

Kadar Kortisol Saliva Menggambarkan Kadar Kortisol Serum Pasien Dermatitis Atopik

(Salivary Cortisol Levels Representing Serum Cortisol Levels in Atopic Dermatitis Patients)

Novia Indriyani Adisty, Marsudi Hutomo, Diah Mira Indramaya

Departemen/Staf Medik Fungsional Ilmu Kesehatan Kulit dan Kelamin

Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga/Rumah Sakit Umum Daerah Dr. Soetomo Surabaya

Abstrak

Latar belakang: Dermatitis atopik (DA) merupakan kelainan kulit beradang kronis, kumat-kumatan dengan lesi yang khas dan distribusi lesi spesifik sesuai fase. Pasien dengan penyakit alergi telah diketahui memiliki variasi pola kortisol. Disfungsi aksis hipotalamus-pituitari-adrenal (HPA) dan peran kortisol telah banyak diteliti pada pasien DA. Kortisol bebas yang dikeluarkan korteks adrenal dianggap aktif secara biologis, dimana akan berdifusi pasif ke semua cairan tubuh termasuk saliva. Keuntungan lain pemeriksaan saliva adalah bersifat noninvasif, bebas stres, dan mudah dilakukan dimana saja. **Tujuan:** Menganalisis korelasi antar kadar kortisol serum dan kortisol saliva pada pasien DA. **Metode:** Penelitian analitik, observasional, potong lintang terhadap 29 pasien DA yang dilakukan pengambilan sampel darah dan saliva dengan metode "passive drooling" yang dilakukan pada jam 08.00-09.00 untuk melihat kadar kortisol serum dan kortisol saliva. **Hasil:** Rerata kadar kortisol serum pasien DA pada 29 pasien adalah 6,703,82g/dL, dan rerata kadar kortisol saliva pasien DA adalah 1,430,96g/dL. Persamaan kortisol saliva = $0,471+0,142*\text{kortisol serum}$ ($R^2=28,5\%$). **Simpulan:** Kenaikan kadar kortisol serum pasien DA mengakibatkan kenaikan kadar kortisol saliva. Metode pengambilan saliva dengan cara "passive drooling" mampu menggambarkan kadar kortisol serum sebesar 28,5%.

Kata kunci: dermatitis atopik, kortisol serum, kortisol saliva.

Abstract

Background: Atopic dermatitis (AD) is a chronic inflammatory skin disorder, recurrent lesion with a distinctive and specific distribution of lesions according phases. Patients with allergic diseases have been known to have a variety of patterns of cortisol. Dysfunction of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis and the role of cortisol has been studied in patients with DA. Free cortisol adrenal cortex is considered biologically active, which passively diffuses into all body fluids including saliva. Another advantage is the saliva examination is non-invasive, stress free and easy to do anywhere. **Purpose:** To analyze the correlation between levels of serum cortisol and salivary cortisol in patients with AD. **Methods:** Analytical, observational, cross-sectional study of the 29 AD patients who underwent blood and saliva samples by the method of "passive drooling" conducted on the hour 8:00 to 9:00 to see the levels of serum cortisol and salivary cortisol. **Results:** Twenty-nine subjects revealed mean serum cortisol levels 6,703,82g/dL, mean salivary cortisol levels was 1,430,96g/dL. Equation of salivary cortisol = $0,471+0,142*\text{serum cortisol}$ ($R^2=28,5\%$). **Conclusions:** The increasing of serum cortisol level of AD patients will result in increased levels of cortisol in saliva. Saliva collection methods by "passive drooling" were able to describe the serum cortisol levels at 28,5%.

Key words: atopic dermatitis, serum cortisol, salivary cortisol.

