# Міністерство освіти і науки України

# Реферат

# Тема: ДНК-діагностика та її застосування у ветеринарії

# 2010

Зміст

Вступ

1. ПЛР – основний метод ДНК - діагностики
2. Проведення полімеразної ланцюгової реакції
3. Переваги ПЛР - діагностики інфекційних захворювань тварин

Висновки

Список використаних джерел

Вступ

Інфекційна патологія у ветеринарії охоплює широке коло хвороб, різних як по характеру течії (гострі, хронічні, латентні), ступені розповсюдження (від спорадичних випадків до епізоотії), так і по складності їх діагностики. Важливе, а при деяких хворобах вирішальне значення мають серологічні дослідження, направлені на виявлення антитіл, що виробляються організмом тварини у відповідь на впровадження інфекційного агента або вакцини. Не дивлячись на ряд переваг, методи, засновані на цьому принципі, володіють недостатньою чутливістю і специфічністю. Істотний прорив був зроблений останніми роками, коли для діагностичних цілей привернули методи генної інженерії і біотехнології. Для діагностики інфекційних захворювань найбільшого застосування знайшов спосіб ампліфікації (множення) нуклеїнових кислот: полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР), лігазна ланцюгова реакція, NASBA-метод та ін [1].

Метою даної роботи було виявити основні переваги і ефективність методу ДНК-діагностики, а також впровадження його в систему державної ветеринарної служби.

У роботі були поставлені наступні завдання:

* дати комплексну оцінку методу ПЛР-діагностики;
* визначити переваги ПЛР-діагностики інфекційних захворювань;
* розглянути деякі види патологій тварин, при яких цей метод грає важливу роль.

1. ПЛР – основний метод ДНК-діагностики

ПЛР в лабораторній діагностиці інфекцій характеризується швидкістю, неперевершеною чутливістю і високою специфічністю, що дозволяє виявляти мікроорганізми, присутні в дуже низьких концентраціях (1-10 збудників в пробі). При цьому ДНК інфекційних агентів може бути достатньо ефективно екстрагована з будь-якої біологічної рідини або тканини, а також з проб об'єктів навколишнього середовища (грунти, води і так далі) і продуктів харчування. Полімеразна ланцюгова реакція ефективна при виявленні бактерійних, грибкових, паразитарних і вірусних патогенів.

Одним словом, це метод, заснований на принципі ампліфікації, — ізольованого множення гена або його певного фрагмента. Ампліфікація — один із способів виживання мікроорганізмів і клітин тварин в умовах дії протипухлинних і протибактерійних препаратів. ПЛР дозволяє проводити аналогічний процес in vitro, тобто в пробірці.

Основні положення ампліфікації ДНК in vitro були обгрунтовані співробітником корпорації "Cetus" (США) Кері Маллісом в 1983 році. Через 10 років за цю розробку він був удостоєний Нобелівської премії по хімії.

Метод базується на добудові ферментом (термостабільна ДНК-полімераза) олігонуклеотидных затравок (праймерів), приєднаних до денатурованої низькокопійованій ДНК-матриці. Праймери визначають специфічність реакції і величину фрагмента. Процес ампліфікації включає багатократне повторення певних циклів, як правило, 30-40. Кожен складається з трьох основних стадій: денатурація ДНК, відпалу (приєднання) і добудови праймерів.

На першій стадії дволанцюгова ДНК-матриця денатурується при 94°С з утворенням одноланцюгових ДНК. На другій температура знижується до 55-65° С і відбувається приєднання праймерів до кожної з двох одноланцюгових ДНК. На третій фермент (термостабільна ДНК-полімераза) при температурі 72° С добудовує обидва праймери в напрямі від 3-го до 5-го кінця, внаслідок чого утворюється дволанцюгова ДНК.

Після першого циклу створюються довгі фрагменти, оскільки полімераза добудовує праймери, використовуючи як матрицю весь геном. У наступних циклах праймери відпалюють із знов синтезованими молекулами ДНК. Полімераза зупиняється, доходячи до кінця цих молекул, тобто до праймерів, використаних в попередньому циклі. Після кожного циклу число молекул матриці подвоюється, в результаті відбувається експоненціальна ампліфікація фрагмента ДНК-матриці. Це дозволяє за 25-40 циклів накопичити ПЛР-продукт в достатній кількості для візуальної детекції після електрофоретичного розділення і фарбування бромистим етидієм [1].

