



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO EN SALIVA.

T E S I N A

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

C I R U J A N A D E N T I S T A

P R E S E N T A:

ESMERALDA OSORIO LUNA

TUTORA: Mtra. ADRIANA PATRICIA RODRÍGUEZ HERNÁNDEZ

ASESORA: Mtra. BEATRIZ CATALINA ALDAPE BARRIOS



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS

A mi familia fuente de satisfacción, orgullo e inagotable cariño. Mis padres Mario Osorio y Carmen Luna cuya paciencia, inmenso amor y cariñoso apoyo han hecho de mí, una gran mujer. Ana y Nehemi, por compartir gustos, pasiones y toda una vida. Alberto por tu gran apoyo durante este tiempo. A Sara por soportar los días interminables que hube que dedicar a este proyecto, y hacer que todo merezca la pena, eres mi principal inspiración.

.... Los amo, gracias porque me han inspirado a lo largo del camino y han hecho de este proyecto una experiencia agradable.

Un agradecimiento especial a mis Maestras:

Dra. Adriana Rodríguez por su invaluable dedicación, paciencia, y la gran atención que puso en mi trabajo, el cual no hubiera terminado sin su ayuda.

Dra. Beatriz Aldape por su magnífica dedicación, por la disposición que tuvo para ayudarme a lo largo de la Licenciatura, me enseñó el verdadero sentido de la carrera, a ser entregada, conocerla es un privilegio. Por el apoyo que me brindó Gracias...

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	5
PROPÓSITO	8
OBJETIVOS	9
OBJETIVO GENERAL.....	9
OBJETIVOS PARTICULARES	9
DESARROLLO	10
Producción y composición salival	10
Generalidades.....	10
Componentes inorgánicos	11
Componentes orgánicos	12
Componentes proteínicos y polipeptídicos	12
Hormonas.....	14
Métodos de identificación microbiológicos.....	16
Identificación fenotípica.....	16
Identificación microscópica	16
Identificación macroscópica	20
Tipificación bioquímica.....	22
Cuentas de microorganismos	22
Detección de Streptococcus en saliva por identificación fenotípica.	23
Identificación genética.....	25
Porcentaje de C+G	26
PCR.....	26
Secuenciación de ácidos nucleicos	27
Hibridaciones de DNA	29
Identificación inmunológica	30
Inmunoglobulinas salivales como bioindicadores para el seguimiento de las infecciones virales.....	30
Inmunofluorescencia	31
ELISA.....	31
OraQuick ADVANCER.....	32
Toma, procesamiento y almacenamiento de muestras en saliva.....	33
Recolección total de saliva	34

Drenando	34
Escupiendo.....	34
Succión.....	35
Absorción.....	35
Salivete (Sarsted, Newton, NC)	35
Recolección de saliva de la glándula parótida.	35
Canulación.....	35
Lashley cup/Carlson- Crittenden cup.....	36
Recolección de la saliva de glándulas submandibulares y sublinguales	36
Canulación.....	36
Segregador	36
Succión.....	37
Aparato de Wolf	37
Saliva de glándulas menores	37
Fluido crevicular	38
Estimulación	38
Fiabilidad.....	39
Procesamiento y almacenamiento	39
Saliva como una herramienta de diagnóstico microbiológico	42
Infecciones detectables en saliva.....	43
Infecciones bacterianas.....	43
Infecciones virales	44
Infecciones fúngicas.	45
COLCLUSIONES	47
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	49
TABLAS.....	54
FIGURAS.....	59

INTRODUCCIÓN

La saliva juega un papel importante en la protección de la cavidad bucal. Es esencial para la digestión, masticación, gusto, habla, deglución, así como, preservación y protección de tejidos mineralizados y mucosa de la cavidad bucal (**Fox 1985**). La disminución en el flujo de la misma (xerostomía) provoca alteraciones dramáticas de salud como por ejemplo la recurrencia de infecciones por microorganismos oportunistas (**Dawes 1996**).

Dentro de sus características, es una secreción mixta de las glándulas salivales mayores y menores, que contiene células descamadas epiteliales, es incolora, presenta un pH entre 6 y 7, y contiene un número de constituyentes orgánicos e inorgánicos importantes para la salud bucal. Esta constituida en un 99% por agua, es isotónica en células acinares, e hipotónica cuando pasa a través del sistema ductal, debido a que el Na^+ y Cl^- que contiene son reabsorbidos. Gracias a sus constituyentes, cuenta con función digestiva, acción amortiguadora, poder remineralizante en órganos dentales, efecto coagulante, acción mecánica, química e inmunitaria. Los principales componentes de la saliva son producidos por las glándulas salivales, por lo tanto, cualquier marcador molecular deriva de estas glándulas a través de su secreción, o por difusión pasiva de los tejidos en contacto directo con la cavidad bucal. En la **Tabla 1** se enlistan diferentes marcadores encontrados en saliva con sus posibles usos, muchos de los cuales se están estudiando actualmente para el desarrollo de una prueba efectiva de diagnóstico en enfermedades tanto de carácter infeccioso como no infeccioso (**Wong 2008**).

La posibilidad de identificación y medición de biomarcadores en saliva, abre puertas para el diagnóstico, la detección temprana, el seguimiento y la progresión de enfermedades, así como el cumplimiento de las distintas modalidades de tratamiento para las mismas **(Wong 2008)**.

Hay estudios en los que se utiliza la saliva para fines de diagnóstico clínicos microbiológicos. Por ejemplo, estudios de carácter bacteriano como: evaluación de niveles elevados de *Streptococcus mutans* y *Lactobacillus* sp., que se relacionan con actividad cariogénica; el incremento de especies como *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* y *Treponema denticola*, se encuentra estrechamente relacionados con diferentes tipos de periodontitis; ensayos inmunológico para *Helicobacter pylori* en saliva, han sido desarrollados para vigilar a pacientes que padecen ulcera gástrica; los marcadores salivales para infecciones virales han sido bien identificados, por mencionar algunos: Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH), Virus de la hepatitis B y C (VHB y VHC), Virus de Epstein Bar (VEB), y algunos Citomegalovirus (CMV); para cáncer bucal, especialmente carcinoma de células escamosas, se han obtenido resultados prometedores a través de análisis salival; con las concentraciones de esteroides, cortisol, estradiol, y progesterona en saliva, se monitorea la función ovárica, los niveles de estrés y la progresión del Síndrome de Cushing. La relación entre enfermedad periodontal y riesgos de enfermedades cardiovasculares, muestran correlación con los niveles de proteína C reactiva en saliva; la creatinina salival, entre otras proteínas salivales, han sido

usadas para fines de diagnóstico de enfermedades renales y eficacia de diálisis **(Wong 2008)**.

Las muestras de saliva son seguras, rápidas y de bajo costo, además de ser procesadas con relativa facilidad, no es un método invasivo, y la tasa de flujo salival y composición iónica son fáciles de medir por métodos sencillos. En la actualidad, se cuenta con la comercialización de varios productos para la recolección adecuada de saliva **(Wong 2008)**, y algunos han obtenido la aprobación de la FDA (administración de medicamentos y alimentos) como pruebas de diagnóstico **(Wong 2008)**.

PROPÓSITO

Describir las propiedades de la saliva, con el fin de explicar el porqué es uno de los métodos de diagnóstico microbiológicos más efectivos en la actualidad, para el diagnóstico de enfermedades infecciosas de tipo bacteriano, viral y fúngico.

De igual manera, el presente trabajo se enfocará a describir las características de cada tipo de identificación microbiológica, lo cual incluye métodos fenotípicos y genéticos para el diagnóstico de enfermedades de tipo infeccioso por medio de muestras salivales, con el fin de enfatizar la importancia de cada una de las metodologías y las situaciones ideales para que sean utilizadas.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Describir los métodos diagnósticos microbiológicos de carácter bacteriano, viral y fúngico, aplicables a muestras de saliva.

OBJETIVOS PARTICULARES

A partir de muestras de saliva:

- Obtener un diagnóstico microbiológico específico de una especie bacteriana desconocida.
- Obtener un diagnóstico microbiológico específico de una especie bacteriana conocida.
- Describir la metodología para el obtener diagnósticos microbiológicos fúngicos.
- Describir la metodología para el obtener diagnósticos microbiológicos virales.

DESARROLLO

PRODUCCIÓN Y COMPOSICIÓN SALIVAL

Generalidades

En condiciones de salud, un adulto produce entre 500 y 1500ml de saliva por día, a un ritmo aproximado de 0.5ml/min (**Chicharro 1998**). Sin embargo, dependiendo de varias condiciones fisiológicas y patológicas, se puede modificar la cantidad y calidad de producción de la misma. Algunos ejemplos de esto incluyen: la estimulación gustativa y olfatoria, la masticación, el estado fisiológico y hormonal, consumo de drogas, la edad, las influencias hereditarias, la higiene oral, y el ejercicio físico entre otros (**Figura 1**)(**Chicharro 1998, Walsh 2004**).

Cada tipo de glándula salival secreta exudado con características distintas. Se pueden observar diferencias en la concentración de iones y proteínas, así como la producción de proteínas salivales por diferentes glándulas; por ejemplo la Cistatina C, es secretada por la glándula submandibular y la Mucina (MUC5B) y Calgranulina, son secretadas por la glándula sublingual (**Hu 2004**). Por otro lado, la composición de la saliva depende de si la secreción salival es o no estimulada (**Kalk 2002**).

La salida de la saliva y su composición dependen de la actividad del sistema nervioso autónomo, dónde la parte serosa de las glándulas, es controlada por el sistema simpático, y la parte mucosa por sistemas parasimpático y simpático. Las estimulaciones adrenérgicas (α y β) y colinérgicas (neurales o farmacológicas) pueden modificar la

cantidad y viscosidad salival, los iones y las proteínas. La estimulación parasimpática a su vez, puede producir alto fluido de saliva que contiene bajos niveles de componentes orgánicos e inorgánicos. La estimulación simpática produce un bajo volumen de proteínas y potasio **(Figura 1) (Aps 2005)**.

La composición de la saliva puede verse alterada por la presencia de alimentos, ya que pueden afectar la estimulación por transmisión selectiva de proteínas. Después de una comida se incrementa el total de proteínas y de α -amilasa salivales **(Messenger 2003)**.

Componentes inorgánicos

La saliva contiene principalmente agua y iones (Na^+ y Cl^- , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Cl^- , HCO_3^- , HPO_4^{2-}) que pueden generar capacidad amortiguadora. La secreción de las glándulas salivales es un ultra-filtrado de plasma (isotónico en comparación con el plasma sanguíneo), dependiente de energía en los conductos salivales. Reabsorbe Na^+ y Cl^- , resultando una secreción hipotónica, con una baja concentración de iones comparada con el plasma **(Figura 1) (Booth 2002)**. Por otra parte, la composición de la saliva no estimulada, es diferente de la estimulada (cuando es más similar en composición al plasma). Por ejemplo: el incremento en el fluido salival obtenido por estimulación con comida ácida, incrementa las concentraciones de Na^+ , Cl^- y bicarbonato, disminuyendo la concentración de K^+ y P en comparación con la saliva estimulada **(Jensdottir 2002)**.

Similar a otros fluidos biológicos, la concentración de iones en saliva, es usualmente medida por electrodos selectivos del ión, absorción atómica (o emisión) **(Siqueira 2004)** y el tradicional método de espectrofotometría **(Anderson 2001)**.

Componentes orgánicos

Pequeñas cantidades de compuestos orgánicos no proteínicos pueden ser detectados en la saliva tales como: ácido úrico (antioxidante), bilirrubina, creatinina, glucosa, aminoácidos, lípidos (colesterol y monodiglicéridos de ácidos grasos) (**Marini 2002, Actis 2005, Agha-Hosseini 2006, Coufal 2003**). Las aminas en saliva como putrescina, cadaverina e indol, también son detectables (**Cooke 2003**).

