima, a aktivni transport iona u izvodnim kanalčićima. Mehanizmi kojima sastojci plazme dospjevaju u slinu:

- a - paracelularno, difuzijom;
  - b - difuzijom kroz staničnu membranu;
  - c - difuzijom kroz proteinske kanalčice;
  - d - aktivnim transportom;
  - e - stanica izvodnog kanalčića;
  - f, h - međustanični prostori;
  - g - tijesni spoj (gap junction);
  - i - stanica acinusa
- (preuzeto i prilagođeno iz 33)

stanične stjenke pneumokoka. Test kojim se on detektira u slini ima relativno slabu osjetljivost (55%), ali prilično veliku specifičnost (97%) (16).

Bolest uzgajivača golubova je bolest plućnog intersticija uzrokovana imunom reakcijom na antigene porijeklom od golubova. U slini se pojavljuje IgG protiv tih antigena, što može biti od koristi u dijagnostici ove bolesti (17).

### Virusne infekcije

HIV infekcija se uobičajeno dijagnosticira detekcijom anti-HIV antitijela pomoću dva testa: enzyme-linked immunosor-

bent assay (ELISA) se koristi za skrining, a konačna dijagnoza se postavlja western blotom. Ovi testovi se mogu izvesti na uzorku seruma, sline ili urina (18). Za dijagnostiku se od svih navedenih najboljim pokazao upravo uzorak sline, s osjetljivošću i specifičnošću većom od 95% (19). Stoga će slina u budućnosti vjerojatno u potpunosti zamijeniti upotrebu seruma za dijagnostiku HIV-infekcije. Danas već postoje komercijalno dostupni testovi za kućnu uporabu (npr. Orasure) kojima se sakuplja sulkusna tekućina, a zatim se u njoj se dokazuju anti-HIV IgG antitijela. Imaju veliku dijagnostičku vrijednost, jednostavni su za izvođenje i očitavanje, a rezultate daju već nakon 20-ak minuta.

Iz uzorka sline (kao alternativa serumu) se također može izmjeriti i razina  $\beta$ -2 mikroglobulina i topljivog receptora za TNF- $\alpha$ . Ta dva proteina služe kao markeri aktivacije imunskog sustava, a koriste se u praćenju aktivnosti HIV infekcije i kroničnih upalnih bolesti (20).

Umjesto seruma, slina se može prilično pouzdano koristiti i za dijagnostiku virusnog hepatitisa uzrokovanog virusima HAV, HBV i HCV (21). Testovi za HBV i HCV hepatitis su visoko osjetljivi i specifični, pa su proizvedeni komercijalni brzi testovi za kućnu uporabu, s navodnom osjetljivošću i specifičnošću većom od 99%.

Slina može poslužiti i za kontrolu imunizacije protiv dječjih virusnih bolesti – ospica, zaušnjaka i rubeole. Kod necijepljene djece, isti testovi mogu pomoći u postavljanju dijagnoze (iako najčešće nisu potrebni zbog jasne kliničke slike). Testovima se dokazuje prisutnost antitijela protiv uzročnika ovih bolesti, a specifičnost i osjetljivost im se kreće između 94% i 98% (21).

Limfotropni herpes virusi (Epstein-Barr virus, citomegalovirus, humani herpes virusi 6, 7, 8) se pojavljuju u slini i sekretu nosne sluznice i odavde se njihove DNA mogu dokazati pomoću PCR-a (22). Sličnim testom se može dokazati i prisutnost HSV-1 u slini bolesnika s reaktiviranom infekcijom. U jednoj studiji je taj test korišten za ranu detekciju reaktivacije HSV-1 u pacijenata s Bellovom paralizom (23). Razvijen je i test koji dokazuje antitijela na antigene kapside EBV. Takav test bi mogao biti koristan u epidemiološkim istraživa-

njima infektivne mononukleoze (24).

