

Salivette으로 채취한 타액의 아밀라제 측정

박정란¹ · 김미혜¹ · 우정민² · 이승재² · 송경은¹

경북대학교 의학전문대학원 임상병리학교실¹, 정신과학교실²

Measurement of Amylase in Saliva Collected by Salivette

Jung Ran Park, M.D.¹, Mi Hye Kim, M.D.¹, Jungmin Woo, M.D.², Seung Jae Lee, M.D.², and Kyung Eun Song, M.D.¹

Departments of Clinical Pathology¹ and Psychiatry², School of Medicine, Kyungpook National University, Daegu, Korea

Background : Saliva is increasingly being used as a specimen for systemic disease as well as for oral health status. Especially, salivary amylase has been studied as an excellent index for psychological stress. Authors evaluated the measurement of salivary amylase activities collected by Salivettes (Sarstedt, Germany).

Methods : Saliva specimens were collected from 13 healthy adults between 10:00 and 11:00 a.m. Participants were asked to gently chew tampons of Salivettes for 1 min. Immediately after collection, all specimens were stored frozen. On the day of testing, they were centrifuged after thawing and diluted with distilled water. Amylase was measured by Dimension RxL Max (Dade Behring Inc., USA). We evaluated precision, linearity, and recovery rate of Salivette. Amylase activities between collection of saliva by Salivette and passive drool were compared, and also the changes of amylase by the storage temperature were evaluated.

Results : Intra-run CVs for three levels of amylase were excellent. Between-day CVs and total CVs were good only for mid and high levels. A good linear relationship was found at all diluted levels. Dosing Salivettes with 2 mL, 1.5 mL, and 1 mL yielded sample recovery $85.5 \pm 2.4\%$, $82.4 \pm 1.5\%$, and $72.2 \pm 3.1\%$, respectively and amylase recovery $78.9 \pm 10.9\%$, $74.1 \pm 13.7\%$, and $37.3 \pm 26.9\%$, respectively. Amylase by Salivette and passive drool were correlated well ($r=0.757$), although they showed a significant difference. Amylase activity was not affected by the storage temperature.

Conclusions : Measurement of salivary amylase using Salivette could be a useful test having good intra-run CVs and linearity. More than 1.5 mL of saliva would be needed to have more than 70% recovery of Salivette. (Korean J Lab Med 2008;28:438-43)

Key Words : Saliva, Amylase, Salivette

서 론

타액은 주성분인 물 외에도 전해질, 점액, 면역글로불린, 성장

인자, 항균 물질, 그리고 효소 등을 포함하며, 말하거나 음식을 삼킬 때 입안의 순환작용을 하고 맛을 보게 하거나 음식을 소화시키며 항균작용을 한다[1-3]. 타액은 비침습적으로 쉽게 검체를 얻을 수 있으므로, 구강 건강을 보는 척도일 뿐만 아니라 전신 건강을 반영하는 것으로 질병을 진단하거나 치료에 대한 반응과 경과를 추적하는 지표로서 그 이용이 점차 증가되고 있다[1-3]. 특히 타액 내 물질 중에서 녹말을 분해하는 소화효소인 아밀라제는 최근 정신적인 스트레스에 대한 자율신경계의 반응지표로서 많은 연구가 이루어졌고[4-10], 그 외 신체활동

Received : August 8, 2008

Revision received : October 24, 2008

Accepted : October 28, 2008

Corresponding author : Kyung Eun Song, M.D.

Department of Clinical Pathology, School of Medicine,
Kyungpook National University, 50 Samdeok 2-ga, Jung-gu,
Daegu 700-721, Korea
Tel : +82-53-420-5294, Fax : +82-53-426-3367
E-mail : kesong@knu.ac.kr

Manuscript No : KJLM2166

이나 약물에 대한 반응을 측정하는데도 이용되고 있다[11, 12].

