

PROTOKOL Z .../ PROTOCOL

<b>Téma</b>	<b>VYŠETŘENÍ SLIN NA PŘÍTOMNOST ANTIGENŮ KREVNÍCH SKUPIN</b>
<b>Topic</b>	<b>SALIVA EXAMINATION ON PRESENCE OF BLOOD GROUP ANTIGENS</b>
<b>Jméno/Name</b>	
<b>Datum/Date</b>	

**TEORIE/ THEORY**

<p>Antigeny (Ag) systému ABO(H) se v lidském organismu vyskytují ve dvou formách:</p> <p>a) v alkoholu rozpustné Ag jsou vázány na membrány téměř všech buněk těla, včetně erytrocytů;</p> <p>b) metabolický produkt první skupiny - ve vodě rozpustné Ag přítomné přibližně u 77 % lidské populace;</p> <p>Metabolická přeměna je řízena geny <i>Se/se</i>, zcela nezávislými na genech ABO určujících příslušnost ke krevní skupině. Kombinace recesivních alel „<i>sese</i>“ zajistí dokonalý rozklad vázaných Ag a tedy nepřítomnosti Ag v tělních tekutinách. Tito jedinci se označují jako <b>nevylučovatelé</b> (nonsekretoři). Jedinci s dominantní alelou <i>Se</i> v genotypu mají Ag přítomny v tělních tekutinách a označují se <b>vylučovatelé</b> (sekretoři).</p>	<p>The antigens (Ag) of the ABO(H) system exist in the human body in two forms:</p> <p>a) alcohol-soluble Ag bound to the membranes of almost all cells in the body, including erythrocytes;</p> <p>b) metabolic product of the first group = water-soluble Ag present in approximately 77% of the human population;</p> <p>This metabolic transformation is controlled by <i>Se/se</i> genes, which are independent of the ABO genes determining blood groups. The combination of recessive alleles "<i>sese</i>" ensures absence of Ag in body fluids. These individuals are referred to as <b>non-secretors</b>. Individuals with a dominant <i>Se</i> allele in the genotype have Ag present in body fluids and are referred to as <b>secretors</b>.</p>
----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

<p><b>Klíčové slovo: aglutinace</b> = sérologická reakce aglutinogenu (Ag, antigen) s aglutininem (Ab, protilátka), projevující se shlukováním aglutinogenu - viz obr. 1 vlevo - aglutinace zvýrazněna modře, v porovnání s výsledkem, kde aglutinace neproběhla (foto: archiv autorky). Obr. 1. zcela vpravo: schematické znázornění podstaty aglutinace - reakce krvinek s protilátkami.</p>	<p><b>Key word: agglutination</b> = serological reaction of agglutinin (Ag, antigen) with agglutinin (Ab, antibodies), manifested by agglutination - see Fig. 1 (left) - agglutination highlighted in blue, in comparison with the result where agglutination does not occur (photo: author's archive). Fig. 1 (right): a schematic representation of the agglutination the reaction of blood cells (agglutinogens) with antibodies (agglutinins).</p>
------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

