



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **25130** (13) **U**  
(51) МПК (2006)  
**G01N 33/483**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ**ОПИС**  
**ДО ПАТЕНТУ**  
**НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ**видається під  
відповідальність  
власника  
патенту**(54) СПОСІБ ВИЯВЛЕННЯ ЗБУДНИКІВ ТОКСОКАРОЗУ М'ЯСОЇДНИХ ТВАРИН**

1

2

(21) u200703289

(22) 27.03.2007

(24) 25.07.2007

(46) 25.07.2007, Бюл. № 11, 2007 р.

(72) Волошина Наталія Олексіївна

(73) НАЦІОНАЛЬНИЙ АГРАРНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

(57) Спосіб виявлення збудників токсокарозу м'ясоїдних тварин, що включає виявлення в об'єктах зовнішнього середовища, продуктах харчування та патологічному матеріалі специфічних фрагментів

нуклеїнових кислот (ДНК) за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР), який відрізняється тим, що для проведення полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) використовують штучно синтезовані олігонуклеотиди (праймери) для збудників токсокарозу м'ясоїдних тварин Toxocara cards, Toxocara cati:

Tox 1 5' - TCACCG AGC TCT GTT GAC AA - 3'

Tox 2 5' - CCACAC TTC TCT TTT TGG CG - 3'.

Корисна модель відноситься до ветеринарної медицини, зокрема ветеринарної паразитології і може бути використана для виявлення збудників токсокарозу м'ясоїдних тварин, що включає виявлення в об'єктах зовнішнього середовища (грунт, змиви з обладнання, вода), продуктах харчування та патологічному матеріалі специфічних фрагментів нуклеїнових кислот (ДНК) за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР).

Принцип методу полімеразної ланцюгової реакції був розроблений американським біохіміком фірми „Cetus” Кері Мюллісом [Mullis K.B., Faron F.A., Scharf S. et al. // Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology. - New York, 1986. - P.263-273].

Нерегламентоване використання органічних добрив в незаражених (фермерських) господарствах сприяє інтенсивному обміненню ґрунту та сільськогосподарських, овочевих та садових культур, які вирощують, збудниками паразитів, створюючи тим самим високий ризик нових заражень людей і тварин.

Більшість гельмінтів одночасно вражає тварин і людей. У цьому плані особливої уваги заслуговують собаки, популяція яких є джерелом збудника токсокарозу. Провідні фактори передачі цієї інвазії людині - ґрунт, харчі і вода, забруднена фекаліями собак, які містять яйця гельмінтів. Негативні результати дослідження фекалій не завжди означають, що тварини вільні від гельмінтів. Яйця і личинки у зовнішньому середовищі доволі стійкі. Вони представляють собою постійну загрозу

реінвазування через предмети догляду і навколишнє середовище.

Другим дуже важливим аспектом є контамінація зовнішнього середовища фекаліями тварин, яких виявляють велику кількість яєць гельмінтів, що у ряді випадків ускладнює епізоотичну і епідемічну ситуацію по зооантропонозам, до яких відносять токсокароз. Виявлення яєць токсокар здійснюють за методикою Г.А. Котельникова і В.М. Хренова (1984) [Романенко Н.А., Падченко І.К., Чебышев Н.В. Санитарная паразитология: (Руководство для врачей). - М.: Медицина, 2000. - 342с].

Недоліком наявного методу виявлення збудника інвазії у організмі тварин та об'єктах навколишнього середовища (ґрунту, води, змивів та ін.) є те, що вони громіздкі, трудомісткі, потребують застосування кошовної апаратури, а ефективність їх вкрай низька. Це не дозволяє проводити повноцінний контроль за ефективністю профілактичних заходів, що виконуються. Перспективними є дослідження, направлені на розробку експрес-методів одномоментного виявлення збудників різних таксономічних груп (яйця гельмінтів, цисти кишкових патогенних найпростіших тощо).