타액을 채취하는 방법에는 타액을 그대로 흘려 받는 방법, 면성분을 이용하여 타액을 흡수한 후 주사기나 원심분리를 통해 분리하는 방법, 여과지를 이용하는 방법, 그리고 미세 스폰지를 이용하는 방법 등이 있다[13, 14]. 일반적으로 타액을 채취하는 방법은 쉽고 비침습적으로 여러 개의 검체를 얻을 수 있는 장점이 있지만 노인이나 어린이에게는 때때로 힘이 들 수도 있다. 또한 타액을 채취하는 방법이나, 구강 내에서 타액을 받는 위치에 따라라도 측정하고자 하는 물질의 값에 차이가 있고[13-15], 하루 중 타액의 채취 시간 즉, 일주기에 의해 영향을 받으며[15, 16] 과, 호르몬이나 분비성 면역글로불린 A와 같은 경우 타액을 채취할 때 면성분을 사용하면 간섭현상이 생긴다고 보고되는[17] 등, 정확한 검사 결과를 얻기 위해서 주의해야 할 점들이 지적되고 있다.

저자들은 최근 타액을 채취하기 위해 많이 쓰이고 있는 Salivette (Sarstedt, Numbrecht, Germany)과 타액 아밀라제 검사에 대해 평가하여 보았다.

재료 및 방법

1. 대상

기저질환이 없는 건강한 성인 13명(남자 7명, 여자 6명)을 대상으로 하였다. 이들의 평균 나이는 28.9세였다.

2. 검체 채취

타액 채취는 오전 10시에서 11시 사이에 이루어졌고, 지원자들은 타액을 채취하기 2시간 전부터 물을 제외한 음식물 섭취, 흡연, 양치질을 하지 않았다. 채취 전에 증류수로 입안을 헹구어 내고 Salivette의 면구(tampon)를 1분간 60회 부드럽게 씹어 타액을 채취하였다. 그리고 5분 후 다시 증류수로 입안을 헹구고 10-15분간 흘려 나오는 타액을 빨대를 이용하여 폴리프로필렌 용기에 모았다. 폴리프로필렌 용기에 모은 타액은 Salivette의 면구에 각각 2 mL, 1.5 mL, 1 mL, 0.5 mL씩 분주하고 나머지는 면구를 제거한 Salivette에 넣었다. Salivette은 즉시 -20°C에 냉동하였다가 검사 당일 해동하여 3,000 rpm으로 5분 동안 원심분리한 후 상층액을 얻어 검사에 이용하였다. 아밀라제는 Amylase Flex Reagent cartridge (Dade Behring Inc., Newark, DE, USA)를 이용하여 Dimension RxL Max (Dade Behring Inc., Deerfield, IL, USA)로 측정하였다.

3. 평가방법

1) 정밀도

Salivette 면구를 씹어서 얻은 타액 5개를 모아 섞은 후 증류수로 1:100, 1:200, 1:400으로 희석한 세 가지 농도의 검체로 Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) EP5-A2 지침에 따라 10일 동안 매일 1회 2번씩 측정하여 정밀도를 평가하였다.

2) 직선성

Salivette 면구를 씹어서 얻은 타액 5개를 모아 섞은 검체를 증류수로 1:100에서 1:1,200까지 12단계로 희석하여 평가하였다.

3) Salivette의 부피 복원력(recovery rate)

흘려 받은 타액 6개를 냉동 전에 Salivette의 면구에 2 mL, 1.5 mL, 1 mL, 0.5 mL씩 분주하고 냉동, 해동한 후 타액의 부피 복원 정도를 평가하였다. Crouch의 보고[16]와 저자들이 확인한 대로 타액 1 mL를 1 g으로 정의하고 Salivette에서 얻은 타액의 무게를 구해 타액 부피의 복원된 비율을 계산하였다.

