

**Instructions for use**  
**a-Amylase Saliva ELISA**

Please use only the valid version of the Instructions for use provided with the kit

**REF****SA E-6900****IVD****CE**

**INTENDED USE**

Enzyme immunoassay for the in vitro determination of alpha amylase in human saliva.

















**INDICATION**

Test system for the in vitro determination of alpha amylase in human saliva for the diagnosis of conditions associated with overproduction of alpha-amylase, such as suspected mental and physical stress, stress-related psychosomatic diseases, pain syndrome (fibromyalgia), and monitoring of the disease course and therapy in stress-related conditions.

**PRINCIPLES OF THE TEST**

The ELISA test kit provides a quantitative in vitro assay for free alpha amylase in human saliva. The test kit contains microtiter strips each with 8 break-off reagent wells coated with anti-rabbit antibodies. In the first reaction step, diluted patient samples are pipetted into the reagent wells together with peroxidase-labelled alpha-amylase and a specific rabbit anti-alpha amylase antibody. Alpha amylase from the patient sample and the labelled alpha amylase in the conjugate compete for the free binding sites of the specific antibody. In the third incubation step, the bound peroxidase catalyses a colour reaction with the peroxidase substrate tetramethyl benzidine (TMB). The intensity of the colour formed is inversely proportional to the concentration of alpha amylase in the sample. The results for the samples are determined using the standard curve.

**CONTENTS OF THE TEST KIT**

Component	Colour	Format	Symbol	REF
<b>1. Microplate wells coated with antibodies</b> 12 microplate strips each containing 8 individual break-off wells in a frame, ready for use	---	12 x 8		SA E-6931
<b>2. Standard A</b> , 0 U/ml, ready for use	light red to dark red	1 x 1.0 ml		SA E-6901
<b>3. Standard B</b> , 10 U/ml, ready for use		1 x 1.0 ml		SA E-6902
<b>4. Standard C</b> , 30 U/ml, ready for use		1 x 1.0 ml		SA E-6903
<b>5. Standard D</b> , 80 U/ml, ready for use		1 x 1.0 ml		SA E-6904
<b>6. Standard E</b> , 200 U/ml, ready for use		1 x 1.0 ml		SA E-6905
<b>7. Standard F</b> , 500 U/ml, ready for use		1 x 1.0 ml		SA E-6906
<b>8. Control 1</b> , ready for use	green	1 x 1.0 ml		SA E-6951
<b>9. Control 2</b> , ready for use	blue	1 x 1.0 ml		SA E-6952
<b>10. Antiserum</b> polyclonal anti-alpha amylase antibody (rabbit), ready for use	yellow	1 x 12 ml		SA E-6910
<b>11. Enzyme conjugate</b> peroxidase-labelled alpha amylase, ready for use	blue	1 x 12 ml		SA E-6940
<b>12. Sample buffer</b> , ready for use	light blue	1 x 100 ml		SA E-6913
<b>13. Wash buffer</b> , 10x concentrate	colourless	1 x 100 ml		SA E-6930
<b>14. Chromogen/substrate solution</b> TMB/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , ready for use	colourless	1 x 12 ml		SA E-6955
<b>15. Stop solution</b> 1 N acidic solution, ready for use	colourless	1 x 12 ml		SA E-6980
Hazards identification: 	H290 May be corrosive to metals. H314 Causes severe skin burns and eye damage.			
<b>16. Protective foil</b>	---	3 pieces		
<b>17. Test instruction</b>	---	1 booklet		
<b>18. Quality control certificate</b>	---	1 protocol		

## **PREPARATION AND STABILITY OF THE REAGENTS**

**Note:** All reagents must be brought to room temperature (+18°C to +25°C) approx. 30 minutes before use. After first use, the reagents are stable until the indicated expiry date if stored at +2°C to +8°C and protected from contamination, unless stated otherwise below.

- **Coated wells:** Ready for use. Tear open the re-sealable protective wrapping of the microplate at the recesses above the grip seam. Do not open until the microplate has reached room temperature to prevent the individual strips from moistening. Immediately replace the remaining wells of a partly used microplate in the protective wrapping and tightly seal with the integrated grip seam (Do not remove the desiccant bag). Once the protective wrapping has been opened for the first time, the wells coated with antibodies can be stored in a dry place and at a temperature between +2°C and +8°C for 4 months.
- **Standards and controls:** Ready for use. The reagents must be mixed thoroughly before use.
- **Enzyme conjugate:** Ready for use. The enzyme conjugate must be mixed thoroughly before use.
- **Antiserum:** Ready for use. The antiserum must be mixed thoroughly before use.
- **Sample buffer:** Ready for use.
- **Wash buffer:** The wash buffer is a 10x concentrate. If crystallization occurs in the concentrated buffer, warm it to 37°C and mix well before diluting. The quantity required should be removed from the bottle using a clean pipette and diluted with deionized or distilled water (1 part reagent plus 9 parts distilled water).  
For example: For 1 microplate strip, 5 ml concentrate plus 45 ml water.  
The working strength wash buffer is stable for 4 weeks when stored at +2°C to +8°C and handled properly.
- **Chromogen/substrate solution:** Ready for use. Close the bottle immediately after use, as the contents are sensitive to light. The chromogen/substrate solution must be clear on use. Do not use the solution if it is blue coloured.
- **Stop solution:** Ready for use.

**Warning:** Some of the reagents contain the toxic agent sodium azide. Avoid skin contact.

## **STORAGE AND STABILITY**

The test kit has to be stored at a temperature between +2°C to +8°C. Do not freeze. Unopened, all test kit components are stable until the indicated expiry date.

## **WASTE DISPOSAL**

Patient samples, standards, controls and incubated microplate strips should be handled as infectious waste. All reagents must be disposed of in accordance with local disposal regulations.

## **PREPARATION AND STABILITY OF THE PATIENT SAMPLES**

### **Sample material**

Human saliva (total saliva). The manufacturer recommends collecting saliva samples with blue cortisol Salivette® (Sarstedt AG & Co, Germany).

### **Stability**

**Patient samples** to be investigated can generally be stored at +2°C to +8°C for up to 14 days. Diluted samples should be incubated within one working day.

### **Sample dilution**

**Patient samples** are diluted **1:201** sample buffer.

For example: 5 µl sample to 1.0 ml sample buffer and mix well by vortexing (sample pipettes are not suitable for mixing).