Основні компоненти ПЛР

1. Два синтетичних олігонуклеотидних праймера (завдовжки приблизно по 18-25 нуклеотидов). Кожен з них комплементарний одному з ланцюгів матриці, що обмежує початок і кінець ампліфікуючої ділянки. Специфічність реакції в основному визначається температурою відпалу праймерів, при якій відбувається їх комплементарна взаємодія з ДНК-матрицею. Температура залежить від довжини праймера і змісту G-C пар (З — гуанин, З — цитозин). Як правило, вона варіюється в діапазоні 50-64° С. Дизайн праймерів здійснюється з використанням спеціальних комп'ютерних програм і автоматичного ДНК-синтезатора.

2. Термостабільна ДНК-полімераза— фермент, який каталізує реакцію полімеризації ДНК. Полімераза для використання в ПЛР повинна зберігати активність при високій температурі тривалий час, тому використовують ферменти, виділені з термофілів, — Thermus aquaticus (Taq-полімераза), Pyrococcus furiosus (Pfu-полімераза), Pyrococcus woe-sei (Pwo-полімераза) та інші.

3. Дезоксинуклеотідтріфосфати (dATP, dGTP, dCTP, dTTP).

4. Іони Mg2+, необхідні для активації полімерази.

5. Буфер, що створює оптимальні умови для функціонування ферменту. Як правило, використовується Тріс-hci буфер, який утримує рН реакційного середовища в межах 7,8. Для стабілізації ферменту в середовище додають желатин або бичачий сироватковий Альбумін, неіонні детергенти (Твін-20, Тритон Х-100 і ін.) [3].

Створення ампліконів необхідної довжини починається з 3 до 25 циклів і носить експоненціальний характер. Через виснаження дезоксинуклеотидтрифосфатов, праймери, інактивацій Taq-полімерази, зростання конкуренції ампліконов у ферменті, починаючи з 40-45 циклів реакція виходить на плато. Звідси, як правило, при постановці реакції число циклів не перевищує 30-35.

ПЛР проводять в ампліфікаторі — приладі, що забезпечує періодичне охолоджування і нагрівання пробірок, зазвичай з точністю не менше 0,1° С. Зазвичай в нім можна задавати складні програми, зокрема можливість "гарячого старту" (Touchdown ПЛР) і подальше зберігання ампліфікованих молекул при 4° С. Для реакції в реальному часі випускають прилади, обладнані флуоресцентним детектором. З тих, що поставляються зарубіжними фірмами найбільш популярні ампліфікатори фірм "Перкин-ельмер", "Еппендорф" і "Хайбенд".

В даний час розроблені вітчизняні прилади: "Цикло-темп", "Медімакс", "Термоцик", "Амрly 4L" та ін.

2. Проведення полімеразної ланцюгової реакції

Вона складається з трьох основних процедур: пробопідготовки, яка в основному зводиться до виділення ДНК або РНК, постановки ПЛР і детекції ампліфікованого продукту.

Виділення нуклеїнових кислот (ДНК, РНК). Досліджуваним матеріалом для ПЛР можуть слугувати будь-які, навіть гістологічні препарати. Визначення можна проводити, використовуючи як клінічний і патологоанатомічний матеріал, так і проби з об'єктів зовнішнього середовища.

Залежно від виду визначеного збудника і клінічної проби застосовують різні способи виділення ДНК (РНК). В деяких випадках обробка полягає в додаванні агента, що лізирує, містить розчин гуанидинтиоционата, з подальшою сорбцією ДНК (РНК), багатократного відмивання і елюції, очищеної нуклеїнової кислоти.

В інших випадках необхідна депротеїнізація фенолом/хлороформом з подальшим осадженням ДНК (РНК) етанолом або ізопропанолом. Останніми роками ряд вітчизняних фірм ("Літех", "ДНК-технологія", "Діалат" і ін.) проводять набори для екстракції ДНК і РНК з різних клінічних зразків.

Постановка ПЛР. У пробірку типу "Eppendorf" об'ємом 0,2 або 0,5 мл додають певну кількість реакційної суміші, що складається з води, ПЛР-буфера, розчину дизоксинуклеотидтрифосфатов, розчину праймерів і Taq-полимеразы. Потім вводять одну краплю мінерального масла з високою точкою кипіння, наприклад вазелінового, для запобігання випаровуванню реакційної суміші в процесі ампліфікації. Якщо використовувати ампліфікатор з кришкою, що підігрівається, цього робити не потрібно.

