

ÖZET**SANTRİFÜJLÜ KOMBİNE ENTEROTOKSEMİ TEŞHİS SİSTEMİ VE YÖNTEMİ**

Buluş, özellikle çiftlik hayvanlarında öldürücü ve ciddi ekonomik kayıplara yol açan Enterotoksemi hastalığının sahada hızlı ve doğru teşhisini sağlayarak ekonomik kayıpları azaltan, ek olarak antikor-antijen tabanlı çalıştığı için antijen ve antikoru mevcut olan tüm hastalıklar için de kullanılabilen bir sistem ve yöntem ilgilidir.

Şekil-1

İSTEMLER

1. Antijen ve antikoru olan mevcut olan hastalıkların tespitini sağlayan sistem olup, **özelliği;**
 - numuneyi santrifüje edip yabancı ve gereksiz partikülleri ayıran santrifüj (1),
 - 5 • bahsedilen santrifüjün (1) hız ve süresini ayarlamayı sağlayan santrifüj kontrol birimi (2),
 - numunelerin santrifüje edebilmesi için konulduğu santrifüj numune kapsülleri (3),
 - santrifüj edilecek numunelerin döndürülmesini sağlayan santrifüj rotoru (4),
 - 10 • bahsedilen santrifüj rotorunun (4) hızını ayarlamayı sağlayan yüksek hızlı DC motor (5),
 - sistemin açılıp kapatılmasını sağlayan açma kapama anahtarı (6),
 - ışık değerlerini okuyarak numunelerin pozitiflik ve negatifliklerini değerlendiren optik algılayıcı (7),
 - 15 • numunenin değerlendirilmesini sağlamak için numunelerin konulduğu antikor kaplı en az bir kuyucuk (8),
 - alttan gönderilen ışığın yoğunluğunu okuyarak aynı anda en az dört numunenin pozitif veya negatif olduğunu değerlendirilmesini sağlayan, numunelerin içine yerleştirildiği numune çekmecesi (9),
 - 20 • kolorimetrik inceleme yapılmasını sağlayan çok renkli LED (10),
 - sistemin uyguladığı yöntem adımları hakkında bilgi veren, sonuçların görüntülenmesini sağlayan ekran (11),
 - saha şartlarında sistemin şarjlı pil (16) vasıtası ile çalışması için enerji sağlayan pil şarj ünitesi (12),
 - 25 • optik algılayıcıdan (7) gelen verileri değerlendiren mikrodenetleyici birim (13),
 - sistemi dış sistemlere bağlamayı ve veri transferi yapılmasını sağlayan bağlantı portu (14),
 - sistemde istenen ayarlamaların yapılmasını sağlayan menü butonları (15),
 - santrifüjün (1) açılıp kapanmasını sağlayan santrifüj güç anahtarı (18),
 - 30 • bahsedilen pil şarj ünitesine (12) elektrik girişi sağlayan şarj girişi (17) içermesidir.
2. İstem-1'e uygun sistem olup, **özelliği;** bahsedilen kuyucukların (8) şeffaf plastikten mamul olmasıdır.

3. Antijen ve antikorlu olan mevcut olan hastalıkların tespitini sağlayan yöntem olup, **özelliliği**;

• okunacak numunenin küçük / büyük santrifüj tüpüne (1B, 1A) konularak santrifüj numune kapsüllerine (3) yerleştirilmesi ve santrifüj güç anahtarının (18) açık duruma getirilmesi,

• ayarlama yapılmasını sağlayan menü butonları (15) ve ekran (11) vasıtası ile bahsedilen santrifüjün (1) hız ve süresini ayarlamayı sağlayan santrifüj kontrol birimi (2) üzerinde gerekli ayarlamaların yapılması,

• yapılan ayarlamalara göre, yüksek hızlı DC motor (5) ile santrifüj rotorunun (4) dönmesinin sağlanması,

• santrifüje edilen numunenin üstte kalan kalan sıvı kısmının santrifüj numune kapsülleri (3) ile alınması ve numune çekmecesinin (9) kuyucuklarına (8) konulması,

