



<https://doi.org/10.29326/2304-196X-2025-14-3-274-282>
УДК 619:579.887.111:616-076:577.2



Валидация и применение тест-системы на основе метода ПЦР в режиме реального времени для выявления ДНК *Mycoplasma dispar*

М. Абед Алхуссен, О. Е. Федорова, А. О. Кротова, О. П. Бьядовская, А. В. Спрыгин

ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ»), ул. Гвардейская, 6, мкр. Юрьеvec, г. Владимир, 600901, Россия

РЕЗЮМЕ

Введение. В настоящее время наблюдается широкое распространение и активная циркуляция *Mycoplasma dispar* в животноводческих хозяйствах по всему миру, в том числе и в Российской Федерации. Актуальность внедрения в ветеринарную практику тест-системы на основе полимеразной цепной реакции в режиме реального времени для выявления ДНК *Mycoplasma dispar* обусловлена важной ролью данного возбудителя в развитии комплекса респираторных болезней крупного рогатого скота, приводящих к значительным экономическим потерям в животноводстве, в том числе являющихся причиной падежа телят.

Цель исследования. Определение основных валидационных характеристик и внедрение в ветеринарную практику разработанной тест-системы для выявления ДНК *Mycoplasma dispar* методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени.

Материалы и методы. Референтный штамм *Mycoplasma dispar* (ATCC № 27140) культивировали на питательной среде 1699 Revised Mycoplasma Medium, рекомендованной American Type Culture Collection. ДНК выделяли с использованием коммерческого набора, постановка ПЦР в режиме реального времени осуществлялась по заранее подобранным параметрам. Были определены основные валидационные характеристики тест-системы: аналитическая чувствительность, аналитическая специфичность, эффективность амплификации, повторяемость и воспроизводимость. Показана возможность практического применения тест-системы на основе ПЦР в режиме реального времени для выявления ДНК *Mycoplasma dispar*.

Результаты. Аналитическая чувствительность (предел обнаружения) тест-системы по выявлению ДНК *Mycoplasma dispar* составила 10 копий ДНК/мкл (или 100 копий ДНК/реакцию), специфичность – 100% (детектирует только ДНК *Mycoplasma dispar*), эффективность амплификации – 99,01%, среднее значение коэффициента вариации при оценке повторяемости – 0,91%, воспроизводимости – 0,66–1,26% в рамках 5 повторений и 0,91% в рамках 15 повторений. Апробацию тест-системы проводили на 228 пробах биоматериала, отобранных от крупного рогатого скота из 13 регионов Российской Федерации, при этом ДНК *Mycoplasma dispar* была обнаружена в 39,47% исследуемых проб.

Заключение. Разработанная тест-система для выявления ДНК *Mycoplasma dispar* продемонстрировала высокие валидационные показатели и может быть использована в диагностике микоплазмоза крупного рогатого скота.

Ключевые слова: *Mycoplasma dispar*, тест-система, ПЦР-РВ, внутренний контрольный образец, чувствительность, специфичность, эффективность амплификации

Благодарности: Работа выполнена за счет средств ФГБУ «ВНИИЗЖ» в рамках научно-исследовательских работ по теме «Ветеринарное благополучие».

Для цитирования: Абед Алхуссен М., Федорова О. Е., Кротова А. О., Бьядовская О. П., Спрыгин А. В. Валидация и применение тест-системы на основе метода ПЦР в режиме реального времени для выявления ДНК *Mycoplasma dispar*. Ветеринария сегодня. 2025; 14 (3): 274–282. <https://doi.org/10.29326/2304-196X-2025-14-3-274-282>

Конфликт интересов: Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Для корреспонденции: Абед Алхуссен Мохаммад, канд. вет. наук, младший научный сотрудник референтной лаборатории болезней крупного рогатого скота ФГБУ «ВНИИЗЖ», ул. Гвардейская, 6, мкр. Юрьеvec, г. Владимир, 600901, Россия, alhussenmohammed85@hotmail.com

Validation and application of qPCR test kit for detection of *Mycoplasma dispar* DNA

Mohammad Abed Alhussen, Olga E. Fedorova, Alena O. Krotova, Olga P. Byadovskaya, Alexander V. Sprygin

Federal Centre for Animal Health, 6 Gvardeyskaya str., Yur'evets, Vladimir 600901, Russia

ABSTRACT

Introduction. Currently, *Mycoplasma dispar* is widely spread and circulating in livestock farms around the world, including in the Russian Federation. The implementation of a real-time polymerase chain reaction test kit for detecting *Mycoplasma dispar* DNA in veterinary practice is highly relevant, as this pathogen can cause respiratory diseases in cattle and contribute to calf mortality, leading to significant economic losses in livestock production.

Objective. To introduce a newly developed real-time polymerase chain reaction test kit *Mycoplasma dispar* DNA detection kit into veterinary practice and determine its major validation parameters.

Materials and methods. *Mycoplasma dispar* reference strain (ATCC No. 27140) was cultured in 1699 Revised Mycoplasma Medium recommended by the American Type Culture Collection. DNA was extracted using a commercial kit, real-time polymerase chain reaction was performed using pre-selected parameters. The major validation parameters of the test kit were determined: analytical sensitivity, analytical specificity, amplification efficiency, repeatability and reproducibility. Applicability of real-time polymerase chain reaction test kit for detection of *Mycoplasma dispar* DNA was demonstrated.