4) Salivette의 아밀라제 값 복원력

흘려 받은 타액 6개를 냉동 전에 Salivette의 면구에 2 mL, 1.5 mL, 1 mL, 0.5 mL씩 분주하고 나머지를 면구를 제거한 Salivette에 넣어 모두 냉동, 해동한 후 증류수로 1:200으로 희석한 검체로 아밀라제를 측정하여 Salivette의 아밀라제의 복원 정도를 평가하였다.

5) 타액 채취 방법 비교

13명에 대하여 Salivette 면구를 씹어서 얻은 타액과 흘려 받은 타액의 아밀라제 값을 비교하였다. 모든 검체는 증류수로 1:200으로 희석하여 아밀라제를 측정하였다.

6) 검체 보관 온도에 따른 비교

Salivette 면구를 씹어서 얻은 타액 5개를 모아 섞은 검체를 세 가지 농도로 희석하고 실온과 4°C에 보관하며 10일 동안 매일 1회 2번씩 측정하여 아밀라제 값의 변화를 관찰하였다.

4. 통계처리

통계는 SPSS 15.0 for Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 이용하였다. 선형회귀분석을 통하여 직선성을 알아보

고, 비선형회귀분석으로 타액과 증류수의 부피 복원력, 타액의 아밀라제 복원력을 분석하였다. 타액 채취 방법 간 차이는 대응 표본 t-검정과 피어슨 상관분석, 검체 보관에 따른 비교는 단일 변량 t-검정으로 시행하였다.

결 과

1. 정밀도

세 가지 농도의 검체를 대상으로 측정한 검사 내 정밀도의 변이계수는 낮은 농도부터 각각 1.59%, 1.63%, 1.07%로 모두 우수하였다. 검사일 간 정밀도의 변이계수와 총 정밀도의 변이계수는 높은 농도에서는 각각 5.65%와 5.6%로 우수한 결과를 나타내었으나 특히 1:400으로 희석한 낮은 농도에서는 변이계수가 매우 컸는데(Table 1), 이는 타액 내의 아밀라제 값이 낮을 때 시간이 지날수록 측정값이 유의하게 감소하였기 때문이었다.

2. 직선성

1:100으로 희석한 값을 기준으로 다른 희석배수의 검체에 대하여 기대값을 구했을 때 측정값은 기대값에 대하여 $Y=1.034X-18.133$ 의 식을 가지며, R^2 은 0.999로 직선성이 유지되었다

Table 1. Precision of salivary amylase at 3 concentrations

Level (dilution)	N	Mean (U/L)	SD	CV (%)		
				Within-run	Between-day	Total
Low (1:400)	20	40.85	30.55	1.59	76.84	76.84
Mid (1:200)	20	181.1	27.23	1.63	15.39	15.31
High (1:100)	20	477.55	26.5	1.07	5.65	5.6

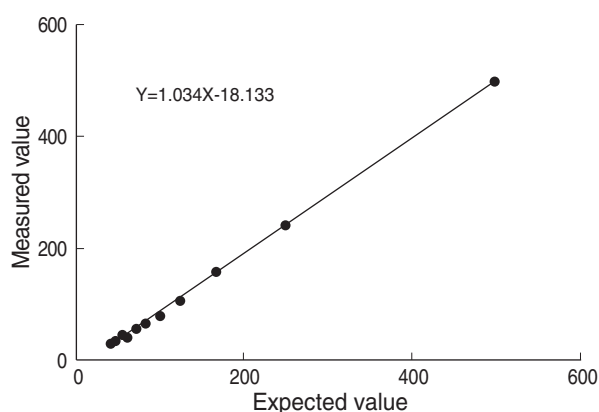


Fig. 1. Linearity of salivary amylase.

(Fig. 1).