Alamat korespondensi: Novia Indriyani Adisty Departemen/Staf Medik Fungsional Ilmu Kesehatan Kulit dan Kelamin Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga/Rumah Sakit Umum Daerah Dr. Soetomo, Jl. Mayjen Prof. Dr. Moestopo No 6-8 Surabaya 60131, Indonesia. Telepon: +62315501609, e-mail: dr.Disty@yahoo.co.id

PENDAHULUAN

Dermatitis atopik (DA) merupakan penyakit inflamasi kulit yang bersifat kronis, kambuh-kambuhan, yang berhubungan dengan gejala atopi lainnya seperti rhinitis alergi, konjungtivitis alergi, dan asma.¹ Prevalensi DA telah meningkat selama 30 tahun terakhir

ini. DA sering dimulai pada awal masa bayi, sekitar 45% dari semua kasus dimulai dalam 6 bulan pertama kehidupan, 60% pada tahun pertama kehidupan, dan 85% sebelum usia 5 tahun.²

Patogenesis DA adalah multifaktorial. Beberapa factor predisposisi, imunopatogen, dan faktor-faktor

pencetus terlibat dalam patogenesis DA. Faktor predisposisi diantaranya adalah genetic dan adanya gangguan fungsi kulit. Sedangkan factor imunopatogen adalah adanya disfungsi sel T, ekspresisitokin bifasik, dan pengeluaran imunoglobulin E. Faktor mikrobial, interaksi psikosomatis, alergen, bahan iritan, makanan dan iklim merupakan factor pencetus yang dapat memunculkan gejala DA.³ Disfungsi aksishipotalamus-pituitari-adrenal (HPA) dan peran kortisol telah banyak diteliti pada pasien dengan DA, walau hingga saat ini belum ada jawaban pasti tentang pertanyaan tentang DA berat yang menyebabkan penurunan terhadap kadarkortisol serum atau penurunan kadarkortisol serum yang menyebabkan DA yang berat.⁴

Kortisol merupakan hormone kortikosteroid endogen yang merupakan hasil akhir pengaktifan aksis HPA. Pasien dengan penyakit alergi memiliki variasi pola kadar kortisol basal dan respon kortisol terhadap stres. Pelepasan sitokin proinflamasi yang berlangsung lama dapat menurunkan respon HPA melalui peningkatan umpan balik negative terhadap peningkatan kadar kortisol endogen atau dengan kata lain pada penyakit inflamasi kronis seperti pada DA akan terjadi pergeseran respon aksis HPA dari hiperreaktif menjadi hiporeaktif.³

Sekitar 95% kortisol yang dikeluarkan korteks adrenal akan terikat dengan protein besar yang disebut *corticosteroid binding globulin* (CBG) dan albumin untuk dibawa keseluruh tubuh dalam darah. Hanya sebagian kecil kortisol yang tidak terikat atau kortisol bebas yang dianggap aktif secara biologis. Dengan berat molekul yang rendah dan sifat lipofiliknya, kortisol bebas akan masuk kedalam sel secara difusi pasif sehingga dimungkinkan untuk mengukur jumlah kortisol bebas dari semua cairan tubuh termasuk saliva.⁵ Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi kadar kortisol serum dan kortisol saliva serta korelasi antara kadar kortisol serum dan kadar kortisol saliva pada pasien DA.

METODE

Penelitian ini merupakan penelitian analitik observasional dengan bentuk potong lintang yang bertujuan untuk mengevaluasi kadar kortisol serum dan kortisol saliva pada pasien DA, dan korelasi antara kadar kortisol serum dengan kortisol saliva pada pasien DA dengan besar sampel sebesar 29 pasien. Sampel penelitian adalah pasien DA yang memenuhi kriteria

penerimaan sampel penelitian, yaitu pasien DA yang memenuhi kriteria diagnosis DA menurut kriteria Hanifin-Rajka, berusia 10 tahun, dan bersedia untuk mengikuti penelitian dan menandatangani *informed consent*. Kriteria penolakan sampel adalah pasien yang menggunakan kortikosteroid sistemik dalam 1 bulan terakhir, dengan penyakit infeksi berat/kronis (tuberkulosis paru, diabetes melitus, HIV, sepsis), mengonsumsi obat-obat kontrasepsi (estrogen, progesteron) dan ketokonazol dalam 1 bulan terakhir, dan pasien hamil atau menyusui.