**NOTE:** Standards and controls are prediluted and ready for use, do not dilute them.

## INCUBATION

<b>Sample incubation:</b> (1. step)	Transfer <b>20 µl of the standards, controls and diluted patient samples</b> into the individual microplate wells according to the pipetting protocol.
	Pipette <b>100 µl of enzyme conjugate solution</b> (peroxidase-labelled alpha-amylase) into each of the microplate wells. Pipette <b>100 µl of antiserum solution</b> (polyclonal anti-alpha amylase antibody) into each of the microplate wells. Cover the microplate wells with the protective foil provided and incubate for <b>60 minutes</b> on a <b>microplate shaker (400 U/min)</b> at room temperature (+18 °C to +25 °C).
<b>Washing:</b>	<u>Manual:</u> Empty the wells and subsequently wash 3 times using 300 µl of working strength wash buffer for each wash. <u>Automatic:</u> Wash reagent wells 3 times with 450 µl working strength wash buffer (program setting: e.g. TECAN Columbus Washer "Overflow Modus").
	Leave the wash buffer in each well for 30 to 60 seconds per washing cycle, then empty the wells. After washing (manual and automated tests), thoroughly dispose of all liquid from the microplate by tapping it on absorbent paper with the openings facing downwards to remove all residual wash buffer.
	<u>Note:</u> Residual liquid (> 10 µl) remaining in the reagent wells after washing can interfere with the substrate and lead to false low extinction values. Insufficient washing (e.g., less than 3 wash cycles, too small wash buffer volumes, or too short reaction times) can lead to false high extinction values.
<b>Substrate incubation:</b> (2. step)	Pipette <b>100 µl of chromogen/substrate solution</b> into each of the microplate wells. Incubate for <b>15 minutes</b> at room temperature (+18°C to +25°C). Protect from direct sunlight.
<b>Stopping the reaction:</b>	Pipette <b>100 µl of stop solution</b> into each of the microplate wells in the same order and at the same speed as the chromogen/substrate solution was introduced.
<b>Measurement:</b>	<b>Photometric measurement</b> of the colour intensity should be made at a <b>wavelength of 450 nm</b> and a reference wavelength between 620 nm and 650 nm <b>within 30 minutes of adding the stop solution</b> . Prior to measuring, slightly shake the microplate to ensure a homogeneous distribution of the solution.

## PIPETTING PROTOCOL

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	<b>Std A</b>	<b>P 1</b>	<b>P 9</b>	<b>P 17</b>								
B	<b>Std B</b>	<b>P 2</b>	<b>P 10</b>	<b>P 18</b>								
C	<b>Std C</b>	<b>P 3</b>	<b>P 11</b>	<b>P 19</b>								
D	<b>Std D</b>	<b>P 4</b>	<b>P 12</b>	<b>P 20</b>								
E	<b>Std E</b>	<b>P 5</b>	<b>P 13</b>	<b>P 21</b>								
F	<b>Std F</b>	<b>P 6</b>	<b>P 14</b>	<b>P 22</b>								
G	<b>Co1</b>	<b>P 7</b>	<b>P 15</b>	<b>P 23</b>								
H	<b>Co2</b>	<b>P 8</b>	<b>P 16</b>	<b>P 24</b>								

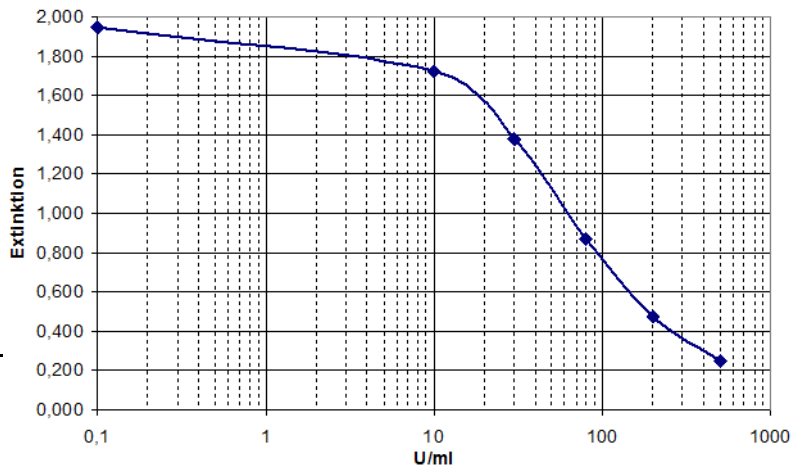
The pipetting protocol for microtiter strips 1-4 is an example for the **quantitative analysis** of 24 patient samples (P 1 to P 24).

The standards (Std A-Std F), the controls 1+2 (Co1 + Co2), and the patient samples have each been incubated in one well. The reliability can be improved by duplicate determinations for each sample.

The controls serve as internal controls for the reliability of the test procedure. They should be assayed with each test run.

## CALCULATION OF RESULTS

**Quantitative:** The standard curve from which the alpha-amylase concentration of antibodies in the unknown serum samples can be taken is obtained by point-to-point plotting of the extinction values measured for the 6 calibration sera against the corresponding units (linear/log). Use "4-parameter logistics" plotting for calculation of the standard curve by computer. For correct logarithmic representation it might be necessary to set the concentration of Standard A to e.g. 0.1 U/ml. The following plot is an example of a typical calibration curve. Please do not use this curve for the determination of alpha-amylase concentrations in patient samples.



If the extinction of a patient sample lies above the value of Standard F (500 U/ml), the result should be given as ">500 U/ml". It is recommended that the sample be re-tested at a dilution of e.g. 1:401 instead of 1:201. The result in U/ml read from the calibration curve for this sample must then be multiplied by a factor of 2. For duplicate determinations the mean of the two values should be taken. If the two values deviate substantially from one another the sample should be retested. Therapeutic decisions should not be made on the basis of results from this test, but only under consideration of clinical findings and further diagnostic values. For diagnosis, the clinical symptoms of the patient should always be taken into account along with the serological results.

## TEST CHARACTERISTICS

### Calibration

The standards and controls are calibrated gravimetrically. For every group of tests performed, the values of the concentrations must lie within the limits stated for the relevant test kit lot. A quality control certificate containing these reference values is included. If the values specified for the controls are not achieved, the test results may be inaccurate and the test should be repeated. The activity of the enzyme used is temperature-dependent and the extinction values may vary if a thermostat is not used. The higher the room temperature during substrate incubation, the greater will be the extinction values. Corresponding variations apply also to the incubation times. However, the standards are subject to the same influences, with the result that such variations will be largely compensated in the calculation of the result.

### Antibodies

A polyclonal anti-alpha amylase antibody is used, which specifically detects alpha amylase in human saliva.

### Linearity

The linearity of the ELISA was determined by assaying 4 serial dilutions of 3 saliva samples. The linear regression was calculated and  $R^2$  amounts to  $> 0.95$  in all samples. The Alpha Amylase Saliva ELISA is linear at least in the tested concentration range (12 to 500 U/ml).

### Detection limit

The lower detection limit is defined as the mean value of an analyte-free sample plus three times the standard deviation and is the smallest detectable alpha amylase concentration. The detection limit of the Alpha Amylase Saliva ELISA is 3.6 U/ml.

### Cross reactivity

This ELISA specifically detects alpha amylase in human saliva. Cross reactions with other amylases are listed in the table below:

Cross reactant	%
Alpha amylase in human saliva	100
Porcine pancreatic alpha amylase	< 0.23
Alpha amylase from Bacillus sp.	< 0.01

### Interference

Contamination with blood up to a concentration of 4.0 % (v/v) did not cause interference with the ELISA. Red tint of the alpha-amylase sample indicates significant contamination with blood. The sample should not be used. We recommend taking a new sample at a later stage instead. Sodium azide can be added as preservative agent. A concentration of up to 0.9% has no effect on the measurement result.

