



УКРАЇНА

(19) UA (11) 60075 (13) A

(51) 7 A61B10/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ
НА ВІНАХІДвидається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ДІАГНОСТИКИ ДИКТИОКАУЛЬОЗУ ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ

1

2

(21) 2003010569

(22) 22 01 2003

(24) 15 09 2003

(46) 15 09 2003, Бюл. № 9, 2003 р.

(72) Волошина Наталя Олександрівна, Галат Владислав Федорович

(73) НАЦІОНАЛЬНИЙ АГРАРНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

(57) Спосіб діагностики диктиокаульозу великої рогатої худоби, що включає виявлення в досліджуваних зразках (пробах фекалій) специфічних фрагментів нуклеїнових кислот (ДНК) за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР)

і двох штучно синтезованих олигонуклеотидів (праймерів), які дозволяють багаторазово копіювати специфічні ділянки ДНК інфекційних агентів при певних температурних і часових параметрах та кількості циклів, який відрізняється тим, що підбирають індивідуальні параметри ампліфікації і послідовність нуклеїнових кислот

5'CCGTCTGCTGCTTTATGATGTTG 3',

5'CGCCGTCTTCTTATATCGTCGTCG 3'

для збудника диктиокаульозу великої рогатої худоби (*Dystocaulus viviparus*)

Винахід відноситься до ветеринарної медицини, зокрема до ветеринарної паразитології.

Відомий метод полімеразної ланцюгової реакції розроблений американським біохіміком фірми "Cetus" Кері Мюллісом (Mullis K B., Falona F A., Scharf S. et al // Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology — NewYork, 1986 — P 263 - 273).

Защиттєвий діагноз на диктиокаульоз жуйних на сьогоднішній день ставлять на основі гельмінтопарвоскопічного дослідження фекалій методами Вайда, Бермана-Орлова, Котельникова-Хренова, які були запропоновані на початку 20-го століття.

Ці методи не завжди дають можливість виявити личинок диктиокаул через характерну біологічну особливість збудника *Dystocaulus viviparus*. Адже в період линьки личинки стають нерухомими і не завжди із проб фекалій виділяються у воду.

Винаходом ставиться завдання створити новий метод діагностики диктиокаульозу великої рогатої худоби.

Поставлене винаходом завдання досягається тим, у спосіб діагностики диктиокаульозу великої рогатої худоби, що включає виявлення в досліджуваних зразках (пробах фекалій) специфічних фрагментів нуклеїнових кислот (ДНК) за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) і двох штучно синтезованих олигонуклеотидів (праймерів), які дозволяють багаторазово копіювати специфічні ділянки ДНК інфекційних агентів при певних температурних і часових параметрах та

кількості циклів, згідно винаходу, підбирають індивідуальні параметри ампліфікації і послідовність нуклеїнових кислот

5'CCGTCTGCTGCTTTATGATGTTG 3',

5'CGCCGTCTTCTTATATCGTCGTCG 3'

для збудника диктиокаульозу великої рогатої худоби (*Dystocaulus viviparus*)

Приклад

Пробу фекалій (1 гр.) поміщують у пластикову пробірку і додають 500мкл дистильованої води. Суміш струшують і центрифугують, після чого проводять виділення ДНК набором реагентів для виділення ДНК. Отриману чисту ДНК (3 - 5мкл) переносять в іншу пробірку і додають 15мкл ПЛР-буфера, 2.5мкл dNTP, по 2.5мкл праймерів, 0.25мкл Tag-полімерази і 1 краплю мінерального масла. Вміст пробірки струшуємо і центрифугуємо, а потім помішуємо в ампліфікатор "Терцик", якому задаємо програму

Температура, °C	Час	К-ть циклів
95	4хв	1
94	1 хв	5
65	1 хв	
72	1 хв	
94	30с	35
65	20с	
72	40с	
74	5хв	1

(13) A

(11) 60075

(19) UA

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

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

Винахід може бути застосований у ветеринарній медицині для ранньої діагностики диктіокаульозу великої рогатої худоби.