© Абед Алхуссен М., Федорова О. Е., Кротова А. О., Бьядовская О. П., Спрыгин А. В., 2025

Results. The *Mycoplasma dispar* DNA detection test kit demonstrated an analytical sensitivity (detection limit) of 10 copies/μL (100 copies/reaction), 100% specificity (exclusive to *Mycoplasma dispar* DNA), 99.01% amplification efficiency, and an average repeatability coefficient of variation of 0.91%. Reproducibility coefficient of variation ranged from 0.66% to 1.26% across 5 replicates and was 0.91% across 15 replicates. The test kit was validated using 228 biological samples from cattle from 13 regions of the Russian Federation, while *Mycoplasma dispar* DNA was detected in 39.47% of the samples tested.

Conclusion. The developed *Mycoplasma dispar* DNA test kit has demonstrated high validation performance and is suitable for diagnosing bovine mycoplasmosis.

Keywords: *Mycoplasma dispar*, test kit, qPCR, internal control, sensitivity, specificity, amplification efficiency

Acknowledgements: The study was funded by the Federal Centre for Animal Health within the research topic "Veterinary Welfare".

For citation: Abed Alhussen M., Fedorova O. E., Krotova A. O., Byadovskaya O. P., Sprygin A. V. Validation and application of qPCR test kit for detection of *Mycoplasma dispar* DNA. *Veterinary Science Today*. 2025; 14 (3): 274–282. <https://doi.org/10.29326/2304-196X-2025-14-3-274-282>

Conflict of interests: The authors declare no conflict of interests.

For correspondence: Mohammad Abed Alhussen, Cand. Sci. (Veterinary Medicine), Junior Researcher, Reference Laboratory for Bovine Diseases, Federal Centre for Animal Health, 6 Gvardeyskaya str., Yur'evets, Vladimir 600901, Russia, alhussenmohammed85@hotmail.com

ВВЕДЕНИЕ

Mycoplasma dispar является одним из возбудителей респираторных заболеваний крупного рогатого скота (КРС), в том числе телят, и имеет повсеместное распространение. Болезнь, вызванная *M. dispar*, характеризуется воспалением слизистых оболочек верхних дыхательных путей и поражением легких, что приводит к значительным убыткам в животноводстве [1, 2, 3].

Данный вид микроорганизмов относится к роду *Mycoplasma*, классу *Mollicutes*, характеризуется отсутствием клеточной стенки, плеоморфизмом, небольшим для бактерий размером генома (803 т. п. н.) с низким соотношением G + C (28,5–29,3 моль%) [4, 5].

Культивирование *M. dispar* требует специальной питательной среды для роста, микроорганизм не образует типичных для микоплазм колоний в виде «яичницы-глазуньи». Кроме того, *M. dispar* не всегда ингибируется гипериммунной сывороткой, что затрудняет традиционную идентификацию на ранних стадиях [5]. *M. dispar* ферментирует глюкозу и восстанавливает соли тетразолия в аэробных и анаэробных условиях, но не гидролизует аргинин, не катаболизирует сыворотку и не обладает фосфатазной активностью [6, 7, 8]. *M. dispar* имеет внешнюю капсулу, состоящую из полисахарида, идентифицированного как полимер галактуроновой кислоты [9]. Эта капсула образуется во время инфицирования клеток млекопитающих-хозяев и может оказывать ингибирующее действие на активность бычьих альвеолярных макрофагов, предотвращая их активацию [10].

Сообщалось, что для уничтожения микоплазмы альвеолярными макрофагами необходимо наличие анти-тел против капсульного полисахарида [9].

Впервые *M. dispar* была выделена и идентифицирована в Англии в 1969 г. от телят с пневмонией. Затем данный вид микоплазм обнаружили в Дании, Бельгии, Голландии, Франции, Австралии, США, Канаде, Корее и Японии [8]. В Европе сообщения о выявлении возбудителя поступали из Великобритании, также инфекция, вызванная *M. dispar*, была зарегистрирована в Бразилии и Италии [11, 12, 13, 14, 15]. В Российской Федерации при исследовании 1186 проб биоматериала, полученных от КРС с клиническими признаками респираторной и/или репродуктивной патологии из 34 различных регионов в период с 2015 по 2018 г., методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с электрофоретической детекцией продуктов амплификации в агарозном геле ДНК *M. dispar* была обнаружена в 37,15% проб [16].

Передается *M. dispar* от инфицированных животных к здоровым в основном через дыхательные секреты, выявляется в дыхательных путях как здоровых, так и больных пневмонией телят [3]. При неблагоприятных условиях микоплазмы самостоятельно или в комбинации с другими инфекционными агентами могут вызывать серьезные респираторные заболевания, тем самым причиняя экономический ущерб крупным животноводческим хозяйствам с высокой концентрацией животных [17, 18]. При обследовании поголовья КРС в Нидерландах *M. dispar* была выделена из 92% проб легких телят с пневмонией и из 40% проб легких здоровых телят [7, 19]. В Дании при исследовании легких телят с признаками фибринозно-некротизирующей, гнойной бронхопневмонии и эмболической пневмонии *M. dispar* выявляли в 50% случаев [20]. Одновременно с микоплазмами обнаруживались и другие бактерии, такие как *Histophilus somni*, *Pasteurella multocida*, *Arcanobacterium pyogenes* и *Mannheimia haemolytica*. В Великобритании *M. dispar* часто выявляют у телят с пневмонией, считается, что она является причиной тяжелой плевропневмонии, сходной с контагиозной плевропневмонией КРС, включенной в список Всемирной организации здравоохранения животных (ВОЖ) и подлежащей обязательной нотификации [21].