• öncelikli olarak daha önceden hazırlanmış olan pozitif ve negatif numuneler daha sonra ise değerlendirilecek numunelerin bir optik algılayıcı (7) ve çok renkli LED'ler (10) vasıtası ile okutulması,

• içerisinde tercihen 4 kuyucuk (8) bulunan numune çekmecesinin (9) içinde bulunan numunelerden öncelikli olarak daha önceden hazırlanmış olan pozitif ve negatif numunelerin daha sonra ise değerlendirilecek numunelerin sistem içerisine yerleştirilmesi ve altta bulunan çok renkli LED'lerden (10) ışık verilerek antijen miktarına göre rengi değişen numunede ışığın yoğunluğu optik algılayıcılar (7) tarafından değerlendirilmesi,

• saha şartlarında sistemin şarjlı pil (16) vasıtası ile çalışması için enerji sağlayan pil şarj ünitesi (12) tarafından sistemin sahada çalışması için gerekli enerjinin sağlanması,

• bahsedilen ekranın (11) menü butonları (15) ile ayarlanarak okutma işleminin mikrodenetleyici birim (13) tarafından tamamlanması ve sonucun pozitif veya negatif olarak ekrana (11) yansıtılması,

• elde edilen verilerin bir USB bağlantı portu (14) ile dış sistemlere aktarılması işlem adımlarını içermesidir.

4. İstem-3'e uygun yöntem olup, **özelliliği**; sistemin açma kapama anahtarı (6) vasıtası ile açılıp kapatılması işlem adımı içermesidir.

5. İstem-3'e uygun yöntem olup, **özelliği**; bahsedilen pil şarj ünitesine (12) elektrik girişinin şarj girişi (17) vasıtası ile sağlanması işlem adımını içermesidir.

TARİFNAME

SANTRİFÜJLÜ KOMBİNE ENTEROTOKSEMİ TEŞHİS SİSTEMİ VE YÖNTEMİ

Teknik Alan

Buluş, özellikle çiftlik hayvanlarında öldürücü ve ciddi ekonomik kayıplara yol açan Enterotoksemi hastalığının sahada hızlı ve doğru teşhisini sağlayarak ekonomik kayıpları azaltan, ek olarak antikör-antijen tabanlı çalıştığı için antijen ve antikoru mevcut olan tüm hastalıklar için de kullanılabilen bir sistem ve yöntem ilgilidir.

Tekniğin Bilinen Durumu

Enterotoksemi ülkemizin de içinde bulunduğu birçok ülkede çiftlik hayvanlarının önemli problemlerinden birisidir ve en önemli klinik semptomları olan ishal ve ani ölümler aynı semptomlarla seyreden birçok hastalıkla karışabilmektedir. Bu hastalıktaki en önemli problem antibiyotiklerle değil ancak aşılama ile hayvanların iyileştirilebilmesidir. Tüm bu sebeplerden dolayı hastalığın hızlı ve doğru teşhisi hayvan ölümlerini önlenmesi ve ekonomik kaybın azaltılması için elzemdir.

Mevcut teknikte, saha şartlarında Veteriner Hekimler bu hastalığın tespitinde zorlandıklarından ya doğrudan antibiyotik tedavisine başlamakta ya da aşılama yapmaktadırlar. Bu ise gereksiz ilaç ve aşı kullanımı yanı sıra yanlış tedavi durumlarında önemli derecede ölümlere sebep olmaktadır. Bu hastalığa etkeni olan *Clostridium perfringens* bakterisi değil bu bakterinin toksinleri sebep olmaktadır ve etkenin başlıca 5 önemli toksini vardır. Piyasada kullanılan teşhis kitleri bu toksinlerin tespitine yöneliktir. Ancak bu bakteri normalde de bağırsaklarda bulunduğu az miktarda toksin salgılar ancak toksin az miktarda olduğunda hastalığa sebep olmaz veya her zaman tespit edilemez. Bu buluşta bakterilerin bağırsaklara tutunup hastalık oluşturmasını sağlayan nörominidaz enziminin hızlı tespiti ve hastalığın güvenilir teşhisi amaçlanmıştır. Böylece daha yüksek oranda doğru teşhis yapılabilecektir. Bu enzimin tespiti sayesinde enterotoksemi hastalığının teşhisi ile ilgili herhangi bir tanı yöntemi bulunmamaktadır.

