



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **103721** (13) **U**  
(51) МПК  
**C12Q 1/68** (2006.01)  
**C12N 15/10** (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ

**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ**

|   |   |
|---|---|
| <b>(21)</b> Номер заявки: <b>u 2015 06553</b>                                     | <b>(72)</b> Винахідник(и):<br><b>Приходько Юрій Олександрович (UA),</b><br><b>Пономаренко Володимир Якович (UA),</b><br><b>Лаптій Олена Петрівна (UA),</b><br><b>Приходько Олена Юріївна (UA),</b><br><b>Кульшин Володимир Євгенович (UA)</b>   |
| <b>(22)</b> Дата подання заявки: <b>03.07.2015</b>                                |   |
| <b>(24)</b> Дата, з якої є чинними права на корисну модель: <b>25.12.2015</b>     |   |
| <b>(46)</b> Публікація відомостей про видачу патенту: <b>25.12.2015, Бюл.№ 24</b> | <b>(73)</b> Власник(и):<br><b>Приходько Юрій Олександрович,</b><br>вул. Героїв Праці, 70, кв. 394, м. Харків, 61144 (UA),<br><b>Пономаренко Володимир Якович,</b><br>пр. Л. Свободи, 31, кв. 113, м. Харків, 61202 (UA),<br><b>Лаптій Олена Петрівна,</b><br>вул. Гвардійців Широнінців, 108, кв. 191, м. Харків, 61195 (UA),<br><b>Приходько Олена Юріївна,</b><br>вул. Героїв Праці, 70, кв. 394, м. Харків, 61144 (UA),<br><b>Кульшин Володимир Євгенович,</b><br>вул. Салтівське шосе, 252, кв. 48, м. Харків, 61361 (UA) |

**(54) СПОСІБ ІДЕНТИФІКАЦІЇ DIPYLIDIUM CANINUM У ПОПУЛЯЦІЇ СОБАК ЗА ДОПОМОГОЮ ПОЛІМЕРАЗНОЇ ЛАНЦЮГОВОЇ РЕАКЦІЇ****(57) Реферат:**

Спосіб ідентифікації *Dipylidium caninum* у популяції собак за допомогою полімеразної ланцюгової реакції включає проведення ПЛР, пробопідготовку, ампліфікацію, детекцію ампліфікаційної ДНК. Використовують ДНК ген 12S рРНК, який складається з таких послідовностей пар праймерів:

5' - CAGCAAGTGAATCCGTTTCAG-3'

5' - GCATCAAAACTCTAATAAGCAGCA-3'.

UA 103721 U



Корисна модель належить до галузі медицини та ветеринарної мікробіології, паразитології, імунології та біотехнології, а саме до способу ідентифікації *Dipylidium caninum* за допомогою полімеразної ланцюгової реакції.

Спосіб полімеразної ланцюгової реакції застосовується для діагностики інфекційних та паразитичних захворювань тварин та людини. В його основі лежить виявлення специфічного фрагмента геному збудника заразної хвороби у біологічних зразках і являє собою багаторазово повторювані цикли синтезу специфічної ділянки ДНК до гена-мішені.

Існують паразитологічні та серологічні способи діагностики наявності збудника *Dipylidium caninum*. Відомим аналогом - паразитологічним способом досліджують фекалії для виявлення члеників дипілідій (Методичні рекомендації. Епідеміологія, лікування та профілактика дипілідіозу.) Недоліком аналога є те, що яйця дипілідій виявляють не у всіх пробах фекалій.

Відомий аналог є спосіб визначення *Toxosara canis* у біологічних зразках за методом Фюлеборна (Робочий Зошит для практичних занять з дисципліни "Паразитологія та інвазійні хвороби тварин". Харківська державна зооветеринарна академія, кафедра паразитології). Недоліком аналога є те, що яйця дипілідій мають високу щільність та в насиченому розчині солі не спливають на поверхні, а осідають на дні.

Найближчим аналогом до корисної моделі є спосіб визначення *Toxosara canis* у собак за допомогою полімеразної ланцюгової реакції [Применение ПЦР в контроле паразитарных ситуаций *Toxosara canis*, *T. cati*. //Труды Всероссийского научно-исследовательского института гельминтологии им. К.И. Скрябина]. Недоліком найближчого аналога є специфічність праймерів не тільки для *Toxosara canis*, але і для деяких інших збудників, що потребує проведення додаткових уточнюючих тестів.