Детальные исследования определили точную роль *M. dispar* в развитии комплекса респираторных заболеваний КРС, который является хронической болезнью, поражающей молочных телят и мясной скот на откормочных площадках. В результате было установлено, что в животноводческой отрасли США производственные потери, расходы на лечение и профилактику данного заболевания составляют более 4 млрд долларов [21].

Телятам с комплексом респираторных заболеваний обычно назначают антимикробные препараты, в то время как некоторые из них неэффективны против микоплазм [22]. Следовательно, существует значительная опасность возникновения резистентности к такого рода лекарственным средствам, что отмечается и при лечении респираторных инфекций, вызванных другими бактериальными патогенами [23].

Механизмы патогенности *M. dispar* достаточно изучены, они включают в себя способность вырабатывать перекись водорода и формировать биопленки – оба известных фактора вирулентности. Также было отмечено, что данный вид микоплазм колонизирует эпителий слизистой оболочки дыхательных путей, оказывая

цитостатическое и даже цитопатическое действие на клетки дистальных бронхов и бронхиол и приводя к нарушению трахеобронхиального клиренса [9, 21, 24]. Кроме того, было показано, что *M. dispar* оказывает иммуносупрессивное действие на организм хозяина [25]. В связи с этим данный вид микоплазм был включен вместе с *Mycoplasma bovis* в число возбудителей, вызывающих или усугубляющих комплекс респираторных заболеваний [8, 21]. *M. dispar* является причиной экссудативного бронхита и пневмонии у телят, передача инфекции происходит в основном воздушно-капельным путем и при тесном многократном контакте [26].

Mycoplasma dispar вызывает образование уплотнений пурпурно-красного цвета, в основном в крапивоventральных областях легкого [27]. При экспериментальном заражении телят *M. dispar* развивались умеренный субклинический бронхиолит с лимфоидной инфильтрацией и легкая пневмония [10]; иногда отмечались случаи мастита [28]. Другие авторы сообщают, что *M. dispar* вызывает альвеолит, при котором нейтрофилы, макрофаги и экссудат накапливаются в альвеолярных стенках и пространствах [26, 29]. При полевых случаях субклинической пневмонии, когда из проб биоматериала была выделена *M. dispar*, регистрировали сходные поражения [30].

Объем генетической информации по *M. dispar* в открытых базах данных ограничен. Полногеномная последовательность референтного штамма *M. dispar* ATCC № 27140 была внесена в GenBank в 2015 г. На основе филогенетического анализа последовательности гена 16S рРНК *M. dispar* сгруппирована вместе с *M. ovipneumoniae*, *M. flocculare* и *M. hyopneumoniae*, выделяемыми от овец и коз [31].

Борьба с микоплазмозом должна включать меры по снижению стресса, обусловленного условиями окружающей среды, и обеспечению надлежащего содержания животных в помещениях с хорошей циркуляцией воздуха. Необходимо проводить мероприятия, направленные на предотвращение заражения телят от взрослых животных [8].

Одним из ключевых компонентов борьбы с микоплазмами КРС является своевременная диагностика. Лабораторное подтверждение заболевания, вызванного *M. dispar*, играет важную роль, в связи с глобальным распространением патогена, что оказывает значительное влияние на благополучие животноводческой отрасли [18, 32, 33, 34].

Классическим способом идентификации микоплазм КРС является их выделение на питательных средах, что имеет приоритетное значение, так как в этом случае можно получить наиболее полную информацию о культурально-морфологических и биологических свойствах возбудителя. Кроме того, у данного метода имеется дополнительное преимущество, заключающееся в возможности создания банка клинических изолятов, которые в дальнейшем можно использовать при разработке и совершенствовании стратегий профилактики, контроля и искоренения микоплазмозов, а также для выявления резистентности микоплазм к антибактериальным препаратам [8, 18, 33, 34]. Но следует также отметить, что данный способ трудоемок и требует 7–10 дней для постановки диагноза [3, 18, 34].

Серологические тесты на выявление антител к *M. dispar* широко не распространены, хотя в прошлом сообщалось о применении реакции радиального гемолиза,

иммуноферментного анализа [35] и пассивной гемагглютинации [36, 37]. Авторами описано, что наличие антител к *M. dispar* у КРС слабо выражено, поскольку данный вид микоплазм обитает только на поверхности легких, однако это может быть связано с низкой чувствительностью используемого серологического анализа, а не с недостаточностью гуморального ответа организма животного [35].