Los ácidos grasos, son medidos en la saliva en particular el ácido α -linoléico y ácido araquidónico: sus concentraciones parecen tener relación con una dieta de ácidos grasos (**Actisn 2005**). En la saliva el lactato es medible y su concentración muestra una alta correlación con la concentración de lactato de sangre capilar (**Chicharro 1998**).

Componentes proteínicos y polipeptídicos

La saliva contiene un largo número de componentes proteínicos, de los cuales la estructura y función pueden ser estudiados con técnicas bioquímicas tradicionales como cromatografía líquida, electroforesis de gel, electroforesis capilar (CE), resonancia magnética, inmunoensayo, así como radioinmunoanálisis (RIA); inmunoensayo radiométrico (IRMA); enzimoimmunoanálisis (EIA); enzimoimmunoanálisis de absorción (ELISA) y análisis de sonda de lectina (**Hu 2005**).

Cerca de 40 proteínas son originalmente identificadas en saliva total, entre otras la amilasa, prolina ricas en proteínas (PRPs), IgA secretora (s-IgA) y anhidrasa carbónica. Otras proteínas pueden ser derivadas de fugas del plasma como IgG y albúmina (**Chiappin 2007**).

Las proteínas de la saliva pueden tener una amplia gama de propiedades funcionales. Estas pueden estar relacionadas con la respuesta inmune y la defensa del hospedero, como es el caso de la lisozima salival, quien rompe los enlaces β 1,4 entre N-acetilglucosamina y N-acetilmurámico de la pared celular bacteriana, por lo tanto actúa principalmente frente a bacterias Gram +. Su eficacia in vivo se encuentra ligada a otros factores como el pH, siendo más activa en situaciones de alcalinidad **(Liébana 2002)**. Otra proteína es la Lactoferrina, quien puede tener un efecto antibacteriano debido a que capta hierro, disminuyendo las concentraciones disponibles para las bacterias, de esta manera disminuye la multiplicación de microorganismos **(Liébana 2002)**. Numerosas bacterias producen peróxido de hidrogeno que además de su acción oxidante frente a otros microorganismos, puede resultar toxico para las células del hospedador. La saliva contiene un sistema antioxidante de H_2O_2 mediante una enzima termolábil, denominada lactoperoxidasa. Actúa junto con el tiocianato salival (SCN), y en presencia de él, origina H_2O e hipotiocianato ($OSCN^-$) que es mucho menos toxico para las células epiteliales; de esta forma se detoxica el ambiente de H_2O_2 . Por otra parte, se ha demostrado que el hipotiocianato inhibe diversas enzimas de la glucolisis bacteriana **(Liébana 2002)**. La mucina (MUC7) tiene acción antibacteriana de amplio espectro, ya que encapsula e inactiva a bacterias y algunos tipos de virus incluyendo VIH **(Wong 2008)**. Histatinas y defensinas, poseen propiedades bactericidas y antifúngicas. Dentro de las inmunoglobulinas, únicamente la s-IgA (producida directamente por los linfocitos B que se encuentran presentes cerca de las glándulas salivales); es secretada en el fluido

intersticial recogido por los acinos y conductos celulares de las glándulas salivales y subsecuentemente secretadas en saliva. Del 5 - 15% de las inmunoglobulinas salivales restantes, se encuentran únicamente IgG e IgM, derivadas del fluido crevicular o de fugas del plasma. Las inmunoglobulinas tienen actividad antimicrobiana de amplio espectro. La IgA, tiene capacidad para unirse con los microorganismos e impedir la fijación de los mismos a las células epiteliales, puede actuar aglutinando o deteniendo la movilidad por interferencia con la acción de los flagelos y por bloquear interacciones entre receptores microbianos y sus ligandos en células epiteliales **(Wong 2008)**.

También están presentes enzimas inhibitorias, hormonas como factores de crecimiento y citocinas como son interleucina-8 **(Tabak 2001, Simpson 2005)**. En la **Figura 2** se puede observar la relación entre las varias funciones de la saliva y sus constituyentes implicados, dónde algunas proteínas participan en más de una función **(Wong 2008)**.

Hormonas

Comúnmente las hormonas cuantificadas en plasma, son detectadas en la saliva. Pueden derivar de la circulación, por difusión pasiva o por transporte activo. Las hormonas en la saliva permiten una definición y conexión con estados fisiológicos y patológicos, son un índice útil de bioactividad sistémica. Las catecolaminas pueden ser reconocidas en saliva en un rango entre 250 y 800 pg/ml **(Marini 2002)**. Parece que se originan por difusión del suero, pero también hay una cantidad de catecolaminas salivales derivadas (por liberación directa) de las terminaciones nerviosas simpáticas. **(Kennedy 2001)**.

La detección de esteroides en saliva es quizá la aplicación más utilizada en estudios hormonales. Los biomarcadores más comúnmente analizados en la saliva son: el cortisol, testosterona, dehidroepiandrosterona (DHEA) **(Patel 2004, Lu 1999)**, 17-hidroxiprogesterona, progesterona y aldosterona.

En la saliva también pueden ser detectadas otras proteínas como la prolactina, melatonina **(Tabak 2001, Simpson 2005)**, factores de crecimiento como TGF- β (factor de crecimiento transformador β): su función es la inmunosupresión de linfocitos B y T citotóxicos, NK y macrófagos, así como la promoción en la producción de IgA **(Henson 2008)**. En general las citocinas y quimiocinas son elementos de la respuesta protectora del organismo, sobre todo activando a las células de defensa como macrófagos y linfocitos **(Murray 2007)**.

MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN MICROBIOLÓGICOS

Identificación fenotípica

El fenotipo se refiere a la expresión externa del material genético de un organismo. Las técnicas de identificación fenotípicas microbiológicas, se basan en la observación de la apariencia microscópica y macroscópica de los microorganismos. Son técnicas clásicas de identificación, por separado cada una de ellas no ofrecen un diagnóstico definitivo por eso suele ser necesario combinar todas ellas para llegar a resultados suficientemente precisos. Estos métodos se aplican para la identificación y cuantificación de especies cultivables previamente caracterizadas o de microorganismos predeterminados a partir de muestras clínicas o cultivos puros. En la **Figura 3** se observa la descripción y ordenamiento de la metodología de identificación fenotípica.

Identificación microscópica

Las técnicas microscópicas nos proporcionan una magnificación inicial del microorganismo que queremos identificar, y nos ofrece distintas características, dependiendo de la técnica que utilizemos. En el caso de las bacterias, como paso inicial, es de mucha importancia saber qué tipo de tinción de Gram muestran las células. Lo cual nos da información más detallada en cuanto a estructura de la pared celular de los microorganismos (**Figura 3**).

La microscopía de luz (o campo brillante), se utiliza rutinariamente en los diagnósticos microbiológicos, examinando frotis de lesiones con tinción. Se pueden observar bacterias

fijadas y teñidas, confirmación de su presencia, determinación del Gram y definición de la morfología celular, dónde la resolución máxima es ente 100-200nm.

Por otro lado, si se desea observar motilidad microbiana, las técnicas microscópicas que no requieren de fijación celular pueden detallar este tipo de características fenotípicas. Las bacterias se mueven por medio de flagelos, cuyo número y ubicación varía en las diferentes especies. Se pueden diferenciar motilidad en nado, de deslizamiento, en espasmos y sin motilidad (**Koneman 1999**). En microscopía de campo oscuro por ejemplo, el espécimen es iluminado oblicuamente por un condensador dónde los organismos aparecen brillantes, como los rayos de luz en el blanco, sobre el fondo oscuro. Se puede confirmar la presencia de bacterias vivas y se puede observar la motilidad bacteriana.

En microscopía de contraste de fases en cambio, raramente son empleados en diagnósticos microbiológicos, esta técnica puede ser usada para definir detalladamente la estructura de microbios sin teñir. Se puede confirmar la presencia de bacterias vivas, y se observa la motilidad.

La microscopía confocal, tiene mayor resolución y contraste que la microscopia tradicional, tiene la posibilidad de realizar secciones ópticas, reconstrucciones 3D y 4D y análisis de imágenes. Utiliza fluorocromos y se pueden estudiar biopelículas en diferentes planos focales. Se pueden observar bacterias vivas o fijadas y la definición de la organización e interacción entre células.

Si lo que se desea obtener detalles ultraestructurales útiles para la identificación de virus, bacterias, parásitos y hongos, puede ser usada la microscopía electrónica de transmisión, con una resolución máxima de 1-2 nm. Es muy útil en el diagnóstico de enfermedades de origen microbianas aunque su principal aplicación es en investigación.

Para estudiar componentes superficiales finos entre 1-10 nm de resolución, para observar la organización entre células y la definición precisa de la morfología celular, se utiliza la microscopía Electrónica de Barrido o SEM (por sus siglas en inglés). En esta técnica se observan bacterias fijadas con una cobertura fina que detalla en imágenes 3D.

Una técnica ideal para visualizar especímenes no coloreados y transparentes, que permite obtener información sobre la densidad óptica de la muestra y observar detalles que de ordinario son invisibles, es la técnica de Interferencia Diferencial de Nomarski, dónde se observan bacterias vivas en imágenes aparentemente tridimensionales. La visualización de estructuras internas, se puede observar la motilidad y definición de morfología celular **(Samaranayake 2002)**.

Los microorganismos unicelulares del dominio bacteria, poseen cuatro morfologías celulares predominantes: cocos (esféricos), bacilos (alargados), espirilos (incurvados) y pleomórficos. La división simple de estos organismos produce agrupaciones características en algunos géneros **(Negroni 2009)**. La morfología se puede observar en los distintos tipos de microscopía ya mencionadas. El conocer la morfología celular es el segundo paso en la secuencia de identificación fenotípica **(Figura 3)**.

En el caso de los virus, no se habla de forma sino de simetría. La simetría es la disposición de la nucleocápside en el espacio y de acuerdo con ello se observan distintos tipos: simetría helicoidal, icosaédrica, binaria o compleja. La nucleocápside de simetría helicoidal es cilíndrica, ya sea extendida o enrollada sobre sí misma. Puede ser rígida o flexible. Todos los virus con esta simetría que infectan al hombre son envueltos. Cuando la simetría es icosaédrica, tiene el aspecto de un poliedro (presenta veinte caras triangulares, treinta aristas, doce vértices y tres ejes de simetría). La unidad más pequeña corresponde a un capsómero. Estos virus pueden ser desnudos o envueltos. La simetría binaria se observa cuando en un mismo virus puede presentarse las dos simetrías anteriores. Esto ocurre con ciertos virus que infectan bacterias y que se denominan bacteriófagos. Los virus de simetría compleja son aquellos que por tener una envoltura laxa carecen de una forma muy típica y pueden ser ovoides, esféricos o pleomorfos **(Negroni 2009)**. Los virus se pueden observar por microscopía electrónica de transmisión (SEM) **(Samaranayake 2002)**.

Los hongos por el contrario, son organismos eucariotas unicelulares o pluricelulares que presentan un cuerpo denominado talo que puede ser unicelular (levaduras, pueden dar pseudomicelios) o pluricelular (continuos o tabicados), micelios con ramificaciones "hifas". Su tamaño puede variar entre 2 -6 μ m a 300 μ m. Forman esporas sexuales y asexuales, son aerobios o microaerófilos y mesófilos; heterótrofos **(Negroni 2009)**.

Identificación macroscópica

En el caso de las bacterias, se pueden identificar características macroscópicas importantes como la tolerancia al oxígeno, dependiendo de la tolerancia en un crecimiento *In vitro*. Las bacterias se clasifican en anaerobias estrictas que crecen en ausencia de oxígeno: microaerofílicas son aeróbicas que crecen únicamente en concentraciones reducidas de oxígeno; capnofílicas que son microaerofílicas que crecen en concentraciones elevadas de CO₂ (5 al 10%); anaerobias facultativas son capaces de crecer bajo en condiciones aeróbicas como anaeróbicas, Aerobios estrictos requieren oxígeno para crecer.