### Reproducibility

The reproducibility of the test was investigated by determining the intra- and inter-assay coefficients of variation using 3 samples. The intra-assay CVs are based on 20 determinations and the inter-assay CVs on duplicate determinations performed in 5 different runs.

<i>Intra-assay variation, n = 20</i>			<i>Inter-assay variation, n = 2 x 5</i>		
Saliva	Mean value (U/ml)	CV (%)	Saliva	Mean value (U/ml)	CV (%)
1	100	4.9	1	23	9.6
2	148	3.6	2	105	4.2
3	242	5.5	3	234	4.8

### CORRELATION

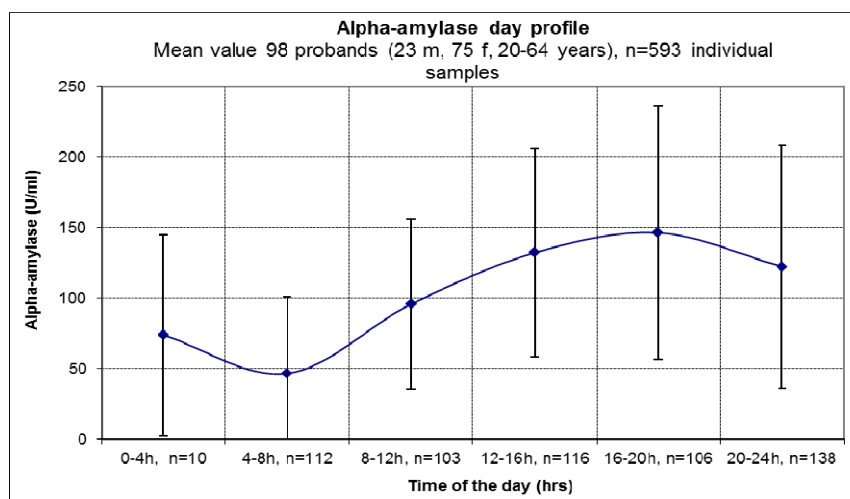
A comparison of the Alpha Amylase Saliva ELISA with several reference tests yielded the following correlation values (sample range of 0-958 U/ml):

Salimetrics, Alpha amylase enzymatic test	<b>EI = 1.04 x Salimetrics - 1.56 U/ml</b> <b>n = 38; R<sup>2</sup> = 0.982</b>
---	--

**Reference range:** 593 saliva samples from healthy adults between 20 and 64 years of age (75 women, 23 men) were analysed using the Alpha Amylase Saliva ELISA.

<b>Alpha amylase concentration (n = 98 test persons, measured between 0 a.m. and 12 p.m.)</b>			
		Mean value	Standard deviation
Time of day	n=	U/ml	
0-4 a.m.	9	73.8	71.4
4-8 a.m.	113	46.5	54.8
8-12 a.m.	104	95.7	60.2
12-4 p.m.	119	132.2	73.8
4-8 p.m.	108	146.3	89.9
8-12 p.m.	140	122.2	86.2
n total=	593		

Standard values can be determined from the measured average diurnal profile. They agree with data from the literature (Rohleder, 2004, Ann. N.Y. Acad. Sci. 1032: 258-263).



Every laboratory should use their own normal values established under specific ambient conditions.

## **CLINICAL SIGNIFICANCE**

The Alpha Amylase Saliva ELISA (sAA ELISA) is designed for the determination of the alpha amylase concentration in saliva depending on the mental burden, particularly stress, of the patient [1, 2].

The enzyme alpha amylase is a digestive ferment which cleaves polysaccharides (long carbohydrate chains) such as "vegetable starch" (amylose and amylopectin, which are found for example in flour) and "animal starch" (glycogen, which occurs in the liver and muscles) into smaller sugar molecules (e.g. malt sugar and other so-called disaccharides) via hydrolysis of 1,4- $\alpha$ -D-glycoside bonds. Three isoforms of alpha amylase are produced in the salivary glands, especially of the ear, and two in the pancreas. They are released into the mouth or duodenum. Some smaller amounts also enter the blood stream.

The relationship between mental/psychiatric stress and physical health was not well researched or measured using scientific methods until the end of the 20th century, and particularly the beginning of the 21st century [2, 3]. Significantly, autoimmune diseases, tumours (particularly carcinoma) and possibly also allergies are often caused by acute or long duration of mental stress in addition to genetic components (gene mutation) and noxious substances (e.g. virus infections).

Today it is possible to measure mental or psychosocial stress, in addition to physical stress, by objective and reproducible determination of antibody and enzyme concentrations (biological stress markers) in saliva using immunological test methods. The effect of stress sensors on the immune system can be assessed reliably, easily and economically without the need to carry out complicated tests such as the investigation of catecholamines, cortisol, lactoferrin, IL-2, IL-6 or IL-12 or heart frequency analysis [1, 2, 3, 4, 6].

Like the Secretory IgA ELISA (sIgA ELISA), the Alpha Amylase Saliva ELISA (sAA ELISA) is a test for measuring the degree of the individual physiopathological effect of stress (stress reactivity) in saliva samples [1, 2, 3, 4, 5, 7]. The concentration of sAA is independent of the amount of saliva produced [8].

The effect of stress on the functioning of inner organs via the autonomic nervous system is explained by the association of sAA secretion with the activity of the autonomic (sympathetic and parasympathetic) nervous system [2, 4]. Thus, stress (e.g. school stress, harassment, etc.), which can be measured indirectly using sAA ELISA, can cause psychosomatic diseases such as cardiovascular symptoms [2, 3].

It is significant that the enzyme level (alpha amylase) in saliva is directly proportional to the immunoglobulin level (IgA) and is direct proportional to the degree of stress [3, 9, 10]. An increased sAA titer can also occur in parotitis, independently of mental stress.

In adults, the sAA peak is achieved 10 to 20 minutes after the onset of physical stress, in children much earlier (after approx. 5 minutes) [9]. With psychosocial stress the sAA titer generally increases later [6, 9]. The sAA level starts to decrease approx. 10 minutes after the stress has subsided [3].

Since stress is a multidimensional condition and sAA results may be affected by nicotine or caffeine intake, different physiological systems should be analysed for diagnosis using saliva tests, e.g. sAA ELISA combined with sIgA ELISA [1, 3]. As an additional test, the concentration of cortisol, the most potent human corticoid, can be determined in saliva. The production of sAA is independent of pancreatic alpha amylase synthesis. Furthermore, the serum alpha amylase level is not directly linked to the sAA concentration.

The effectiveness of psychotherapeutic stress therapy and drug-therapy for the treatment of autonomic stress responses (e.g. using beta blockers) can be monitored by investigation of the sAA titer [11].