Использование ПЦР значительно облегчило выявление микоплазм, хотя только в 2004 г. было сообщено о ПЦР, специфичной для выявления генома *M. dispar* [38]. В данной реакции применялись специфические и универсальные олигонуклеотиды для обнаружения единичных полиморфизмов в 16S рРНК последовательности. В то же время был описан метод ПЦР/ДГГЭ (денатурирующий градиентный гель-электрофорез), который позволяет выявлять и идентифицировать более 70 различных микоплазм, включая *M. dispar* [39, 40].

В современных условиях оперативность диагностики может быть достигнута за счет применения ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РВ), которая обеспечивает быструю и точную идентификацию специфических локусов генома микоплазм в пробах биологического материала [18, 32, 34, 41].

Использование флуоресцентных (TaqMan) зондов, которые распознают конкретную последовательность-мишень в межпраймерном сегменте, позволяет достичь высокой специфичности исследования. В отличие от традиционных методов ПЦР, метод в реальном времени не требует дополнительных операций с образцом после амплификации, что снижает риск контаминации и приводит к сокращению времени проведения анализа и увеличению пропускной способности.

Включение в состав тест-систем ПЦР-РВ внутреннего контрольного образца (ВКО) позволяет с высокой степенью достоверности интерпретировать полученные данные и исключить ложноотрицательные результаты из-за наличия в пробе ингибиторов ПЦР [42]. Таким образом, актуальной задачей для производителей современных тест-систем на основе ПЦР-РВ является использование ВКО, который позволяет контролировать как этап выделения нуклеиновой кислоты, так и этап амплификации [43, 44, 45, 46].

Также стоит отметить, что в соответствии с требованиями ВОЗ в каждый ПЦР-тест рекомендуется включать ВКО для контроля качества [47].

Наличие инструментов молекулярной идентификации геномов микоплазм, в том числе *M. dispar*, позволяет не только отслеживать эпизоотическую ситуацию в отечественных хозяйствах, но и осуществлять контроль как при ввозе животных, так и при использовании их в производственных целях [34, 48].

На сегодняшний день в Российской Федерации отсутствуют коммерчески доступные тест-системы ПЦР-РВ отечественного производства, выявляющие ДНК *M. dispar*, в связи с чем разработка и внедрение в ветеринарную практику специфичной диагностической тест-системы на основе ПЦР-РВ является актуальной задачей [34].

Целью данной работы являлось определение основных валидационных характеристик и внедрение в ветеринарную практику разработанной в ФГБУ «ВНИИЗЖ» тест-системы для выявления ДНК *M. dispar* методом ПЦР-РВ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Бактерии и вирусы. В работе использовали референтный штамм *M. dispar* (ATCC № 27140), полученный из коллекции штаммов микроорганизмов ФГБУ «ВНИИЗЖ», а также пробы биологического материала, отобранные от КРС различных возрастных групп (стабилизированная кровь; назальные и трахеальные смывы; кусочки легких, трахеи и лимфатических узлов; плевральная жидкость).

Для оценки аналитической специфичности разработанной тест-системы были использованы штаммы бактерий: *M. bovis* ATCC № 25523, *M. bovis* ATCC № 19852, *M. bovis* «Калуга 2020», ДНК *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC (MmmSC) Madugri-8 (ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр вирусологии и микробиологии», Россия), *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC (MmmSC) «Т1/44/ВНИИЗЖ», а также другие бактериальные и вирусные агенты, способные вызвать аналогичную патологию у КРС: *Escherichia coli* «ЕС-21», *Mannheimia haemolytica* «№ 1412», *Pasteurella multocida* «№ 1414», изолят *M. bovis*, вирус парагриппа-3 КРС «ВГНКИ-4», респираторно-синцитиальный вирус КРС «Вологда/2020», вирус вирусной диареи КРС «NADL-ВНИИЗЖ».

Культивирование *M. dispar*. Референтный штамм *M. dispar* (ATCC № 27140) культивировали на рекомендованной American Type Culture Collection питательной среде 1699 Revised Mycoplasma Medium, состоящей из бульона с сердечно-мозговым экстрактом, – 7,5 г; 10× сбалансированного солевого раствора Хенкса – 40,0 мл; 0,25%-го раствора фенолового красного – 10,0 мл; термически инактивированной свиной сыворотки – 200,0 мл; 5%-го гидролизата лактальбумина в 1× фосфатно-буферном растворе – 100,0 мл; дрожжевого экстракта – 20,0 мл и дистиллированной воды – 660,0 мл. Культивирование проводили в инкубаторе при температуре (37 ± 0,5) °C и 5% CO₂ в течение 5 сут. После завершения инкубации наблюдалось помутнение в пробирках и изменение цвета среды (пожелтение), на плотной питательной среде формировались колонии, характерные для *M. dispar*. Определение биологической активности *M. dispar* проводили путем подсчета колониеобразующих единиц (КОЕ/мл) [49, 50].

Выделение ДНК осуществляли с использованием коммерческого набора «Ампли Прайм РИБО-сорб» (ФБУН «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Роспотребнадзора, Россия) в соответствии с инструкцией производителя.