Dengue je akutna virusna bolest koju prenose komarci, a ograničena je uglavnom na tropsko podneblje. Primarna infekcija se najčešće manifestira kao samoograničavajuća febrilna bolest, dok sekundarna infekcija može imati ozbiljne i smrtonosne komplikacije (hemoragična groznica). Mjerenjem razine IgG i IgM antitijela u slini, moguće je postaviti dijagnozu bolesti, a uz to još i razlikovati primarnu od sekundarne infekcije (25).

### Hormoni

Iz uzorka sline je moguće prilično pouzdano izmjeriti razine nekih hormona. To se posebice odnosi na steroidne hormone koji zbog dobre topljivosti u lipidima lako prolaze kroz staničnu membranu acinarnih stanica. Zato njihove koncentracije u slini vrlo točno odražavaju plazmatsku koncentraciju hormona. Za razliku od serumskih testova kojima se mjeri ukupna koncentracija hormona (vezanog za proteine plazme i nevezanog), salivarni testovi omogućavaju mjerenje samo nevezanog dijela hormona. Budući da je samo nevezani dio hormona funkcionalno aktivan, određivanje razine hormona iz sline nam daje bolji uvid u aktivnost hormona nego kada se za testove koristi serum. Steroidni hormoni čija se razina može precizno odrediti iz uzorka sline su: kortizol, testosteron i njegov prekursor dehidroepiandrosteron, estradiol, estriol i progesteron (26).

U slini se mogu detektirati i peptidni hormoni, ali njihova koncentracija nije pouzdano mjerilo plazmatske koncentracije. Oni u slinu dospjevaju kroz sulkusnu tekućinu ili ozljede oralne sluznice, jer nisu topljivi u lipidima pa ne difundiraju kroz membrane acinarnih stanica. Zato njihova koncentracija u slini više ovisi o protoku i sastavu sulkusne tekućine nego o stvarnoj koncentraciji u plazmi (27).

### Lijekovi

Mnogi lijekovi se pojavljuju u mjerljivim količinama u slini, a da pritom njihova koncentracija odražava koncentraciju lijeka u plazmi. Prisutnost lijeka u slini ovisi o cijelom nizu fizikalno-kemijskih faktora (liposolubilnost, molekularna masa, električni naboj, stupanj vezanja na proteine

plazme, pH sline, biotransformacija), pa molekula lijeka mora zadovoljiti određene uvjete da bi se mogla pojaviti u slini. Male, dobro topljive u lipidima i neionizirane molekule ulaze u slinu jednostavnom difuzijom i njihova koncentracija u slini dobro korelira s koncentracijom u plazmi. Takvim lijekovima se može iz poznate koncentracije u slini odrediti plazmatska koncentracija.

Određivanje koncentracije lijeka iz sline moglo bi naći primjenu u nadzoru suradnje (compliance) psihijatrijskih bolesnika – testovima bi se lako moglo provjeriti uzimaju li pacijenti svoje lijekove. Neki od lijekova pogodnih za ovakva testiranja su: litij, karbamazepin, fenobarbital, fenitoin, metadon, benzodiazepini. Ostali lijekovi kojima se koncentracija može odrediti iz sline su: digoksin, cisplatin, ciklosporin, paracetamol, teofilin, metoprolol, okspre-nolol i drugi (2).

### Zloporaba droga

Uporaba različitih sredstava ovisnosti može se dokazati salivarnim testovima. Kao i kod lijekova, molekula takvog sredstva mora imati određena fizikalno-kemijska svojstva da bi se mogla naći u slini (vidi prije). Međutim, za razliku od lijekova, testovi za droge ne moraju biti kvantitativno precizni – dovoljno je da dokazuju prisutnost ili odsutnost određene supstance. Droge koje mogu biti identificirane u slini, bez potrebe za mjerenjem točne koncentracije su: amfetamini, barbiturati, benzodiazepini, fenciklidin, kokain, opioidi i marihuana (28).

Poseban slučaj predstavlja etilni alkohol. Zbog njegovih svojstava (liposolubilna, neionizirana, nevezana za proteine plazme i ima malu molekularnu masu), etilni alkohol difundira u slinu toliko brzo da mu se koncentracija u plazmi i slini odnose gotovo u omjeru 1:1. Zato bi mjerenje alkohola u slini moglo poslužiti za procjenu koncentracije alkohola u krvi, kao alternativa mjerenju u ekspiriranom zraku (29).