Indication for the use of the Alpha Amylase Saliva ELISA (non-invasive measuring of the stress psychobiology in saliva) [2, 3]:

1. Suspected clinical cases of
  - stress (physical and/or mental/psychosocial)
  - stress-related psychosomatic disease
  - pain syndrome (e.g. fibromyalgia)
2. Monitoring of disease course and therapy success in stress-related diseases







## **LITERATURE REFERENCES**

1. Allwood MA, Handwerker K, Kivlighan KT, Granger DA, Stroud LR. **Direct and moderating links of salivary alpha-amylase and cortisol stress-reactivity to youth behavioral and emotional adjustment.** Biol Psychol 2011 Jul 21.
2. Nater UM, La Marca R, Florin L, Moses A, Langhans W, Koller MM, Ehlert U. **Stress-induced changes in human salivary alpha-amylase activity -associations with adrenergic activity.** Psychoneuroendocrinology 31 (2006) 49-58.
3. 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 1098 (2007) 122-144.
4. Bosch JA, Veerman EC, de Geus EJ, Proctor GB.  **$\alpha$ -Amylase as a reliable and convenient measure of sympathetic activity: don't start salivating just yet!** Psychoneuroendocrinology 36 (2011) 449-453.
5. EUROIMMUN AG. Stöcker W, Schlumberger W. **Alle Beiträge zum Thema Autoimmundiagnostik.** In: Gressner A, Arndt T (Hrsg.) Springer Lexikon Klinische Chemie. **Medizinische Labordiagnostik von A-Z.** Springer Medizin Verlag, Heidelberg 1 (2007).
6. Engert V, Vogel S, Efanov SI, Duchesne A, Corbo V, Ali N, Pruessner JC. **Investigation into the cross-correlation of salivary cortisol and alpha-amylase responses to psychological stress.** Psychoneuroendocrinology 2011 Apr 4.

7. Brandtzaeg P. **Do salivary antibodies reliably reflect both mucosal and systemic immunity?** Ann N Y Acad Sci 1098 (2007) 288-311.
8. Rohleder N, Wolf JM, Maldonado EF, Kirschbaum C. **The psychosocial stress-induced increase in salivary alpha-amylase is independent of saliva flow rate.** Psychophysiology 43 (2006) 645-652.
9. Capranica L, Lupo C, Cortis C, Chiodo S, Cibelli G, Tessitore A. **Salivary cortisol and alpha-amylase reactivity to taekwondo competition in children.** Eur J Appl Physiol 2011 Jun 4.
10. Wang D, Zhuo JQ, Zhao MP. **A simple and rapid competitive enzyme-linked immunosorbent assay (cELISA) for high-throughput measurement of secretory immunoglobulin A (sIgA) in saliva.** Talanta 82 (2010) 432-436.
11. van Stegeren A, Rohleder N, Everaerd W, Wolf OT. **Salivary alpha amylase as marker for adrenergic activity during stress: effect of betablockade.** Psychoneuroendocrinology 31 (2006) 137-141.

Please use only the valid version of the Instructions for Use provided with the kit

**Symbols:**

	Storage temperature		Manufacturer		Contains sufficient for <n> tests
	Expiry date	<b>LOT</b>	Batch code	<b>IVD</b>	For in-vitro diagnostic use only!
	Consult instructions for use	<b>CONT</b>	Content	<b>CE</b>	CE labelled
	Caution	<b>REF</b>	Catalogue number		



**INDIKATION**

Testsystem zur In-vitro-Bestimmung von Alpha-Amylase in menschlichem Speichel zur Diagnostik von Erkrankungen, die mit einer Überproduktion von Alpha-Amylase assoziiert sind, wie z. B. psychischer und physischer Stress, Schmerz-Syndrom (Fibromyalgie), und zur Verlaufs- und Therapie-Kontrolle einer Stress-Krankheit.

**KLINISCHE BEDEUTUNG**

Der Alpha-Amylase Saliva ELISA (sAA ELISA) dient dem Nachweis der Alpha-Amylase-Konzentration im Mundspeichel in Abhängigkeit von der psychischen Belastung, insbesondere der Stress-Belastung eines Patienten [1, 2].

Das Enzym Alpha-Amylase ist ein Verdauungsferment, das Polysaccharide (lange Kohlenhydratketten) wie „pflanzliche Stärke“ (Amylose und Amylopektin, Vorkommen z.B. im Mehl) und „tierische Stärke“ (Glykogen, Vorkommen in Leber und Muskel) in kleinere Zuckermoleküle (z.B. Malzzucker und andere sog. Disaccharide) über die Hydrolyse von 1,4- $\alpha$ -D-Glykosidbindungen spaltet [3, 4, 5]. Drei Isoformen der Alpha-Amylase werden in den Speicheldrüsen, vor allem in den Ohrspeicheldrüsen, gebildet, zwei weitere Isoformen in der Bauchspeicheldrüse. Sie werden in den Mund bzw. in den Zwölffingerdarm abgegeben. Kleinere Mengen treten auch ins Blut über.

Erst Ende des 20. und insbesondere Anfang des 21. Jahrhunderts ist es gelungen, den Zusammenhang zwischen psychischen/psychiatrischen Belastungssituationen und physischem Gesundheitszustand zu objektivieren und mit naturwissenschaftlichen Methoden messbar zu machen [2, 3]. Hierbei ist von Bedeutung, dass als Auslöser einer Autoimmunerkrankung oder eines Tumors (insbes. eines Karzinoms), möglicherweise auch einer Allergie, neben einer genetischen Komponente (Genmutation) und einer Noxe (z.B. Virusinfekt) eine akute oder länger andauernde psychische Ausnahmesituation verantwortlich ist.

Mithilfe immunologischer Testverfahren ist es nun möglich geworden, neben physischem Stress seelische Belastungen, insbesondere psychischen/psychosozialen Stress, durch Nachweis von Antikörper- und Enzym-Konzentrationen (biologische Stress-Marker) im Mundspeichel objektiv und reproduzierbar zu messen und die Auswirkungen von Stressoren auf das Immunsystem sicher, einfach und ökonomisch zu beurteilen, ohne komplizierte Untersuchungen wie Bestimmung von Katecholaminen, Cortisol, Laktoferrin, IL-2, IL-6 und IL-12, Herzfrequenzanalyse etc. durchführen zu müssen [1, 2, 3, 4, 6].

Neben dem sekretorischen IgA ELISA (sIgA ELISA) ist der Alpha-Amylase Saliva ELISA (sAA ELISA) ein weiterer Test, der es gestattet, aus einer Mundspeichelprobe indirekt das Ausmaß der individuellen physiopathologischen Wirkung von Stress (Stress-Reaktivität) messbar zu machen [1, 2, 3, 4, 5, 7]. Die Konzentration von sAA ist unabhängig von der Menge des produzierten Speichels [8].

Da die Sekretion von sAA mit der Aktivität des vegetativen (sympathischen und parasympatischen) Nervensystems assoziiert ist, ist der Einfluss von Stress über das autonome Nervensystem auf die Funktion der inneren Organe gegeben [2, 4]. Somit kann Stress (z.B. Schulstress oder Mobbing), indirekt messbar mittels sAA ELISA, psychosomatische Erkrankungen mit z.B. kardiovaskulären Symptomen auslösen [2, 3].

Hierbei ist von Bedeutung, dass im Speichel der Enzym Spiegel (Alpha-Amylase) direkt proportional zum Immunglobulinspiegel (IgA) aber umgekehrt proportional zur Stressbelastung ist [3, 9, 10]. Unabhängig von einer psychischen Ausnahmesituation kann ein erhöhter sAA-Titer auch bei einer Ohrspeicheldrüsen-Entzündung (Parotitis) auftreten.