Постановка ПЦР-РВ. Реакционная смесь для амплификации на одну реакцию содержала следующие компоненты: ПЦР-буфер-Б для Taq ДНК-полимеразы 10× («Синтол», Россия); SynTaq ДНК-полимераза с ингибирующими активностью фермента антителами, 5 ЕД/мкл («Синтол», Россия); 25 мМ водный раствор хлорида магния MgCl₂ («Синтол», Россия); 100 мМ водных растворов четырех дезоксирибонуклеотидтрифосфатов (дНТФ): дАТФ, дГТФ, дТТФ, дЦТФ (готовится общая смесь дНТФ и разводится водой, свободной от нуклеаз, до концентрации 10 мМ каждого дНТФ; Fermentas, Литва); прямой праймер (100 пмоль/мкл), обратный праймер (100 пмоль/мкл) и TaqMan-зонд (100 пмоль/мкл) для выявления участка гена, кодирующего 16S рРНК *M. dispar* («Синтол», Россия); прямой праймер (100 пмоль/мкл), обратный праймер (100 пмоль/мкл) и TaqMan-зонд (100 пмоль/мкл) для выявления искусственно синте-

зированного ВКО («Синтол», Россия) [51]. Полученный объем реакционной смеси доводили до 15 мкл водой деионизированной, свободной от нуклеаз («Евроген», Россия). После добавляли в подготовленные пробирки по 15 мкл реакционной смеси и по 10 мкл ДНК-матрицы исследуемых образцов. Амплификацию проводили в программируемом амплификаторе Rotor-Gene Q (QIAGEN, Германия).

Таблица 1
Значения порогового цикла Ct при оптимизации температурно-временного режима ПЦР-РВ для выявления ДНК *M. dispar* (n = 3)

Table 1
Threshold cycle (Ct) values of optimized real-time polymerase chain reaction temperature-time profile for *M. dispar* DNA detection (n = 3)

Стадия реакции	Темпе- ратура	Продолжительность	Количество циклов	Среднее значение Ct ± SD
1-й режим				
Прогрев реакционной смеси	95 °C	5 мин	1	25,46 ± 0,37
Денатурация	95 °C	15 с	40	
Отжиг праймеров и элонгация	60 °C	60 с (измерение флуоресценции Green/FAM, Red/Cy5)		
2-й режим				
Прогрев реакционной смеси	95 °C	5 мин	1	26,30 ± 0,86
Денатурация	95 °C	10 с	40	
Отжиг праймеров	60 °C	20 с (измерение флуоресценции Green/FAM, Red/Cy5)		
Элонгация	72 °C	20 с		
3-й режим				
Прогрев реакционной смеси	95 °C	5 мин	1	28,87 ± 0,15
Денатурация	95 °C	10 с	45	
Отжиг праймеров	58 °C	20 с (измерение флуоресценции Green/FAM, Red/Cy5)		
Элонгация	72 °C	20 с		

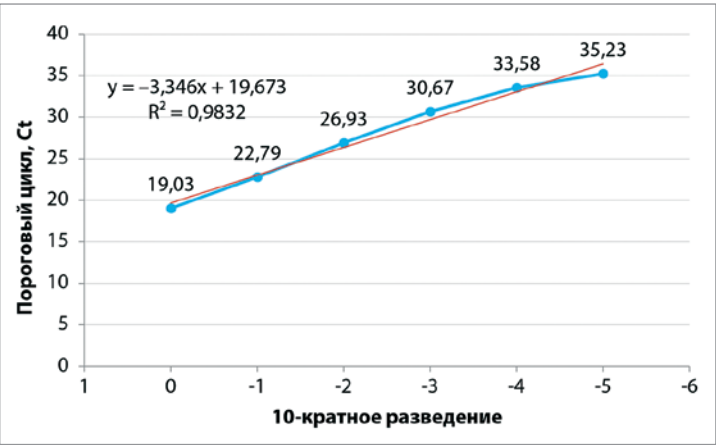


Рис. 1. Линейная зависимость результатов ПЦР-РВ при тестировании 10-кратных разведений ДНК генома *M. dispar*
Fig. 1. Linear correlation of real-time polymerase chain reaction results for 10-fold dilutions of the *M. dispar* genome DNA

Таблица 2
Определение специфичности разработанной тест-системы на основе ПЦР-РВ для выявления ДНК *M. dispar* ($n = 3$)

Table 2
Specificity assessment of the developed real-time polymerase chain reaction kit for *M. dispar* DNA detection ($n = 3$)

Генетический материал	Штамм	Результат ПЦР-РВ, Green/FAM (ДНК <i>M. dispar</i>)	Результат ПЦР-РВ, Red/Cy5 (ДНК ВКО)
<i>Escherichia coli</i>	«ЕС-21»	отр.	+
<i>Mannheimia haemolytica</i>	«№1412»	отр.	+
<i>Pasteurella multocida</i>	«№1414»	отр.	+
<i>Mycoplasma bovis</i>	ATCC № 19852	отр.	+
<i>Mycoplasma bovis</i>	изолят	отр.	+
<i>Mycoplasma dispar</i>	ATCC № 27140	пол.	+
<i>Mycoplasma dispar</i>	изолят	пол.	+
<i>Mycoplasma bovis</i>	ATCC № 25523	отр.	+
<i>Mycoplasma bovis</i>	«Калуга 2020»	отр.	+
<i>Mycoplasma bovis</i>	изолят	отр.	+
<i>Mycoplasma mycoides</i> subsp. <i>mycoides</i> SC (MmmSC)	«Т1/44/ВНИИЗЖ»	отр.	+
<i>Mycoplasma mycoides</i> subsp. <i>mycoides</i> SC (MmmSC)	Madugri-8	отр.	+
Вирус парагриппа-3 КРС	«ВГНКИ-4»	отр.	+
Респираторно-синцитиальный вирус КРС	«Вологда/2020»	отр.	+
Вирус вирусной диареи КРС	«NADL-ВНИИЗЖ»	отр.	+
Вода, свободная от нуклеаз	—	отр.	+