El cultivo de microorganismos *In-vitro*, se lleva a cabo utilizando medios usuales a los que se les añade factores de crecimiento requeridos por cada género ya sea bacteriano o fúngico. En el caso de los virus, no es posible realizar un cultivo *In-vitro*, sin embargo el cultivo *In vivo* es una alternativa comúnmente utilizada.

Si se desea partir de un crecimiento bacteriano donde se desconoce a la especie a identificar, lo más adecuado es realizar un cultivo en medio enriquecido, el cual va a contar con nutrimentos necesarios para que se dé su crecimiento, tales como: suero, sangre o factores específicos, como vitamina K o cofactores que no sintetizan algún tipo de especies bacterianas. En los medios con sangre por ejemplo, se pueden observar tipos de hemólisis, lo cual puede ser indicador específico de alguna especie como es el caso de los *Streptococcus*. Alrededor de la colonia se produce un halo de hemólisis por acción de las hemolisinas liberadas por las bacterias. Las colonias pueden producir una hemólisis

total o β hemólisis, de modo que el agar se vuelve transparente alrededor de la colonia, una o hemólisis parcial o α hemólisis, formándose un halo verdoso alrededor de la colonia, o no presentar hemólisis conocida como γ hemólisis. Todas estas características (tamaño, forma, hemólisis), permiten detectar la presencia de diversos tipos de colonias y orientar sobre el microorganismo que las forma. Muchas colonias de bacterias anaerobias son características de grupo, género o de especie, como *Actinomyces* sp, *Clostridium* sp, *Propionibacterium* sp, ó *Prevotella* sp y *Porphyromonas* sp, que producen un pigmento melanótico característico (especies de pigmentación negra) **(Figura 4) (Prats 2006)**

Desde el punto de vista de su finalidad, los medios se pueden clasificar en: 1) medios de aislamiento, 2) medios para siembra, 3) medios de identificación, 4) medios para antibiograma y 5) medios de conservación **(Prats 2006)**.

Por ejemplo, cuando se interesa aislar específicamente un solo tipo de especie bacteriana de un cultivo mixto,, se utiliza un medio selectivo con escasa cantidad de nutrientes. Dichos medios permiten el crecimiento del género y especies deseadas, inhibiendo el resto de las bacterias existentes en la muestra. Diversas sustancias añadidas a un medio de cultivo pueden cumplir esta función, entre otras el cloruro sódico, el cristal violeta, las sales biliares, así como diversos antibióticos y antisépticos. Cada producto inhibe a un grupo de bacterias sin afectar a otras. En cambio, un medio diferencial, permiten distinguir entre dos o, más bacterias por características coloniales, dependiendo de alguna actividad metabólica ó enzimática determinada **(Prats 2006; Koneman 1999)**.

Algunos microbiólogos utilizan una lupa o un estereomicroscopio para ayudarse en la detección de colonias minúsculas o inmaduras y observar mejor sus características. Las características de las colonias usadas en la identificación de la bacteria son: tamaño (diámetro en mm); forma (puntiforme, circular, filamentosa, irregular, rizoide, fusiforme); elevación (plana, elevada, convexa, monticular, umbeliforme umblicada); margen (borde de la colonia: entero, ondulado, lobulosos, aserrado, filamentoso, rizado); color (blanco, amarillo, negro, ante, naranja, etc.); superficie (brillante, mate); densidad (opaca, translúcida, transparente, etc.); consistencia (buritosa, viscosa, membranosa, quebradiza, etc)

Tipificación bioquímica

Existen varios procesos para la identificación bioquímica de las bacterias como fermentación de carbohidratos, análisis de productos terminales, catalasa, oxidasa, coagulasa o reacciones de aglutinación (Koneman 1999). Por ejemplo, si en el momento de la identificación fenotípica se conoce que la morfología bacteriana es de un coco, Gram positivo, que forma racimos en SEM, y además es Catalasa positivo, podemos hacer la identificación definitiva de *Staphylococcus*, ya que no podría ser el género de *Streptococcus* por ser catalasa negativo.

Cuentas de microorganismos

La cuantificación de microorganismos puede realizarse con cuentas de microorganismos viables o no viables, dependiendo de lo que se desee obtener. Por ejemplo para cuentas viables se realiza la enumeración de cuentas a partir de diluciones seriadas en cultivos en

agar. Partiendo de que a partir de una célula bacteriana, se forma una colonia, recibe el nombre la técnica de cuentas viables por Unidades Formadoras de Colonia (UFCs). La cuantificación de bacterias y hongos no viables, se pueden realizar por ejemplo con cuentas Directas, enumerando las bacterias totales en un campo microscópico seleccionado al azar. Las cuentas espectrofotométricas, se realizan con las concentraciones de células por unidad de volumen.

Detección de Streptococcus en saliva por identificación fenotípica.

Los *Streptococcus* son bacterias de forma esférica (cocos) y están agrupados en cadenas de longitud variable, son Gram positivos, no esporulados, carecen de flagelos de modo que son inmóviles, presentan prolongaciones extracelulares del tipo de las fimbrias y pueden tener cápsula. Son catalasa negativos (**Figura 4**), se comportan como anaerobios facultativos o estrictos; pero según los productos de las reacciones de oxidación-reducción se comprueba que son fermentadores. Producen ácido láctico (**Negróni 2009**).

Para su identificación primero se recolecta la saliva no estimulada, escupiendo directamente en tubos de plástico estériles. Después de 3 horas las muestras de saliva se diluyen por 10 veces (10^{-3} – 10^{-8}) deben ser preparadas en medios de transporte reducidos. Una cantidad de 100µl de cada dilución se vierte en agar sangre para el total de UFC. El medio Agar tripticase con extracto de levaduras y cisteína TYC (medio selectivo para *Streptococcus* sp) (**Schaeken 1986**), es usado para el aislamiento de *Streptococcus mitis*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus vestibularis*, *Streptococcus anginosus* y *Streptococcus gordinii*. Todas son especies que colonizan

normalmente la placa dentobacteriana, entre otras superficies de la cavidad oral. Y *S. mutans* son aisladas en medio TYC/azúcar bacitracina. Todas las placas son incubadas anaeróbicamente a 37 °C por 4 días.

Para su enumeración bacteriana y aislamiento, cada morfología de colonia se describe contada en ambas placas de medios (selectivos y no selectivos) de la dilución que tuvo menos de 300 colonias. Se presenta el mínimo nivel de detección de UFC. Los resultados se expresan como: UFC/ml de saliva, como un porcentaje de la cuenta total con agar sangre para esa placa particular, y como un porcentaje de la cuenta en agar sangre individual (**Tappuni 1993**).

Las colonias de *Streptococcus* sp., son pequeñas, elevadas, de color blanco a gris, opacas duras y secas con un halo claro bien definido de hemólisis completa (hemólisis β) como de 2mm de diámetro (**UNAM 2009**).

La identificación de especies de *Streptococcus* se realiza como una colonia representativa de todas las distinguibles morfologías de colonias son aisladas y caracterizadas: en promedio, una placa de muestra de saliva en TYC presentan distintas morfologías de colonias. Se realizan cultivos puros de los cocos Gram positivos aislados de las placas de TYC. La especie cultivada en el medio TYC/azúcar y bacitracina es crecidas por la noche en 10ml de caldo preesterilizado Todd-Hewitt a 37 °C.

Las pruebas de azúcar y enzimas, usadas para la identificación de cocos Gram positivos y *Streptococcus* sp. Se pueden observar en la **tabla 2**. Basados en la escala de Kilian para la

identificación de *S. viridans*. Una cantidad de 50 µl del caldo de cultivo es revestida en agar sangre e incubado anaeróticamente por 24 horas. Una suspensión de menos de 4×10^9 células/ml es preparado para el crecimiento puro en las placas de agar en 3 ml de salina. 0.5 µl de alícuota de esta suspensión es incubada a 37 °C con cada solución de prueba en un tubo esterilizado. Los resultados de estas pruebas deben ser tomadas después de 4 horas de incubación.

Las pruebas con resultados claros se incuban hasta 24h. Con cepas representativas de todos los biotipos aislados se confirma su identificación incluyendo IgA proteasa activa **(Tappuni 1993)**.

De esta se forma se obtiene el diagnostico de una especie bacteriana no conocida por métodos de diagnostico fenotípicos.

Identificación genética

El DNA presente en la saliva, puede provenir de células epiteliales, o células bacterianas. La saliva es una abundante fuente de extracción de DNA genómico, que proporciona una fuente útil para la identificación de biomarcadores para la detección de infecciones **(Wong 2008)**.

Existen varios procesos por los cuales se pueden identificar genéticamente los microorganismos. Entre las ventajas principales de los métodos de identificación genéticos, encontramos que llevan poco tiempo de elaboración, son de bajo costo, se

tiene un manejo sencillo de las muestras, no es limitado a especies cultivables y en algunas de ellas es posible analizar un alto número de muestras.

Porcentaje de C+G

Es el método genético más antiguo, en el que se cuentan los pares de citosina y guanina que se encuentran en el DNA o RNA. Se hace un recuento de los enlaces de hidrogeno de la bacteria y así es posible clasificarla dependiendo de su porcentaje, como bacterias con G y C alto o bajo. El valor es constante para cada microorganismo, las bacterias relacionadas tiene porcentajes similares, pero porcentajes similares no necesariamente indican que las especies están relacionadas, porque la técnica no detecta la acomodación lineal de nucleótidos. Actualmente se utiliza como método descriptivo y no como herramienta para la clasificación o identificación de especies. Por ejemplo uno de los temas centrales de la genómica evolutiva es averiguar las estrategias de adaptación de los microorganismos para estabilizar las moléculas de ácido nucléico a altas temperatura en la familia de *Bacillacea se ha* demostrado que un nivel mayor de G+C genómico no tienen ningún papel en la estabilización de la estructura secundaria de ARN mensajero a altas temperaturas (**Basak 2010**).

PCR

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se invento en 1980, es una técnica sencilla en la que una región corta de una molécula de DNA se copia repetidamente por la enzima DNA polimerasa; es utilizada para identificar microorganismos específicos. Se utiliza en los procedimientos de diagnósticos rápidos. La sensibilidad del PCR ha dado lugar a su uso

en el diagnóstico rápido de las enfermedades virales, bacterianas, por hongos y otros **(Samaranayake 2002)**.

El PCR se utiliza para amplificar cantidades extremadamente pequeñas de DNA específico presente en una muestra clínica, haciendo posible su detección. Emplea una DNA polimerasa termoestable, para producir una amplificación doble del DNA blanco en cada ciclo de temperatura. El DNA extraído de la muestra clínica, junto con los oligonucleótidos específicos de secuencia, los nucleótidos, la DNA polimerasa termoestable y el amortiguador, se calientan a 90-95°C para desnaturalizar (separar) las dos cadenas del DNA blanco (para lo cual es importante saber el porcentaje de G y C del DNA de nuestra muestra. La temperatura de la reacción se disminuye entre 45-60°C dependiendo de los iniciadores, para permitir el templete cocido de los iniciadores, e integrarlos al DNA blanco, cada iniciador es extendido por medio de la DNA polimerasa termoestable mediante la adición de nucleótidos complementarios del DNA blanco generándose finalmente la amplificación doble. Después se repite el ciclo de 30 a 40 veces hasta lograr una amplificación del segmento del DNA blanco de 10^5 a 10^6 veces. El segmento amplificado a menudo puede observarse en un campo de gel electroforético o se puede detectar mediante el análisis "Southern blot" utilizando sondas de DNA marcadas específicas para ese segmento **(Negroni 2009)**.

Secuenciación de ácidos nucleicos

La estructura de un DNA determinado, está definida por la ordenación o "secuencia" de las bases nitrogenadas en la cadena de polinucleótidos, residiendo precisamente en esta

secuencia de bases la información genética del DNA. La estructura en doble hélice del DNA, con el apareamiento de bases limitado (A-T; G-C), implica que el orden o secuencia de bases de una de las cadenas determina automáticamente el orden de la otra, por ello se dice que las cadenas son complementarias. En este método se utiliza fluorescencia, y lo habitual es realizar cuatro mezclas de reacción, cada una con nucleótido trifosfato (dTTP) marcado con un fluorocromo distinto. Este sistema permite automatizar el proceso de manera que es posible leer al mismo tiempo los DNAs de nueva síntesis producto de las cuatro mezclas de reacción.