Enterotokseminin saha şartlarında teşhisi için kullanılan toksin strip kitlerinin duyarlılıkları yukarıda açıklanan sebeplerle çok yüksek değildir. Daha hassas olan

ELISA kitleri ise ancak laboratuvar koşullarında yapılabilmekte bu ise zaman

almaktadır. Bu sebeple saha şartlarında hastalığın hızlı teşhisi ekonomik kayıpları azaltmak açısından oldukça önemlidir.

Konu ile ilgili yapılan araştırma sonucunda, 2021/019550 numaralı “Bir tıbbi teşhis cihazı” başlıklı başvuruya rastlanılmıştır. Sistemde, temel olarak transkripsiyonel regülatör ve biyo algılama modülü ile oluşturulan sentetik genetik devre sayesinde üre ve ürik asit tespiti yapan hücresel biyosensöre sahip bir tıbbi teşhis cihazı tarif edilmektedir.

Sonuç olarak, yukarıda anlatılan olumsuzluklardan dolayı ve mevcut çözümlerin konu hakkındaki yetersizliği nedeniyle ilgili teknik alanda bir geliştirme yapılması gerekli kılınmıştır.

Buluşun Amacı

Buluş, mevcut durumlardan esinlenerek oluşturulup yukarıda belirtilen olumsuzlukları çözmeyi amaçlamaktadır.

Buluşun ana amacı, Enterotoksemi hastalığının hızlı şekilde teşhisini sağlamaktır.

Buluşun diğer bir amacı, hastalığın etkeni olan Clostridium perfringens bakterisinin bağırsak hücrelerine yapışması ve toksin salgılamasını sağlayan nörominidaz isimli faktöre karşı geliştirilen antikorlar ile numunedeki antijenleri arayan ve hastalığın teşhisi kolorimetrik olarak hızlı bir şekilde ve laboratuvara numune göndermeye gerek kalmadan yapılmasına imkân veren bir sistem ve yöntem ortaya koymaktır.

Buluşun diğer bir amacı, içermiş olduğu mini santrifüj ile numunelerin hızlı bir şekilde işlenmesini sağlayan bir sistem ve yöntem oluşturmaktır.

Nörominidaz bir enzim olup hastalık etkeninin bağırsaklara tutunmasını ve hastalık yapmasını sağlar. Bu nedenle buluş özellikle bağırsak içeriğinde nöraminidazın tespiti ile hastalığın daha hızlı ve güvenilir şekilde teşhisini sağlayacaktır. Ayrıca daha ucuz, pratik ve doğru teşhisin önünü açacaktır. Bağırsak içeriğinde fazla miktarda yabancı partikül bulunduğu için bunların uzaklaştırılması için mini bir santrifüjün eklenerek kombine hale getirilmesi hem iş yükünü azaltacak hem de doğruluk oranlarını arttıracaktır.

Geliştirilen bu biyosensörlü ve santrifüjlü kombine cihaz çalışmamız kapsamında tarafımızca üretilen ELISA kitleri ve piyasada satılan ticari tüm ELISA kitleri ile

kullanılabilecektir. Enteretoksemi hastalığının tespitinde nörominidaz üzerinden çalışan ticari bir kit bulunmamaktadır. Kendi laboratuvarımızda üretilen anti nörominidaz antikorlu kaplı ELISA kuyucuklarının üzerine şüpheli hayvanlardan alınan ve santrifüje edilerek yabancı partiküllerinden arındırılan sıvı numune konulacak akabinde yine

5 çalışmamız kapsamında geliştirilecek olan enzim işaretli sekonder antikor ve enzime uygun substrat konularak antijen-antikor bağlanması yani nörominidaz bulunan kuyularda renk değişimi gözlenecektir. Oluşan bu renk değişimi hastalık açısından pozitif durumu gösterecektir.