Pengambilan sampel dilakukan dengan cara *consecutive sampling*. Pengambilan sampel darah dan saliva dilakukan pada pagi hari jam 08.00–09.00, dilakukan pemeriksaan laboratorium di Rumah Sakit Penyakit Tropik dan Infeksi Universitas Airlangga Surabaya. Kadar kortisol serum dan saliva diperiksa menggunakan DBC kortisol kit dengan metode kompetitif ELISA. Nilai normal kadar kortisol serum adalah 3,95–27,23g/dL, sedangkan kadar normal kortisol saliva adalah 0,5–2,16g/dL.

HASIL

Sampel penelitian berjumlah 29 orang yang terdiri dari 25 pasien wanita (86,2%) dan 4 pasien laki-laki (13,8%). Jumlah pasien terbanyak terdapat pada kelompok umur 30–34 tahun (20,7%). Pekerjaan pasien terbanyak yaitu bekerja swasta sebanyak 13 orang (44,8%), sedangkan pelajar/mahasiswa sebanyak 10 orang (34,5%). Lama keluhan sakit terbanyak yaitu <6 minggu sebanyak 16 orang (55,2%) disusul dengan 6 minggu–6 bulan sebanyak 9 orang (31%).

Tabel 1. Distribusi riwayat atopi serta jenis atopi pada pasien DA dan keluarga

| Anamnesis | Jumlah (%) n=29 |
|----------------------|--------------------|
| Riwayat atopi : | |
| Pasien sendiri | 7 (24,1) |
| Keluarga | 8 (27,6) |
| Pasien & keluarga | 6 (20,7) |
| Tanpa riwayat atopi | 8 (27,6) |
| Jenis atopi pasien | |
| Asma | 3 (23,1) |
| Rhinitis | 10 (76,9) |
| Jenis atopi keluarga | |
| Dermatitis atopik | 5 (35,7) |
| Asma | 5 (35,7) |
| Rhinitis | 7 (50) |

Keterangan: satu keluarga dapat memiliki lebih dari satu jenis atopi

Tabel 1 menunjukkan bahwa 21 pasien DA memiliki riwayat atopi positif baik pada dirinya sendiri, keluarga atau diri sendiri dan keluarga. Jenis atopi terbanyak pada pasien dan keluarga yaitu rhinitis alergi (RA) masing-masing sebesar 76,9% dan 50%.

Tabel 2. Distribusi lokasi lesi berdasar usia pasien DA (n=29)

| Lokasi Lesi berdasar usia | DA remaja (n=2) | DA dewasa (n=27) |
|---------------------------|-----------------|------------------|
| Lipatan siku | 0 | 10 |
| Lipatan lutut | 0 | 3 |
| Tangan | 0 | 4 |
| Kaki | 2 | 7 |
| Wajah | 0 | 3 |
| Badan | 0 | 10 |
| Lain-lain : | | |
| - Leher | 0 | 8 |
| - Lengan | 1 | 11 |
| - Tungkai | 1 | 11 |
| - Putingsusu | 0 | 2 |

Keterangan: satu pasien dapat memiliki lebih dari satu lokasi lesi

Tabel 2 menunjukkan bahwa pada kelompok DA remaja didapatkan distribusi lokasi lesi terbanyak yaitu pada kaki, sedangkan pada kelompok DA dewasa lokasi terbanyak pada lengan dan tungkai disusul dengan lipatan siku dan badan.

Dari hasil penelitian ini didapatkan kadar kortisol serum tertinggi 15,29µg/dL terendah 0,346µg/dL, sedangkan kadar kortisol saliva tertinggi 3,23µg/dL, dan terendah 0,02µg/dL. Semua data berdistribusi normal sehingga analisis statistik korelasi dilakukan menggunakan uji korelasi Pearson dengan hasil korelasi kadar kortisol saliva terhadap kadar kortisol serum adalah $p=0,002$ ($p<0,05$).