3. Salivette의 부피 복원력

6개의 흘려 받은 타액을 각각 Salivette의 면구에 2 mL, 1.5 mL, 1 mL, 0.5 mL씩 넣었을 때 부피 복원 정도는 각각 $85.5 \pm 2.4\%$, $82.4 \pm 1.5\%$, $72.2 \pm 3.1\%$, $49.3 \pm 4.4\%$ 였다. 복원 정도는 분주한 타액 부피에 따라 유의한 차이를 나타내었으며 특히 0.5 mL을 분주하였을 때는 복원력이 50% 이하였으므로 Salivette을 이용할 때는 적어도 1 mL 이상의 부피가 필요함을 알 수 있었다($P < 0.01$) (Fig. 2).

4. Salivette의 아밀라제 복원력

6개의 흘려 받은 타액을 증류수로 1:200으로 희석한 아밀라제 값은 137.7 ± 60.3 U/L였고, 각각 Salivette의 면구에 2 mL, 1.5 mL, 1 mL, 0.5 mL씩 분주해 만든 검체의 아밀라제 값은 각각 105.8 ± 40.5 U/L, 98.8 ± 38.6 U/L, 46.3 ± 30.1 U/L, 12.3 ± 14.4 U/L였다. 면구에 분주한 타액은 흘려 받은 것에 비해 $78.9 \pm 10.9\%$, $74.1 \pm 13.7\%$, $37.3 \pm 26.9\%$, $10.2 \pm 12.6\%$ 가 복원되었다(Fig. 3). 아밀라제 복원력은 타액의 부피에 따라 유의한 차이를 나타내었으며($P < 0.01$) Salivette을 이용하여 채취한 타액으로 아밀라제를 측정할 때는 적어도 1.5 mL 이상은 필요함을 알 수 있었다.

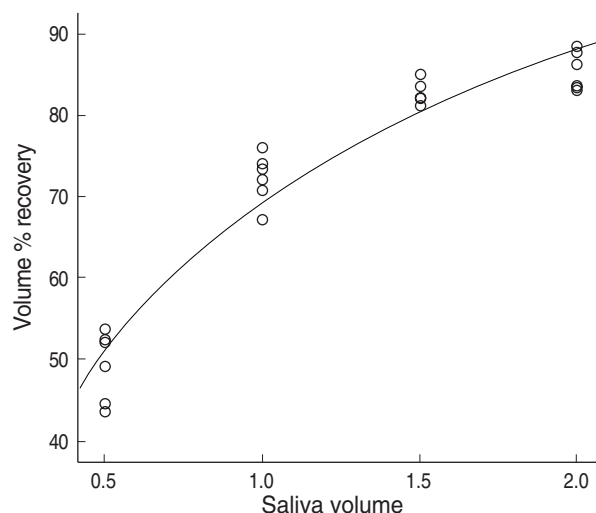


Fig. 2. Recovery of saliva volume from Salivettes. Line: Logarithmic curve.

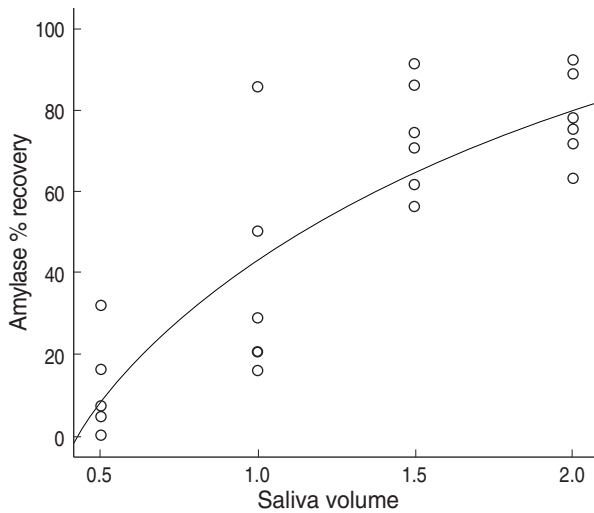


Fig. 3. Recovery of salivary amylase from Salivettes. Line: Logarithmic curve.