В основу корисної моделі поставлена задача розробити спосіб ідентифікації *Dipylidium caninum* у популяції собак за допомогою полімеразної ланцюгової реакції.

Поставлена задача вирішується тим, що спосіб включає проведення ПЛР, пробопідготовку, ампліфікацію, детекцію ампліфікаційної ДНК, згідно з корисною моделлю, використовують ДНК ген 12S рРНК (L49460.1), який складається з наступних послідовностей пар праймерів:

5" - CAGCAAGTGAATCCGTTTCAG-3'

5" - GCATCAAAACTCTAATAAGCAGCA-3",

щоб забезпечити ефективність способу ідентифікації *Dipylidium caninum*.

Корисну модель виконують наступним чином.

Спочатку проводять пробопідготовку. Для цього відбирають свіжі проби фекалій і ретельно перемішують у ступці з додаванням дистильованої води. Одержану суспензію фекалій фільтрують через металеве ситечко або марлеву салфетку в чисту склянку, після чого придонний осад розподіляють у лабораторні пробірки типу "Еппіндорф" та заморожують при  $t = -20^{\circ}\text{C}$ . Для проведення ПЛР використовують праймери до послідовності ДНК гена 12S рРНК *D. caninum*:

5" - CAGCAAGTGAATCCGTTTCAG-3'

5" - GCATCAAAACTCTAATAAGCAGCA-3".

Виділення ДНК із зразків проводять за допомогою набору для виділення ДНК фірми "Мініпреп" (Сілекс М, Росія).

Буфер для ампліфікації містив 10 мМ Тріс-НСІ (рН 8,3); 50 мМ КСІ; 0,01 % альбуміну; 2,5 мМ  $\text{MgCl}_2$  і по 200 мМ дезоксинуклеозид три фосфатів (dATP, dTTP, dCTP, dGTP). На 50 мкл реакційної суміші було додано 50 пмоль кожного праймера і 1 од. Tag - полімерази. Виділена з проб ДНК додавалась у кількості 5 мкл. Для попередження випару реакційної суміші зверху нашаровувалося 50 мкл мінеральної олії.

Ампліфікацію проводять по наступній програмі:

94 °C-3 хв (1 цикл)

94 °C-30 сек.

59 °C-30 сек.

72 °C-30 сек.

(35 циклів)

Розмір продукту ампліфікації - 179 п. н.

Детекцію ампліфікованої ДНК здійснюють з використанням електрофореза у 1,5 % агарозному гелі з ТБЕ-буфером. Для цього 10 мкл ампліфікованого зразка наносять в лунку агарозного гелю та експонують при 20 мВт/см протягом 15 хв. Забарвлення гелю проводять 0,1 % розчином етидію броміду протягом 5 хв.

Приклад Порівняльна оцінка чутливості розробленого способу для ідентифікації ДНК *Dipylidium caninum*. (Таблиця 1, 2).

Аналіз чутливості розробленого способу, при дослідженні ДНК виділеної з фекалій хворих тварин, проводили в порівнянні з методами копроскопії.

При одночасному обстеженні собак та кішок за допомогою копроскопії та ПЛР встановлено, що за даними дослідження фекалій екстенсивність інвазії складала 0 %, за даними ПЛР - 8 %.

5 Результати дослідження фекалій за допомогою ПЛР на наявність антигенів *Dipylidium caninum* вказують на поширення цих гельмінтів серед обстежених тварин. Серед 135 обстежених собак встановлено 11 (8,14 %) позитивних проб на *Dipylidium caninum*. Серед 52 обстежених кішок встановлено 5 (9,6 %) позитивних проб на *Dipylidium caninum*.

10 Таким чином ПЛР є сучасним та більш достовірним способом діагностики дипілідіозу тварин та може використовуватись в лабораторіях ветеринарії і медицини.