Para la identificación y clasificación de microorganismos lo más común es la secuenciación de la porción 16S rRNA.

La porción 16S rRNA tiene porciones estables (conservadas) en su secuencia. Cada microorganismo posee muchas copias. Se puede evaluar e identificar utilizando sondas que permiten detectar el doble híbrido; estas técnicas son utilizadas ampliamente para la identificación de muchos microorganismos.

Con la ayuda de indicadores específicos de experimentos conservados se pueden amplificar y secuenciar regiones variables del rRNA 16S. Estas secuencias variables son los marcadores específicos de especie que permiten la identificación de los microorganismos; patógenos cuyo cultivo es difícil e imposible en el laboratorio se han identificado por esta técnica **(Negroni 2009)**.

Hibridaciones de DNA

Principio subyacente en el diagnóstico molecular es la hibridación de una sonda de ácidos nucleicos. Es aplicable para la identificación y cuantificación de microorganismos específicos. Se hace uso de fragmentos de DNA con algún tipo de marcaje (radiactivo o quimioluminiscentes) conocidos como sondas de DNA, los cuales se pondrán en hibridación con una muestra template.

Por ejemplo, la sonda de RNA o de DNA de una cadena se emplea para detectar RNA complementario o RNA desnaturalizado en un espécimen. Por lo general, la sonda de ácido nucleico está marcada con enzimas, sustratos antigénicos, moléculas quimioluminiscentes o radioisótopos para facilitar la detección del producto de la hibridación. La detección del ácido nucleico en la muestra se puede hacer sumamente específica mediante una cuidadosa selección de la muestra o la elaboración de un oligonucleótido específico y al ejecutar la hibridación bajo condiciones muy estrictas.

La hibridación de ácidos nucleicos para detectar virus es muy sensible y específica. La muestra se coloca sobre una membrana de nitrocelulosa y el ácido nucleico viral presente en la muestra se le une; a continuación se desnaturaliza con álcali in situ, se hibrida con un fragmento de ácidos nucleico viral marcado, y se detectan los productos híbridos. Para los rotavirus que contienen RNA de doble cadena, el método de hibridación en punto es incluso más sensible que el EIA. Se puede evaluar e identificar también la fracción 16S rRNA, utilizando sondas que permiten detectar el doble híbrido; estas técnicas son

utilizadas ampliamente para la identificación de muchos microorganismos **(Negroni 2009)**.

Identificación inmunológica

Inmunoglobulinas salivales como bioindicadores para el seguimiento de las infecciones virales

La respuesta de anticuerpos a la infección es la base para muchas pruebas de diagnóstico en virología. Las inmunoglobulinas salivales (s-IgA e IgG) son útiles en la proyección de infecciones virales y la inmunización. Se ha reportado relación entre los anticuerpos y la saliva de los virus de VIH, VHA y C, VEB, CMV y *Rubivirus* sp. También se han encontrado anticuerpos en saliva después de la vacunación contra el virus de la poliomielitis, rotavirus, y VHA. Por esta razón, las pruebas de anticuerpos específicos salivales pueden ser un medio importante para evaluar la inmunidad sistémica en enfermedades o para evaluar la inmunidad en respuesta a la vacunación **(Chiappin 2007)**.

El análisis de anticuerpos en la saliva como prueba de diagnóstico para el VIH u otras infecciones, ofrecen varias ventajas en comparación con el suero. La saliva puede recopilarse no invasivamente, y elimina el riesgo de infección para el trabajador de salud que recopila la muestra, ya que la transmisión de VIH a través de la saliva es poco probable, por que las partículas infecciosas del virus son raramente aisladas de la saliva. Las pruebas de diagnóstico para la detección de infecciones virales son esencialmente cualitativas, es decir, debe ser confiable detectar la ausencia o la presencia de anticuerpos específicos. Con el fin de optimizar la sensibilidad, el manejo de muestras de

saliva, debe principalmente ser orientadas a la prevención de desglose de los biomarcadores. Aunque las inmunoglobulinas son intrínsecamente estables, el bajo nivel de IgG requiere que cuando no se puede llevar a cabo el ensayo sobre las muestras de saliva sea óptimamente preparado y estabilizado para prevenir la degradación proteolítica. Para ello, se recomienda almacenar las muestras a -20 C o más bajo. El almacenamiento a temperaturas más altas, dará lugar a la degradación proteolítica y a resultados falsos-negativos **(Wong 2008.)**.

Inmunofluorescencia

Este método emplea el principio de emisión de diferentes longitudes de ondas de luz cuando la luz de una longitud de onda chica con un objeto fluorescente. La luz ultravioleta es normalmente usada y las bacterias o células son marcadas con marcadores fluorescentes como Uramine; por ejemplo para detectar un antígeno de un microorganismo en una muestra, se marca con anticuerpos específicos agregando marcadores fluorescentes. También se puede confirmar la presencia de bacterias vivas, se observa la motilidad y se puede definir la morfología y componentes celulares **(Samarenayeke 2002)**.

ELISA

Los EIA como el ELISA y la prueba de aglutinación, se emplean para detectar antígenos de agentes infecciosos presentes en las muestras clínicas. Otra forma de EIA para detectar anticuerpos es el linmunoblotting (Western blot).

La prueba de ELISA es de detección principal utilizada para el diagnóstico de infecciones por VIH-1. Generalmente los antígenos de VIH-1 se inmovilizan en una superficie sólida que suele ser una moldura convexa o caja de plástico, a la cual se adiciona el suero del paciente y los reactivos apropiados. Los anticuerpos contra VIH-1 adheridos a los antígenos inmovilizados de VIH-1 si detectan con una IgG anti humana marcada con enzima y una reacción colorimétrica. La cantidad de color resulta proporcionalmente más alta con concentraciones más altas de anticuerpos anti VIH-1. El color por encima de un punto de expansión particular se considera una prueba positiva. La prueba de ELISA para detección de VIH-1 resulta 99% sensible y 99% específica (**Negroni 2009**).

OraQuick ADVANCER

Es un inmunoensayo cualitativo de un solo uso, para detectar anticuerpos de VIH tipo 1 y tipo 2 en saliva, sangre y plasma. Es la primera prueba rápida aprobada por la FDA de Estados Unidos, que puede producir resultados en una sola consulta y en menos de media hora, por su sencillez velocidad y probabilidad. En la **figura 5**, se explica la metodología para realizar la prueba. (Orasure Technologies, Inc.)

TOMA, PROCESAMIENTO Y ALMACENAMIENTO DE MUESTRAS EN SALIVA

La medición exacta del flujo salival y la composición son esenciales para muchos protocolos clínicos, experimentales y de diagnóstico. El valor de la recolección de saliva es de uso limitado, sin embargo su valor como una muestra de diagnóstico es cada vez más reconocido. A pesar de sus limitaciones, la recolección de la saliva se convertirá en un procedimiento de diagnóstico cotidianamente común, que requiere la normalización y precisión **(Wong 2008)**.

La saliva puede recolectarse fácilmente de los humanos, el paciente debe recibir información detallada acerca del procedimiento. Es importante darle indicaciones como excluir el cepillado de los dientes antes de la recolección de saliva, también debe evitar la ingesta de alimentos y fluidos (excepto agua) por al menos 30 minutos antes de la recolección. También deben ser informados sobre los procedimientos para el almacenamiento de la muestra **(Chiappin 2007)**.

Si son necesarios, los inhibidores o aditivos específicos deben incluirse en el espécimen antes de que las muestras sean recogidas y analizadas de lo contrario se pueden congelar hasta el análisis de laboratorio **(Chiappin 2007)**.

La recolección de la saliva debe ser con la boca vacía y previamente enjuagada con agua desionizada. El paciente puede estar sentado confortablemente con los ojos abiertos y con la cabeza inclinada ligeramente hacia delante **(Figura 6) (Wong 2008)**.

La estandarización de la colección de saliva tiene una gran importancia en el análisis de la misma, debido a que varios factores pueden afectar el flujo salival. Toda la saliva de los conductos de las glándulas, fluido crevicular y trasudado de las mucosas, son muestras alcanzables y se han diseñado métodos especiales para su recolección. Hoy en día están disponibles varios métodos y dispositivos; la forma más fácil y el método más factible es la recolección de toda la saliva **(Chiappin 2007)**.

Recolección total de saliva

Los métodos y dispositivos comunes para la recolección de toda la saliva incluyen:

Drenando

La saliva se deposita de gota en gota en un tubo graduado y pesado previamente. El tubo debe estar adaptado a un embudo para la recolección de la saliva por goteo. La cantidad de la saliva es determinada por el peso al leer la escala de la graduación del tubo **(Wong 2008)**.

Escupiendo

La saliva debe acumularse sobre el piso de la boca y escupirla dentro del tubo o un contenedor. La cantidad de saliva es determinada por peso o leyendo la graduación del tubo **(Wong 2008)**.

Succión

La saliva es continuamente aspirada del piso de la boca dentro del tubo graduado, la muestra se puede tomar mediante un eyector de saliva, la cantidad de saliva se mide leyendo o pesando el tubo graduado **(Wong 2008)**.

Absorción

La saliva es recolectada (absorbida) con una esponja prepesada, un rollo de algodón, o una gasa directamente en los orificios de los conductos excretores de una glándula mayor y se quita para pesarla hasta el final de la recolección **(Wong 2008)**.

Salivete (Sarsted, Newton, NC)

Con este método, la saliva se recolecta masticando un rollo de algodón suavemente, de 1-2 minutos aproximadamente (puede tener ácido cítrico). Se coloca el algodón en el salivete y se centrifuga; de esta manera el algodón se exprime, obteniéndose así la muestra de saliva, que se utiliza para el análisis **(Figura 6) (Wong 2008)**.

Una muestra más específica se obtiene con procedimientos menos fáciles. Los procedimientos siguientes están disponibles para recoger la saliva específica de una glándula.

Recolección de saliva de la glándula parótida.

Canulación

El orificio del conducto excretor de la glándula parótida se localiza en la mucosa bucal a nivel del segundo molar superior y es muy accesible para la canulación. Se puede utilizar

una sonda lacrimal roma. Después un tubo delgado puede ser insertado en el conducto **(Wong 2008)**.

Lashley cup/Carlson- Crittenden cup

Estas copas son fáciles de utilizar, tienen una cámara interior que está conectada a una perilla de goma, un dispositivo de succión a través de unos tubos de plástico y la copa que se coloca sobre el conducto parotídeo, la saliva recolectada es usualmente sobre estimulación **(Figura 6) (Wong 2008)**.

Recolección de la saliva de glándulas submandibulares y sublinguales

La saliva de estas glándulas contribuye entre el 30 y 60% del volumen total de la saliva estimulada, dependiendo del grado de estimulación. Los métodos para su recolección son relativamente fáciles pero no son universalmente aceptadas **(Wong 2008)**.

Canulación

Para la canulación del conducto Subamandibular se puede utilizar un tubo de polietileno con inclinación (0.5-1.5mm). Se debe tener extrema precaución debido a que la pared del conducto es delgada y puede romperse **(Wong 2008)**.

Segregador

Schneyer, introdujo un método para la recolección por separado de la saliva de la glándula submandibular y la sublingual, por medio de un dispositivo colector que tiene una cámara central para la recolección de la saliva submandibular y dos cámaras laterales para la recolección de la saliva sublingual, el colector es colocado en la mandíbula. Un

tubo de polietileno conecta las cámaras al tubo recolector. Este método no es factible en la práctica general pues el aparato tiene que ser individualmente adaptado **(Wong 2008)**.

Succión

Este es un método simple para la recolección de la saliva mixta (sublingual y submandibular), se bloquea el conducto parotídeo y la saliva que se junta en el piso de la boca puede ser recolectada succionando suavemente con una jeringa, o una micropipeta. **(Figura 6) (Wong 2008)**.

