

KAT'Î REAKTİFLER

İhtimali reaktiflerle müspet sonuç alındığı ve elde yeterli miktarda materyal bulunduğunda kesin sonuç veren kati reaktiflere geçilir.

Bunlar hemin billurlarının oluşturulması, hemokromojen billurlarının oluşturulması, Heller'in florans deneyi, lekenin spektroskopik muayenesi, pas lekesi ile kan lekesinin ayırımında kullanılan metotlardır.

HEMİN BİLLURLARININ OLUŞTURULMASI

Hemin billurları; Teichmann metodu, Wagennar deneyi, Gabriel Bertrand, Stryzowski reaktifleri ile oluŐturulmaktadır.

Teichmann–Hemin BİLLURLARI

Eğer leke kazınma tarzında alınmış bir leke ise, kazıntıdan toplu iğne başı büyüklüğünde bir parça, lam üzerine konur, maserasyona tabi tutulmuş bir leke ise, maserasyon mayiinden bir iki damla lama damlatılıp kurutulur. Bu leke üzerine bir lamel kapatılır ve lamelin kenarından bir damla glasiyal asetik asit ile bir damla %1'lik sodyum klorür çözeltisi damlatılıp, kaynatmadan çok hafif bir alev üzerinde tutularak, glasiyel asetik asitle sodyum klorür çözeltisi uçurulur.

Teichmann–Hemin Billurları

İyice soğuduktan sonra bu işlem bir kaç defa daha tekrar edilir. Mikroskopta incelendiğinde kahverengi saman çöpü şeklinde görülen billurlar, reaktifin pozitif sonuç verdiğini, lekenin kan lekesi olduğunu gösterir. Bu billurlara Hemin billurları denir.



Wagennar Deneyi

Kırmızı renk farkedilebilecek kadar dilüe leke solüsyonları bile, pozitif sonuç alınması için yeterlidir.

Maserasyona tabi tutulmuş leke dilüsyonundan bir lam üzerine bir damla damlatılır, üzerine bir damla aseton ile bir damla %10'luk hidroklorik asit veya sülfirik asit damlatılarak lam çok hafif bir alevde kaynatmadan kurutmak amacı ile ısıtılır. Oda hararetinde soğumaya bırakılır. Leke kan lekesi ise mikroskobun orta büyütmesinde Teichmann hemin billurlarını andıran daha küçük Asetonklorhemin kristalleri görülür.

Gabriel Bertrand Reaktifi

1 gr Kristalize magnezyum klorür, 5 gr Saf gliserin, 20 cc Glasiyel asetik asit, 1 cc Distile su karıştırılarak reaktif elde edilir.

Bu reaktif çok hassas olup kaynatılmış veya pas ile karışmış, çok eski ve miktarı 0,0005 mg gibi çok az olan kan lekeleriyle bile kesin sonuç verir.

Gabriel Bertrand Reaktifi

Bir lam üzerine kazınma tarzında ise çok az dilüsyon halindeyse bir damla leke konur. Üzerine bir damla reaktif damlatılıp bir süre bekletildikten sonra mikroskopta hemin billurlarına benzeyen, renkleri sarı–kahverengi arası olan rhomboit şekilli billurlar görülür. Bu billurlara, klor hidrat de hemin billurları denir. Bu billurların görülmesi, lekenin kan lekesi olduğunu gösterir (2, 24).

Stryzowski Reaktifi

- 1) 1 cc Alkol, 1 cc Distile su, 1 cc Glasiyal (asetik) asit, 2 damla İyothidrik asit
- 2) 1 cc Glasiyal (asetik) asit, 1 cc %25'lik Gomme arebique, 3–5 damla %1'lik Folik asit

Stryzowski REAKTİFİ

Lekeden lam üzerine bir parça konur ve üzerine lamel kapatılır. Lamelin kenarından reaktiflerden herhangi biri sızdırılıp hafif alevde ısıtılarak reaktif uçurular, soğutulularak bu işlem en az üç kez tekrarlanır. Bu reaktif ile mikroskopta 20 mikron uzunlukta koyu kahverengi bir takım kristaller görüldüğünde, lekenin kan lekesi olduğu gösterilmiş olur. Romboid şekilli bu kristallere hematin iyothidrat kristalleri denir (2, 13, 15, 26).

Hemokromojen Kristalleri

Hemokromojen kristalleri, eski, ısıtılmış, kokuşmuş kan ile de oluşabilmektedir. Şekilleri dikdörtgen, iğne gibi veya iğ biçimindedir.