Спосіб ідентифікації *Dipylidium caninum* у популяції собак за допомогою полімеразної ланцюгової реакції

Таблиця 1

| № проби | Дані копроскопічних досліджень (кількість членків у полі зору) | Дані ПЛР <i>Dipylidium caninum</i> |
|---------|--|------------------------------------|
| 1       | -  | +                                  |
| 2       | -  | -                                  |
| 3       | -  | -                                  |
| 4       | -  | -                                  |
| 5       | -  | +                                  |
| 6       | -  | +                                  |
| 7       | -  | -                                  |
| 8       | -  | -                                  |
| 9       | -  | -                                  |
| 10      | -  | -                                  |
| 11      | -  | -                                  |
| 12      | -  | -                                  |
| 13      | -  | -                                  |
| 14      | -  | -                                  |
| 15      | -  | -                                  |
| 16      | -  | -                                  |
| 17      | -  | -                                  |
| 18      | -  | -                                  |
| 19      | -  | -                                  |
| 20      | -  | -                                  |
| 21      | -  | -                                  |
| 22      | -  | -                                  |
| 23      | -  | -                                  |
| 24      | -  | -                                  |
| 25      | -  | -                                  |
| 26      | -  | -                                  |
| 27      | -  | -                                  |
| 28      | -  | -                                  |
| 29      | -  | -                                  |
| 30      | -  | -                                  |
| 31      | -  | -                                  |
| 32      | -  | -                                  |
| 33      | -  | -                                  |
| 34      | -  | -                                  |
| 35      | -  | -                                  |
| 36      | -  | -                                  |
| 37      | -  | -                                  |
| 38      | -  | -                                  |
| 39      | -  | -                                  |
| 40      | -  | -                                  |
| 41      | -  | -                                  |

Продовження таблиці 1

| № проби | Дані копроскопічних досліджень (кількість члеників у полі зору) | Дані ПЛР <i>Dipylidium caninum</i> |
|---------|---|------------------------------------|
| 42      | -   | -                                  |
| 43      | -   | -                                  |
| 44      | -   | -                                  |
| 45      | -   | -                                  |
| 46      | -   | -                                  |
| 47      | -   | -                                  |
| 48      | -   | -                                  |
| 49      | -   | -                                  |
| 50      | -   | -                                  |
| 51      | -   | -                                  |
| 52      | -   | -                                  |
| 53      | -   | -                                  |
| 51      | -   | -                                  |
| 55      | -   | -                                  |
| 56      | -   | -                                  |
| 57      | -   | -                                  |
| 58      | -   | -                                  |
| 59      | -   | -                                  |
| 60      | -   | -                                  |
| 61      | -   | +                                  |
| 62      | -   | -                                  |
| 63      | -   | -                                  |
| 64      | -   | -                                  |
| 65      | -   | -                                  |
| 66      | -   | -                                  |
| 67      | -   | -                                  |
| 68      | -   | -                                  |
| 69      | -   | -                                  |
| 70      | -   | -                                  |
| 71      | -   | -                                  |
| 72      | -   | -                                  |
| 73      | -   | -                                  |
| 74      | -   | -                                  |
| 75      | -   | +                                  |
| 76      | -   | -                                  |
| 77      | -   | -                                  |
| 78      | -   | -                                  |
| 79      | -   | -                                  |
| 80      | -   | -                                  |
| 81      | -   | -                                  |
| 82      | -   | -                                  |
| 83      | -   | -                                  |
| 84      | -   | -                                  |
| 85      | -   | -                                  |
| 86      | -   | -                                  |
| 87      | -   | -                                  |
| 88      | -   | +                                  |
| 89      | -   | -                                  |
| 90      | -   | -                                  |
| 91      | -   | -                                  |
| 92      | -   | -                                  |
| 93      | -   | -                                  |
| 94      | -   | -                                  |