Aparato de Wolf

El sistema recolector de saliva de la glándula submandibular y sublingual desarrollado por Wolf consiste en un tubo recolector, una cámara búfer, un tubo de almacenamiento y un dispositivo de succión.

La principal función de esta cámara búfer es arrastrar la saliva hacia el dispositivo de succión; de esta manera más del 93% de las muestras recogidas se recuperan en el tubo de almacenamiento, cuando la saliva se recoge por medio de succión las burbujas son frecuentes; la cámara búfer ofrece un espacio donde las burbujas se pueden expandir y romper. Finalmente el líquido fluye hacia el tubo de almacenamiento sin fugas en el tubo conectado al dispositivo de succión **(Wong 2008)**.

Saliva de glándulas menores

La saliva de estas glándulas puede ser recolectada con una pipeta o por un filtro de papel absorbente, la saliva del paladar se puede obtener mediante una impresión con alginato ya que al retirar el molde queda cubierto de una capa de saliva que es

predominantemente del paladar, este método no es muy factible. También se puede hacer un Segregador para el paladar **(Wong 2008)**.

Fluido crevicular

Fluido crevicular puede ser colectado insertando directamente en el surco gingival un filtro de papel, una micropipeta o un tubo delgado. Es una excelente muestra pero es poco probable que se desarrollen pruebas comerciales para este líquido por la dificultad de su recolección y el pequeño volumen de líquido recogido **(Jacobs 2005)**.

Estimulación

La producción de la saliva puede ser estimulada por métodos como la masticación con cera de parafina o chicle y el ácido cítrico que tiene el potencial de estimular la secreción salival y reduce el pH de la muestra (menos de 3.0). Se aplica con un hisopo de 0.1-0.2mol/L de ácido cítrico en el borde lateral de la lengua (bilateralmente) en un intervalo de 30-60 segundos **(Schwartz 1998)**.

La desventaja de utilizar estimulantes gustatorios es que estos pueden interferir con el análisis y también puede afectar en los resultados de los análisis hormonales como la medición de testosterona, en inmunoanálisis por interferencia en los enlaces con anticuerpos. Además, los estimulantes pueden no sacar un fluido constante. Por el contrario la estimulación mecánica por ejemplo masticación de cera de parafina no contamina la saliva con sustratos exógenos. **(Wong 2008)**.

Fiabilidad

El índice de datos de fluido de la saliva depende del método de recolección aplicado. La succión y la absorción inducen mayor grado de estimulación y variabilidad y estos no son recomendados para la recolección de saliva no estimulada. Los métodos de drenaje y escupiendo, suministran la misma cantidad de saliva **(Wong 2008)**.

Los rollos de algodón pueden reducir el contenido de Na^+ , K^+ , Cl^- , glucoproteínas, IgA, lisozima y lactoferrina; incrementando concentraciones de Ca^+ , fosfato inorgánico, tiocinato, testosterona, DHEA, estradiol, 17-OHhidroxiprogesterona. Los niveles en saliva de otras hormonas esteroides (cortisol, DHEA-s) no parecen ser afectados por muestreos de algodón **(Chiappin 2007)**.

También los niveles de esteroides, obtenidos con el método Salivette, no correlacionan con los niveles en saliva recolectada con el método pasivo de salivación **(Wong 2008)**.

Procesamiento y almacenamiento

Debido a razones logísticas, financieras, prácticas y metodológicas, no siempre resulta posible analizar muestras inmediatamente después de la recolección. Por lo tanto, a menudo es necesario el almacenamiento y estabilización antes del análisis de las muestras de saliva.

Directrices generales que deben ser consideradas:

- Estandarizar la recolección de la saliva en hielo

- Mezclar (2min, máxima velocidad) cuando no se conocen las mediciones serológicas y no es necesario para la saliva recolectada directamente desde el orificio de una glándula, utilizando cánula o copa de Lashley
- Centrifugación (5min, 10,000 xg, o 20min, 3, 000 xg) no necesaria para la saliva recogida directamente desde el orificio de una glándula utilizando cánula o copa Lashley. Congelación del sobrenadante de la muestra de toda la saliva en nitrógeno líquido.
- Almacenar a -20°C o menos, preferentemente a -80°C.

(Wong 2008)

Como un enfoque general para evitar la degradación de los compuestos salivales, las muestras deben almacenarse teniendo en cuenta el siguiente esquema:

- Inmediatamente almacenar en alícuotas de saliva, sin ningún procesamiento. Los especímenes a menudo pueden ser almacenados a temperatura ambiente (cuando el análisis se lleva a cabo inmediatamente o en 30-90 min. de la recolección), a + 4°C (cuando el análisis se lleva a cabo en 3-6 h de colección), a -20°C y mejor a -80°C (cuando el análisis es llevado a cabo días a meses después de la colección).
- Congelación de saliva en nitrógeno líquido: mezclar un volumen igual de glicerol al 80% en H₂O con la saliva y, a continuación, pasar la muestra en nitrógeno líquido. Este procedimiento de almacenamiento pretende inhibir la actividad bacteriana, proteasas degradantes algunos componentes de proteínas salivales, tales como IgG.
- Inhibición de la actividad de la enzima presente en la saliva: mezclar cada alícuota de saliva con inhibidores de la enzima 10:1 (leupeptin, aprotinina y 4-(2-aminoethyl)

benzenesulfonyl flúor). En el laboratorio, una mezcla de inhibidores de la proteasa y sustancias estabilizadoras se puede usar (aprotinina, leupeptin, antipain, pepstatin A, fenil metil sulfonil fluoruro, EDTA y timerosal).

- Adición de azida de sodio (NaN_3) a los especímenes de saliva en intento de retardar el crecimiento bacteriano. El uso de la Azida sódica no influyen la medición de los marcadores salivales cuando inmunoradioanálisis basado en el suero se modifican para saliva, estos métodos implican separación o extracción de pasos. Pero la posible interferencia de Azida sódica obtenida del rábano (peroxidasa), un componente común de enzimas de inmunoanálisis, debe tenerse en cuenta.
- Adición de acetato de trifluor en la solución de agua de 10%, desnaturaliza las enzimas salivales que podrían degradar varios compuestos salivales, tales como las proteínas y las hormonas esteroideas (**Whembolua 2006, Schwartz 2003, Gröschl 2001**).

SALIVA COMO UNA HERRAMIENTA DE DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO

En general la saliva es una mezcla de varias secreciones junto con desechos y células que no son originales de las glándulas salivales. La ventaja de la saliva como material de muestra para el diagnóstico es que su recolección es fácil y no invasiva, el método es libre de estrés en el paciente (comparada con la recolección de sangre) y no es privado (comparada con la recolección de orina) **(Wong 2008)**.

Entre otras ventajas, las muestras de saliva son seguras para el operador y el paciente, su almacenamiento es fácil y son de bajo costo. Estas características hacen posible supervisar varios biomarcadores en pacientes no colaboradores, como los bebés, niños, ancianos y pacientes con hemofilia. **(Chiappin 2007)**.

El análisis de saliva puede ser usado por el Odontólogo para ayudar a evaluar el riesgo de infecciones como la caries; la especificidad y cuantificación bacteriana; la medición de la capacidad amortiguadora de la saliva (ya que ayuda en la neutralización de ácidos protegiendo el esmalte contra desmineralización), para realizar diagnósticos de enfermedades sistémicas como son el síndrome de Sjögren, altamente relacionado con recurrencia de infecciones oportunistas como la Candidiasis, por la presencia de xerostomía **(Chiappin 2007)**.

Infecciones detectables en saliva

Infecciones bacterianas

La cavidad bucal alberga un ecosistema compuesto por más de 500 especies bacterianas, que interactúan entre ellas y con el hospedero (**Paster 2001, Kolenbrander 2000**). El conjunto de interacciones bacterianas se da gracias a la formación de una biopelícula adherida a las superficies de la cavidad oral. Y el desequilibrio o incremento en proporción de especies de la flora comensal, puede ocasionar infecciones endógenas mixtas, como es el caso de las enfermedades periodontales, o la caries.

El aislamiento de bacterias de la placa dentobacteriana y bacterias cariogénicas de varios tipos de muestras bucales (incluyendo salival), se llevan a cabo por distintos métodos de cultivo, y su identificación puede ser más completa, si se utilizan métodos de identificación molecular o genético. Bacterias periodontopatogenas y cariogénicas u organismos que causan enfermedades respiratorias parenquimatosas, pueden ser rutinariamente detectadas en muestras de saliva por métodos fenotípicos aunque en la actualidad se utiliza con mucha más frecuencia la identificación genética. Por ejemplo, el 98% de la detección de *Mycobacterium tuberculosis* puede ser obtenida por medio de PCR, mientras que el 17.35% se obtiene por métodos de cultivo tradicional (**Wong 2008**).

Otro tipo de infecciones de la flora comensal como es el caso de *H. pylori* (agente etiológico de principal de ulcera gástrica), pueden ser detectadas en saliva. La detección de rRNA de *H. pylori* por medio de PCR en muestras de saliva de pacientes sintomáticos, es fiable para indicar una infección activa; así como la infección por *S. pneumoniae*

detectada por la presencia de un polisacárido pneumococcal C en saliva. En la **Tabla 2** se muestran ejemplos de enfermedades bacterianas, de las que se pueden encontrar anticuerpos, antígenos o ácidos nucleicos en la saliva. Por otro lado, también pueden ser diagnosticadas en saliva infecciones transitorias como es el caso de *M. tuberculosis*, *Treponema pallidum*, *Clostridium tetani* (**Wong 2008**).

Infecciones virales

En la saliva, la detección viral frecuentemente se amplifica por PCR y técnicas inmunológicas. Además de la selección del genoma, la presencia de un virus puede ser medido por detección de genes transcritos durante la fase productiva de la infección. Los virus de RNA como el VHC, VIH y el DEN-1, 2 y 3 (virus del dengue) (**Mims 1999**), pueden ser más difíciles de detectar en saliva por su única hebra RNA. Aunque la transmisión oral de VIH es rara, no pueden descartarse factores secundarios como la periodontitis y gingivitis, que podrían incrementar el riesgo de transmisión. En la actualidad, no existe ninguna vacuna contra el VIH, sin embargo la detección de anticuerpos contra antígenos específicos de VIH, es suficiente para llegar a su diagnóstico específico. En la actualidad, existen pruebas de detección de VIH de cuarta generación, que combinan la detección de anticuerpos y la detección del antígeno p24 para identificar infecciones virales dentro de la ventana de seroconversión. La determinación de la carga viral por la detección de RNA o en menor medida usando la detección de p24, se utiliza principalmente para controlar la respuesta a la terapia de medicamentos (**Wong 2008**).

Una situación diferente se presenta en el diagnóstico de infección por Ébola, esta infección puede ser diagnosticada por la detección directa del virus, usando antígenos o detección de RNA de *Filovirus virus Ébola-Zaire*. En la **Tabla 3**, se muestran ejemplos de enfermedades virales que se pueden diagnosticar encontrando anticuerpos, antígenos y ácidos nucleicos en saliva **(Wong 2008)**.

Infecciones fúngicas.

Mientras que la mayoría de los microorganismos en infecciones bucales son de origen bacteriano o viral, la presencia de microorganismos fúngicos presentes en la flora comensal (como es el caso de *Candida albicans*), también puede ocasionar infecciones oportunistas. En la **Tabla 4**, se observan ejemplos de infecciones fúngicas, de las cuales se encuentran anticuerpos o antígenos en la saliva **(Wong 2008)**.

La especie *C. albicans* normalmente se encuentra en piel y en mucosas (bucal y vaginal), no es considerado un patógeno primario, sin embargo pero puede ocasionar infecciones oportunistas como candidiasis orofaríngea cuando el medio ambiente en la cavidad bucal se encuentra en un desequilibrio microbiológico (como es el caso de otra infección), porque el organismo se encuentre inmunocomprometido, o por un tratamiento de antibioterapia prolongada **(Wong 2008)**.