Cihazın kolorimetrik sensörlü bölümündeki numune çekmecesinin kısmında 4 kuyucuk bulunmakta olup numune çekmecesinin cihazı yerleştirildiğinde alttan numuneye renkli led ışık verilecek ve şeffaf plastikten üretilen kuyucukların üstünde bulunan ve ışığın yoğunluğunu yani kuyucuğun renk değişikliği miktarını algılayacak sensörler ile ışık değerleri belirlenecektir. Bu sensörler ayrıca numune çekmecesinin doğru yerleştirilip yerleştirilmediğini, solüsyonların doğru uygulanıp uygulanmadığını da algılayacak ve

10 ekranda uyarı verecektir.

Geliştirilecek biyosensörün 4 farklı kuyucuktaki numuneleri aynı anda okuyabilmesi planlanmıştır. Her bir yeni okutmada ilk önce cihaza birinci kuyuda pozitif kontrol, ikinci kuyuda negatif kontrol okutulacak ve cihazın bunu hafızasına kaydetmesi sağlanacaktır. Cihaza yazılım aracılığı ile pozitif ve negatiflik için artı/eksi değerler

20 girilecek ve bu partide bundan sonraki okutmalarda cihaz ölçüm aralığına göre kendisi değerlendirme yaparak okutulan numunenin hastalık açısından pozitif veya negatif olduğunu kullanıcıya otomatik olarak ekran üzerinden gösterecektir. Her okutma için pozitif ve negatif kontrolün en başta bir kere okutulması yeterli olacaktır bu da sürü taramalarında iş yükünü önemli ölçüde azaltacaktır. Yukarıda belirtildiği gibi cihaz

25 sadece nörominidaza spesifik değildir. Kolorimetrik sonuç veren tüm maddeler (hastalık tespiti, hormon vb. değerler) için kullanılabilir. Çalışma sırasında başka bir antijen/antikor ile ölçüm yapılmaya geçilirse uygun pozitif ve negatif kontrolün okutularak cihazın ölçüm aralığının tekrar belirlenmesi gerekecektir.

Biyosensör aracılığı ile okutulan numune sonuçları uygun uygulamalar sayesinde

30 telefon, tablet ve bilgisayara aktarılabilecek, üzerinde çalışmalar yapılabilecek ve istenilen formatta saklanabilecektir.

Sonuç olarak küçük, portatif ve tüm kolorimetrik çalışmalara uygun olan bu santrifüjlü biyosensör sayesinde hastalıkların tespiti ekstra bir laboratuvar çalışması

gerektirmeden sahada hızlıca yapılabilecek ve sonuçlar birkaç dakika içinde belirlenecek ve sonrasında da değerlendirilmek üzere elektronik ortamda saklanabilecektir.

Yukarıda anlatılan amaçların yerine getirilmesi için buluş, antijen ve antikor mevcut olan hastalıkların tespitini sağlayan sistemdir. Buna göre sistem;

- numuneyi santrifüje edip yabancı ve gereksiz partikülleri ayıran santrifüj,
- bahsedilen santrifüjün hız ve süresini ayarlamayı sağlayan santrifüj kontrol birimi,
- numunelerin santrifüje edebilmesi için konulduğu santrifüj numune kapsülleri,
- santrifüj edilecek numunelerin döndürülmesini sağlayan santrifüj rotoru,
- bahsedilen santrifüj rotorunun hızını ayarlamayı sağlayan yüksek hızlı DC motor,
- sistemin açılıp kapatılmasını sağlayan açma kapama anahtarı,
- ışık değerlerini okuyarak numunelerin pozitiflik ve negatifliklerini değerlendiren optik algılayıcı,
- numunenin değerlendirilmesini sağlamak için numunelerin konulduğu antikor kaplı en az bir kuyucuk,
- alttan gönderilen ışığın yoğunluğunu okuyarak aynı anda en az dört numunenin pozitif veya negatif olduğunu değerlendirilmesini sağlayan, numunelerin içine yerleştirildiği numune çekmecesini,
- kolorimetrik inceleme yapılmasını sağlayan çok renkli LED,
- sistemin uyguladığı yöntem adımları hakkında bilgi veren, sonuçların görüntülenmesini sağlayan ekran,
- saha şartlarında sistemin şarjlı pil vasıtası ile çalışması için enerji sağlayan pil şarj ünitesi,
- optik algılayıcıdan gelen verileri değerlendiren mikrodenetleyici birim,
- sistemi dış sistemlere bağlamayı ve veri transferi yapılmasını sağlayan bağlantı portu,
- sistemde istenen ayarlamaların yapılmasını sağlayan menü butonları,
- santrifüjün açılıp kapanmasını sağlayan santrifüj güç anahtarı,
- bahsedilen pil şarj ünitesine elektrik girişi sağlayan şarj girişi

içermektedir.

