

İNSAN ve HAYVAN KANI AYIRIMI

Lekenin kan lekesi olduğuna karar verildiğinde, grup tayinine geçmeden önce insan kanı olup olmadığının araştırılması gerekir. Takayasu ve arkadaşları (1988) şempanzeler üzerinde yaptıkları araştırmada insan A₁ antijeni ile şempanzelerdeki A antijeninin aynı serolojik özelliğe sahip olduğunu göstermişlerdir. Bunun için de sitolojik metotlar (kan boyama preparatlarının hazırlanması, lökosit sayılması) ve immünolojik metotlar (presipitan serum-tüp tekniği, kapiller test, agar-gel diffüzyon testi ve antiglobülin human test) uygulanır.

Presipitasyon Esasına Dayanan Testler

Presipitasyon: Basitçe, suda erimiş antijenlerin, elektrolitli ortamda kendi immunoglobulinleri (antikorları) ile birleşmeleriyle önce bulanıklık, sonra bir çökme olayı şeklinde sonuçlanan reaksiyona presipitasyon denir. Önceleri tüpte iki sıvının belli miktarlarda karıştırılması ile uygulanan ve pek kısıtlı kullanma alanı bulunan, mikrobiyolojinin değerli bir serolojik testi olan presipitasyon, her gün yeni tekniklerin ortaya konması ile gittikçe genişleyen bir uygulama alanı bulmuş ve Adli Bilimlerin de önemli testleri arasına girmiştir.

Presipitasyon için presipitan seruma ihtiyaç vardır. Tavşanların karın derisi altına, peritona veya kulak venine 20 gün boyunca 3-4 gün aralıklarla, her defasında 3-4 ml olmak üzere, steril insan veya hayvan serumu enjekte edilir. Tavşanların 1/3'ünün kanında, enjekte edilen seruma karşı antikor oluşur. Tavşanlar son enjeksiyondan sonra 24 saat aç bırakılarak kanları alınır ve serumları titre edilerek presipitan serum elde edilir

Halka Testi: Basit olarak bir bağışık serumda, belli bir antijene karşı antikor olup olmadığını ya da bir sıvıda belli bir antikora karşı antijen olup olmadığını, kalitatif olarak anlamak m¼mk¼nd¼r. Bu metot, bazı besin maddelerinde bulunan yabancı proteinlerin (sucuklarda uygunsuz etlerin), bazı kuşkulu lekelerin insan ya da hayvan kanı olup olmadığının anlaşılması gibi konularda uygulanabilmektedir

İnce bir tüp içerisine az bir miktar bağışık serum konur. Üzerine iki sıvı karışmayacak ve tabakalaşacak şekilde tüpe 45° eğip damlalığın ucu tüpe değdirilerek yavaşça antijen eriyiğinden eklenir. Eğer ortamda birbirine uygun antijen ve antikor bulunuyorsa bir süre sonra iki sıvının birleştiği yerde beyaz bulut görünümünde bir presipitasyon halkası oluşur.

Tüp Tekniği: Adli tıp pratiğinde presipitasyon için, daha ziyade tüp tekniği kullanılmaktadır. Presipitan serumla kan lekesinin, insan kanı olup olmadığının araştırılması, kan serumu içindeki proteinlere dayanır.

Huber'in Modifiye Presipitasyon Testi: Bir lam üzerine, yan yana bir damla anti human presipitan serum, bir damla da araştırılacak olan kan lekesi ekstraktından damlatılıp, lamel kapatılır. Mikroskopta incelendiğinde iki zon arasında beyaz çizgi şeklinde bir reaksiyon gözlenir. Normal mikroskopla görmek her zaman mümkün olmadığından, incelemenin karanlık saha mikroskobuyla yapılması, bu bandı açıkça görmeyi sağlar.

Kapiller test: Bu test, tüp testinin yüz defa küçültülmüş şeklidir. Çok az miktardaki lekeler üzerine uygulanabildiği gibi, serum tasarrufunda da bulunulmuş olur. Bir ml antiserumla 10-15 inceleme yapılabilir. 20 cm. uzunluğunda 2.5 mm. çapında kalın cam kapillerler kullanılır. Kapillerlerin alt ucundan aralarında ufak bir hava kabarcığı bırakılarak önce ekstrakt daha sonra anti serum emdirilir. Kapillerlerin alt uçları bir parça plastin ile kapatılarak kapillere parmakla hafifçe vurup hava kabarcığı çıkarılarak ekstraktla serumun teması sağlanır. 2-3 dk. sonra siyah bir fon ve kuvvetlice bir ışık karşısında presipitasyonun oluşup oluşmadığı kontrol edilir.

Agar-Gel Diffüzyon Testi: Bu test, santrifüj yoluyla iyice berraklaştırılmayan kan lekeleri için tercih edilen bir metottur. Ayrıca reaksiyonun uzun müddet devam etmesi ve saklanabilmesi gibi avantajları da vardır.