5. 타액 채취 방법 비교

13명을 대상으로 Salivette 면구를 씹어서 얻은 타액과 흘려 받은 타액을 모두 증류수로 1:200 희석한 아밀라제 값은 각각 191.1 ± 71.7 U/L와 132.0 ± 65.4 U/L로 Salivette을 이용한 값이 유의하게 높았으나($P < 0.01$) 상관계수는 0.757로 상관성은 우수하였다(Fig. 4).

6. 검체 보관에 따른 비교

세 가지 농도의 검체에 대하여 10일 동안 실온과 냉장 보관하며 측정한 결과, 보관 온도에 따라서는 아밀라제의 값은 유의한 차이가 없었다($P = 0.136$). 그러나 낮은 농도의 타액 아밀라제는 날짜가 지남에 따라 유의하게 감소함을 알 수 있었다($P < 0.01$) (Fig. 5).

고 찰

타액은 검체를 얻기가 용이하다는 것이 가장 큰 장점으로 이미 여러 검사에 이용되고 있다. 더구나 타액의 아밀라제는 고압 산소에 노출되거나 자전거, 트레드밀 운동 등의 신체적인 스트레스나 정신적인 스트레스에 반응하여 증가하는 물질로서 그 측정이 중요시되고 있다[1-3]. 타액 내 아밀라제는 타액선에서 만들어져 구강 내 점막에서 국소적으로 분비되므로, 전신적인 혈액 내 농도를 반영하지 않으며 위장관의 상태를 나타내는 것은 아니다. 정상적인 구강의 건강 상태하에서 타액의 아밀라제는

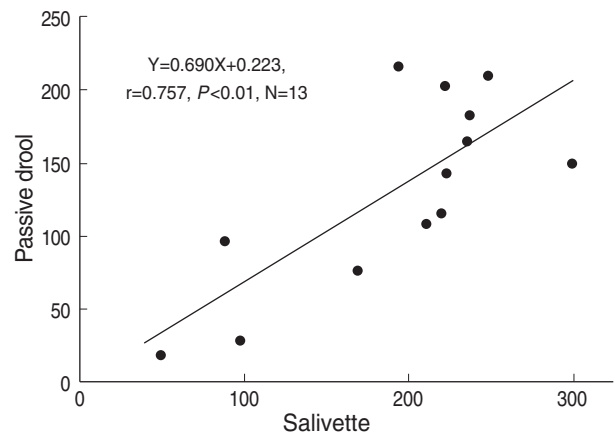


Fig. 4. Comparison of salivary amylase between collection of saliva by Salivette and passive drooling. All samples are diluted at 1:200 with distilled water.

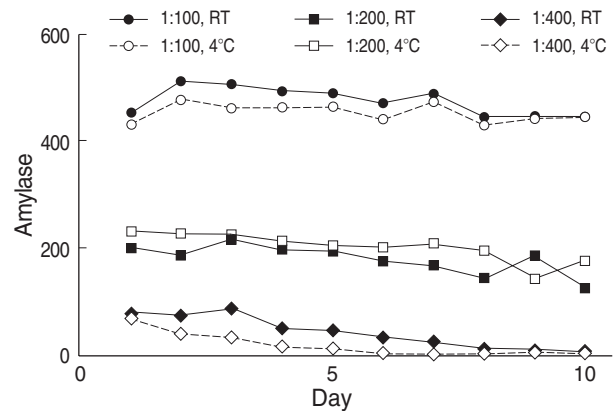


Fig. 5. Stability of Amylase of 3 concentrations kept in the room temperature and 4°C during 10 days.

혈액 내 농도에 비해 매우 높으므로[9] 자동화분석기를 이용하여 측정하기 위해서는 타액을 적절하게 희석하는 것이 필요하다.