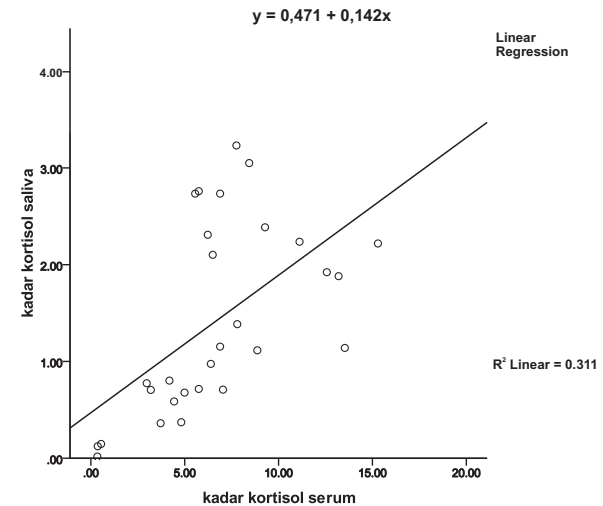
Tabel 3 dan Gambar 1 menunjukan analisis regresi linier untuk mengetahui hubungan antara kadar kortisol saliva dengan kadar kortisol serum dan memprediksikan kadar kortisol serum dengan menggunakan kadar kortisol saliva pada pasien DA tanpa penyakit kronis dan infeksi (tuberkulosis, diabetes melitus, sepsis, dan HIV). Diperoleh persamaan kortisol saliva = $0,471+0,142*\text{kortisol serum}$ ($R^2=28,5\%$). *Adjusted R*² sebesar 28,5% artinya kemampuan kortisol saliva untuk menjelaskan kortisol serum sebesar 28,5%. Koefisien korelasi kortisol saliva sebesar 0,558 yang berarti memiliki kekuatan korelasi positif sedang.

PEMBAHASAN

Hasil penelitian terhadap 29 pasien DA didapatkan

Tabel 1. Distribusi riwayat atopi serta jenis atopi pada pasien DA dan keluarga

| Parameter | Hasil |
|-------------------------|---|
| Persamaan | Kortisol saliva = $0,471 + 0,142 * \text{kortisol serum}$ |
| Adjusted R ² | 28,5% |
| Koefisien korelasi | Kortisol saliva = 0,558 |



Gambar 1. Diagram *scatter* korelasi kadar kortisol saliva terhadap kadar kortisol serum

jumlah pasien DA dengan jenis kelamin wanita lebih banyak daripada pria dengan rasio pria dan wanita adalah 1:6,25. Dalam beberapa tahun terakhir, tercatat bahwa anak perempuan lebih sering menderita DA daripada anak laki-laki, tapi Verboom et al. menunjukkan bahwa sampai usia 6 tahun, kedua jenis kelamin dikatakan memiliki prevalensi yang sama. Selanjutnya, prevalensi DA pada anak perempuan lebih tinggi dibanding anak laki-laki.⁶ Beberapa penelitian DA dewasa menunjukkan bahwa prevalensi pada wanita lebih tinggi daripada pria, terutama pada orang dewasa muda. Walaupun demikian tidak ada temuan yang mendukung bahwa jenis kelamin dapat meningkatkan resiko terjadinya DA.^{7,8}

Prevalensi DA dewasa mengalami peningkatan antara 1-3% pada berbagai populasi.^{9,10} Penelitian ini mengelompokkan pasien berdasarkan kategori usia menurut *World Health Organization* (WHO). Kelompok usia terbanyak adalah 30-34 tahun sebanyak 6 orang (20,7%). Pasien termuda adalah 14 tahun, tertua 69 tahun dan rata-rata usia 33,24 tahun (SD14,52).