Bei Erwachsenen wird der sAA-Peak 10 bis 20 Minuten nach Einsetzen des physischen Stress erreicht, bei Kleinkindern deutlich früher (nach ca. 5 Minuten) [9]. Bei psychosozialen Stress setzt der sAA-Titer-Anstieg im Allgemeinen später ein [6, 9]. Der Abfall des sAA-Spiegels beginnt ca. 10 Minuten nach Ende der Stressbelastung [3].

Da Stress ein multidimensionale Belastung darstellt, ist zur Diagnosesicherung die Messung verschiedener physiologischer Systeme mittels Mundspeichel-Tests, z.B. sAA ELISA plus sIgA ELISA, angezeigt, da das sAA-Messergebnis beispielsweise durch Nikotin- oder Coffein-Abusus beeinflusst (erhöht) sein kann [1, 3]. Ergänzend lässt sich die Konzentration von Cortisol, dem potentesten humanen Corticoid, im Mundspeichel testen. Die Bildung der sAA erfolgt unabhängig von der Pankreas-Alpha-Amylase-Synthese; der Serum-Alpha-Amylase-Spiegel steht auch nicht in direktem Zusammenhang mit der sAA-Konzentration.

Die Wirkungen psychotherapeutischer Stress-Behandlung und medikamentöser Therapie vegetativer Stressreaktionen (z.B. mit Betablocker) lassen sich anhand der Höhe des sAA-Titers kontrollieren [11].

Indikationsspektrum für den Alpha-Amylase Saliva ELISA (nicht-invasive Messung der Psychobiologie von Stress im Speichel) [2, 3]:

1. Klinischer Verdacht auf:
  - Stress (physisch und/oder psychisch/psychosozial)
  - stressbedingte psychosomatische Erkrankung
  - Schmerz-Syndrom (z.B. Fibromyalgie)
2. Verlaufs- und Therapie-Kontrolle einer Stress-Krankheit

### **TESTPRINZIP**

Der vorliegende ELISA-Testsatz dient der quantitativen In-vitro-Bestimmung von Alpha-Amylase in humanem Speichel. Die Testpackung enthält Mikrotiterstreifen zu je 8 vereinzelbaren Reagenzgefäßen, die mit Anti-Kaninchen-Antikörpern beschichtet sind. In die Reagenzgefäße werden im ersten Analyseschritt verdünnte Patientenproben zusammen mit Peroxidase-markierter Alpha-Amylase und einem spezifischen Kaninchen-anti-Alpha-Amylase-Antikörper pipettiert. Die Alpha-Amylase aus der Patientenprobe konkurriert dabei mit der markierten Alpha-Amylase aus dem Konjugat um die freien Bindungsplätze des spezifischen Antikörpers. Die gebundene Peroxidase katalysiert in einem dritten Inkubationsschritt mit dem Peroxidase-Substrat Tetramethyl-Benzidin (TMB) eine Farbreaktion. Die Intensität der gebildeten Farbe ist dabei umgekehrt proportional zur Alpha-Amylase-Konzentration in den Proben. Die Ergebnisse der Proben werden anhand einer Standardkurve bestimmt.

### **INHALT EINER TESTPACKUNG**

Bezeichnung	Farbe	Format	Symbol	REF
<b>1. Antikörper-beschichtete Reagenzgefäße</b> 12 Mikrotiterstreifen zu je 8 vereinzelbaren Reagenzgefäßen im Rahmen, gebrauchsfertig	---	12 x 8		SA E-6931
<b>2. Standard A</b> , 0 U/ml, gebrauchsfertig	hellrot bis dunkelrot	1 x 1,0 ml		SA E-6901
<b>3. Standard B</b> , 10 U/ml, gebrauchsfertig		1 x 1,0 ml		SA E-6902
<b>4. Standard C</b> , 30 U/ml, gebrauchsfertig		1 x 1,0 ml		SA E-6903
<b>5. Standard D</b> , 80 U/ml, gebrauchsfertig		1 x 1,0 ml		SA E-6904
<b>6. Standard E</b> , 200 U/ml, gebrauchsfertig		1 x 1,0 ml		SA E-6905
<b>7. Standard F</b> , 500 U/ml, gebrauchsfertig		1 x 1,0 ml		SA E-6906
<b>8. Kontrolle 1</b> , gebrauchsfertig	grün	1 x 1,0 ml		SA E-6951
<b>9. Kontrolle 2</b> , gebrauchsfertig	blau	1 x 1,0 ml		SA E-6952
<b>10. Antiserum</b> polyklonaler Anti-Alpha-Amylase-Antikörper (Kaninchen), gebrauchsfertig	gelb	1 x 12 ml		SA E-6910
<b>11. Enzymkonjugat</b> Peroxidase-markierte Alpha-Amylase, gebrauchsfertig	blau	1 x 12 ml		SA E-6940
<b>12. Probenpuffer</b> , gebrauchsfertig	hellblau	1 x 100 ml		SA E-6913
<b>13. Waschpuffer, 10fach konzentriert</b>	farblos	1 x 100 ml		SA E-6930
<b>14. Chromogen/Substrat-Lösung</b> TMB/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , gebrauchsfertig	farblos	1 x 12 ml		SA E-6955
<b>15. Stopplösung</b> , 0,5 M Schwefelsäure, gebrauchsfertig	farblos	1 x 12 ml		SA E-6980
Mögliche Gefahren:	<p>H290 Kann gegenüber Metallen korrosiv sein. H314 Verursacht schwere Verätzungen der Haut und schwere Augenschäden.</p>			
<b>16. Abdeckfolie</b>	---	3 Stück		
<b>17. Arbeitsanleitung</b>	---	1 Heft		
<b>18. Qualitätskontrollzertifikat</b>	---	1 Protokoll		

## **VORBEREITUNG UND HALTBARKEIT DER REAGENZIEN**

**Hinweis:** Sämtliche Reagenzien müssen ca. 30 Minuten vor Gebrauch auf Raumtemperatur (+18 °C bis +25 °C) gebracht werden. Nach erstmaligem Öffnen sind die Reagenzien bis zum angegebenen Verfallsdatum haltbar, wenn sie bei +2 °C bis +8 °C gelagert und gegen Kontamination geschützt werden und es im nachfolgenden Text nicht ausdrücklich anders beschrieben ist.