저자들은 타액을 1:100, 1:200, 그리고 1:400으로 희석하여 정밀도를 평가한 결과, 검사 내 정밀도의 변이계수는 모두 Harmon 등[15]이 보고한 7.5%보다 우수하였으나 타액을 1:400으로 희석하였을 때는 날짜가 지남에 따라 아밀라제의 값이 점차 감소하여 검사일 간 정밀도가 매우 좋지 않았다. 타액 아밀라제의 경우 자동화분석기에서 사용할 수 있는 정도 관리 물질이 없고, 1,000 U/L의 검체가 실온에서 값이 안정하다는 DeCare [14]의 보고가 있어 본 연구에서도 환자 검체를 실온 상태에 두고 정밀도를 측정하게 되었다. 그러나 Fig. 5에서 보면 아밀라제는 온도에는 영향을 받지 않았으나 날짜가 지남에 따라 저농도 검체는 값이 감소하는 문제를 발견하게 되었고 따라서 오차를 줄이기 위해서는 타액을 해동하여 처리한 날 검사하는 것이

좋을 것으로 생각되었다. 1:100에서 1,1200까지 희석한 검체로 측정할 직선성은 우수하므로 당일 해동한 검체를 희석하는 것은 문제가 없을 것이다.

타액을 채취하기 위한 여러 방법 중 최근에 가장 많이 이용하는 것이 Salivette이다. 그러나 타액 내의 물질들을 측정함에 있어 Salivette의 면구로 인한 간섭현상이 보고[18]되고 있으므로 저자들은 Salivette의 면구의 복원력을 살펴 보았다. 타액과 증류수를 각각 2 mL, 1.5 mL, 1 mL를 분주하였을 때는 70% 이상의 부피 복원력을 보였으나 0.5 mL를 분주하였을 때는 50% 정도였으며, 이는 Harmon 등[19]의 보고와 유사한 결과였다. 아밀라제의 복원력에서 저자들은 2 mL, 1.5 mL를 분주하였을 때 각각 $78.9 \pm 10.9\%$, $74.1 \pm 13.7\%$ 였으나 1 mL에서는 37.3%로 매우 낮았다. DeCaro [14]의 연구에서 1 mL, 0.5 mL를 분주하였을 때 복원력은 저자들의 결과보다 우수하였으나 큰 편차를 보였다. Salivette 면구에 분주한 검체량과 복원력 사이에는 유의한 상관성을 보여, 면구가 타액으로 포화상태로 적셔진다고 해도 복원력은 100% 미만이며 검체량이 적을수록 복원력이 낮으므로 Salivette을 이용할 때는 검체량이 적어도 1.5 mL 이상 필요함을 알 수 있었다.

이렇게 Salivette의 복원력이 100% 미만임에도 불구하고 저자들의 결과에서 Salivette 면구를 씹어서 얻은 검체가 흘려 받은 검체에 비해 아밀라제가 유의하게 높았는데 이는 Salivette의 면구를 1분 동안 씹는 동작을 하는 것이 타액 내 아밀라제의 분비를 더욱 촉진하였고 또한 면구의 위치가 이하선의 개구부와 좀 더 가까웠던 점 등에 의한 것으로 생각되었다. Harmon [15]은 이하선에서 나오는 타액의 아밀라제가 턱밑샘과는 별 차이가 없었으나 혀밑샘보다는 더 높다고 하여 타액을 채취하는 위치에 따라서도 차이가 있음을 보여 주었다.

Salivette과 같이 면 성분을 사용할 때는 물 분자가 면 성분에 잔류하여 타액이 농축되거나 반대로 타액 내에서 측정하고자 하는 물질이 면 성분에 축적될 수 있고 특히 면역측정법에서는 면 성분에서 나온 물질들이 교차반응을 일으킬 수 있으므로 [13] 주의가 필요하다는 지적들이 있다. 이미 더욱 간편하게 스트립에 타액을 묻혀 아밀라제를 측정하는 이동형 장비가 개발되어 이러한 문제들을 해결하고 있다[20, 21].

