

ÖZET**ENTEROTOKSEMİ HASTALIĞININ HIZLI TEŞHİSİ İÇİN BİR TEST KİTİ**

- 5 Buluş, enterotoksemi hastalığının teşhisi için hastalığının etkeni olan *Clostridium perfringens* bakterisinin bağırsaklarda tutunup hastalık oluşturmalarını sağlayan nöraminidaz enzimini tespit eden bir test kiti ile ilgilidir. *Clostridium perfringens* bakterisi normalde de bağırsaklarda bulunmaktadır. Hastalık oluşturan durum ise etkenin bağırsaklara tutunup toksin üretmesidir. Nöraminidaz ise etkenin önemli bir virülans faktörüdür ve tespiti hastalığın varlığı açısından önemlidir. Test kiti doğrudan bu enzimin tespitine yönelik olduğundan duyarlılığı da yüksek olacak, hastalığın hızlı teşhisini ve dolayısıyla hızlı tedavisini sağlayacaktır.
- 10

İSTEMLER

1. Enterotoksemi hastalığının teşhisi için numune pedi (NP), konjuge pedi (KP), membran (M), test çizgisi (TÇ) ve kontrol çizgisi (KÇ) içeren bir test kiti olup özelliği; enterotoksemi hastalığının etkeni olan *Clostridium perfringens* bakterisinin bağırsaklarda tutunup hastalık oluşturmalarını sağlayan nöraminidaz enzimini tespit eden nöraminidaza karşı oluşturulmuş monoklonal veya poliklonal antikorlar içermesidir.
2. İstem 1'e uygun bir test kiti olup özelliği; bir hayvana ait immunglobulin ve bu immunglobulini yakalayacak başka hayvana ait antikorların kullanıldığı bir kontrol çizgisi (KÇ) içermesidir.
3. İstem 1'e uygun bir test kiti olup özelliği; test çizgisini (TÇ) oluşturmak üzere altın nanoparçacıklar ile konjuge edilmiş *Clostridium perfringens* bakterisinin nöraminidazına karşı oluşturulmuş monoklonal antikorlar ve *Clostridium perfringens* bakterisinin nöraminidazına karşı oluşturulmuş monoklonal antikorlar ile kontrol çizgisini (KÇ) oluşturmak üzere nanoparçacık ile konjuge edilmiş tavşan IgG antikor emdirilmiş konjuge pedi (KP) içermesidir.
4. İstem 1'e uygun bir test kiti olup özelliği; capture antikor olarak keçi poliklonal antinöraminidaz veya farede geliştirilen monoklonal antikor emdirilmiş ; ayrıca kontrol çizgisini (KÇ) oluşturmak üzere Goat antirabbit IgG emdirilmiş Membran (M) içermesidir.

TARİFNAME

ENTEROTOKSEMİ HASTALIĞININ HIZLI TEŞHİSİ İÇİN BİR TEST KİTİ

5 Teknik Alan

Buluş, enterotoksemi hastalığının teşhisi için hastalığının etkeni olan *Clostridium perfringens* bakterisinin bağırsaklarda tutunup hastalık oluşturmalarını sağlayan nöraminidaz enzimini tespit eden bir test kiti ile ilgilidir.

10

Buluş özellikle koyun, keçi ve sığır gibi çiftlik hayvanlarında ölümlere ve önemli ekonomik kayıplara yol açan enterotoksemi hastalığının hızlı teşhisine yöneliktir.