отр. – ДНК *M. dispar* не выявлена (*M. dispar* DNA was not detected); пол. – ДНК *M. dispar* выявлена (*M. dispar* DNA was detected); «+» – ДНК ВКО выявлена (internal control sample DNA was detected).

Таблица 3
Вариабельность значений порогового цикла Ct в ПЦР-РВ для *M. dispar* ($n = 15$)

Table 3
Variability of real-time polymerase chain reaction Ct values for *M. dispar* ($n = 15$)

Номер постановки	Номер повторности	Полученное значение Ct	Среднее значение Ct	Стандартное отклонение (SD)	Коэффициент вариации (Cv, %)
I	1	27,09	26,74	0,22	0,82
	2	26,76			
	3	26,51			
	4	26,68			
	5	26,64			
II	1	27,41	27,36	0,18	0,66
	2	27,50			
	3	27,54			
	4	27,13			
	5	27,20			
III	1	26,58	27,00	0,34	1,26
	2	26,93			
	3	27,32			
	4	27,38			
	5	26,77			
Итого			27,03	0,25	0,91

В качестве положительного контрольного образца (ПКО) использовали плазмидную конструкцию, содержащую олигонуклеотидную последовательность участка генома (с начальной концентрацией 2×10^7 копий/мкл) и специфичный участок генома *M. dispar* (целевой фрагмент).

В качестве отрицательного контрольного образца (ОКО) и отрицательного контроля ПЦР (ОК) использовали воду деионизированную, свободную от нуклеаз («Евроген», Россия).

Валидация. Валидационные параметры тест-системы определяли согласно рекомендованному S. A. Bustin et al. руководству по публикации результатов разработки количественных ПЦР-РВ-протоколов [52].

Для установления специфичности разработанной ПЦР-РВ были протестированы образцы биологического материала, содержащие ДНК представителей рода *Mycoplasma* и нуклеиновые кислоты вирусов и бактерий, способных вызывать аналогичную патологию у КРС. Чувствительность тест-системы определяли, используя заведомо положительные пробы биологического материала, содержащие ДНК *M. dispar*.

Предел обнаружения ДНК *M. dispar* (аналитическую чувствительность) разработанной тест-системы устанавливали, применяя ПКО, включающий ДНК *M. dispar* с начальной концентрацией 2×10^7 копий/мкл, каждое разведение исследовалось в 5 повторностях.

Эффективность амплификации оценивали с помощью серии последовательных 10-кратных разведений положительного образца биоматериала, содержащего ДНК *M. dispar*, в 3 повторностях и вычисляли согласно формуле:

$$E = (10^{1/\text{slope}} - 1) \times 100\%,$$

где slope – это значение наклона линейной области зависимости Ct от логарифма концентрации кДНК-матрицы.

Статистическую обработку полученных результатов осуществляли с помощью программы Microsoft Excel: рассчитывали средние значения и их стандартные отклонения ($\pm$ SD), проводили регрессионный анализ и вычисляли коэффициенты вариации. Коэффициент вариации (CV) при оценке воспроизводимости и схожести (повторяемости) не должен превышать 10%.

Анализ промежуточной прецизионности в условиях повторяемости (воспроизводимости) проводили с одним образцом, который тестировали в 5 повторностях в течение трех постановок ПЦР-РВ ($n = 15$).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Впервые в России в ФГБУ «ВНИИЗЖ» была разработана и валидирована тест-система на основе ПЦР-РВ с применением ВКО для выявления ДНК *M. dispar*.

Использование ВКО значительно повышает достоверность и точность результатов ПЦР, в том числе решает проблемы ингибирования. Комитет Американской ассоциации ветеринарных лабораторных диагностов (AAVLD) рекомендовал, чтобы все внедряемые молекулярные диагностические тесты, которые проходят процедуру валидации, включали стратегию контроля ингибирования реакции, основанную на внутренней валидации для тестируемого образца, целевого вида-хозяина и комбинации матриц проб [53].

Начальным этапом валидации тест-системы был подбор температурного профиля, при котором

достигается максимальная аналитическая чувствительность и эффективность амплификации.

Оптимизация температурно-временного режима ПЦР-РВ проводилась с ранее выверенными концентрациями компонентов реакции для получения средних значений порогового цикла *Ct*. Результаты представлены в таблице 1.

Был определен следующий оптимальный температурно-временной режим ПЦР-РВ для выявления ДНК *M. dispar*: 5 мин при 95 °С (прогрев реакционной смеси), далее 40 циклов ПЦР, состоящих из денатурации ДНК в течение 15 с при 95 °С, отжига праймеров и элонгации кДНК в течение 60 с при 60 °С.