Продовження таблиці 1

| № проби | Дані копроскопічних досліджень (кількість члеників у полі зору) | Дані ПЛР <i>Dipylidium caninum</i> |
|---------|---|------------------------------------|
| 95      | -   | -                                  |
| 96      | -   | -                                  |
| 97      | -   | -                                  |
| 98      | -   | -                                  |
| 99      | -   | -                                  |
| 100     | -   | -                                  |
| 101     | -   | -                                  |
| 102     | -   | +                                  |
| 103     | -   | -                                  |
| 104     | -   | -                                  |
| 105     | -   | -                                  |
| 106     | -   | -                                  |
| 107     | -   | -                                  |
| 108     | -   | -                                  |
| 109     | -   | -                                  |
| 110     | -   | -                                  |
| 111     | -   | -                                  |
| 112     | -   | -                                  |
| 113     | -   | +                                  |
| 114     | -   | -                                  |
| 115     | -   | -                                  |
| 116     | -   | -                                  |
| 117     | -   | -                                  |
| 118     | -   | -                                  |
| 119     | -   | -                                  |
| 120     | -   | -                                  |
| 121     | -   | -                                  |
| 122     | -   | -                                  |
| 123     | -   | -                                  |
| 124     | -   | -                                  |
| 125     | -   | -                                  |
| 126     | -   | +                                  |
| 127     | -   | -                                  |
| 128     | -   | -                                  |
| 129     | -   | -                                  |
| 130     | -   | -                                  |
| 131     | -   | -                                  |
| 132     | -   | -                                  |
| 133     | -   | -                                  |
| 134     | -   | -                                  |
| 135     | -   | -                                  |

Спосіб ідентифікації *Dipylidium caninum* у популяції кішок за допомогою полімеразної ланцюгової реакції

5

Таблиця 2

| № проби | Дані копроскопічних досліджень (кількість члеників у полі зору) | Дані ПЛР <i>Dipylidium caninum</i> |
|---------|---|------------------------------------|
| 1       | -   | -                                  |
| 2       | -   | -                                  |
| 3       | -   | -                                  |
| 4       | -   | -                                  |

Продовження таблиці 2

| № проби | Дані копроскопічних досліджень (кількість члеників у полі зору) | Дані ПЛР <i>Dipylidium caninum</i> |
|---------|---|------------------------------------|
| 5       | -   |                                    |
| 6       | -   | -                                  |
| 7       | -   | -                                  |
| 8       | -   | -                                  |
| 9       | -   | -                                  |
| 10      |   | -                                  |
| 11      | -   | -                                  |
| 12      | -   | +                                  |
| 13      | -   | -                                  |
| 14      | -   | -                                  |
| 15      | -   | -                                  |
| 16      | -   | +                                  |
| 17      | -   | -                                  |
| 18      | -   | -                                  |
| 19      | -   | -                                  |
| 20      | -   | -                                  |
| 21      | -   | -                                  |
| 22      | -   | -                                  |
| 23      |   | -                                  |
| 24      | -   | -                                  |
| 25      | -   | -                                  |
| 26      | -   | -                                  |
| 27      | -   | +                                  |
| 28      | -   | -                                  |
| 29      | -   | -                                  |
| 30      | -   | -                                  |
| 31      | -   | -                                  |
| 32      | -   | -                                  |
| 33      | -   | -                                  |
| 34      | -   | -                                  |
| 35      | -   | -                                  |
| 36      | -   | +                                  |
| 37      | -   | -                                  |
| 38      |   | -                                  |
| 39      | -   | -                                  |
| 40      | -   | -                                  |
| 41      | -   | -                                  |
| 42      | -   | -                                  |
| 43      | -   | -                                  |
| 44      | -   | -                                  |
| 45      | -   | -                                  |
| 46      | -   | -                                  |
| 47      | -   |                                    |
| 48      | -   | -                                  |
| 49      | -   | -                                  |
| 50      | -   | -                                  |
| 51      | -   | -                                  |
| 52      | -   | -                                  |

## ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

- 5 Спосіб ідентифікації *Dipylidium caninum* у популяції собак за допомогою полімеразної ланцюгової реакції, що включає проведення ПЛР, пробопідготовку, ампліфікацію, детекцію

ампліфікаційної ДНК, який **відрізняється** тим, що використовують ДНК ген 12S рРНК, який складається з таких послідовностей пар праймерів:

5' - CAGCAAGTGAATCCGTTTCAG-3'

5' – GCATCAAAACTCTAATAAGCAGCA-3'.

5

---

Комп'ютерна верстка А. Крижанівський

---

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Василя Липківського, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

---

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601