La Zigomicosis se debe a microorganismos micóticos del *Phylum Zygomycota*, que incluye a los géneros *Mucor*, *Absidia* y *Rhizopus* e *Histoplasma capsulatum*, que es el agente causal de la Histoplasmosis, infección pulmonar crónica debida a la inhalación de esporas de *H. capsulatum*, puede acompañarse de lesiones intraorales asociadas que consisten en

una úlcera crónica parecida a una lesión maligna. Se diagnostica mediante la combinación de datos obtenidos de la evaluación clínica, microscópica, el cultivo, los hallazgos serológicos y la prueba cutánea de la histoplasmina. La prueba más sensible y fiable es la de inmunodifusión, que detecta los anticuerpos séricos del paciente frente al antígeno H y M de *H. capsulatum*.

COLCLUSIONES

- La saliva además de ser un ultra-filtrado de la sangre, que dentro de sus propiedades participa como mediador de defensa y protección para los tejidos duros y blandos de la cavidad bucal, es un fluido que alberga marcadores específicos como anticuerpos, antígenos o ácidos nucleicos de bacterias, virus y hongos, que pueden estar presentes en la cavidad bucal de manera transitoria.
- Directamente del fluido salival, por diversas metodologías fenotípicas o genéticas, es posible aislar y cuantificar microorganismos no sólo transitorios, sino de la flora comensal, que pudieran estar jugando un papel infeccioso en el lugar donde residen o en otra superficie bucal.
- Existen distintos métodos disponibles para el estudio de la saliva como muestra de diagnóstico. Desde los métodos fenotípicos, que se basan en la observación y que a veces se tiene que combinar para llegar a resultados muy precisos, hasta los genéticos que tienen la ventaja de ser muy específicos, de los cuales se reduce el tiempo para obtener el resultado y comparado con los métodos de cultivo tradicional, no son limitados a especies cultivables, aunque también tienen desventajas porque con ellos no se pueden realizar pruebas de susceptibilidad bacteriana.
- Una de las principales ventajas de la saliva como prueba de diagnóstico es que su recolección no es invasiva, comparada con la recolección de sangre; aunque obtener saliva de los conductos glandulares es algo complicado. El procedimiento se puede realizar en pacientes que no son colaboradores como es el caso de niños y ancianos; o bien en pacientes con alguna enfermedad como la Hemofilia.

- Las muestras de saliva son seguras, su almacenamiento es fácil. Existen dispositivos disponibles para su recolección y también existen productos para el diagnóstico de enfermedades, el de importancia para el Dentista es el OraQuick que es una prueba muy sencilla para la detección de anticuerpos en saliva de VIH.
- La composición de la saliva es esencial para muchos protocolos clínicos, experimentales y de diagnóstico para una variedad de enfermedades sistémicas e infecciosas, el nivel de algunos medicamentos, drogas, hormonas, para evaluar el riesgo de caries y el contenido bacteriano; por lo tanto como muestra para diagnóstico es cada vez más reconocida.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Actis AB, Perovic NR, Defagò D, Beccacece C, Eynard AR. *Fatty acid profile of human saliva: a possible indicator of dietary fat intake. Arch Oral Biol* **2005**;50(1):1–6
- Agha-Hosseini F, Dizgah IM, Amirkhani S. *The composition of unstimulated whole saliva of healthy dental students. J Contemp Dent Pract* **2006**;7(2):104–11.
- Anderson P, Hector MP, Rampersad MA. Critical pH in resting and stimulated whole saliva in groups of children and adults. *Int J Paediatr Dent* **2001**(4):266–73.
- Aps JKM, Martens LC. Review: the physiology of saliva and transfer of drugs into saliva. *Forensic Sci Int* **2005**;150:119–31.
- Basak S, Mukhopadhyay P, Gupta SK, Ghosh TC. *Falta título Genomic adaptation of prokaryotic organisms at high temperature.. Bioinformation* **2010** Feb 28;4(8):352-6.
- Booth RE, Johnson JP, Stockand JD. *Aldosterone. Adv Physiol Educ* **2002**;26(1):8–20.
- Chiappin Silvia, Antonelli Giorgia, et al. Saliva specimen: A new laboratory tool for diagnostic and basic investigation. *ScienceDirect* **2007**; 383: 30–40.
- Chicharro JL, Lucia A, Perez M, Vaquero AF, Urena R. *Saliva composition and exercise. Sports Med* **1998**;26(1):17–27.
- Cooke M, Leeves N, White C. Time profile of putrescine, cadaverine, indole and scatole in human saliva. *Arch Oral Biol* **2003**;48:323–7.
- Coufal P, Zuska J, van de Goor T, Smith V, Gas B. Separation of twenty underivatized essential amino acids by capillary zone electrophoresis with contactless conductivity detection. *Electrophoresis* **2003**;24:671–7.

- David T. Wong. *Salivary Diagnostics*, 1ed, EditorialWiley-Blackwell, USA 2008. PP. 295.
- Granger DA, Schwartz EB, Booth A, Curran M, Zakaria D. Assessing dehydroepiandrosterone in saliva: a simple radioimmunoassay for use in studies of children, adolescents and adults. **Psychoneuroendocrinology** 1999;24:567–79.
- Gröschl M,Wagner R, Rauh M, Dörr HG. Stability of salivary steroids: the influences of storage, food and dental care. **Steroids** 2001; 66:737–41.
- Huang CM. Comparative proteomic analysis of human whole saliva. **Arch Oral Biol** 2004;49:951–62.
- Hu S, Denny P, Denny P, et al. Differentially expressed protein markers in human submandibular and sublingual secretions. **Int J Oncol** 2004; 25:1423–30.
- Hu S, Xie Y, Ramachandran P, et al. Large scale identification of proteins in human salivary proteome by liquid chromatography/mass spectrometry and two-dimensional gel electrophoresis-mass spectrometry. **Proteomics** 2005;5:1714–28.
- Jacobs N, Nicolson NA, Deron C, Derespaul P, van-Os J, Myin-Germeys I. *Electronic monitoring of salivary cortisol sampling compliance in daily life*. **Life Sci** 2005; 76(21):2431–43.
- Janda, William; Allen, Stephen; Koneman, Elmer W,et. al, 5ª edición (07/1999), *Diagnóstico Microbiológico. Texto y Atlas a color*, ISBN: 8479034378 ISBN-13: 9788479034375, Editorial Médica Panamericana, S.A.5ªed **México, 1997**. PP. 169-195.
- Jensdottir T, Nauntofte B, Buchwald C, Bardow A. *Effects of sucking acidic candy on whole-mouth saliva composition*. **Caries Res** 2005;39: 468–74.

- Kalk WW, Vissink A, Stegenga B, Bootsma H, Nieuw Amerongen AV, Kallenberg CG. *Sialometry and sialochemistry: a non-invasive approach for diagnosing Sjogren's syndrome*. **Ann Rheum Dis** **2002**;61:137–44.
- Kennedy B, Dillon E, Mills PJ, Ziegler MG. *Catecholamines in human saliva*. **Life Sci** **2001**;69:87–99
- Lu Y, Bentley GR, Gann PH, Hodges KR, Chatterton RT. Salivary estradiol and progesterone levels in conception and non conception cycles in women: evaluation of a new assay for salivary estradiol. **Fertil Steril** **1999**,71(5):863–8.
- Marini A, Cabassi E. La saliva: approccio complementare nella diagnostica clinica e nella ricerca biologica. **Ann Fac Med Vet Parma** **2002**;22:295–311.
- Martha Negroni. *Microbiología estomatológica, Fundamentos y guía práctica*, 2ª Edición, ISBN10:9500615843; ISBN13:9789500615846, Editorial medica Panamericana, **Buenos Aires** **2009**. PP. 656.
- Messenger B, Clifford MN, Morgan LM. Glucose-dependent insulintropic polypeptide and insulin-like immunoreactivity following sham-fed and swallowed meals. **J Endocrinol** **2003**;177:407–12.
- Nurkka A, Obiero J, Kaythy H, Scott AG. Effects of sample collection and storage methods on antipneumococcal immunoglobulin A in saliva. **Clin Diagn Lab Immunol** **2003**;10(3):357–61.

- Patel RS, Shaw SR, MacIntyre H, McGarry GW, Wallace AM. Production of gender-specific morning salivary cortisol reference intervals using international accepted procedures. **Clin Chem Lab Med** 2004;42 (12):1424–9.
- Pocock Guillian, Richards Christopher. *Fisiología Humana, La Base de La Medicina*. 2da Edición. Editorial Mason. 2006, pp. 427-429.
- Prats Guillem. *Microbiología Clínica*. Editorial Médica Panamericana. **España 2006**. PP. 19-81.
- Samarenayake L. *Essential Microbiology for Dentistry*, 2ª Edición, Editorial Churchill Livingstone. **USA 2002**. Pp. 1-83
- Schaeken J, Van der Hoeven and Franzken. *Comparative Recovery of Streptococcus mutans on Five Isolation Media, including a New Simple Selective Medium*. International and American Associations for Dental Research (**IAADR**) **1986** 65: 906-906-908
- Schwartz EB, Granger DA, Susman EJ, Laird B. *Assessing salivary cortisol in studies of child development*. **Child Dev** 1998;69(6):1503–13.
- Simpson JL, Wood LG, Gibson PG. Inflammatory mediators in exhaled breath, induced sputum and saliva. **Clin Exp Allergy** 2005;35:1180–5.
- Siqueira WL, De Oliveira E, Mustacchi Z, Nicolau J. *Electrolite concentration in saliva of children aged 6–10 years with Down syndrome*. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endo** 2004;98:76–9.
- Tabak LA. A revolution in biomedical assessment: the development of salivary diagnostics. **J Dent Educ** 2001;65(12):1335–9.

Tappuni A. R. and Challacombe S. J., Distribution and isolation Frequency of Eight Streptococcus Species In Saliva from Pre dentate and Dentate Children and Adults.

Journal of Dental Research 1993; 72:31-36.

Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Odontología. *Manual de prácticas de Microbiología 2009*. PP 33-37.

Walsh NP, Laing SJ, Oliver SJ, Montague JC, Walters R, Bilzon JLJ. *Saliva parameters as potential indices of hydration status during acute dehydration*. **Med Sci Sports Exerc 2004**:1535–42.

Whemolua GL, Granger DA, Singer S, Kivlighan KT, Marquin JA. Bacteria in the oral mucosa and its effect on measurement of cortisol, dehydroepiandrosterone and testosterone in saliva. **Horm Behav 2006**;49 (4):478–83.

TABLAS

Tabla 1. Biomarcadores salivales y su aplicación para el desarrollo de una prueba efectiva

Biomarcador	Aplicaciones potenciales
DNA	Diagnóstico de infecciones bacterianas, diagnóstico de cáncer de cabeza y cuello, medicina forense.
RNA	Diagnóstico de infecciones virales y bacterianas, diagnóstico de cáncer bucal.
Proteínas	Condiciones periodontales, diagnóstico de cáncer bucal, susceptibilidad cariogénica.
Mucinas y glicoproteínas	Diagnóstico de cáncer de cabeza y cuello, y susceptibilidad cariogénica.
Inmunoglobulinas	Diagnóstico de infecciones virales.
Metabolitos	Identificación de condiciones endocrinas, estrés, estado psicológico, diagnóstico periodontal y de fibrosis quística.
Drogas y Metabolitos	Para monitorear el abuso de drogas, así como el cumplimiento del paciente a la terapia.
Bacteria	Susceptibilidad cariogénica.
Material celular	Diagnóstico de cáncer de cabeza y cuello.

Tabla 2. Tipificación bioquímica. Esquema para la identificación fenotípica de *Streptococcus* sp. bucales.