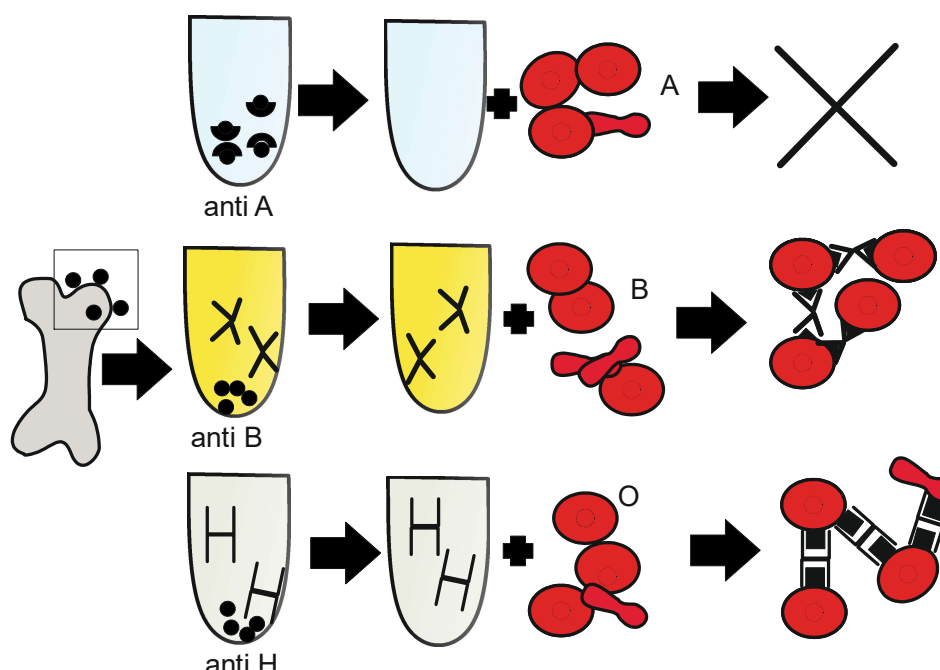


**Obr. 1:** Ukázka aglutinace (sérologická reakce aglutinogenu s aglutininem). Vpravo: schematické znázornění aglutinační reakce erytrocytů s protilátkami.

**Fig. 1:** Demonstration of agglutination (serological reaction of agglutinogen with agglutinin). Right: a schematic representation of the agglutination the reaction of blood cells (agglutinogens) with antibodies (agglutinins).

<p><b>Cíl:</b> Zhodnocení výskytu vylučovatelů a nevylučovatelů ve skupině studentů</p> <p><b>Metoda:</b> <b>Absorpčně inhibiční metoda</b> (AI, obr. 2), jejímž principem je <b>inhibice hemaglutinace</b>, je založena na vysycení vazebných míst na Ag přítomných ve slinách přidáním diagnostikem vhodného titru a následným stanovením množství nenavázaných Ab přidáním určitého množství suspenze odpovídajících erytrocytů. Intenzita aglutinace je nepřímo úměrná množství skupinových substancí ve slinách. Absorpčně inhibiční metoda je složena ze dvou fází:</p> <p><b>1. absorpce:</b> k vyšetřovanému vzorku (antigenu) se dodá známé množství protilátky, dojde k vazbě antigen-protilátka.</p> <p><b>2. aglutinace:</b> v této fázi je zjišťována kvantita nenavázaných protilátek poklesem jejich titru. Pokles se projeví inhibicí aglutinace přidáním náplavem známých krvinek o známém objemu a koncentraci.</p>	<p><b>Aims:</b> Evaluation of the presence of excretors and non-excretors in our group of students</p> <p><b>Method:</b> <b>The absorption inhibition method</b> (AI, Fig 2), based on the inhibition of haemagglutination. It is based on the reaction of the ABO antigens present in saliva with a defined titer of antibodies (Ab). The amount of unbound Ab after adding a certain amount of erythrocyte suspension with corresponding blood group (A, B, or O) is then analysed. The intensity of agglutination is inversely proportional to the amount of ABO antigens in saliva. The absorption inhibition method consists of two phases:</p> <p><b>1. absorption:</b> a defined amount of antibodies is added to the test sample (antigens), antigen-antibody binding occurs.</p> <p><b>2. agglutination:</b> the quantity of unbound antibodies is analysed by adding erythrocyte suspension of a corresponding blood group to the sample. Presence of agglutination = negative</p>
---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

	result (= no antigens in the examined sample) and on the contrary.
--	--------------------------------------------------------------------