Nadalje, mjerenje kotinina (metabolita nikotina) u slini može poslužiti kao indikator pušenja. Moglo bi se iskoristiti za procjenu rizika od različitih bolesti povezanih s pušenjem kod ljudi koji su aktivni pušači ili su izloženi pasivnom pušenju na radnom mjestu (30).

### Bolesti bubrega

Iako nema puno podataka o potencijalnim salivarnim markerima za pojedine bubrežne bolesti, pokazalo se da bi određivanje kreatinina moglo pomoći u procjeni funkcije bubrega. Kreatinin je metabolit kreatin-fosfata, energijom bogatog spoja iz skeletnih mišića. Izlučuje se glomerularnom filtracijom (zanemarivo malo i tubularnom sekrecijom), ne reapsorbira se u tubulima i služi kao indikator funkcije bubrega. Povišena razina u plazmi (a time i u slini) upućuje na smanjenu funkciju bubrega (31).

### Rizik od karijesa i paradontne bolesti

Razvijeni su testovi kojima se kvalitativno i kvantitativno određuje mikrobiološki sastav plaka. Prije svega su usmjereni na dokazivanje glavnih patogena odgovornih za razvoj karijesa (*S. mutans*, *L. acidophilus*) te paradontne bolesti (*P. gingivalis*), ali i na mnoge druge. Takvi testovi nisu dijagnostički osobito značajni, jer patogenost ovih bolesti ovisi o mnogim drugim faktorima, a učestalost i težina bolesti ne pokazuje jednostavnu korelaciju s brojem i vrstom patogena prisutnih u plaku. Zato oni nisu „pravi“ dijagnostički testovi, već služe samo za procjenu rizika od karijesa i paradontne bolesti (32).

Neka novija istraživanja povezuju rizik od razvoja karijesa s razlikama u sastavu salivarnih oligosaharida koji ulaze u sastav pelikule. Pritom jedna skupina oligosaharida olakšava adheziju i agregaciju bakterija na površinu zuba i povezana je s povećanim rizikom od karijesa, dok ih druga skupina aglutinira i djeluje opsonizacijski te tako smanjuje rizik od karijesa (33).

### Nasljedne bolesti

Cistična fibroza je autosomno-recesivna bolest koju karakterizira poremećeni promet elektrolita u epitelnim stanicama. Klinički se manifestira kao generalizirana egzokrinopatija. Slina pacijenata oboljelih od cistične fibroze pokazuje promijenjen sastav: nalazimo povišene koncentracije natrija, klorida, kalcija, fosfata, uree, lipida i prostaglandina E2 te promijenjen, biološki slabo aktivan epidermalni faktor rasta (EGF) (2). Ovi nalazi su dugo pozna-

ti ali se ne koriste za dijagnostiku cistične fibroze. Ipak, mogli bi biti korisni za identifikaciju asimptomatskih heterozigota. To bi pomoglo u planiranju obitelji – izbjegavanjem brakova između nositelja smanjila bi se incidencija cistične fibroze.

Celijakija (netropska sprue) je nasljedni poremećaj u kojem nastaju antitijela na gliadin (sastojak glutena iz hrane). Ta antitijela zbog križne reaktivnosti oštećuju stjenku tankog crijeva pa nastaje malapsorpcija i proljevi. Anti-glijadinska antitijela mogu se dokazati u slini, što se može iskoristiti za skrining celijakije kao i za kontrolu pridržavanja potrebne dijeta bez glutena.