Kriteria penegakan diagnosis DA oleh Hanifin dan Rajka merupakan baku emas penegakan DA. Salah satu

kriteria mayor DA adalah perjalanan penyakit yang kronis atau kambuh-kambuhan.¹¹ Pada penelitian ini lama keluhan sakit terbanyak yaitu <6 minggu sebanyak 16 orang (55,2%), dan 6 minggu–6 bulan sebanyak 9 orang (31,0%).

Riwayat atopi positif pada pasien (24,1%), keluarga (27,6%) atau pasien dan keluarga (20,7%). Jenis atopi terbanyak pada pasien dan keluarga yaitu RA masing-masing sebesar 76,9% dan 50% (Tabel 1). Hal ini sesuai dengan literatur yang menyebutkan bahwa lebih dari 70% pasien DA memiliki riwayat penyakit atopi pada keluarga yang positif. Kemungkinan kejadian DA meningkat hingga 2-3 kali lebih tinggi pada anak yang memiliki 1 orang tua dengan DA, dan hal ini meningkat hingga 3-5 kali bila kedua orang tua menderita DA. Riwayat DA pada ibu dikatakan lebih berperan dalam mencetuskan DA.¹² Terreehorst I melaporkan tingginya prevalensi RA pada penelitian terhadap 325 pasien atopik, didapatkan 34% terdiagnosis RA.¹³

Gambaran klinis DA tergantung pada onset terjadinya penyakit. Fase remaja terjadi pada anak berumur 4 hingga 16 tahun, lesi berkembang secara simetris dengan lokasi terbanyak pada area lipatan, tangan, dan kaki. Fase dewasa (usia > 16 tahun) dengan ciri-ciri lesi berada pada wajah, badan bagian atas, area lipatan, dan tangan.^{1,9} Saat keluhan yang muncul merupakan kelanjutan dari DA fase anak, penegakan diagnosis biasanya mudah dilakukan dan gambaran klinisnya khas. Kesulitan timbul bila onset terjadinya penyakit muncul setelah remaja atau lebih karena morfologi dan gambarannya tidak khas, walaupun dermatitis fleksural masih bisa ditemui. Tungkai merupakan lokasi terbanyak pada kelompok DA dewasa dalam penelitian ini. Distribusi lesi di area ekstensor dapat ditemui pada DA dewasa dan hal ini menunjukkan prognosis yang buruk dengan pengobatan standar.^{6,14}

Hormon kortisol diklasifikasikan sebagai kortikosteroid karena disintesis dalam korteks adrenal. Pelepasan kortisol diatur melalui mekanisme umpan balik aksis HPA. Ketika aksis HPA diaktifkan oleh sinyal otak maka akan dilepaskan *corticotropin-releasing hormone* (CRH) pada tingkat hipotalamus. CRH kemudian merangsang pelepasan *adrenocorticotrophic hormone* (ACTH) pada tingkat kelenjar pituitari. ACTH dilepaskan ke dalam sirkulasi umum dan berfungsi untuk merangsang pelepasan kortisol dari korteks adrenal. Ketika kortisol dilepaskan ke dalam sirkulasi, ia akan berfungsi sebagai umpan

balik negatif dengan memberikan sinyal penghambatan pada tingkat hipotalamus, pituitari, dan hipokampus. Hormon steroid dapat masuk ke dalam saliva melalui berbagai mekanisme namun jalur yang paling umum adalah melalui difusi cepat melalui sel-sel asinar yang konsentrasinya tidak bergantung pada kecepatan laju saliva. Steroid juga dapat masuk ke dalam saliva melalui darah atau plasma dari luka lecet pada rongga mulut atau langsung dari bahan makanan oleh kontaminasi dengan steroid eksogen.^{15,16}