**Obr. 2.** Absorpčně inhibiční metoda schematicky./**Fig. 2.** Absorption inhibition method schematically.

<p><b>Použití:</b> Hemaglutinačně inhibičního testu se hojně užívá k průkazu slabých A a B aglutinogenů a při zjišťování ABO substancí v buňkách lidských tkání, ve spermích, na leukocytech, trombocytech a v krevních skvrnách.</p>	<p><b>Application:</b> The haemagglutination inhibition test is widely used for the detection of weak A and B agglutinogens and in the detection of ABO substances in human tissue cells, spermatozoa, leukocytes, platelets and blood stains.</p>
---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

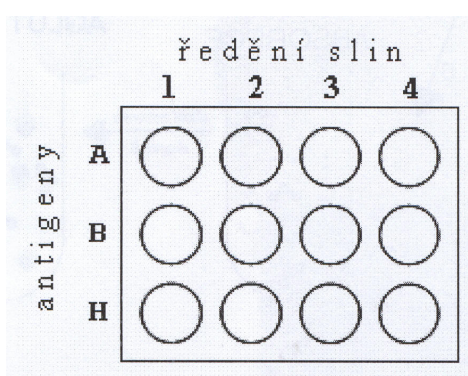
### PRAKTICKÁ ČÁST/PRACTICAL EXERCISE

<p><b>Materiál:</b> Komerční diagnostika (EXBIO Olomouc) anti-A (IgM) monoklonální, anti-B (IgM) monoklonální, anti-H (monoklonální); fyziol. roztok 0,85% NaCl, náplav diagnostických erytrocytů A,B,0; bromelin (0,5%), zkumavky, pipety, špičky, stojany na zkumavky, <u>rukavice (!!!)</u>, centrifuga, destičky k odečítání výsledků, vodní lázeň (100 °C), nádoby na odpad</p> <p><b>Dbáme na pečlivé značení zkumavek!</b></p>	<p><b>Material:</b> Commercial diagnostics (EXBIO Olomouc) anti-A (IgM) monoclonal, anti-B (IgM) monoclonal, anti-H (monoclonal); saline (0.85% NaCl), suspension of diagnostic erythrocytes A, B, 0 (EXBIO Olomouc); bromelain (0.5%), test-tubes, pipettes, tips, gloves, centrifuge, water bath (100 °C), waste containers, plastic plates</p> <p><b>Please pay attention to the careful labeling of the test-tubes!</b></p>
-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

<p><b>Postup:</b></p> <p><b>a) Ředění diagnostik:</b> Jako vhodná ředění sér byla experimentálně vybrána 1:8 pro anti-A, 1:32 pro antiB a 1:20 pro anti-H. Ředíme fyziologickým roztokem.</p> <p><b>b) Příprava 3 % suspenze (náplavu) diagnostických erytrocytů (promyté krvinky bez plazmy):</b> 60 µl periferní krve (krevní masa tvoří 50 %) v označených zkumavkách se rozsuspenduje v 940 µl fyziologického roztoku (FR), zcentrifuguje 1 min. při 1500 ot./min., supernatant odstraníme, promyjeme 970 µl FR, zcentrifuguje, supernatant odstraníme, rozsuspendujeme v 970 µl FR a uložíme v chladničce.</p> <p><b>c) Příprava 3 % suspenze diagnostických erytrocytů ošetřených bromelinem</b>  Bromelin hydrolyzuje peptidické vazby v membránách erytrocytů a tímto způsobem membránu „natráví“. Z fyzikálního hlediska se jedná o snížení povrchového napětí membrány. Důsledkem je zesílení některých interakcí antigen-protilátka, v našem případě by se účinkem bromelinu měla zvýšit intenzita aglutinace erytrocytů. Krvinky natrávené bromelinem by tedy měly být citlivější k působení příslušných protilátek, tj. aglutinace by se měla projevat i při větším zředění protilátek, než tomu bude u krvinek neovlivněných bromelinem.  - do zkumavek typu Eppendorf (EPP) s 20 µl 0,5% bromelinu přidáme 180 µl erytrocytární</p>	<p><b>Procedure:</b></p> <p><b>a) Dilution of diagnostics:</b> 1: 8 for anti-A, 1:32 for anti-B and 1:20 for anti-H; dilute with saline.</p> <p><b>b) Preparation of a 3% suspension of diagnostic erythrocytes (washed blood cells without plasma):</b> 60 µl of peripheral blood (erythrocyte mass makes up 50 %) in the labeled test-tubes is resuspended in 940 µl of saline (FR), centrifuged for 1 min. at 1500 rpm. Remove the supernatant, wash with 970 µl saline, centrifuge, remove the supernatant, resuspend in 970 µl of saline and store in the refrigerator.</p> <p><b>c) Preparation of a 3% suspension of diagnostic erythrocytes treated with bromelain</b>  Bromelin hydrolyzes peptide bonds in erythrocyte membranes and in this way "digests" the membrane. From a physical point of view, this is a reduction in the surface tension of the membrane. Intensification of antigen-antibody interactions is the result. In our case, the effect of bromelain increases the intensity of erythrocyte agglutination. Blood cells treated with bromelain are more sensitive to the reaction with the corresponding antibodies. That means, that agglutination should occur at higher antibody dilutions than in cases not affected by bromelain.  - add 180 µl of erythrocyte suspension to the Eppendorf (EPP) test-tubes with 20 µl of 0.5% bromelain  - incubate the test-tubes for 10-15 minutes at 37 ° C.</p>
------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