Buluş aynı zamanda, antijen ve antikoru olan mevcut olan hastalıkların tespitini sağlayan yöntemi de kapsamaktadır. Buna göre yöntem;

- okunacak numunenin küçük / büyük santrifüj tüpüne konularak santrifüj numune kapsüllerine yerleştirilmesi ve santrifüj güç anahtarının açık duruma getirilmesi,
 - 5 • ayarlama yapılmasını sağlayan menü butonları ve ekran vasıtası ile bahsedilen santrifüjün hız ve süresini ayarlamayı sağlayan santrifüj kontrol birimi üzerinde gerekli ayarlamaların yapılması,
 - yapılan ayarlamalara göre, yüksek hızlı DC motor ile santrifüj rotorunun dönmesinin sağlanması,
 - 10 • santrifüje edilen numunenin üstte kalan sıvı kısmının santrifüj numune kapsülleri ile alınması ve numune çekmecesinin kuyucuklarına konulması,
 - öncelikli olarak daha önceden hazırlanmış olan pozitif ve negatif numuneler daha sonra ise değerlendirilecek numunelerin bir optik algılayıcı ve çok renkli LED'ler vasıtası ile okutulması,
 - 15 • içerisinde tercihen 4 kuyucuk bulunan numune çekmecesinin içinde bulunan numunelerden öncelikli olarak daha önceden hazırlanmış olan pozitif ve negatif numunelerin daha sonra ise değerlendirilecek numunelerin sistem içerisine yerleştirilmesi ve altta bulunan çok renkli LED'lerden ışık verilerek antijen miktarına göre rengi değişen numunede ışığın yoğunluğunun optik algılayıcılar tarafından değerlendirilmesi,
 - 20 • saha şartlarında sistemin şarjlı pil vasıtası ile çalışması için enerji sağlayan pil şarj ünitesi tarafından sistemin sahada çalışması için gerekli enerjinin sağlanması,
 - bahsedilen ekranın menü butonları ile ayarlanarak okutma işleminin
 - 25 mikrodenetleyici birim tarafından tamamlanması ve sonucun pozitif veya negatif olarak ekrana yansıtılması,
 - elde edilen verilerin bir USB bağlantı portu ile dış sistemlere aktarılması
- işlem adımlarını içermektedir.

- 30 Buluşun yapısal ve karakteristik özellikleri ve tüm avantajları aşağıda verilen şekiller ve bu şekillere atıflar yapılmak suretiyle yazılan detaylı açıklama sayesinde daha net olarak anlaşılacaktır ve bu nedenle değerlendirmenin de bu şekiller ve detaylı açıklama göz önüne alınarak yapılması gerekmektedir.

Buluşun Anlaşılmasına Yardımcı Olacak Şekiller

Şekil 1, buluşa konu olan sistemin çeşitli açılardan görüntüsünü vermektedir.

Parça Referanslarının Açıklaması

1. Santrifüj
- 1A. Büyük santrifüj tüpü
- 5 1B. Küçük santrifüj tüpü
2. Santrifüj kontrol birimi
3. Santrifüj numune kapsülleri
4. Santrifüj motoru
5. Yüksek hızlı DC motor
- 10 6. Açma kapama anahtarı
7. Optik algılayıcı
8. Kuyucuk
9. Numune çekmeces
10. Çok renkli LED
- 15 11. Ekran
12. Pil şarj ünitesi
13. Mikrodenetleyici birim
14. USB bağlantı portu
15. Menü butonu
- 20 16. Şarjlı pil
17. Şarj girişı
18. Santrifüj güç anahtarı

Buluşun Detaylı Açıklaması

Bu detaylı açıklamada, buluşa konu olan sistem ve yöntemin tercih edilen yapılanmaları, sadece konunun daha iyi anlaşılmasına yönelik olarak açıklanmaktadır.