Keuntungan utama pemeriksaan saliva adalah bersifat noninvasif, bebas stres, dan bisa dilakukan secara berulang saat pengambilan darah sulit untuk dikerjakan. Selain itu, tidak memerlukan pelatihan atau peralatan khusus dan pasien dengan mudah dapat mengumpulkan sampelnya sendiri.¹⁷ Terdapat beberapa metode cara pengambilan sampel saliva. Metode yang paling sering digunakan adalah pengambilan saliva melalui *cotton swab* (Salivette®) dan “*passive drooling*” ke dalam pot steril. Metode “*passive drooling*” merupakan salah satu metode yang direkomendasikan karena harganya murah dan bisa dilakukan untuk mengukur hampir semua bahan analit. Keuntungan metode ini mampu memberikan sampel yang murni, volume sampel yang besar, dan mudah dilakukan. Kelemahannya dapat mengandung mucin dan menimbulkan bau saat pengambilan. Metode pengambilan sampel saliva yang lain adalah dengan menggunakan bahan penyerap seperti pada Salivette®. Kelebihan metode itu adalah dapat menyaring makro partikel yang tidak dibutuhkan dalam pemeriksaan, dan tidak menimbulkan bau. Kekurangannya adalah volume saliva yang diperoleh sangat sedikit dan tidak dapat digunakan pada anak dibawah usia 6 tahun karena risiko tertelan, saliva dari bahan penyerap harus segera dilakukan sentrifugasi dan dibekukan pada suhu -20°C atau lebih untuk meminimalisasi siklus beku dan mencair.^{5,18}

Metode pemeriksaan ELISA yang digunakan dalam penelitian ini adalah ELISA kompetitif. Hal utama ELISA kompetitif adalah proses reaksi kompetitif antara antigen sampel dan antigen berlabel enzim pada lempengan mikrotiter dengan antibodi primer. Proses pencucian akan melepaskan antibodi yang tidak terikat. Setelah proses pencucian, substrat enzim ditambahkan. Reaksi enzimatik akan berakhir dengan penambahan *stopping solution*. Pembacaan dilakukan dengan menggunakan *microtiter plate reader*. Perubahan warna yang muncul menggambarkan

konsentrasi kortisol dalam sampel.¹⁹

Beberapa penelitian menunjukkan bahwa metode pengambilan sampel memiliki dampak terhadap kadar kortisol saliva. Eva Maria dan kawan-kawan menyimpulkan bahwa metode pengambilan saliva dengan perantara Salivette® lebih unggul dibanding dengan "passive drooling".^{20,21} Gallagher dan kawan-kawan pada studinya menunjukkan kadar kortisol plasma lebih tinggi secara signifikan dibanding dengan kadar kortisol saliva dengan kedua metode, dan kadar kortisol saliva dengan Salivette® lebih tinggi secara signifikan dibanding dengan "passive drooling".^{20,22} Hal yang mungkin dapat menjelaskan penyebab kortisol saliva dalam penelitian ini hanya mampu menjelaskan kortisol serum sebesar 28,5% adalah oleh karena keterbatasan dalam metode yang digunakan saat pengambilan sampel saliva. Cotton swab (Salivette®) saat ini belum tersedia di Indonesia, sehingga kami menggunakan metode "passive drooling" dalam proses pengambilan sampel saliva. Dengan segala keuntungan dan kerugian yang dimiliki oleh kedua metode pengambilan saliva diatas, mungkin hal inilah yang dapat menggambarkan kondisi akhir yang didapat.