타액 내 아밀라제는 환경적, 정신적 요인에 따라 개인 간에는 차이가 크지만 개인 내에서는 비교적 안정된 값을 보인다[9]. 흡연, 음주, 운동 그리고 수분 섭취 등에 따라 영향을 받고 일주기에 따라서도 그 값에 차이가 있으므로, 타액 내의 성분을 정확히 측정하기 위해서는 타액 채취 전 음식물 섭취, 흡연, 운동을 제한하고 채취시간을 통일하는 것이 필요하다.

저자들의 경험에서는 Salivette 면구를 씹어서 검체를 얻는 것이 흘려 받는 것보다 더 간편하고 피검자들도 부담을 느끼지 않아 편안하게 채취할 수 있었다. 검체 채취에 따른 오차 요인을 줄인다면 Salivette을 이용하여 채취한 타액의 아밀라제 측정은 임상적으로 유용한 검사가 될 것으로 생각되었다.

요 약

배경 : 타액은 구강 건강 상태뿐만 아니라 전신 질환을 반영하는 지표로서 그 이용이 점차 증가되고 있다. 특히 타액 내 아밀라제는 최근 정신적인 스트레스에 대한 자율신경계의 반응지표로서 많은 연구가 이루어졌다. 저자들은 최근 많이 사용되고 있는 Salivette (Sarstedt, Germany)으로 채취한 타액의 아밀라제 검사에 대해 평가하여 보았다.

방법 : 건강한 성인 13명을 대상으로 오전 10시에서 11시 사이에 타액을 채취하였다. 대상자들은 Salivette의 면구를 1분간 부드럽게 씹었고, 모든 검체는 즉시 냉동 보관하였다. 검사 당일 검체를 원심분리한 다음 증류수로 희석하였다. 타액 아밀라제는 Dimension RxL Max (Dade Behring Inc., USA)로 측정하였다. 정밀도, 직선성과 복원력을 평가하였고, Salivette과 흘려 받은 타액 간의 아밀라제 비교, 검체 보관 온도에 따른 비교를 시행하였다.

결과 : 세 가지 농도의 검체를 대상으로 측정한 검사 내 정밀도 변이계수는 모두 우수하였다. 검사일 간 정밀도 변이계수와 총정밀도 변이계수는 높은 농도와 중간 농도에서만 우수한 결과를 나타내었다. 직선성은 모든 희석단계에서 우수하였다. Salivette에 타액 2 mL, 1.5 mL, 1 mL 분주 시 부피 복원력은 각각 $85.5 \pm 2.4\%$, $82.4 \pm 1.5\%$, $72.2 \pm 3.1\%$ 였고, 아밀라제 복원력은 $78.9 \pm 10.9\%$, $74.1 \pm 13.7\%$, $37.3 \pm 26.9\%$ 였다. Salivette으로 채취한 타액과 흘려 받은 타액의 아밀라제는 유의한 차이가 있었지만 상관성은 우수하였다($r=0.757$). 보관 온도에 따라서는 아밀라제의 값의 유의한 차이가 없었다.

결론 : Salivette을 이용하여 채취한 타액에서 아밀라제를 측정하는 것은 검사 내 변이계수와 직선성이 우수하므로 유용하게 사용될 수 있다. 70% 이상의 복원력을 얻기 위해서는 적어도 1.5 mL 이상의 타액이 필요하다.