Додавання пірофосфатази може збільшити вихід ПЛР-реакції. Цей фермент каталізує гідроліз пірофосфата, побічного продукту приєднання нуклеотидтрифосфатов до ланцюга ДНК, що росте, до ортофосфату.

Оброблену клінічну пробу вносять під масло в об'ємі 5-10 мкл. Ампліфікація проводиться в програмованому термостаті в автоматичному режимі за програмою, відповідно виду визначеної інфекції. Як правило, необхідно 1,5-3 години залежно від заданої програми.

При постановці реакції проводиться відповідний контроль: позитивний — препарату ДНК досліджуваного збудника; негативний — деіонізованої води. Останній необхідний для перевірки реакційної суміші на наявність контамінації продуктами ампліфікації (ампліконами).

В одній реакції ампліфікації можливе визначення декількох інфекцій (Multiplex PCR). З цією метою в реакційну суміш додають декілька пар праймерів, проте при цьому зменшується кількість води. Враховуючи, що чутливість реакції знижується пропорційно розбавленню, рекомендується одночасно визначати не більше 3 інфекцій.

Для визначення РНК-вмісних вірусів у складі реакційної суміші додатково вносять зворотну транскриптазу і інгібітор рибонуклеази (RT-PCR).

Ефективність ПЛР залежить від багатьох чинників, зокрема від кількості ДНК-матриці, якості Taq-полимеразы і дезоксинуклеотидтрифосфатів, специфічності праймерів, концентрації Мд2+ і програми ампліфікації. Для отримання максимального ефекту проводять оптимізацію реакції. У таблиці наведені межі варіації її основних параметрів.

Чутливість ПЛР істотно залежить від температури відпалу праймерів. При заниженій підвищується вірогідність ампліфікації неспецифічних фрагментів, при підвищеній знижується вихід ампліфікованого продукту, оскільки праймери слабо взаємодіють з ДНК-матрицею.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Параметр | Діапазон варіацій | Градієнт варіацій |
| Концентрація Mg2+ | 1,5-3,0 mM | 0,25 mM |
| Кількість Taq-полимеразы в пробірці | 0,5-3,0 ед. | 0,5 ед./100 мкл |
| Концентрація кожного праймера | 0,2-2,0 мкМ | 0,5 мкМ |
| Температура відпалу | 45-64° З | 2-3° З |

Насьогодні розроблений ряд підходів, що підвищують специфічність реакцій. Часто з цією метою застосовується так звана "Nested PCR" (гніздова ПЛР). Принцип даного методу полягає у використанні двох пар праймерів, одна з яких здатна ампліфікувати внутрішню ділянку амплікона, отриманого після першого раунду, із зовнішньою парою праймерів. Застосування гніздової ПЛР має переваги: висока чутливість методики; відсутність необхідності використовувати інші методи. До недоліків відносять перенесення продуктів реакції з однієї пробірки в іншу, що істотно знижує концентрацію інгібіторів, а також приводить до появи великої кількості псевдопозитивних результатів внаслідок перехресної контамінації проб продуктами ампліфікації.

Останніми роками для підвищення чутливості і специфічності реакції використовується "гарячий старт". Суть його полягає в тому, що перш ніж додавати Taq-пoіимеразу, реакційна суміш прогрівається заздалегідь до 95° С. Це виключає можливість утворення неспецифічних фрагментів внаслідок неспецифічного відпалу праймерів при температурі нижче оптимальною.

Механізм простої полімеразної ланцюгової реакції непридатний для ідентифікації рибонуклеїнових кислот (РНК), оскільки Taq-noлимераза нездатна каталізувати синтез ДНК на матриці РНК. Разом з тим добре відомо, що геноми багатьох вірусів складаються з молекул рибонуклеїнових кислот (РНК), і внаслідок цього актуальна ідентифікація РНК-вірусів. Практично це вирішується за допомогою декількох прийомів, зокрема використання додаткового ферменту — РНК-залежної ДНК-полімерази — зворотної транскриптазы (RT — reverse transcriptase). Реакція, що каталізується цим ферментом, приводить до утворення одноланцюгових фрагментів ДНК, використовуваних надалі в ампліфікації за допомогою Taq-полимеразы.