В результате проведенных испытаний продемонстрировано, что разработанная тест-система позволяет избежать ложноположительных результатов при тестировании с генетическим материалом бактерий – возбудителей респираторных заболеваний КРС. Показано, что тест-система обладает 100%-й аналитической специфичностью в отношении *M. dispar* (табл. 2), что выше, чем в исследовании J. B. W. J. Cornelissen et al., где специфичность составила 98,2% [54]. Олигонуклеотиды также верифицировались по базе данных BLAST NCBI, при этом значимой гомологии ни с одним из видов микоплазм не установлено, то есть олигонуклеотиды уникальны для генома *M. dispar*.

Эффективность амплификации при постановке реакции оценивали с помощью серии последовательных 10-кратных разведений положительного образца, содержащего ДНК *M. dispar*. На основе полученных средних значений порогового цикла каждого разведения эффективность амплификации (Е) составила 99,01%, что оказалось более значительным по сравнению с 97,49%-й эффективностью, продемонстрированной J. B. W. J. Cornelissen et al. при разработке одноплексной ПЦР [54]. Коэффициент детерминации (R^2) при этом был равен 0,9832 (рис. 1).

Внутрилабораторную прецизионность в условиях воспроизводимости оценивали с учетом таких показателей, как «персонал», «время» и «оборудование». Испытания осуществляли с использованием биологического материала, содержащего и не содержащего ДНК *M. dispar*. Проведенные исследования показали, что результаты выявления ДНК *M. dispar* с использованием разработанной тест-системы полностью совпадают с ожидаемым результатом и не зависят от показателей «время», «персонал» и «оборудование».

Оценку промежуточной прецизионности в условиях повторяемости (сходимости) проводили с одним

Таблица 4

Аналитическая чувствительность (предел обнаружения) тест-системы ПЦР-РВ для выявления ДНК *M. dispar*

Table 4

Analytical sensitivity (detection limit) of the real-time polymerase chain reaction test kit for *M. dispar* DNA detection

Характеристика матрицы	Результат выявления ДНК <i>M. dispar</i> , повторность					Соответствие ожидаемому результату, %
	1	2	3	4	5	
2×10^7 копий ДНК/мкл	пол.	пол.	пол.	пол.	пол.	100
2×10^6 копий ДНК/мкл	пол.	пол.	пол.	пол.	пол.	100
2×10^5 копий ДНК/мкл	пол.	пол.	пол.	пол.	пол.	100
2×10^4 копий ДНК/мкл	пол.	пол.	пол.	пол.	пол.	100
2×10^3 копий ДНК/мкл	пол.	пол.	пол.	пол.	пол.	100
2×10^2 копий ДНК/мкл	пол.	пол.	пол.	пол.	пол.	100
20 копий ДНК/мкл	пол.	пол.	пол.	пол.	пол.	100
10 копий ДНК/мкл	пол.	пол.	пол.	пол.	пол.	100
5 копий ДНК/мкл	отр.	пол.	отр.	пол.	отр.	40

пол. – ДНК *M. dispar* выявлена (*M. dispar* DNA detected);

отр. – ДНК *M. dispar* не выявлена (*M. dispar* DNA not detected).

Таблица 5

Требования к результатам контролей после амплификации

Table 5

Requirements for the control results following amplification

Контроль	Значение порогового цикла (<i>Ct</i>)	
	канал Green/FAM	канал Red/Cy5
Отрицательный контроль ПЦР	отсутствует	отсутствует
Отрицательный контрольный образец «ОКО»	отсутствует	≤ 35
Положительный контроль « <i>M. dispar</i> »	≤ 35	≤ 35

образцом, который тестировали в 5 повторностях в течение трех постановок ПЦР ($n = 15$).

Среднее значение порогового цикла (*Ct*) на протяжении трех постановок ПЦР-РВ варьировало от 26,74 до 27,36 с разбросом стандартного отклонения (SD) от 0,18 до 0,34. Коэффициент вариации составил 0,91% при максимальном допустимом значении 10%. При суммировании результатов трех постановок ПЦР-РВ среднее значение порогового цикла (*Ct*) и стандартного отклонения было равно 27,03 и $\pm 0,25$ соответственно (табл. 3).

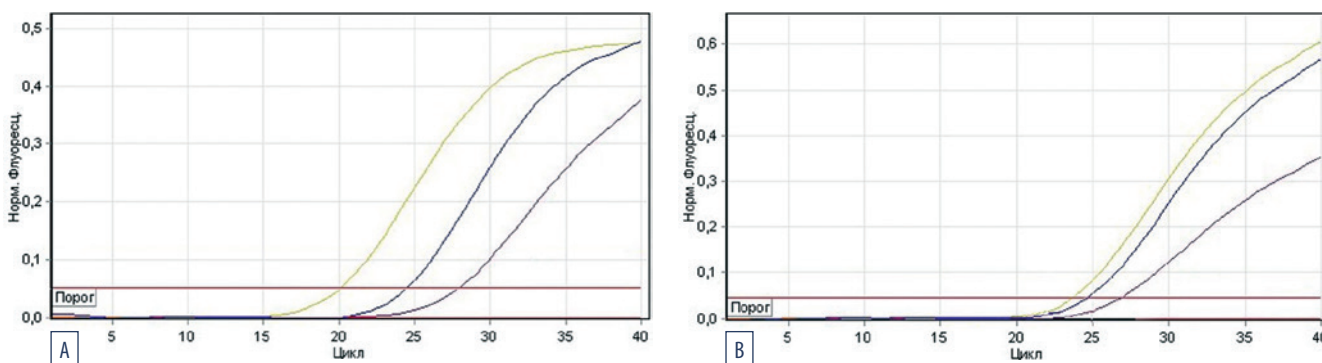


Рис. 2. Кривые флуоресценции: А – канал Green/FAM (ДНК *M. dispar*); В – канал Red/Cy5 (ДНК ВКО)