Bir petri kutusu içine 2-3 mm. kalınlığında % 1.5 agar çözeltisi dökülür. Soėutulduktan ve hafif katılaştıktan sonra bir mantar delicisiyle tam ortasında 3-5 mm. apında bir delik ve etrafına da 1 cm. apında dört delik daha açılır. Ortadaki deliğe anti human presipitan serum, diğer deliklere de kontrol için ekstraktın çeşitli dilüsyonlarından konulur.

Aynı büyüklükteki diğer bir petri kutusunda hazırlanan agar çözeltilisine de aynı delikler açılarak ortadakine incelemesi yapılan ekstrakt, soldakine anti human, alttakine anti sığır, sağdakine anti domuz presipitan serumları konularak agar gel plaklarının delikleri karşılıklı gelmek üzere üst üste konur ve 1-3 gün süreyle buzdolabında bekletilir. Pozitif reaksiyonun oluştuğu ortadaki deliğin etrafında halka şeklinde koyu renkli bir bulanıklığın belirmesiyle anlaşılır.

Ohterlony Presipitasyon Testi

<https://www.youtube.com/watch?v=hmK7yYr2T54>

<https://www.youtube.com/watch?v=Fnx5CkGRBEM>

Aglütinasyon Esasına Dayanan Testler

Aglütinasyon: Antikorların, birden fazla antijenik hücre ile, antijenik hücrelerin de, birden fazla antikorla birleşmesi sebebiyle eritrositlerin bir araya toplanmasına aglütinasyon denir. Bir araya toplanan bu eritrositler gözle, büyüteçle veya mikroskopla görülebilir. Aglütinasyon olayının gerçekleşebilmesi için, antijeni taşıyan hücrelerin elektrolitli ortamda (serum fizyolojikte) süspansiyon halinde bulunmaları gerekir.

Coombs testi, Anti-human globulin testi, Pasif hemaglutinasyon testi, Leke içinde anti-art aglutininlerin varlığı esasına dayanan metotlar bu testlerden bazılarıdır.

Coombs Testi: Bu test, 1949 yılında Wiener tarafından geliştirilerek Adli Tıp alanında insan kanı ile hayvan kanı ayırımı için kullanılmaya başlanmıştır. Coombs serumu, eritrositlerin etrafını kaplayan inkomplet Rh antiserumunun ortaya çıkarılmasında kullanılır. İnkomplet Rh antiserumu ile kaplanıp aglütinasyon vermeyen eritrositlerin üzerine bir damla anti-human globulin serum (Coombs serumu) damlatıldığında, anti globulin molekülleri hassaslaştırılmış olan eritrositleri aglütine ederler.

Anti-Human Globulin Test: Jungwirth, 1956'da anti human globulin serum ile insan proteinlerinin biraraya gelmesi sonucunda Coombs serumunun nötralize olması, yani aktivitesini tamamen kaybetmesi özelliğinden yararlanarak bu metodu geliştirmiştir.

Bu testin tercih nedeni, bulanık ekstraktların temizlenmesine gerek kalmaması, tüp testinden kolay, çabuk ve onun kadar hassas olmasıdır. O grubu Rh + kan eritrositleri Anti H serumu ile yarım saat 37°C'de inkübe edilir. Üç defa serum fizyolojikle yıkanarak %5'lik süspansiyonu hazırlanır. Coombs serumunun 1/50'lik solüsyonundan bir tüpe veya bir lama bir damla konur. Bir damla da leke ekstraktından damlatılıp karıştırılır, 5 dk. bekletilir. Üzerine eritrosit süspansiyonundan bir damla damlatılır, 5-10 dk. bekletilip aglütinasyon meydana gelip gelmediğine bakılır. Eğer aglütinasyon meydana gelmemişse araştırılan leke insan kanı lekesidir.

Pasif Hemaglutinasyon Testi: Eritrositler, tanen ile muamele edilir ve globulin içeren insan serumundaki proteinle bağlanma kabiliyeti kazandırılır. Bu globuline bağlanma özelliği kazanan eritrositlerden bir tüpe bir damla konur ve üzerine anti human globulin serum eklenir. Aglutinasyon meydana gelmiş ise, leke insan kanı lekesidir (Camps, 1968, s.:196).

Leke içinde Anti-Art Aglütininin Varlığı Esasına Dayanan Metot: Bu metot Marx, Ehren ve Roorh tarafından bulunmuştur. Araştırılan kan lekesinin % 0,6'lık serum fizyolojik ile oldukça konsantre bir solusyonu hazırlanır. Bundan lama bir damla damlatılır. Parmak ucundan direkt olarak alınan kandan bir damla ilave edilir, aglütinasyon meydana gelmiş ise, leke insan kanı lekesi değildir. Çünkü bu aglütinasyonun oluşumuna neden olan anti-art aglütinin, bir çok hayvanın serumunda da bulunmaktadır.