Buluş, antijen ve antikoru olan mevcut olan hastalıkların tespitini sağlayan sistemdir.

- 5 Şekil-1'de buluşa konu olan sistemin şematik görüntüsü verilmektedir. Buna göre sistem; numuneyi santrifüje edip yabancı ve gereksiz partikülleri ayıran santrifüj (1), bahsedilen santrifüjün (1) hız ve süresini ayarlamayı sağlayan santrifüj kontrol birimi (2), numunelerin santrifüje edebilmesi için konulduğu santrifüj numune kapsülleri (3), santrifüj edilecek numunelerin döndürülmesini sağlayan santrifüj rotoru (4), bahsedilen
- 10 santrifüj rotorunun (4) hızını ayarlamayı sağlayan yüksek hızlı DC motor (5), sistemin açılıp kapatılmasını sağlayan açma kapama anahtarı (6), ışık değerlerini okuyarak numunelerin pozitiflik ve negatifliklerini değerlendiren optik algılayıcı (7), numunenin değerlendirilmesini sağlamak için numunelerin konulduğu antikor kaplı en az bir kuyucuk (8), alttan gönderilen ışığın yoğunluğunu okuyarak aynı anda en az dört
- 15 numunenin pozitif veya negatif olduğunu değerlendirilmesini sağlayan, numunelerin içine yerleştirildiği numune çekmecesini (9), kolorimetrik inceleme yapılmasını sağlayan çok renkli LED (10), sistemin uyguladığı yöntem adımları hakkında bilgi veren, sonuçların görüntülenmesini sağlayan ekran (11), saha şartlarında sistemin şarjlı pil (16) vasıtası ile çalışması için enerji sağlayan pil şarj ünitesi (12), optik algılayıcıdan (7)
- 20 gelen verileri değerlendiren mikrodenetleyici birim (13), sistemi dış sistemlere bağlamayı ve veri transferi yapılmasını sağlayan bağlantı portu (14), sistemde istenen ayarlamaların yapılmasını sağlayan menü butonları (15), santrifüjün (1) açılıp kapanmasını sağlayan santrifüj güç anahtarı (18), bahsedilen pil şarj ünitesine (12) elektrik girişi sağlayan şarj girişi (17) içermektedir.
- 25 Sistemin tercih edilen uygulamasında bahsedilen kuyucuklar (8) şeffaf ve özel plastiken yapılmakta ve antikor kaplı olarak karakterize edilmektedir.