	S. mtis 1 y 2		<i>S. oralis</i>	<i>S. salivarius</i>	<i>S. anginosus</i>	<i>S. gordini</i>	<i>S. vestibularis</i>	<i>S. sanguis</i>	<i>S. mutans</i>
	Glucosa	+	+	+	+	+	+	+	+
Manitol	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Sorbitol	-	(60)%	-	-	-	-	-	V	+
Trehalosa	-	-	+	-(70%)	+	+	v	+	+
Melibiose	-	+	+	-	-(75%)	v	-	V	+
Rafinose	+(70%)	+	+(56%)	-	-(75%)	v	-	V	+
Aesculin hidrólisis	-	-	-	+	+	+	+	V	+
Hidrólisis arginina	-	+	-	-	+	+	-	+	-
α-Fucosidase	-	-	-	-	-	+	-	-	-
A-galactoside	+	+	+(60%)	-	-	v	-	V	+
Inulin	-	-	-	+(60%)	-	+	-	+	+
Amigdalín	-	-	-	+	+(58%)	+	n.d.	-	+(70%)
Voges-Proskauer	-	-	-	+(60%)	+(70%)	-	+	-	+
H₂O₂	+	+	+	-	+(57%)	+	+	+	-
EPS	-	-	+(78%)	+	-	+	-	+	-
Inhibición por Bacitracina	+	+	+	+	+	+	+	+	-

+ >80% de cepas son positivas.

- >80% de cepas son negativas.

V los resultados de reacción de fermentación diferían con diferentes biovares.

() porcentaje de cepas positivas o negativas.

n.d. la prueba no se ha hecho.

Tabla 3. Ejemplos de enfermedades bacterianas en las que se encuentran antígenos, anticuerpos o ácidos nucleicos en saliva.

Bacteria	Anticuerpo	Antígeno	DNA
<i>Bordetella pertussis</i>	X		
<i>Campylobacter jejuni</i>	X		
<i>Clostridium tetani</i> ¹	X		
<i>Escherichia coli</i> O157	X		
<i>Helicobacter pylori</i>	X		X
<i>Leptospira ssp</i>	X		
<i>Moraxella catarrhalis</i>	X		
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	X		X
<i>Porphyromonas gingivalis</i> ²	X		X
<i>Salmonella thyphi</i>	X		
<i>Shigella sp</i> ³	X		
<i>Streptococcus ssp</i> ⁴			X
<i>Streptococcus pneumoniae</i> ⁵	X	X	
<i>Treponema pallidum</i>	X		X ⁶

1. Detección de anticuerpos en saliva tras la vacunación con toxoide tetánico aislado, inactivado de *Clostridium tetani*.

2. Incluyen otras bacterias periodontopatogenas (no especificadas en la tabla): *Agregatibacter actinomycetemcomitans*, *Bacteroides forsythus*, *Campylobacter rectus*, *Capnocytophaga gingivalis*, *Eikenella corrodens*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella melaninogenica*, *Prevotella nigrescens*, *Streptococcus mitis*, *Tannerella forsythensis* y *Treponema denticola*. No incluye las numerosas referencias en las que la detección fue interpretada en muestras de placa subgingival. 3. Incluyen *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri* y *Shigella sonnei*.

4. No incluye *Streptococcus pneumoniae*, pero incluye otras especies de *mutans*, *mitis* y el grupo de *Streptococcus salivarius*: *Streptococcus gordini*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus sanguis* y *Streptococcus sobrinus*. 5. Detección de antígenos basada en la presencia de polisacárido C pneumococcal.

6. Muestras absorbidas de las úlceras bucales de sospechosos de Sífilis.

Tabla 4. Ejemplos de enfermedades virales que se pueden diagnosticar encontrando anticuerpos, antígenos o ácido nucleico en la saliva.

Virus	Anticuerpo	Antígeno	Ácido nucleico
<i>Cytomegalovirus</i> ¹	X		X
<i>DEN 1, 2 y 3</i>	X		
<i>Filovirus Ebola</i> ²		X	X
<i>Epstein-Barr</i> ¹	X		X
<i>Hepatitis A</i>	X		X
<i>Hepatitis B</i> ³	X	X	X
<i>Hepatitis C</i>	X		X
<i>Hepatitis G</i> ⁴			X
<i>Herpes simple</i> ^{1 5}	X		X
<i>Herpes humano(6,7,8)</i> ¹			X
<i>Inmunodeficiencia humana</i> ^{6 7}	X	X	X
<i>Papiloma humano</i>	X		X
<i>Parvovirus humano B19</i>	X		
<i>Influenza</i>	X		
<i>Measles</i>	X		X
<i>Mumps</i>	X		X
<i>Norwalk</i>	X		
<i>Polio</i>	X		
<i>Rabia</i> ⁸		X	X
<i>Rotavirus</i>	X		
<i>Rubivirus</i>	X		X
<i>SARS corona</i> ⁹			X
<i>Torque teno</i> ¹⁰			X
<i>Varicela zoster</i>	X		X

1. Virus del Herpes humano HHV tipos: Cytomegalovirus HHV-5, Epstein-Barr HHV-4, Virus del Herpes Simple-1 y virus-2, respectivamente HHV-1 y HHV-2; Varicella-Zoster HHV-3; VVH-6 y VVH-7 son utilizados al referirse a roseolovirus; y HHV-8 es un Rhadinovirus.

2. Detección de antígenos con hiperinmune polivalente de suero de conejo a subtipos de virus aislados/identificados durante los brotes de Ebola fiebre hemorrágica.

3. Detección de antígenos basados en la presencia de Hepatitis B (HBsAg).

4. Un nombre actualmente más preferido del virus de Hepatitis G (HGV) es GB virus C (GVH-C). el virus no causa Hepatitis; si causa una enfermedad específica es incierto.

5. Incluye el tipo 1 y 2 del virus de Herpes Simple.

6. Detección de antígeno basado en la presencia de VIH p24 proteína del núcleo.

7. Además de la detección de las secuencias de DNA genómico, algunos también informan de detección de secuencias de DNA proviral.

8. Detección de antígenos basados en la presencia de nucleoproteínas de rabia.

9. SARS es Síndrome respiratorio agudo severo.

10. Torque teno virus (TTV) es también se denomina transfusión, transmisión, virus. El virus es asociado con las transfusiones de sangre y Hepatitis, pero hasta ahora no se ha establecido su papel etiológico en la Hepatitis.

Tabla 5. Ejemplos de enfermedades fúngicas de las que se encuentran anticuerpos en la saliva.

Microorganismo	Anticuerpo	Antígeno	Acido nucléico
<i>Candida albicans</i>	X	X	X
<i>Histoplasma capsulatum</i>	X	X	X
<i>Mucor, Absidia y Rhizopus sp</i>	X		X

FIGURAS

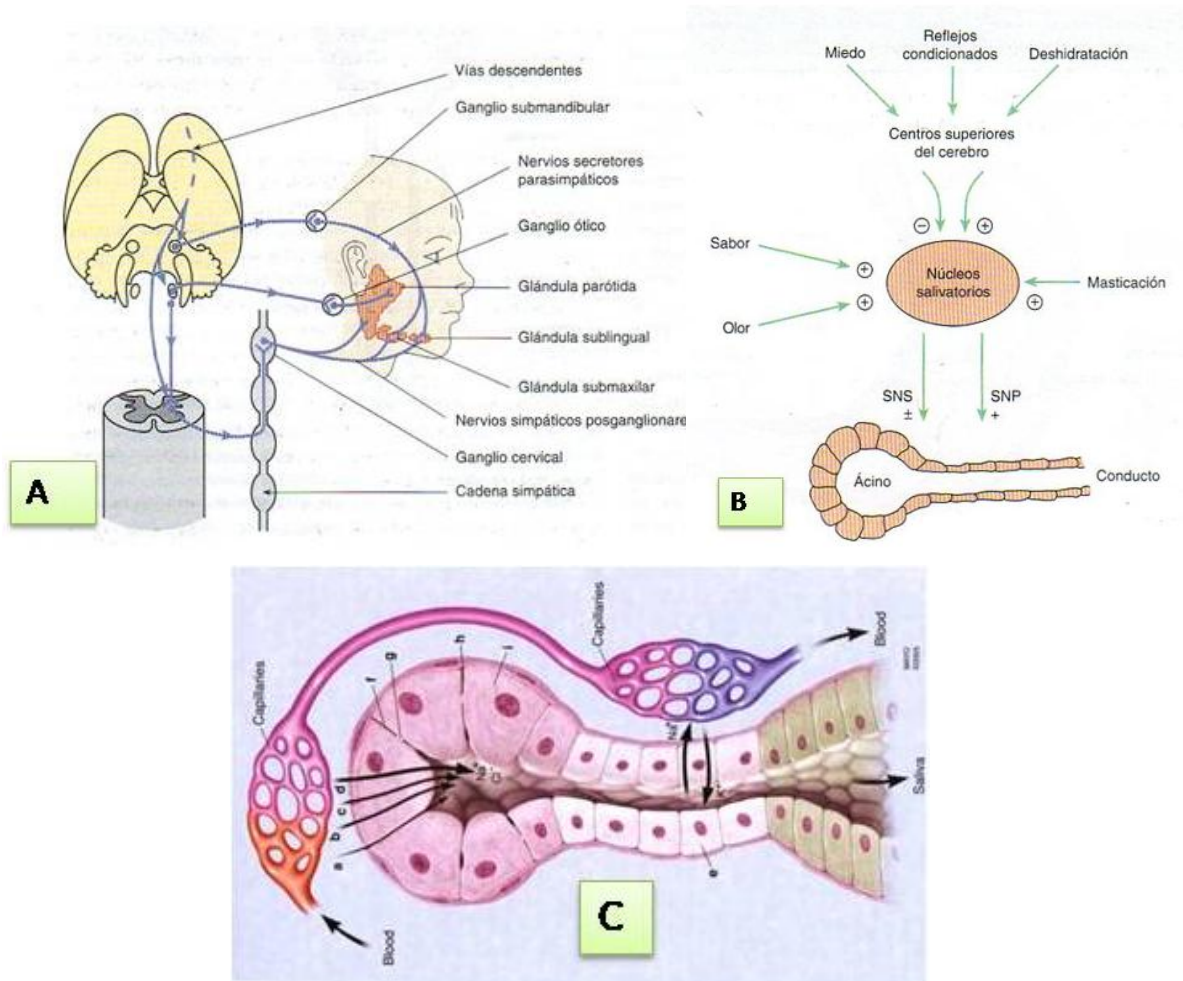


Figura 1. A) Vías nerviosas relacionadas con el reflejo salival. B) Principales factores que influyen sobre la secreción de la saliva. SNP, sistema nervioso parasimpático; SNS, sistema nervioso simpático. C) transporte de electrolitos implicados en la formación de saliva, por las células acinares y ductales de una glándula salival. Esta secreción primaria es modificada posteriormente por la absorción de e de electrolitos a medida que el líquido discurre por los conductos (Pocock 2006).

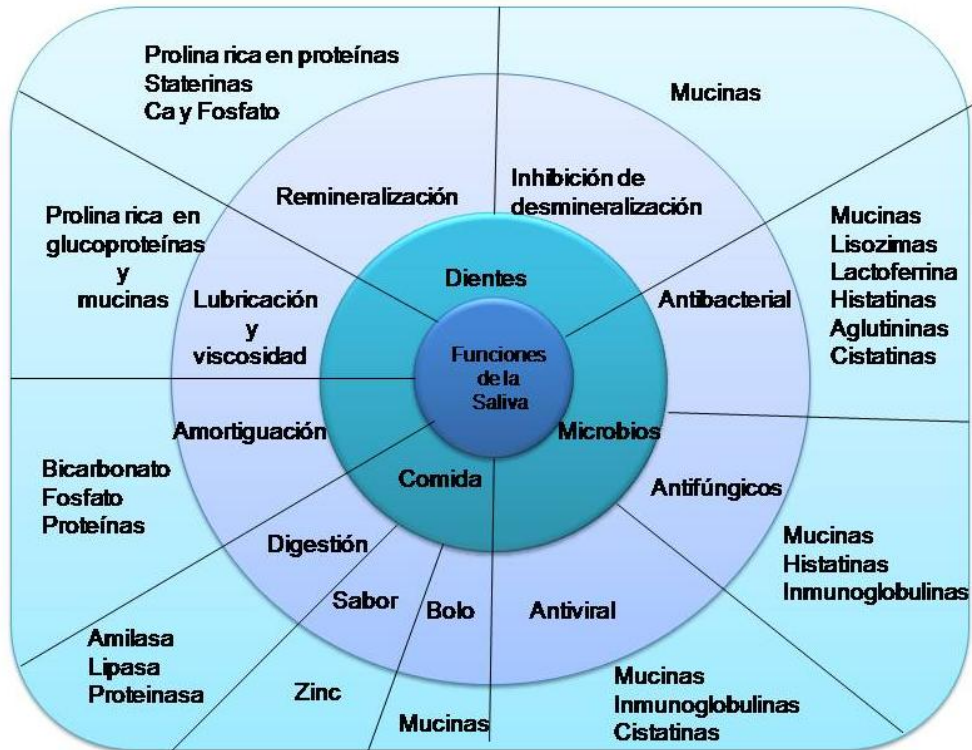


Figura 2. Funciones de la saliva: digestión, antimicrobiana, remineralizante, amortiguadora y lubricante.