Як було відмічено вище, Taq-полімераза нездатна каталізувати процес зворотньої транскрипції, тобто синтез одноланцюгової ДНК на РНК-матриці. У 1991 році Маєрсом і Гельфандом охарактеризований фермент ДНК-залежної ДНК-полімерази, виділеної з іншого екстремального термофілу Thermus thermophilus (Tth-полиме-раза), який у присутності іонів магнію і хелаторов іонів марганцю дозволяв ферменту каталізувати звичайну ДНК-залежну ДНК-полімеразну реакцію. Цей фермент міг бути використаний для одночасного синтезу комплементарних одноланцюгових фрагментів ДНК і ампліфікації.

Реєстрація результатів. В більшості випадків ампліфікований фрагмент ДНК або кДНК виявляють методом електрофорезу в 1,5-2% гелю агарози у присутності бромистого етидія, який утворює з фрагментами ДНК стійкий комплекс. При опромінюванні гелю ультрафіолетом довжиною хвилі 290-330 нм ампліфіковані фрагменти ДНК виявляються у вигляді смуг, що світяться.

Специфічність смуги визначається її положенням по відношенню до ДНК-маркера і позитивного контролю.

Специфічність ампліфікованого фрагмента також може бути підтверджена рестрикційним аналізом або гібридизацією із специфічним міченим флуоресцентним або радіоактивним зондом.

Інші методи детекції засновані на ідентифікації мічених компонентів реакції. Зокрема, в окремих тест-системах (фірми "Хофманн Ля Рош") використовуються праймери, мічені биотином. В процесі детекції амлікон, мічений биотином, гібридизуєтся із специфічним ДНК-зондом, іммобілізованним на мікропланшеті. Активність ферменту, що входить в комплекс ампликон-биотин-авидин-пероксидаза хріну, виявляють прийомом, використовуваним при стандартному іммуноферментном аналізі. Інтенсивність забарвлення визначають на планшетному фотометрі при 450 нм. Даний підхід дозволяє проводити об'єктивну оцінку результатів реакції у вигляді показників оптичної щільності і, отже, кількісно визначати концентрацію ДНК або РНК в пробі.

Полімеразна ланцюгова реакція — високочутливий специфічний метод. Нажаль, він не виключає можливої контамінації.

Попадання в реакційну пробірку слідів ДНК або кДНК збудника (специфічних продуктів ампліфікації; ДНК-стандарту, використовуваного як позитивний контроль; ДНК або кДНК збудника клінічного зразка) приводить до ампліфікації в процесі реакції специфічного фрагмента ДНК і, як наслідок, до появи псевдопозитивних результатів.

Небезпеку представляють в основному два види контамінації: перехресна — від проби до проби (в процесі обробки клінічних зразків або розбризкування реакційної суміші), що приводить до появи спорадичних псевдопозитивних результатів; і продуктами ампліфікація (ампликоны), яка є також причиною отримання псевдопозитивних результатів. В процесі проведення ПЛР ампликоны накопичуються у великих кількостях і є класичними матрицями для реампліфікації.

Розрізняють і контамінацію слідами ампліконами посуду, автоматичних піпеток і лабораторного устаткування, поверхні лабораторних столів.

На підставі досвіду ПЛР-лабораторий до теперішнього часу сформульовані основні принципи організації діагности, що виключають можливість контамінації і отримання псевдопозитивних результатів.

Необхідно розділити різні стадії проведення аналізу, розміщуючи їх в окремих приміщеннях: для виділення ДНК або РНК; для проведення детекції продуктів ампліфікації.

Клінічні зразки необхідно поміщати тільки в одноразові стерильні пластикові пробірки. Робота повинна проводитися в лабораторному одязі, що змінюється при переході з одного приміщення в інше. Бажано, щоб на кожному етапі проведення реакції працювали інші співробітники.

На різних стадіях аналізу слід мати окремі набори напівавтоматичних піпеток.

Використовувати тільки одноразові матеріали, наконечники для мікропіпеток, пробірки, рукавички і так далі. Бажано застосовувати наконечники з аерозольним фільтром, що оберігає попадання мікрокрапель розчину в піпетку. Після роботи пробірки і наконечники повинні скидатися в дезинфікуючий розчин (1Н соляної кислоти, 10% гипохлорида натрію, 10% хлорною винищити).

Опромінювання робочих поверхонь проводять протягом 1 години до початку і після досвіду (випромінювання до 260 нм).