### Zaključak

Slina je prepoznata kao korisna i potencijalno široko upotrebljiva dijagnostička tekućina. Dostupnost sline, jednostavno i atraumatsko prikupljanje kao i smanjeni rizik od infekcije daju joj prednost pred serumom, a nove metode molekularne biologije omogućile su detekciju različitih sastojaka sline koji su identificirani kao markeri pojedinih bolesti. Raznolikost stanja i bolesti koje se mogu dijagnosticirati testovima iz sline dalo je poticaj razvoju salivarne dijagnostike. Salivarnim se testovima može detektirati mnoštvo markera, kako oralnih tako i sistemskih bolesti. Ti testovi imaju različitu dijagnostičku vrijednost (npr. odnos osjetljivost – specifičnost te pozitivna – negativna prediktivna vrijednost) što im određuje primjenjivost u praksi – neki su prilično pouzdani za postavljanje dijagnoze (npr. HIV-testovi), neki se mogu koristiti u kombinaciji sa serumskim testovima, a neki pak kao jeftina i praktična metoda skrininga.

Većina testova je u eksperimentalnoj fazi i još nisu našli široku primjenu u svakodnevnom radu. Ipak, neki se zbog svojih karakteristika već rutinski koriste, a možda će i u potpunosti zamijeniti serumske testove. Najbolji primjer su HIV-testovi koji su jednako dijagnostički vrijedni kao i serumski testovi, a po nekim istraživanjima čak i vrjedniji. Testovi za steroidne hormone, virusni hepatitis i neke maligne bolesti također su prilično pouzdani, ali još se ne koriste rutinski kao HIV-testovi.

Razvoj salivarne dijagnostike puno obećava i za očekivati je da će u skorijoj bu-

dućnosti biti dostupni jednostavni, jeftini i praktični, a istovremeno dovoljno pouzdani testovi koji će zasigurno naći svoju primjenu u kliničkoj praksi. **S**