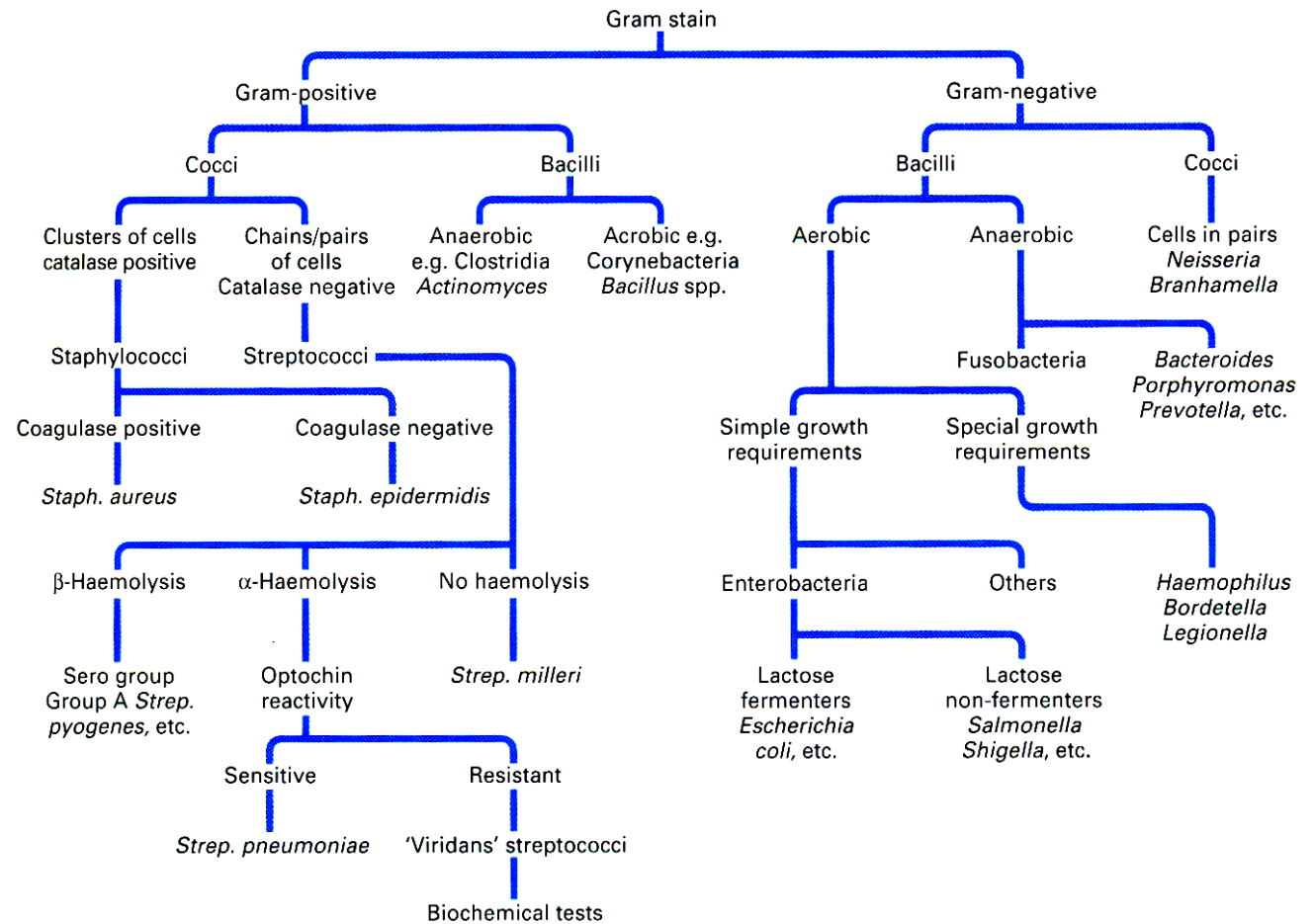


Figura 3. Diagrama de técnicas de identificación fenotípica

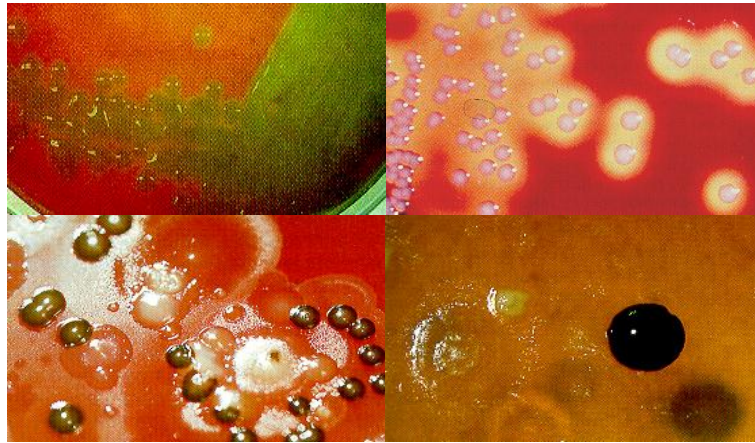


Figura 4. Identificación macroscópica. Imagen superior derecha: colonias de *Streptococcus* en agar sangre que muestran β hemólisis; imagen superior izquierda: colonias de *Staphylococcus* en agar sangre que muestran α hemólisis; imágenes inferiores: cultivos mixtos con distintos tipos de morfología de colonia, muestran algunas especies de pigmentación negra (*Prevotella* sp. y *Porphyromonas* sp.).



Figura 5.OraQuick. A) Paleta, no se debe tocar. B) Paquete absorbente. C y D) La paleta se coloca sobre el fondo se saco superior e inferior y se frota suavemente, no se debe pasar por el paladar, ni la lengua. E y F) La paleta se inserta en el dispositivo, debe tocar el fondo del frasco. G) Después de 20 minutos lea los resultado: el resultado no es reactivo si aparece una línea de color rojo-púrpura junto al triángulo que dice **C** y no aparece ninguna línea junto al triángulo que dice **T**. El resultado es reactivo si aparece una línea de color rojo-púrpura junto al triángulo que dice **C** y aparece una línea rojo-púrpura junto al triángulo que dice **T**. Una de esas líneas puede ser más obscura que la otra. El resultado de la prueba es reactivo si aparece cualquier línea rojo-púrpura en el triángulo que dice **T** y junto al que dice **C**; sin importar si son muy tenues.

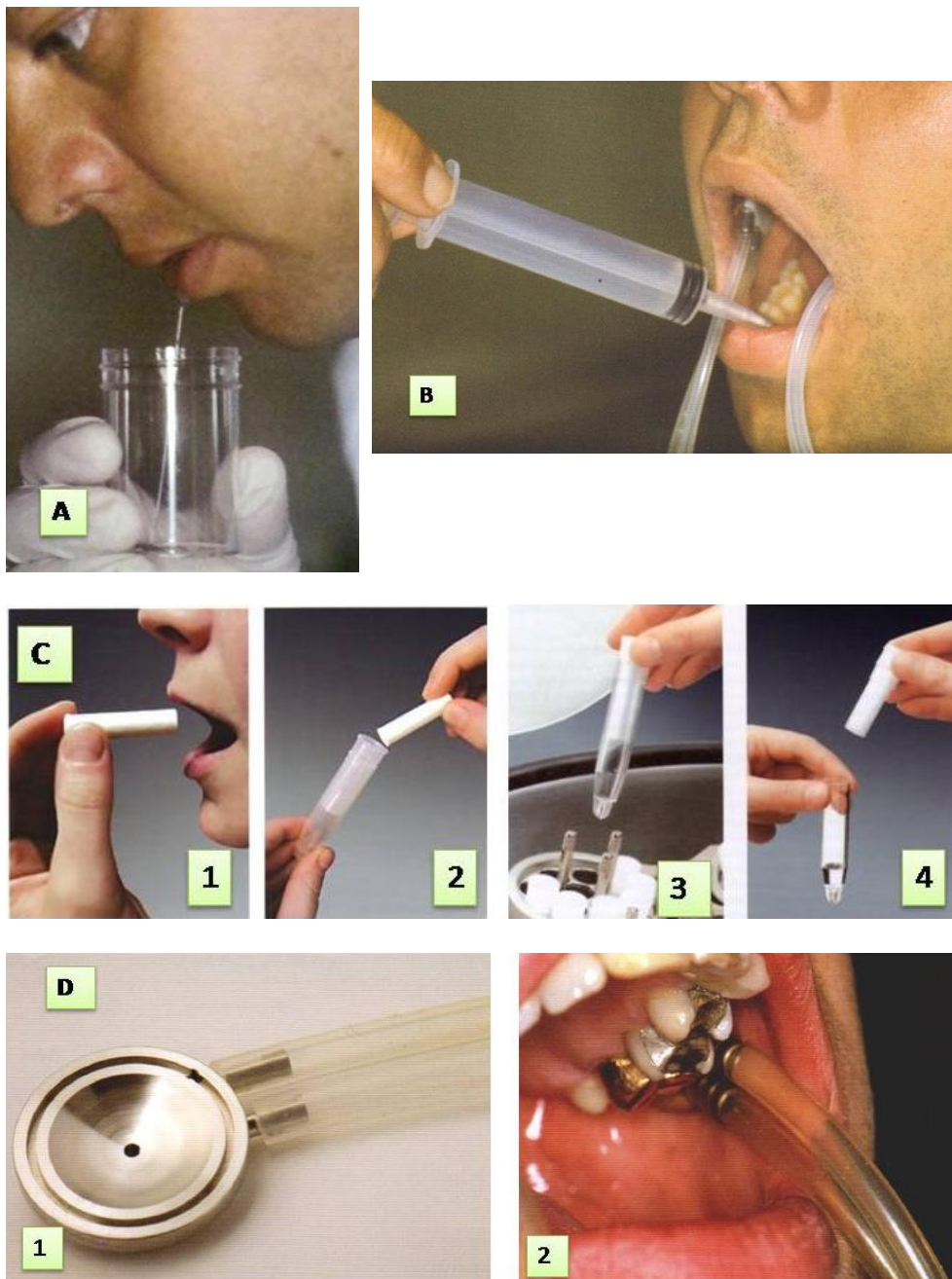


Figura 6. Recolección de muestras de saliva. A. Recolección de toda la saliva. B. Recolección de la saliva de las glándulas submandibular y sublingual (el conducto de la glándula parótida se bloquea con Lashley cup o rollos de algodón). C. Salivette, 1) la recolección de saliva se lleva a cabo masticando un rollo de algodón; 2) la recuperación de la muestra de saliva se obtiene colocando el rollo de algodón en el Salivette, 3) centrifugación del contenido; 4) la muestra de saliva está lista para su análisis. D. Lashley cup para la recolección de la saliva de la glándula parótida; 1) es una copa con 2 cámaras, la interior es la cámara recolectora de saliva; 2) el aparato se coloca directamente en orificio del conducto de la glándula.