KEPUSTAKAAN

1. Remitz A, Reitamo S. The clinical manifestations of atopic dermatitis. In: Reitamo S, Luger TA, Steinhoff M, editors. Textbook of atopic dermatitis. London: Informa; 2008. p.1-12.
2. Watson W, Kapur S. Atopic dermatitis. Allergy Asthma Clin Immunol 2011; 7(Suppl 1): S4.
3. Nutan, Kanwar AJ, Bhansali A, Parsad D. Evaluation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis in patients with atopic dermatitis. Indian J Dermatol Venereol Leprol 2011; 77: 288-93.
4. Fukuda H, Suzuki T, Saotome A, Sode E, Mukai H. Efficacy of inpatient treatment for atopic dermatitis evaluated by changes in serum cortisol levels. J Dermatol 2013; 40: 43-7.
5. Salimetrics. Saliva collection and handling advice. 3rd ed. London: Salimetrics; 2012.
6. Weber AS, Haidinger G. The prevalence of atopic dermatitis in children is influenced by their parents education: results of two cross-sectional studies conducted in Upper Austria. Pediatr Allergy Immunol 2010; 21: 1028-35.
7. Sinclair W, Aboobaker J, Jordaan F, Modi D, Todd G. Management of atopic dermatitis in adolescents and adults in South Africa. S Afr Med J 2008; 98: 301-20.
8. Medendorp HV, Noordermeer SA, Koomen CB, Weller MB. Sick leave and factors influencing sick leave in adults patients with atopic dermatitis: a cross-sectional study. J Clin Med 2015; 4: 535-47.
9. Leung DYM, Eichenfield LF, Boguniewicz M. Atopic dermatitis (atopic eczema). In: Goldsmith LA, Katz SI, Gilchrist BA, Paller AS, Leffell DJ, Wolff K, editors. Fitzpatrick's dermatology in general medicine. 8th ed. New York: McGraw-Hill Companies; 2012. p.165-82.
10. Kanwar AJ, Narang T. Adult onset atopic dermatitis: under-recognized or under-reported. IDOJ 2013; 4: 167-71.
11. Carson CG. Risk factors for developing atopic dermatitis. Dan Med J 2013; 60: 1-24.
12. Eichenfield LF, Tom WL, Chamlin SL, Feldman SR, Hanifin JM, Simpson EL, et al. Guidelines of care for the management of atopic dermatitis. Section 1. Diagnosis and assessment of atopic dermatitis. J Am Acad Dermatol 2014; 70: 338-51.
13. Terreehorst I, Oosting AJ, Pavlica T, Monchy JGR, Koomen MB, Hak E, et al. Prevalence and severity of allergic rhinitis in house dust mite-allergic patients with bronchial asthma or atopic dermatitis. Clin Exp Allergy 2002; 32: 1160-5.
14. Correale CE, Walker C, Murphy L, Craig TJ. Atopic dermatitis: a review of diagnosis and treatment. Am Fam Physician 1999; 60: 1191-8
15. Brandt. Steroid biosynthesis and regulation of cortisol production. In: Nussey S, Whitehead S, editors. Endocrinology: An integrated approach. Oxford: BIOS Scientific Publishers; 2011. p. 19-33.
16. Sudheimer KD. The effects of cortisol on emotion (dissertation). Michigan: The University of Michigan; 2009.
17. Lewis JG. Steroid analysis in saliva: An overview. Clin Biochem Rev 2006; 27: 139-46.
18. Chiappin S, Antonelli G, Gatti R, De Palo EF. Saliva specimen: a new laboratory tool for diagnostic and basic investigation. Clinica Chimica Acta 2007; 383: 30-40.
19. Sino Biological. Indirect ELISA, conventional but efficient. China: Sino Biological Inc; 2012.
20. Poll EM, Andermahr IK, Langejuergen Y, Stanzel S, Gilsbach JM, Gressner A, et al. Saliva collection method affects predictability of serum cortisol. Clinica Chimica Acta 2007; 382: 15-9.
21. Strazdins L, Meyerkort S, Brent V, D'Souza RM,

- Broom DH, Kyd JM, et al. Impact of saliva collection methods on sIgA and cortisol assays and acceptability to participants. *J Immunol Methods* 2005; 307: 167-71.
22. Gallagher P, Leitch MM, Massey AE, Williams RHM, Young AH. Assessing cortisol and dehydroepiandrosterone (DHEA) in saliva: effects of collection method. *J Psychopharmacology* 2006; 20: 643-9.