### **Kitinhalt**

- 1. Beschichtete Reagenzgefäße:** Gebrauchsfertig. Die wiederverschließbare Schutzhülle der Mikrotiterplatte an den Einkerbungen oberhalb der Gripnaht aufreißen. Schutzhülle erst öffnen, wenn der Inhalt Raumtemperatur angenommen hat, damit die Präparate nicht feucht werden! Nicht gebrauchte Reagenzgefäße einer angebrochenen Mikrotiterplatte sofort wieder in die Schutzhülle legen und mit der integrierten Gripnaht dicht verschließen (Trockenbeutel nicht entfernen). Nach dem erstmaligen Öffnen der Schutzhülle sind die Antikörper-beschichteten Reagenzgefäße trocken bei +2 °C bis +8 °C gelagert 4 Monate lang haltbar.
- 2. Standards und Kontrollen:** Gebrauchsfertig. Die Reagenzien sind vor Gebrauch gründlich zu durchmischen.
- 3. Enzymkonjugat:** Gebrauchsfertig. Das Enzymkonjugat ist vor Gebrauch gründlich zu durchmischen.
- 4. Antiserum:** Gebrauchsfertig. Das Antiserum ist vor Gebrauch gründlich zu durchmischen.
- 5. Probenpuffer:** Gebrauchsfertig.
- 6. Waschpuffer:** Der Waschpuffer ist 10fach konzentriert. Sollten im konzentrierten Puffer Salzkristalle auftreten, den Puffer auf 37 °C erwärmen und vor dem Verdünnen gut durchmischen. Das benötigte Volumen ist der Flasche mit einer sauberen Pipettenspitze zu entnehmen und mit entionisiertem oder destilliertem Wasser zu verdünnen (1 Teil Reagenz plus 9 Teile Wasser).  
Beispiel: Für 1 Mikrotiterstreifen 5 ml Konzentrat plus 45 ml Wasser. Der gebrauchsfertig verdünnte Waschpuffer ist bei +2 °C bis +8 °C gelagert und bei sachgerechter Handhabung 4 Wochen lang haltbar.
- 7. Chromogen/Substrat-Lösung:** Gebrauchsfertig. Die Flasche sofort nach Gebrauch wieder verschließen, da die Lösung lichtempfindlich ist. Die Substratlösung muss klar sein, wenn sie vor Benutzung bereits bläulich verfärbt ist, darf sie nicht mehr verwendet werden.
- 8. Stopplösung:** Gebrauchsfertig.

**Warnung:** Einige der Reagenzien enthalten das giftige Natriumazid, Hautkontakt ist zu vermeiden.

### **Lagerung und Haltbarkeit**

Die Testpackung ist bei +2 °C bis +8 °C aufzubewahren, nicht einfrieren! Ungeöffnet sind die Testsatzkomponenten bis zum angegebenen Verfallsdatum haltbar.

### **Entsorgung**

Unverdünnte Patientenproben und inkubierte Mikrotiterstreifen sind wie infektiöser Abfall zu handhaben. Alle Reagenzien sind nach den gesetzlichen Vorschriften zu entsorgen.

## **VORBEREITUNG UND HALTBARKEIT DER PROBEN**

**Probenmaterial:** Humane Saliva (Gesamtspeichel).

Für die korrekte Speichelsammlung empfehlen wir geeignete Sammelgefäße aus ultra reinem Polypropylen zu verwenden.

**Haltbarkeit:** Die zu untersuchenden Patientenproben können in der Regel bei +2 °C bis +8 °C bis zu 14 Tage aufbewahrt werden. Verdünnte Proben müssen innerhalb eines Arbeitstages inkubiert werden.

**Probenverdünnung:** Die zu untersuchenden Patientenproben werden im Verhältnis 1:201 mit Probenpuffer verdünnt.

Beispiel: 5 µl Probe in 1,0 ml Probenpuffer aufnehmen und gut durchmischen (Vortex). Die Probenpipette ist zum Mischen ungeeignet.

**Hinweis:** Die Standards und Kontrollen sind gebrauchsfertig, nicht verdünnen.

## TESTDURCHFÜHRUNG

**Proben-Inkubation:** Entsprechend dem Pipettierschema je **20 µl Standards, Kontrollen und verdünnte Patientenproben** in die einzelnen Reagenzgefäße pipettieren.  
(1. Schritt)

Jeweils **100 µl Enzymkonjugat-Lösung** (Peroxidase-markierte Alpha-Amylase) in die Reagenzgefäße pipettieren.

Jeweils **100 µl Antiserum-Lösung** (Polyklonaler Anti-Alpha-Amylase-Antikörper) in die Reagenzgefäße pipettieren.

Die Reagenzgefäße mit beiliegender Haftklebefolie abdecken und **60 Minuten** auf einem **Mikrotiterplattenschüttler (400 U/min)** bei Raumtemperatur (+18 °C bis +25 °C) inkubieren.

**Waschen:** Reagenzgefäße entleeren und anschließend 3x mit jeweils 300 µl gebrauchsfertig verdünntem Waschpuffer waschen.

Den Waschpuffer in jedem Reagenzgefäß pro Waschzyklus 30-60 Sekunden einwirken lassen, anschließend absaugen oder ausschütten. Nach dem Waschvorgang sowohl bei manueller als auch automatischer Durchführung die Mikrotiterplatte mit den Öffnungen nach unten kräftig auf Vliespapier ausschlagen, um Waschpufferreste vollständig zu entfernen.

**Achtung:** Flüssigkeitsreste (>10 µl), die nach dem Waschvorgang in den Reagenzgefäßen verbleiben, können einen Einfluss auf die Substrat-umsetzung haben und zu falsch erniedrigten Extinktionswerten führen. Unzureichendes Waschen (z. B. weniger als 3 Waschzyklen, zu geringe Waschpuffervolumina oder zu geringe Einwirkzeiten) kann zu falsch erhöhten Extinktionswerten führen.

**Substrat-Inkubation:** Jeweils **100 µl Chromogen/Substrat-Lösung** in die Reagenzgefäße pipettieren. **15 Minuten** bei Raumtemperatur (+18 °C bis +25 °C) inkubieren (vor direkter Sonneneinstrahlung schützen).  
(2. Schritt)

**Stoppen:** Jeweils **100 µl Stopplösung** in die Reagenzgefäße pipettieren, in der gleichen Reihenfolge und mit der gleichen Geschwindigkeit wie bei der Zugabe der Chromogen/Substrat-Lösung.

**Messen:** Die **photometrische Auswertung** der Farbintensität sollte **innerhalb von 30 Minuten nach dem Stoppen** erfolgen, bei **450 nm Messwellenlänge** und einer Referenzwellenlänge zwischen 620 nm und 650 nm. Vor dem Messen die Mikrotiterplatte vorsichtig schütteln, um eine homogene Verteilung der Farblösung zu gewährleisten.