В даний час успішно застосовують метод ферментативного попередження контамінації. Суть його полягає в тому, що замість одного з 4 дНТФ, а саме замість дТТФ (дезокситимідинтрифосфат) вводиться аналог дУТФ (дезоксиуридинтрифосфат), який включившись в ампліфікон замість дТТФ, робить цей ампліфікон чутливим до ферменту урацил-глікозилази, яка також вводиться в ампліфікациону суміш. Деякі комерційні ПЛР-тест-систеи містять ці компоненти і тому гарантують відсутність псевдопозитивних результатів від контамінації. Подібну систему захисту мають ряд тест-систем, що випускаються зарубіжними фірмами, зокрема фірмою "Хофманн Ля Рош" [1].

3. Переваги ПЛР-діагностики інфекційних захворювань тварин

Метод дозволяє досягти гранично можливої чутливості: від одного до декількох збудників в пробі. Специфічність методу складає 99-100 відсотків. Для ПЛР-аналіза придатний будь-який матеріал, у тому числі і гістологічні препарати. Кількість досліджуваного матеріалу, як правило, складає декілька десятків мікролітів. Висока чутливість методу дозволяє контролювати ефективність лікування, що проводиться. ПЛР успішно використовується при діагностиці важкокультивованих і некультивованих збудників, а також хронічних, латентних і персистентных форм інфекції. Тривалість аналізу не перевищує 5-6 годин.

Але разом з перевагими є певний недолік, який можна охарактеризувати як технологічний. Маються на увазі підвищені вимоги до оснащення лабораторії, якості тест-наборів і строге дотримання регламенту дослідження щоб уникнути отримання помилкових результатів. Вирішення проблеми якості аналізів можливо при відповідній кваліфікації персоналу і обов'язкової сертифікації лабораторії.

Розробка методик і випробування приладів і устаткування — один з етапів великої роботи по впровадженню ПЛР-методів в практику діагностичних лабораторій. У зв'язку із зростаючим інтересом до ПЛР-діагностики впровадження її методів в систему державної ветеринарної служби — справа сьогоднішнього дня. Необхідно відзначити, що перспективними напрямами є визначення антибіотикорезистентності клінічних штамів збудників, можливість кількісного обліку результатів для контролю динаміки інфекційного процесу, правильного вибору тактики лікування і оцінки ефективності вживаних лікарських засобів.

До теперішнього часу ветеринарними фахівцями вже розроблені тест-системи для діагностики методом ПЛР таких захворювань, як туберкульоз, сибірська виразка, лейкоз, чума великої рогатої худоби, сказ, ящур, бруцельоз, кампилобактеріоз, лістеріоз, хламідіоз тварин, класична чума свиней, респіраторно-репродуктивний синдром свиней, парвовірусна інфекція свиней, енцефаломіокардит свиней, сальмонельоз, стафилококкоз, мікоплазмоз, хвороба Марека, реовирусная інфекція, хвороба Гамборо, інфекційний бронхіт птахів, ньюкаслська хвороба; чума м'ясоїдних, вірусний ентерит норок, вірусний гепатит качок та ін. [4].

Діагностика приватної патології методом ПЛР. У даному розділі розглянуті тільки деякі види патології, при яких цей метод грає важливу роль. Слід зазначити, що дана діагностика — один із способів і не може повністю замінити вживаний в даний час комплекс діагностичних досліджень.

Серед методів лабораторної діагностики грипу птахів найбільш ефективним вважається метод полімеразної ланцюгової реакції. Використовуючи праймери до НА, NA і М-генам різних субтипів вірусу грипу, Zhang W. і Evans D.N. (1991 р.) вперше продемонстрували можливість детекції вірусів. Проте дослідження були виконані на музейних штамах.

Головними перевагами ПЛР порівняно з методами культурального підходу є його вища чутливість, швидкість і безпека для персоналу. При порівнянні з серологічними методами ПЛР істотно виграє, оскільки дозволяє виявляти віруси грипу на найраніших стадіях, задовго до появи антитіл.

Окрім явних діагностичних переваг, його доповнюють методом секвенування ДНК, і тоді він є універсальним молекулярно-генетичним підходом до визначення більшості біологічних властивостей вірусів грипу птахів, що дозволяє виявляти спорідненість циркулюючих штамів, передбачати його небезпеку для людини і ефективність противірусної терапії [2].