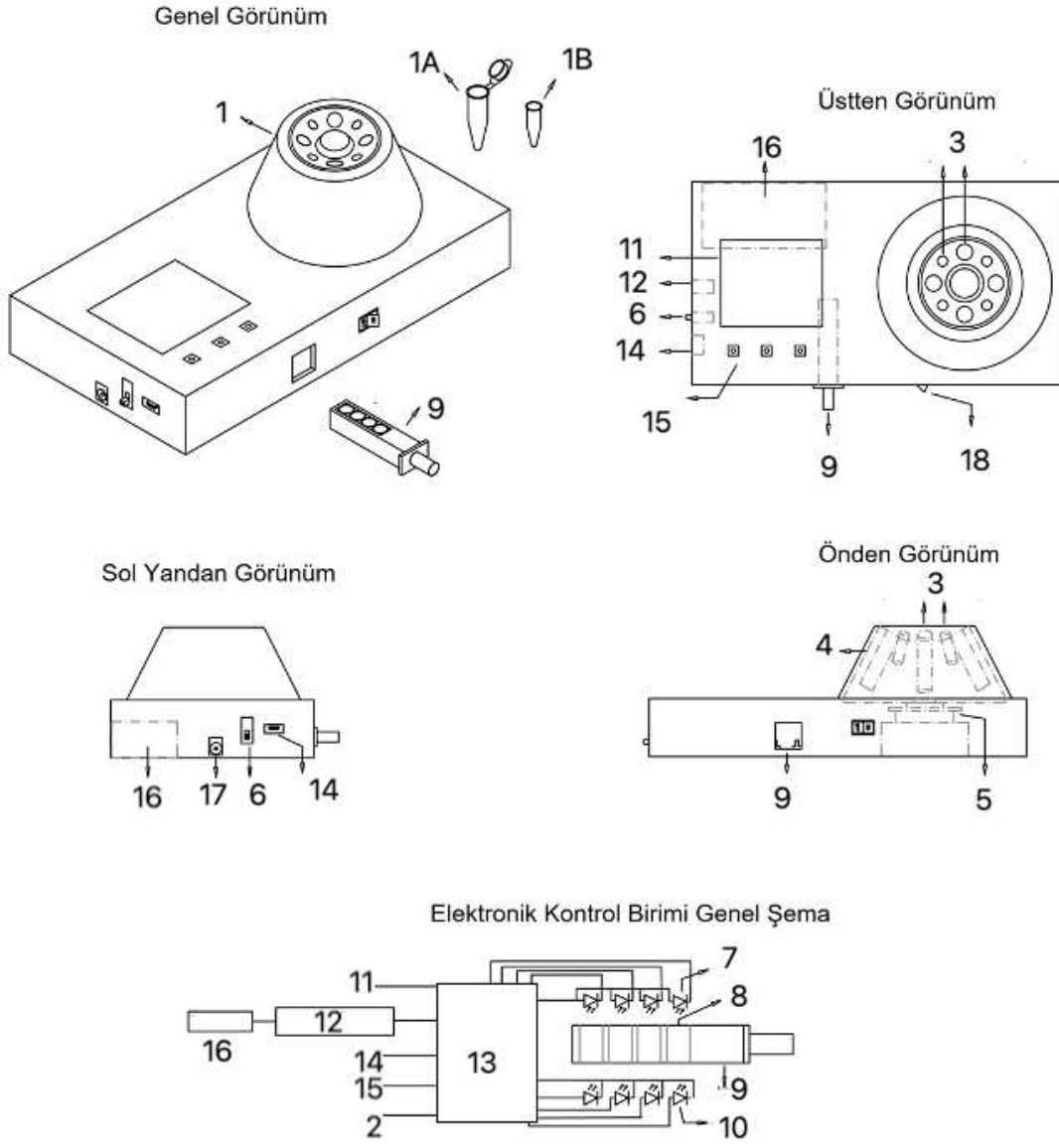
Sistemin çalışma prensibi ise şu şekildedir:

- Bağırsak içeriği veya kan gibi numune alınır. Okunacak numune küçük / büyük santrifüj
- 30 tüpüne (1B, 1A) konularak santrifüj numune kapsüllerine (3) yerleştirilir. Santrifüj güç anahtarı (18) açık duruma getirilir. Santrifüj kontrol birimi (2) için ekran (11) üzerinde gerekli ayarlamalar yapılır. Yüksek hızlı DC motor (5) ile rotorun (4) dönmesi sağlanır. Santrifüje edilen numunenin üstte kalan sıvı kısmı alınır ve numune çekmecesinin (9) kuyucuklarına (8) konulur. Bu aşamada ilk olarak daha önceden hazırlanmış olan

pozitif ve negatif numuneler okutulur ardından değerlendirilecek numuneler okutulur. Numune çekmesinde (9) tercihen dört adet numune kuyucuğu (8) bulunur. Çekmece düzgünce cihaza yerleştirildiğinde altta bulunan çok renkli LED'lerden (10) ışıık verilerek antijen miktarına göre rengi değişen numunede ışıığın yoğunluğu optik algılayıcılar (7) tarafından değerlendirilir. Cihaz saha şartlarında kullanılacağı için enerji kaynağı olarak şarjlı pil (16) ve pil şarj ünitesi (12) içermektedir. Dijital ekran (11) menü butonları (15) ile ayarlanarak okutma işlemleri mikrodeneleyici birim (13) tarafından tamamlanır ve sonuç pozitif veya negatif olarak ekranda (11) gösterilir. Elde edilen veriler önce cihaza daha sonra saklamak için USB bağlantı portu (14) ile başka bir bilgisayara aktarılır.

10

15



Şekil-1