### Pipettierschema

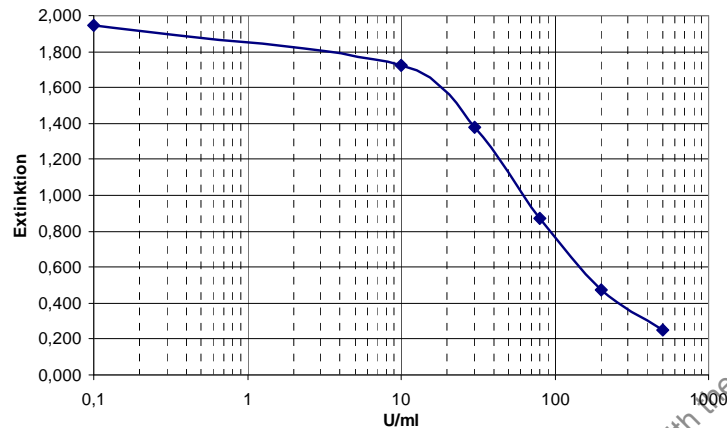
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	<b>Std A</b>	<b>P 1</b>	<b>P 10</b>	<b>P 17</b>								
B	<b>Std B</b>	<b>P 2</b>	<b>P 11</b>	<b>P 18</b>								
C	<b>Std C</b>	<b>P 3</b>	<b>P 12</b>	<b>P 19</b>								
D	<b>Std D</b>	<b>P 4</b>	<b>P 13</b>	<b>P 20</b>								
E	<b>Std E</b>	<b>P 5</b>	<b>P 14</b>	<b>P 21</b>								
F	<b>Std F</b>	<b>P 6</b>	<b>P 15</b>	<b>P 22</b>								
G	<b>Ko1</b>	<b>P 7</b>	<b>P 16</b>	<b>P 23</b>								
H	<b>Ko2</b>	<b>P 8</b>	<b>P 17</b>	<b>P 24</b>								

Das für die Mikrotiterstreifen 1-4 angegebene Pipettierschema gilt beispielhaft für die **quantitative Analyse** von 24 Patientenproben (P 1 bis P 24).

Die Standards (Std A-Std F), die Kontrollen 1+2 (Ko 1 + Ko 2), sowie die Patientenproben werden jeweils in Einzelbestimmung eingesetzt. Die Zuverlässigkeit der Bestimmung kann noch gesteigert werden, wenn man jede Probe doppelt einsetzt. Die Kontrollen dienen als interne Kontrollen für die Zuverlässigkeit des Testverlaufs. Sie sollten bei jedem Testdurchlauf verwendet werden.

## TESTAUSWERTUNG

**Quantitativ:** Nach Auftragen der gemessenen Extinktionen für die 6 Standards gegen die entsprechenden Konzentrationen (linear/log) kann eine Standardkurve erstellt werden, mit deren Hilfe die Alpha-Amylase-Konzentrationen der unbekanntenen Proben ermittelt werden können. Zur computergesteuerten Berechnung der Standardkurve sollte das Auswerteverfahren „4-Parameter-Logistik“ gewählt werden. Für eine fehlerfreie logarithmische Darstellung ist es eventuell notwendig, die Konzentration des Standards A auf z.B. 0,1 U/ml zu setzen. Nachfolgend ist ein typisches Beispiel für eine Standardkurve aufgeführt. Verwenden Sie diese Kurve bitte nicht zur Ermittlung der Alpha-Amylase-Konzentration in Patientenproben.



Liegt die Extinktion einer Patientenprobe oberhalb der des Standards F (500 U/ml), ist das Ergebnis mit „>500 U/ml“ anzugeben. Es empfiehlt sich, diese Probe in einem neuen Testansatz mit einer Verdünnung von z. B. 1:401 statt 1:201 wiederholt zu messen. Das aus der Standardkurve ermittelte Ergebnis in U/ml muss entsprechend diesem Beispiel dann noch mit dem Verdünnungsfaktor 2 multipliziert werden.

Bei Doppelbestimmungen ist der Mittelwert für Berechnungen zu verwenden. Weichen die Ergebnisse einer Doppelbestimmung erheblich voneinander ab, empfiehlt der Hersteller, die Probe erneut zu messen.

Therapeutische Maßnahmen sollten nicht allein aufgrund der mit diesem Test ermittelten Werte getroffen werden, sondern nur unter Berücksichtigung aller klinischen Beobachtungen und weiterer diagnostischer Mittel.

Für die Diagnose ist neben dem Laborbefund auch immer die Klinik des Patienten zu beachten.

## TEST-CHARAKTERISTIKA

**Kalibrierung:** Die Standards und Kontrollen werden gravimetrisch eingestellt.

Bei jedem Testansatz müssen die Konzentrationen der Kontrollen innerhalb der für jede Charge angegebenen Toleranzen liegen. Ein Qualitätskontrollzertifikat mit den entsprechenden Daten ist beigelegt. Wenn diese Anforderungen an die Kontrollen nicht erfüllt sind, können die Testergebnisse ungenau sein, und der Test sollte wiederholt werden.

Das Bindungsverhalten der Antikörper sowie die Aktivität des eingesetzten Enzyms hängen von der Temperatur ab. Es empfiehlt sich daher, für alle Inkubationsschritte einen Thermostaten einzusetzen. Je höher die Umgebungstemperatur bei den Inkubationen, desto höher werden die Extinktionswerte. Entsprechende Variationen gelten auch für die Inkubationszeiten. Die Standards sind aber den gleichen Einflüssen unterworfen, sodass sich diese Variationen bei der Ergebnisberechnung weitgehend aufheben.

**Antikörper:** Es wird ein polyklonaler Anti-Alpha-Amylase-Antikörper verwendet, der sehr spezifisch humane Speichel-Alpha-Amylase erfasst.

### Linearität

Die Linearität des ELISA wurde durch 4 serielle Verdünnungen von 3 Salivaproben bestimmt. Die lineare Regression wurde berechnet und  $R^2$  betrug bei allen Proben  $> 0,95$ . Der Alpha-Amylase-Saliva-ELISA ist im untersuchten Konzentrationsbereich von 12-500 U/ml linear.

### Nachweisempfindlichkeit

Die untere Nachweisgrenze ist definiert als der Mittelwert einer analytischen Probe minus der dreifachen Standardabweichung und gibt die geringste eindeutig erfassbare Alpha-Amylase-Konzentration an. Die untere Nachweisgrenze des Alpha-Amylase-Saliva-ELISA liegt bei 3,6 U/ml.

### Kreuzreaktivität

Der vorliegende ELISA weist spezifisch humane Speichel-Alpha-Amylase nach. Kreuzreaktionen mit anderen Amylasen sind in der nachfolgenden Tabelle aufgeführt:

Kreuzreaktant	%
Humane Speichel-Alpha-Amylase	100
Schweine Pankreas-Alpha-Amylase	< 0,23
Alpha-Amylase aus Bacillus sp.	< 0,01

### Interferenzen

Verunreinigungen durch Blut gaben bis zu einer Konzentration von 4,0 % (v/v) keine Interferenzen im vorliegenden ELISA. Rötlich verfärbte Salivaprobe weisen aber auf eine nennenswert durch Blut verunreinigte Probe hin. Diese Proben sollten daher nicht eingesetzt werden und stattdessen eine weitere Probe zu einem späteren Zeitpunkt gewonnen werden. Natriumazid kann den Proben als Konservierungsmittel bis zu einer Konzentration von 0,9% ohne nennenswerten Einfluss auf das Messergebnis zugesetzt werden.

### Reproduzierbarkeit

Zur Kontrolle der Reproduzierbarkeit wurden die Intra- und Inter-Assay-Variationskoeffizienten mit je 3 Proben ermittelt. Den Intra-Assay-Variationskoeffizienten liegen jeweils 20 Bestimmungen, den Inter-Assay-Variationskoeffizienten jeweils Doppelbestimmungen, ermittelt in 5 verschiedenen Läufen, zugrunde.