Bunları oluşturabilmek için;

2,5 gr iyot, 0,5 gr potasyum iyodür'ün 25 cc 95°'lik alkolle hazırlanmış eriyiği ile bir damla piridin ve % 2'lik sodyum hidrosülfid'e ihtiyaç vardır.

Hemokromojen Kristalleri

Eğer leke kazınma tarzında alınmış bir leke ise, kazıntıdan toplu iğne başı büyüklüğünde bir parça lam üzerine konur, maserasyona tabi tutulmuş bir lekeyse, maserasyon mayiinden bir iki damla lama damlatılıp kurutulur, üzerine birkaç damla iyotlu eriyik, bir damla piridin, birkaç damla hidrosülfid konulduğunda leke kan lekesi ise, hemokromojen kristalleri oluşur,

Hemokromojen kristalleri Takayama, Oustinov, Sarda–Derrien reaktifleri ile de oluşturulabilmektedir.

Takayama REAKTİFİ

3 cc NaOH % 10

3 cc Glikoz %10

3 cc Pyridin

7 cc Distile su

TAKAYAMA REAKTİFİ

Maserasyona tabi tutulmuş lekeden, bir lam üzerine bir damla damlatılıp lamel kapatılır. Lamelin kenarından reaktif sızdırılır ve reaktif ile lekenin birleştiği yerde önce sarı, sonra kırmızı renge dönüşen bir renk değişikliği ortaya çıkar. Ardından mikroskopta hemokromojen kristalleri oluşur. Kristaller, bir saat süre ile aynı şekilde gözlenir, daha sonra erimeye başlar ve azalır. Bu reaktif, koyu renkli bir şişede 3–4 hafta bozulmadan muhafaza edilebilir.

OUSTİNOV REAKTİFİ

3 kısım Pyridin

1 kısım % 20'lik Gomme arabik'dir.

Daha çok kazınma tarzında alınan lekelerde kullanılır. Kazınma tarzında alınan kan lekesinden bir parça, lam üzerine konur ve bir iki damla reaktif damlatılarak lamel kapatılır. Çok hafif bir alevden geçirilip, ısıtılarak kurutulur. Mikroskopta incelendiğinde, kırmızı esmer renkte hemokromogen kristalleri görülür.

SARDA-DERRIEN REAKTİFİ

10 g Baum de Canada

20 g Pyridin

Bulan kişilerin adları ile anılır. Oustinov gibi uygulanır.

HELLER'İN FLORANS TESTİ

Bu metot, 1916 yılında Heller tarafından bulunmuştur. Leke materyali dilüsyon şeklinde ise, bir lam üzerine bir iki damla damlatılır. Eğer kazınma tarzında alınmış ise, bir lam üzerine bir parça konulur ve bu leke materyaline bir iki damla konsantre sülfürik asit ilave edilir. Leke kan lekesi ise, kan lekesinin içinde bulunan hematoporfirin parçalanarak porfirin açığa çıkar. Açığa çıkan bu porfirin, mikroskopta incelendiğinde, oldukça yoğun bir florans ve parlak bir görünüm gözlenir.

LEKENİN SPEKTROSKOPİK MUAYENESİ

Bu tetkikten sonuç alınabilmesi için, en azından narçiçeği görünümünü almış leke solüsyonu gereklidir. Daha açık renkli bir solüsyonla sonuç alınamaz. Şeffaf bir kap içine konulan leke solüsyonu, spektroskopla incelendiğinde leke eğer kan lekesi değilse, spektroskopla görülen renkler arasında hiçbir değişiklik olmaz.

LEKENİN SPEKTROSKOPİK MUAYENESİ

Kan lekesinde ise, spektroskoptaki sarıyla yeşil rengin birleştiği yerde, D ve E bandları arasında, soldaki sağdakine göre hafif genişçe yukarıdan aşağıya uzanan absorpsiyon bandı adı verilen iki siyah çizgi görülür.

PAS LEKESİ İLE KAN LEKESİNİN AYIRIMI

Pas lekesi suda erimez, süzgeç kağıdı ıslatılıp lekeye sürüldüğünde, pas lekesi kağıda çıkmaz. Buna, Taylor izi negatiftir denir. Pas lekesi KOH'ta erimez, HCl'de erir. % 65 Potasyum Ferrosiyanür ile Prusya mavisi rengindeki çöküntü, pas lekesi ile oluşur. Bu çöküntü, oksalik asitte erir. Pas lekesi, tanenle siyah renk verir. Mayer reaksiyonu pas ile negatif, Adler reaktifi ise, pozitif sonuç verir.