Хламідіозная інфекція широко поширена практично серед всіх видів ссавців і завдає істотного економічного збитку різним галузям тваринництва, викликаючи загибель тварин, патологію їх репродуктивних органів, аборти, народження мертвого або нежиттєздатного приплоду.

Хворі тварини часто стають джерелом інфекції працівників господарств, що приводить до виникнення епідемічних спалахів. Поширеність збудників хламідіозов в природі серед диких тварин і особливо птахів представляє постійну загрозу спорадичних захворювань для людей, професійно не зайнятих в сільському господарстві.

Тривалий час загальновизнаним еталоном для прямих методів виявлення хламідій вважається виділення збудника в культури клітин. Проте метод має недоліки, що істотно обтяжує його широке використання в практичній ветеринарії. Перш за все високий ризик інфікування персоналу, а отже, необхідність проведення робіт по виділенню збудника в спеціальній режимній лабораторії.

Крім того, культуральний метод трудомісткий і займає багато часу. Не дивлячись на те, що для висіву патогена підходить практично будь-який матеріал від інфікованої тварини, успіх дослідження багато в чому залежить від швидкості транспортування проб в лабораторію і дотримання умов доставки зразків (спеціальні транспортні середовища, охолоджування, додавання антибіотиків, попереднє очищення матеріалу від токсичних речовин і так далі).

З урахуванням цих недоліків були розроблені альтернативні тести, такі, як визначення антигена методами іммуноферментного аналізу (ІФА), прямій імунофлуоресценції (МФА), а також експрес-методами.

Разом з тим для Іфа-детекциі антигенів так само, як і для культурального методу, характерні низька чутливість і специфічність. Враховуючи, що при проведенні методу імунофлуоресценції для достовірного виявлення хламідій необхідно виявити певне число елементарних тілець у всьому досліджуваному зразку, чутливість аналізу залежить від досвіду роботи лаборанта.

В даний час одним з найбільш перспективних слід рахувати метод полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). Для діагностики хламидиозов людини і тварин він був вперше застосований в 1989 році. Це швидкий і надійний діагноз, своєчасна ефективна терапія і науково обгрунтована профілактика. Додаткова інформація про різновид збудника, легко отримувана методом ПЛР, дозволить проводити епідеміологічний контроль і запобігати розповсюдженню небезпечних штамів хламідій [3].

Сьогодні основним масовим і доступним у ветеринарній практиці методом прижиттєвої діагностики туберкульозу є внутрішньошкірна проба із застосуванням ППД-туберкуліна для ссавців. Проте даний тест має відомі недоліки: тривалий термін виявлення захворювання; збудник туберкульозу при посіві патолого-анатомического матеріалу росте поволі; колонії мікобактерій туберкульозу бичачого вигляду з'являються тільки через 20-60 днів, а пташиного — через 15-30 днів посіву. При адаптації до живильного середовища швидкість росту може зростати.

При діагностиці туберкульозу ПЛР-метод застосовують у разі отримання позитивних результатів при проведенні планових алергічних досліджень в благополучних по туберкульозу господарствах. Кров всіх тварин аналізують при введенні туберкуліну. Також полімеразну ланцюгову реакцію доцільно застосовувати при вивченні патматериала від вбитих тварин для діагностики і ідентифікації культур М. Bovis і М. Tuberculosis з іншими видами мікобактерій [1].

Висновки

Отже, активний розвиток і впровадження методу ПЛР в діагностичну практику дозволив продемонструвати основні переваги і ефективність цієї реакції, виявити недоліки і виробити підходи для їх подолання.

Таким чином, висока чутливість і специфічність ПЛР-метода дозволяє гарантовано виявляти одиничних збудників в біологічному матеріалі за короткий проміжок часу, що дозволяє поставити точний діагноз, призначити адекватне лікування і розробити профілактичні заходи.

На закінчення слід зазначити, результати ПЛР-анализу, як і інші діагностичні тести in vitro, необхідно розглядати з урахуванням даних, отриманих традиційними методами.

Для раціонального використання ПЛР у ветеринарній практиці потрібно визначити її місце, зважаючи на специфіку поставлених завдань і економічне обгрунтування для вирішення тих або інших проблем.

Список використаних джерел

1. http://www.webpticeprom.ru

2. http://www.medlinks.ru

3. http://www.veterinarka.ru

4. http://www.vetotvet.com