<p>suspenze (viz bod b), tj. 10x zř.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- zkumavky inkubujeme 10-15 minut při 37 °C.</li> <li>- centrifugujeme 1 min. při 1500 ot., opatrně odsajeme supernatant, k sedimentu erytrocytů na dně zkumavky přidáme 180 µl fyziologického roztoku, opatrně rozsuspendujeme, opět centrifugujeme a odsajeme, celkem 3 x, čímž ze suspenze erytrocytů důkladně vymyjeme bromelin. Po posledním promytí přidáme 180 µl fyz. roztoku a tímto máme připravenou 3% suspenzi natrávených erytrocytů.</li> </ul> <p><b>d) Zpracování slin:</b> Sliny vyšetřovaných osob se zahřívají v skleněné nádobce (asi 1 ml) při 100 °C ve vodní lázni po dobu 10 minut z důvodu inaktivace enzymů, aby nedošlo k natrávení, a tím snížení množství skupinových substancí. Varem ztratí sliny svou vazkost, stanou se tekutějšími a lépe se zpracovávají. Sliny se pak centrifugují při 2000 ot./min po dobu 10 min., tím se odstraní koagulovaný hlen a buněčný detrit. Čirá tekutina se ze supernatantu pipetuje do zkumavky typu EPP. Pro účely experimentu sliny ředíme v EPP zkumavce fyziologickým roztokem na základní ředění 1:100.</p> <p><b>e) AI metoda:</b> Připravíme 3 řady označených <b>aglutinačních zkumavek</b> po 4 zkumavkách (viz obr. 3).</p> <p><b>Do první a druhé zkumavky</b> v každé řadě (A, B, H) dáme po 30 µl naředěných slin. Do všech zkumavek <b>kromě prvních</b> (tzn. do 2., 3. a 4.) pipetujeme 30 µl FR a provedeme titraci 30 µl s ředicím koeficientem 2, tzn. obsah 2. zkumavky promícháme a přeneseme 30 µl do 3. zkumavky, promícháme, přeneseme 30 µl do 4. zkumavky,</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- centrifuge for 1 min. at 1500 rpm, carefully remove the supernatant, add 180 µl of saline to the erythrocyte sediment at the bottom of the test-tube, carefully resuspend, centrifuge again and remove supernatant. Repeat this procedure 3 times. In this way we thoroughly wash the bromelain from the erythrocyte suspension. Finally, add 180 µl of physical solution to prepare a 3% suspension of digested erythrocytes.</li> </ul> <p><b>d) Saliva treatment:</b> The saliva of the subjects is heated in a glass vessel (about 1 ml) at 100 °C in a water bath for 10 minutes to inactivate the enzymes and prevent the damage of blood group substances. By boiling, saliva loses its viscosity, becomes more fluid and can be better processed. The saliva is then centrifuged at 2000 rpm for 10 minutes to remove coagulated mucus and cell detritus. The clear liquid (supernatant) is pipetted into an Eppendorf test-tube. For the purposes of the saliva experiment, dilute saliva with saline to a basic dilution of 1: 100.</p> <p><b>e) AI method:</b> Prepare 3 rows of labeled agglutination test-tubes of, each row with 4 test-tubes (see Fig. 3).</p> <p>Add 30 µl of diluted saliva to the first and second test-tubes in each row (A, B, H). Pipette 30 µl of saline into all test-tubes except the first ones (ie. into 2nd, 3rd and 4th). Now titrate with 30 µl with a dilution factor of 2 = mix the contents of the 2nd test-tube and transfer 30 µl to the 3rd test-tube, mix, transfer 30 µl to the 4th test-tube, mix and withdraw 30 µl from this last test-tube as well. The resulting saliva dilutions in the</p>
--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