참고문헌

1. Streckfus CF and Bigler LR. Saliva as a diagnostic fluid. Oral Dis 2002;8:69-76.

2. Lawrence HP. Salivary markers of systemic disease: noninvasive diagnosis of disease and monitoring of general health. *J Can Dent Assoc* 2002;68:170-4.
3. Kaufman E and Lamster IB. The diagnostic applications of saliva--a review. *Crit Rev Oral Biol Med* 2002;13:197-212.
4. Nater UM, Rohleder N, Gaab J, Berger S, Jud A, Kirschbaum C, et al. Human salivary alpha-amylase reactivity in a psychosocial stress paradigm. *Int J Psychophysiol* 2005;55:333-42.
5. Nater UM, La Marca R, Florin L, Moses A, Langhans W, Koller MM, et al. Stress-induced changes in human salivary alpha-amylase activity--associations with adrenergic activity. *Psychoneuroendocrinology* 2006;31:49-58.
6. Takai N, Yamaguchi M, Aragaki T, Eto K, Uchihashi K, Nishikawa Y. Effect of psychological stress on the salivary cortisol and amylase levels in healthy young adults. *Arch Oral Biol* 2004;49:963-8.
7. Gordis EB, Granger DA, Susman EJ, Trickett PK. Asymmetry between salivary cortisol and alpha-amylase reactivity to stress: relation to aggressive behavior in adolescents. *Psychoneuroendocrinology* 2006;31:976-87.
8. van Stegeren A, Rohleder N, Everaerd W, Wolf OT. Salivary alpha amylase as marker for adrenergic activity during stress: effect of betablockade. *Psychoneuroendocrinology* 2006;31:137-41.
9. Granger DA, Kivlighan KT, el-Sheikh M, Gordis EB, Stroud LR. Salivary alpha-amylase in biobehavioral research: recent developments and applications. *Ann N Y Acad Sci* 2007;1098:122-44.
10. Noto Y, Sato T, Kudo M, Kurata K, Hirota K. The relationship between salivary biomarkers and state-trait anxiety inventory score under mental arithmetic stress: a pilot study. *Anesth Analg* 2005;101:1873-6.
11. Ehlert U, Erni K, Hebisch G, Nater U. Salivary alpha-amylase levels after yohimbine challenge in healthy men. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91:5130-3.
12. Chicharro JL, Lucia A, Perez M, Vaquero AF, Urena R. Saliva composition and exercise. *Sports Med* 1998;26:17-27.
13. Granger DA, Kivlighan KT, Fortunato C, Harmon AG, Hibel LC, Schwartz EB, et al. Integration of salivary biomarkers into developmental and behaviorally-oriented research: problems and solutions for collecting specimens. *Physiol Behav* 2007;92:583-90.
14. DeCaro JA. Methodological considerations in the use of salivary alpha-amylase as a stress marker in field research. *Am J Hum Biol* 2008;20:617-9.
15. Harmon AG, Towe-Goodman NR, Fortunato CK, Granger DA. Differences in saliva collection location and disparities in baseline and diurnal rhythms of alpha-amylase: a preliminary note of caution. *Horm Behav* 2008;21.
16. Nater UM, Rohleder N, Schlotz W, Ehlert U, Kirschbaum C. Determinants of the diurnal course of salivary alpha-amylase. *Psychoneuroendocrinology* 2007;32:392-401.
17. Schirtcliff EA, Granger DA, Schwartz E, Curran MJ. Use of salivary biomarkers in biobehavioral research: cotton-based sample collection methods can interfere with salivary immunoassay results. *Psychoneuroendocrinology* 2001;26:165-73.
18. Crouch DJ. Oral fluid collection: the neglected variable in oral fluid testing. *Forensic Sci Int* 2005;150:165-73.
19. Harmon AG, Hibel LC, Rumyantseva O, Granger DA. Measuring salivary cortisol in studies of child development: watch out--what goes in may not come out of saliva collection devices. *Dev Psychobiol* 2007;49:495-500.
20. Yamaguchi M, Kanemori T, Kanemaru M, Takai N, Mizuno Y, Yoshida H. Performance evaluation of salivary amylase activity monitor. *Biosens Bioelectron* 2004;20:491-7.
21. Yamaguchi Y, Deguchi M, Wakasugi J, Ono S, Takai N, Higashi T, et al. Hand-held monitor of sympathetic nervous system using salivary amylase activity and its validation by driver fatigue assessment. *Biosens Bioelectron* 2006;21:1007-14.