В основу корисної моделі поставлено завдання розробити ефективний спосіб виявлення збудників токсокарозу м'ясоїдних тварин, який би забезпечував виявлення в об'єктах зовнішнього середовища (ґрунт, змиви з обладнання, вода), продуктах харчування та патологічному матеріалі специфічних фрагментів нуклеїнових кислот (ДНК) за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР).

(13) **U**(11) **25130**(19) **UA**

Поставлене корисною моделлю завдання досягається тим, що у способі виявлення збудників токсокарозу м'ясоїдних тварин, який включає виявлення в об'єктах зовнішнього середовища, продуктах харчування та патологічному матеріалі специфічних фрагментів нуклеїнових кислот (ДНК) за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР), згідно корисній моделі для проведення ПЛР використовують штучно синтезовані олігонуклео-

тиди (праймери) для збудників токсокарозу м'ясоїдних тварин (*Toxocara canis*, *Toxocara cati*):

Tox 1 5' - TCA CCG AGC TCT GTT GAC AA - 3'

Tox 2 5' - CCA CAC TTC TCT TTT TGG CG - 3'

Розроблені праймери у процесі полімеразної ланцюгової реакції дозволяють багаторазово копіювати специфічні ділянки ДНК інфекційних агентів при певних температурних і часових параметрах та кількості циклів (табл.).

Таблиця

№ циклу	Температура	Час	Кількість циклів
1	95°C	5хв.	1
2	94°C	1хв.	5
	64°C	1хв.	
	74°C	1хв.	
3	94°C	0,5хв.	35
	62°C	0,5хв.	
	73°C	0,5хв.	
4	72°C	5хв.	1
5		Зберігання	

Приклад: Пробу (ґрунт, вода, проби фекалій, змиви з обладнання тощо) в кількості 1 гр. поміщають у пластикову пробірку ємністю 1,5см<sup>3</sup> і додають 0,005см<sup>3</sup> дистильованої води. Суміш струшують і центрифугують, після чого проводять виділення ДНК набором реагентів для виділення ДНК. Отриману чисту ДНК (0,003-0,005см<sup>3</sup>) поміщають у пробірку ємністю 0,5см<sup>3</sup> і додають 0,0015см<sup>3</sup> ПЛР-буфера, 0,0025см<sup>3</sup> dNTP по 0,0025мкл. праймерів, 0,00025мкл Tag-полімерази та 1 краплю мінерального масла. Вміст пробірки струшуємо і центрифугуємо, а потім поміщуємо в ампліфікатор „Терцик”, якому задаємо вищевказану програму.

Для перевірки ефективності розробленого способу було проведено науковий дослід. Матеріалом для досліджень були проби фекалій від собак інвазованих збудниками токсокарозу, проби ґрунту, води, трави, змивів із вольєрів, де утримують собак, продукти харчування тощо.

Із дослідного матеріалу були виділені ДНК за допомогою набору реагентів для виділення ДНК.

Потім була проведена ампліфікація отриманого матеріалу та отримання результату.

Детекція результату проводиться в 1,5% агарозному гелі з барвником - бромистим етидієм. В гелеві лунки вносять 10-12мкл ампліфікованої суміші. Після проведення електрофорезу фрагменти ДНК згруповуються в смужки, які виявлять флуорисцентно.

Результат ПЛР може бути оцінений візуально по наявності смужок, що відповідають продуктам реакції.

Промислове застосування способу може бути використано для виявлення яєць гельмінтів *Toxocara canis* та *Toxocara cati* роду *Ascarididae* у об'єктах навколишнього середовища, патологічному матеріалі.

У порівнянні із стандартизованими методами виявлення збудників *Toxocara canis* та *Toxocara cati* розроблений метод має високий відсоток достовірності (90-100%), є специфічним до даного виду збудника та швидким у виконанні (результат отримують за 6-8год.).