<p>promícháme a odebereme 30 <math>\mu\text{l}</math> i z této poslední zkumavky. Výsledná ředění slin ve zkumavkách jsou 1:100, 1:200, 1:400 a 1:800.</p> <p>Do 4 zkumavek řady A přidáme po 20 <math>\mu\text{l}</math> diagnostika anti-A <b>naředěného</b> 1:8, do zkumavek řady B po 20 <math>\mu\text{l}</math> diagnostika <b>naředěného</b> anti-B 1:32, do zkumavek řady H po 20 <math>\mu\text{l}</math> diagnostika anti-H <b>naředěného</b> 1:20. Směs promícháme a ponecháme při laboratorní teplotě 20 minut, občas lehce protřepat.</p> <p>Poté přidáme 20 <math>\mu\text{l}</math> 3% suspenze erytrocytů, vždy příslušných danému séru, tzn. <b>do zkumavek řady A erytrocyty skupiny A</b>, do zkumavek řady B erytrocyty B, do zkumavek řady H erytrocyty 0. Zkumavky jemně promícháme a necháme 10 minut odstát při laboratorní teplotě (<b>netřepat!</b>). Vše přehledně ilustruje tabulka 1 níže.</p> <p>Dalším krokem je centrifugace všech zkumavek při 1000 ot./min po dobu jedné minuty. Zkumavky poté dobře protřepeme a znovu centrifugujeme 1 minutu při 1000 ot./min.</p>	<p>tubes are 1:100, 1:200, 1: 400 and 1:800.</p> <p>Add 20 <math>\mu\text{l}</math> of anti-A diagnostics diluted 1:8 to 4 A test-tubes, 20 <math>\mu\text{l}</math> of 1:32 diluted anti-B diagnostics to B test-tubes, and 1:20 anti-H diagnostic diluted 1:20 to H test-tubes. Mix the contents of the test-tubes and leave at room temperature for 20 minutes, shaking occasionally.</p> <p>Then add 20 <math>\mu\text{l}</math> of 3% erythrocyte suspension, always corresponding to the antibodies, ie. <b>group A erythrocytes into A test-tubes</b>, group B erythrocytes into B test-tubes, group 0 erythrocytes into 0 test-tubes. Mix the contents of test-tubes gently and allow to stand at room temperature for 10 minutes (<b>do not shake!</b>). The whole procedure is illustrated in the table below (Tab. 1).</p> <p>The next step is to centrifuge all test-tubes at 1000 rpm for one minute. Shake the test-tubes well. Centrifuge again for 1 minute at 1000 rpm.</p>
---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------



**Obr. 3:** Schéma vyšetření: pro každý antigen (A, B, H=0) čtyři ředění slin (1-4), používáme aglutinační zkumavky.

**Fig. 3:** Scheme of the experiment: 4 dilutions of saliva (1-4) for each antigen (A, B, H=0), we use agglutination test-tubes.