Intra-Assay-Variation, n = 20		
Saliva	Mittelwert (U/ml)	VK (%)
1	100	4,9
2	148	3,6
3	242	5,5

Inter-Assay-Variation, n = 2 x 5		
Saliva	Mittelwert (U/ml)	VK (%)
4	23	9,6
5	105	4,2
6	234	4,8

### Korrelation

Der Alpha-Amylase-Saliva-ELISA wurde gegen einen kommerziell erhältlichen ELISA abgeglichen und weist folgende Korrelation auf (Probenbereich 0-958 U/ml):

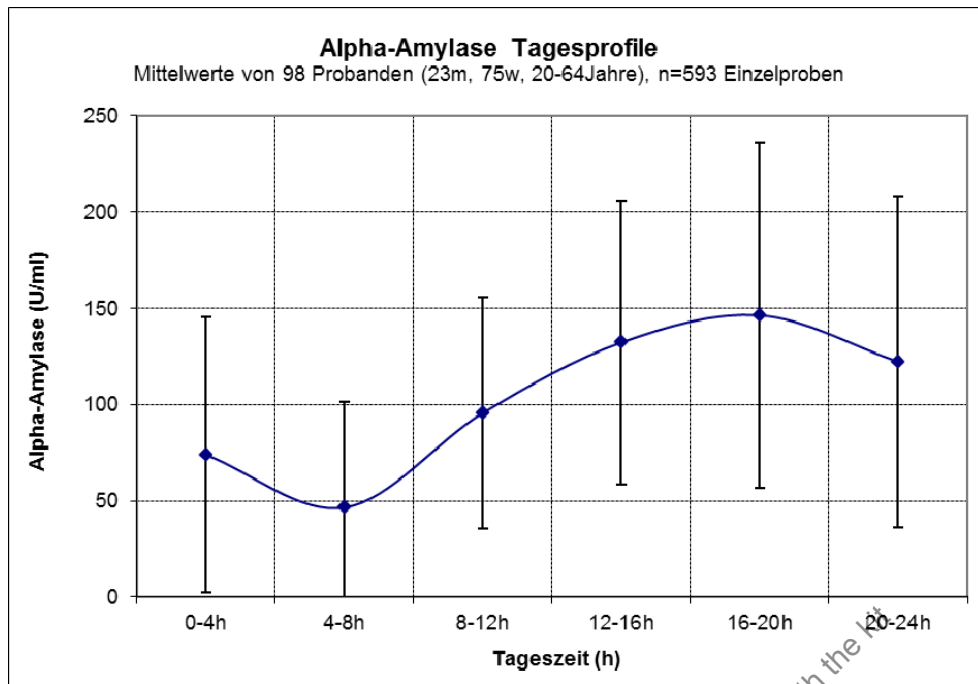
Salimetrics, Alpha-Amylase enzymatischer Test	<b>ET = 1,04 x Salimetrics - 1,56 U/ml</b> <b>n = 38; R<sup>2</sup> = 0,982</b>
--	--

### Referenzbereich

Zwischen 0-24 Uhr wurden 593 Salivaprobe bei 98 gesund erscheinenden Erwachsenen im Alter von 20 bis 64 Jahren (75 Frauen, 23 Männer) gewonnen und mit dem Alpha-Amylase-Saliva-ELISA bestimmt:

AA Konzentration (n = 98 Probanden, gemessen zwischen 0-24 Uhr)			
		Mittelwert	Standardabweichung
Tageszeit	n =	U/ml	
0-4h	9	73,8	71,4
4-8h	113	46,5	54,8
8-12h	104	95,7	60,2
12-16h	119	132,2	73,8
16-20h	108	146,3	89,9
20-24h	140	122,2	86,2
<b>n gesamt =</b>	593		

Anhand des ermittelten durchschnittlichen Tagesprofils lassen sich die Normalwerte ablesen. Diese entsprechen den Angaben aus der Literatur (Rohleder, 2004, Ann. N.Y. Acad. Sci. 1032: 258-263).









Es wird jedem Labor geraten, eigene unter entsprechenden spezifischen Umgebungsbedingungen erhobene Normalwerte zu erstellen.

#### **LITERATURLISTE**

1. Allwood MA, Handwerker K, Kivlighan KT, Granger DA, Stroud LR. **Direct and moderating links of salivary alpha-amylase and cortisol stress-reactivity to youth behavioral and emotional adjustment.** Biol Psychol 2011 Jul 21 [Epub ahead of print].
2. Nater UM, La Marca R, Florin L, Moses A, Langhans W, Koller MM, Ehlert U. **Stress-induced changes in human salivary alpha-amylase activity -associations with adrenergic activity.** Psychoneuroendocrinology 31 (2006) 49-58.
3. 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 1098 (2007) 122-144.
4. Bosch JA, Veerman EC, de Geus EJ, Proctor GB.  **$\alpha$ -Amylase as a reliable and convenient measure of sympathetic activity: don't start salivating just yet!** Psychoneuroendocrinology 36 (2011) 449-453.
5. EUROIMMUN AG. Stöcker W, Schlumberger W. **Alle Beiträge zum Thema Autoimmundiagnostik.** In: Gressner A, Arndt T (Hrsg.) Springer Lexikon Klinische Chemie. **Medizinische Labordiagnostik von A-Z.** Springer Medizin Verlag, Heidelberg 1 (2007).
6. Engert V, Vogel S, Efanov SI, Duchesne A, Corbo V, Ali N, Pruessner JC. **Investigation into the cross-correlation of salivary cortisol and alpha-amylase responses to psychological stress.** Psychoneuroendocrinology 2011 Apr 4 [Epub ahead of print].
7. Brandtzaeg P. **Do salivary antibodies reliably reflect both mucosal and systemic immunity?** Ann N Y Acad Sci 1098 (2007) 288-311.
8. Rohleder N, Wolf JM, Maldonado EF, Kirschbaum C. **The psychosocial stress-induced increase in salivary alpha-amylase is independent of saliva flow rate.** Psychophysiology 43 (2006) 645-652.
9. Capranica L, Lupo C, Cortis C, Chiodo S, Cibelli G, Tessitore A. **Salivary cortisol and alpha-amylase reactivity to taekwondo competition in children.** Eur J Appl Physiol 2011 Jun 4 [Epub ahead of print].
10. Wang D, Zhuo JQ, Zhao MP. **A simple and rapid competitive enzyme-linked immunosorbent assay (cELISA) for high-throughput measurement of secretory immunoglobulin A (sIgA) in saliva.** Talanta 82 (2010) 432-436.
11. van Stegeren A, Rohleder N, Everaerd W, Wolf OT. **Salivary alpha amylase as marker for adrenergic activity during stress: effect of betablockade.** Psychoneuroendocrinology 31 (2006) 137-141.

Please use only the valid version of the Instructions for Use provided with the kit

**Symbole:**

	Lagertemperatur		Hersteller		Enthält Testmaterial für <n> Teste
	Verwendbar bis	<b>LOT</b>	Chargennummer	<b>IVD</b>	In vitro Diagnostikum
	Vor Gebrauch Packungsbeilage lesen	<b>CONT</b>	Inhalt	<b>CE</b>	CE gekennzeichnet
	Achtung	<b>REF</b>	Katalog-Nummer		