## LITERATURA

1. **Guyton AC, Hall JE.** Medicinska fiziologija. 10th ed. Zagreb: Medicinska naklada; 2003.
2. **Kaufman E, Lamster IB.** The diagnostic applications of saliva - a review. *Crit Rev Oral Biol Med* 2002; 13:197-212.
3. **Goodson JM.** Gingival crevice fluid flow. *Periodontol* 2000 2003;31:43D54.
4. **Wolf HF, Rateitschak-Plüss EM, Rateitschak K.** Parodontologija - stomatološki atlas. 1st ed. Zagreb: Naklada slap; 2009.
5. **Meyers RA, editor.** Encyclopedia of Molecular Cell Biology and Molecular Medicine. 2nd ed. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co; 2004.
6. **Bourhis J, et al.** Analysis of p53 serum antibodies in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 1996;88:1228-33.
7. **Lubin R, Schlichtholz B, Teillaud JL, Garay E, Bussel A, Wild CP.** p53 antibodies in patients with various types of cancer: assay, identification, and characterization. *Clin Cancer Res* 1995;1:1463-9.
8. **Boyle JO, Mao L, Brennan JA et al.** Gene mutations in saliva as molecular markers for head and neck squamous cell carcinomas. *Am J Surg* 1994;168:429-32.
9. **Streckfus C, Bigler L, Dellinger T, Pfeifer M, Rose A, Thigpen JT.** CA15-3 and c-erbB-2 presence in the saliva of women. *Clin Oral Invest* 1999;3:138-43.
10. **Navarro MA, Mesia R, Diez-Gibert O, Rueda A, Ojeda B, Alonso MC.** Epidermal growth factor in plasma and saliva of patients with active breast cancer and breast cancer patients in follow-up compared with healthy women. *Breast Cancer Res Treat* 1997;42:83-6.
11. **Chien DX, Schwartz PE.** Saliva and serum CA 125 assays for detecting malignant ovarian tumors. *Obstet Gynecol* 1990;75:701-4.
12. **Mizukawa N, Sugiyama K, Fukunaga J, Ueno T, Mishima K, Takagi S, et al.** Defensin-1, a peptide detected in the saliva of oral squamous cell carcinoma patients. *Anticancer Res* 1998;18:4645-9.
13. **Jiang C, Li C, Ha T et al.** Identification of *H. pylori* in saliva by a nested PCR assay derived from a newly cloned DNA probe. *Dig Dis Sci* 1998;43:1211-8.
14. **Schultsz C, Qadri F, Hossain SA, Ahmed F, Ciznar I.** Shigella-specific IgA in saliva of children with bacillary dysentery. *FEMS Microbiol Immunol* 1992;4:65-72.
15. **Schwartz BS, Ford DP, Childs JE, Rothman N, Thomas RJ.** Anti-tick saliva antibody: a biologic marker of tick exposure that is a risk factor for Lyme disease seropositivity. *Am J Epidemiol* 1991;134:86-95.
16. **Krook A, Fredlund H, Holmberg H.** Diagnosis of pneumococcal pneumonia by detection of antigen in saliva. *Eur J Clin Microbiol* 1986;5:639-42.
17. **McSharry C, MacLeod K, McGregor S, Speekenbrink AB, Sriram S, Boyd F, et al.** Mucosal immunity in extrinsic allergic alveolitis: salivary immunoglobulins and antibody against inhaled avian antigens among pigeon breeders. *Clin Exp Allergy* 1999;29:957-64.
18. **Martinez PM, Torres AR, Ortiz de Lejarazu R, Montoya A, Martin JF, Eiros JM.** Human immunodeficiency virus antibody testing by enzyme-linked fluorescent and western blot assays using serum, gingival-cervicular transudate, and urine samples. *J Clin Microbiol* 1999;37:1100-6.
19. **Malamud D.** Oral diagnostic testing for detecting human immunodeficiency virus-1 antibodies: a technology whose time has come. *Am J Med* 1997;102:9-14.
20. **Nishanian P, Aziz N, Chung J, Detels R, Fahey JL.** Oral fluids as an alternative to serum for measurement of markers of immune activation. *Clin Diagn Laboratory Immunol* 1998;5:507-12.
21. **Thieme T, Yoshihara P, Piacentini S, Beller M.** Clinical evaluation of oral fluid samples for diagnosis of viral hepatitis. *J Clin Microbiol* 1992;30:1076-9.
22. **Blackbourn DJ, Lennette ET, Ambroziak J, Mourich DV, Levy JA.** Human herpesvirus 8 detection in nasal secretions and saliva. *J Infect Dis* 1998;177:213-6.
23. **Furuta Y, Fukuda S, Chida E, Takasu T, Ohtani F, Inuyama Y, et al.** Reactivation of herpes simplex virus type 1 in patients with Bell's palsy. *J Med Virol* 1998;54:162-6.
24. **Crowcroft NS, Vyse A, Brown DW, Strachan DP.** Epidemiology of Epstein-Barr virus infection in preadolescent children: application of a new salivary method in Edinburgh, Scotland. *J Epidemiol Community Health* 1998;52:101-4.
25. **Cuzzubbo AJ, Vaughn DW, Nisalak A, Suntayakorn S, Aaskov J, Devine PL.** Detection of specific antibodies in saliva during dengue infection. *J Clin Microbiol* 1998;36:3737-9.
26. **Streckfus CF, Bigler LR.** Saliva as a diagnostic fluid. *Oral Dis* 2002;8:69-76.
27. **Vining RF, McGinley RA.** Hormones in saliva. *Crit Rev Clin Lab Sci* 1986;23:95-146.
28. **Kidwell DA, Holland JC, Athanasis S.** Testing for drugs of abuse in saliva and sweat. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 1998;713:111-35.
29. **Penttila A, Karhunen PJ, Pikkarainen J.** Alcohol screening with the alcscan test strip in forensic praxis. *Forensic Sci Int* 1990;44:43-8.
30. **Repace JL, Jinot J, Bayard S, Emmons K, Hammond SK.** Air nicotine and saliva cotinine as indicators of workplace passive smoking exposure and risk. *Risk Anal* 1998;18:71-83.
31. **Lloyd JE, Broughton A, Selby C.** Salivary creatinine assays as a potential screen for renal disease. *Ann Clin Biochem* 1996;33:428-31.
32. **Larmas M.** Plaque-mediated disease: basic and clinical studies on the value of salivary monitoring. *Ann NY Acad Sci* 1993;694:252-64.
33. **Wong DT, editor.** Salivary diagnostics. 1st ed. Ames: Wiley-Blackwell; 2008. p156-68.