30μl slin/saliva 1:100 20μl antiA 1:8 20μl ery A 3%	30μl slin/saliva 1:200 20μl antiA 1:8 20μl ery A 3%	30μl slin/saliva 1:400 20μl antiA 1:8 20μl ery A 3%	30μl slin/saliva 1:800 20μl antiA 1:8 20μl ery A 3%
30μl slin/saliva 1:100 20μl antiB 1:32 20μl ery B 3%	30μl slin/saliva 1:200 20μl antiB 1:32 20μl ery B 3%	30μl slin/saliva 1:400 20μl antiB 1:32 20μl ery B 3%	30μl slin/saliva 1:800 20μl antiB 1:32 20μl ery B 3%
30μl slin/saliva 1:100 20μl antiH 1:20 20μl ery 3%	30μl slin/saliva 1:200 20μl antiH 1:20 20μl ery 3%	30μl slin/saliva 1:400 20μl antiH 1:20 20μl ery 3%	30μl slin/saliva 1:800 20μl antiH 1:20 20μl ery 3%

**Tab. 1:** Schematicky znázorněné obsahy 12 zkumavek při popsaném postupu vyšetření slin

**Tab. 1:** Schematic representation of the contents of 12 test-tubes in the described saliva examination procedure

<p>Po centrifugaci jsou zkumavky připraveny <b>k hodnocení</b> - obsah zkumavek vyléváme na destičky.</p> <p>Výhodou aglutinačně inhibičního testu je, že negativní výsledek je dán přítomností aglutinace, a tudíž <b>máme kontrolu</b>, že jsme umístili do zkumavek sérum a erythrocyty stejné specifčnosti.</p> <p><b>f) Odečítání a hodnocení výsledků:</b> Je-li ve vyšetřovaných slinách vyšetřovaný antigen a přidané erythrocyty se neshlukují, značí to, že antigen slin vysytil diagnostický titer aglutininu a můžeme s určitostí říci, že jde o sliny vylučovatele.</p> <p>Jde-li o sliny nevylučovatele, přidané krvinky jsou diagnostickým sérem aglutinovány. Při vizuálním hodnocení se zaznamená pro každou zkumavku stupeň aglutinace podle následujících pravidel:</p> <p>++++ kompletně shluklý kompaktní sediment +++ sedimentované erythrocyty se po jemném poklepání na dno zkumavky rozdělí na 2-4 nepravidelné hrudky ++ sediment se rozpadne na víc drobných částí</p>	<p>After centrifugation, the test-tubes are ready for <b>evaluation</b> - the contents of the tubes is poured onto plastic plates.</p> <p>The advantage of the agglutination inhibition test is, that the negative result is due to the presence of agglutination.</p> <p><b>f) Evaluation of the results:</b> If the agglutination does not occur in the examined sample, it means that the saliva antigens have saturated the diagnostic titer of agglutinins and you are a secretor.</p> <p>In the case of non-secretory saliva, added diagnostic erythrocytes are agglutinated with added agglutinins. For visual evaluation, the following degrees of agglutination are taken into account:</p> <p>++++ completely agglutinated, one compact cluster +++ agglutinated erythrocytes split into 2-4 irregular clusters after shaking of the test-tube ++ small agglutinated clusters + light agglutination, the erythrocytes remain after tapping the bottom of the test-tube in the</p>
-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

<p>+ sediment zůstane po poklepání na dno zkumavky ve tvaru jemně zrnitého písku</p> <p>- negativní reakce, sedimentované erythrocyty se volně zvíří ve fyziologickém roztoku</p>	<p>shape of fine-grained sand</p> <p>- negative reaction, erythrocytes freely in saline</p>
-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	---------------------------------------------------------------------------------------------