Tekniğin Bilinen Durumu

15

Özellikle koyun, keçi ve sığır gibi çiftlik hayvanlarında ölümlere ve önemli ekonomik kayıplara yol açan enterotoksemi hastalığı ishal ve ani ölüm gibi semptomlar ile seyreder ve sahada birçok hastalıkla karışabilir. Ancak enterotoksemilerin tedavisi antibiyotiklerle tedavi edilebilen diğer hastalıkların tersine aşılama ile yapılmaktadır. Bu sebeple hızlı ve kesin teşhis, tedavinin doğru yapılması ve hayvan kaybının önlenmesi açısından önemlidir. Mevcut teknikteki US9408900B2 numaralı Amerikan patenti, prokaryotik ekspresyon vektörü kullanılarak *Clostridium perfringens*'in toksik olmayan rekombinant EtxY71G proteininin üretilmesi ve yüksek seviyede ekspresyonu ile ilgilidir. Patent ana amacı, *Clostridium perfringens* ve epsilon toksin intoksikasyonuna karşı rekombinant bir aşı üretmektir.

25

Veteriner Hekimler saha şartlarında bu hastalığı tespit etmekte zorlandıklarından ya doğrudan antibiyotik tedavisine başlamakta ya da aşılama yapmaktadırlar. Bu ise gereksiz ilaç ve aşı kullanımının yanı sıra yanlış tedavi durumlarında önemli derecede ölüme sebep olmaktadır. Bu hastalığın etkeni olan *Clostridium perfringens* isimli bakterinin toksinleri hastalığın şekillenmesine sebep olur ve başlıca 5 önemli toksini vardır. Piyasada kullanılan teşhis kitleri bu toksinlerin tespitine yöneliktir. Bu bakteri normalde de bağırsaklarda bulunduğundan az miktarda toksin salgılar ancak toksin az miktarda olduğunda hastalığa sebep olmaz veya her zaman tespit edilemez.

35

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 önem arz etmektedir.

5

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

10 **Buluşun Amacı**

Bu buluşta, bakterilerin bağırsaklara tutunup hastalık oluşturmalarını sağlayan nöraminidaz enziminin tespiti amaçlanmıştır. Buluş konusu test kiti ile bağırsak içeriğinde enterotoksemi hastalığının daha güvenilir şekilde teşhisi sağlanacaktır. Ayrıca daha ucuz, pratik ve doğru teşhisin önü açılacaktır.

15

Buluş sayesinde enterotokseminin teşhisi için etkenin bağırsak yüzeyine yapışmasını sağlayan nöraminidaz enziminin hızlı teşhisi ile hastalık teşhis edilecektir.

20 Buluşun yapısal ve karakteristik özellikleri ve tüm avantajları aşağıda verilen şekiller ve bu şekillere atıflar yapılmak suretiyle yazılan detaylı açıklama sayesinde daha net olarak anlaşılabacaktır.

Şekillerin Açıklaması

25

Şekil 1, buluş konusu test kitinin şematik görünümüdür.

Çizimlerin mutlaka ölçeklendirilmesi gerekmemektedir ve mevcut buluşu anlamak için gerekli olmayan detaylar ihmal edilmiş olabilmektedir.

30

Parça Referanslarının Açıklaması

AY. Akış yönü

F. Fıtıl

35

KÇ. Kontrol çizgisi

KP. Konjuge pedi

M. Membran

N. Numune

NP. Numune pedi

5 TÇ. Test çizgisi

Buluşun Detaylı Açıklaması

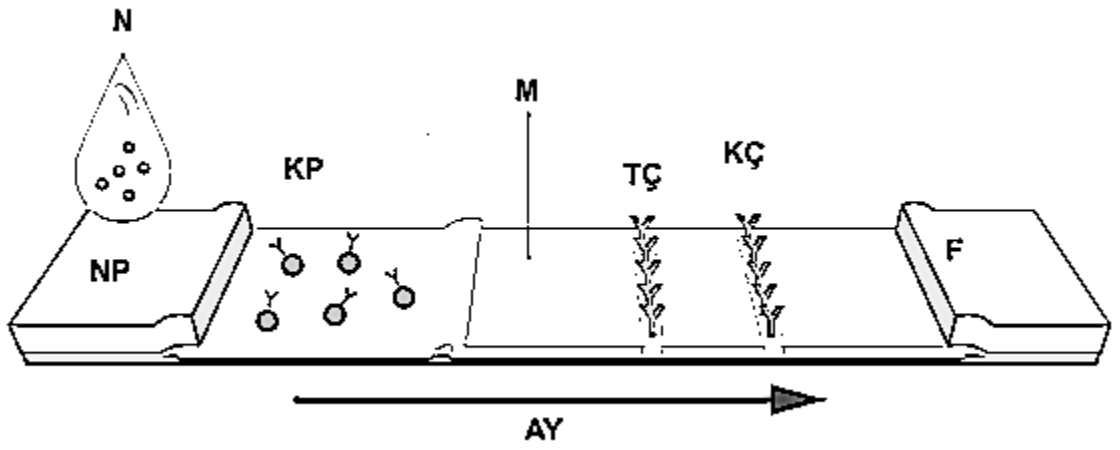
10 Bu detaylı açıklamada, buluşun tercih edilen yapılanmaları, sadece konunun daha iyi anlaşılmasına yönelik olarak ve hiçbir sınırlayıcı etki oluşturmayacak şekilde açıklanmaktadır.

15 Buluş konusu test kiti, enterotoksemi hastalığının teşhisi için hastalığının etkeni olan *Clostridium perfringens* bakterisinin bağırsaklarda tutunup hastalık oluşturmalarını sağlayan nöraminidaz enzimini tespit etmek üzere konjuge pedine (KP), test çizgisini (TÇ) oluşturmak üzere altın nanoparçacıklar ile konjuge edilmiş *Clostridium perfringens* bakterisinin nöraminidazına karşı oluşturulmuş monoklonal antikorlar, kontrol çizgisini (KÇ) oluşturmak üzere ise yine nanoparçacık ile konjuge edilmiş tavşan IgG antikor emdirilecektir. Membrana (M) capture antikor olarak keçi poliklonal antinöraminidaz veya 20 farede geliştirilen monoklonal antikor emdirilecektir. Ayrıca, kontrol çizgisini (KÇ) oluşturmak üzere membrana (M) Goat antirabbit IgG emdirilecektir. Hasta hayvanda gaita sulu kıvamlı olacağından numune (N) de sıvı kıvamlı olacak ya da serum örneği doğrudan kullanılacaktır. Numune (N) (gaita örneği veya serum) sıvısı numune çukuruna damlatılacak ve numune pedinden (NP) emilen sıvı test çizgisine kadar ilerlediğinde 25 pozitif ise antikor ile birleşerek renkli bir çizginin oluşması sağlanacaktır. Böylelikle bağırsak içerisinde bulunan bakteri tarafından sentezlenen ve hastalığın gelişiminin önemli bir göstergesi olan nöraminidaz varlığı saptanarak hastalığın teşhisi yapılacaktır.

30 Daha önce de belirtildiği gibi bu hastalığa sebep olan *Clostridium perfringens* bakterisi normalde de bağırsaklarda bulunmaktadır. Hastalık oluşturan durum ise etkenin bağırsaklara tutunup toksin üretmesidir. Nöraminidaz ise etkenin önemli bir virülans faktörüdür ve tespiti hastalığın varlığı açısından önemlidir. Strip kit tasarımı doğrudan bu enzimin tespitine yönelik olduğundan duyarlılığı da yüksek olacak, hastalığın hızlı teşhisini ve dolayısıyla hızlı tedavisini sağlayacaktır.

35

Şekil 1’de gösterilen test kitinin kullanımı için test edilmek istenen numune (N) kit üzerindeki numune çukuruna yerleştirilecektir. Numune pedi (NP) tarafından emilen numune (N) sırasıyla test kiti üzerindeki konjuge pedi (KP) ve membrandan (M) geçerek test çizgisi (TÇ) ve kontrol çizgisine (KÇ) ulaşacaktır. Her iki çizginin (TÇ, KÇ) de görünür olduğu durumda hastalık teşhis edilecektir.



Şekil 1