Fig. 2. Fluorescence curves: А – Green/FAM channel (*M. dispar* DNA); В – Red/Cy5 channel (internal control sample DNA)

На следующем этапе определяли предел обнаружения (аналитическую чувствительность) ДНК *M. dispar*, выделенной из ряда 10-кратных последовательных разведений искусственно синтезированной последовательности ДНК, соответствующей специфичному участку в геноме *M. dispar*, с исходной активностью 2×10^7 копий ДНК/мкл. Каждое разведение исследовалось в 5 повторностях (табл. 4).

Таблица 6
Интерпретация результатов для исследуемых образцов

Table 6
Interpretation of the results for the tested samples

Значение порогового цикла (Ct)		Результат
канал Green/FAM (ДНК <i>M. dispar</i>)	канал Red/Cy5 (ВКО)	
отсутствует	≤ 35	ДНК <i>M. dispar</i> не выявлена
≤ 35	определено или отсутствует	ДНК <i>M. dispar</i> выявлена
> 35	≤ 35	сомнительный ¹
отсутствует или > 35	отсутствует или > 35	недостоверен ²

¹ провести повторное исследование для соответствующих образцов начиная с этапа экстракции ДНК, при повторении результата считать, что ДНК *M. dispar* в образце выявлена (re-test relevant samples, starting from the DNA extraction stage, if the test yields the same results, it can be assumed that *M. dispar* DNA has been detected in the original sample);

² провести повторное исследование для соответствующих образцов начиная с этапа экстракции ДНК (re-test the relevant samples, starting from the DNA extraction stage).

Таблица 7
Идентификация и выявление генома *M. dispar* в пробах биоматериала с использованием разработанной тест-системы в 2024 г.

Table 7
Identification and detection of *M. dispar* genome in biological samples using the developed test kit in 2024

Регион	Смывы (назальные, трахеальные)		Патологический материал (стабилизированная кровь, кусочки легких, трахеи и лимфатических узлов, плевральная жидкость)	
	Общее количество проб	Количество положительных проб	Общее количество проб	Количество положительных проб
Воронежская область	—	—	52	0
Вологодская область	—	—	2	0
Владимирская область	12	10	24	4
Московская область	22	8	2	2
Нижегородская область	10	0	10	4
Чувашская Республика	10	10	—	—
Краснодарский край	—	—	2	0
Республика Татарстан	24	24	2	2
Рязанская область	10	0	4	4
Ярославская область	—	—	4	0
Республика Марий Эл	—	—	2	2
Оренбургская область	6	2	8	6
Самарская область	16	6	6	6
Итого	110	60	118	30

«—» — пробы для исследования из данного региона не поступали (samples from this region were not received for testing).

Установлено, что для разработанной тест-системы на основе ПЦР-РВ предел обнаружения ДНК *M. dispar* составляет 10 копий ДНК/мкл (100 копий ДНК/реакцию).

В исследованиях, проведенных L. McAuliffe et al., для дифференциации 32 видов микоплазм был использован денатурирующий градиентный гель-электрофорез (DGGE) продукта ПЦР 16S рибосомальной ДНК. Данный метод позволяет быстро идентифицировать многие виды микоплазм, для которых не существует специфичной ПЦР и которые выявляются с помощью культуральных и серологических тестов [39, 40]. Однако артефакты, вносимые в ходе ПЦР или последующего DGGE-анализа, приводят к искажению результатов при использовании этого метода для количественного анализа α -разнообразия или относительного обилия оперативных таксономических единиц [55].

Некоторые исследователи для выявления *M. dispar* в пробах биологического материала использовали классическую ПЦР [31, 38, 56], однако ПЦР-РВ позволяет в режиме реального времени без использования гелей быстрее получить более точные результаты [57].

Анализ и интерпретация результатов. Рекомендуемые параметры ПЦР-анализа для каналов Green/FAM и Red/Cy5 тождественны: установка динамического фона, корректировка уклона, устранение выбросов на 10%, линейная шкала и пороговое значение, которое составляет 0,05 (рис. 2). Результаты интерпретируются на основании наличия или отсутствия пересечения кривой флуоресценции с пороговой линией, что соответствует наличию или отсутствию на каналах Green/FAM и Red/Cy5 значений пороговых циклов амплификации (Ct) в соответствующих графах таблиц результатов, отображаемых амплификатором.

Результат ПЦР-РВ считают достоверным при условии получения корректных результатов для отрицательного контроля ПЦР, отрицательного контрольного образца «ОКО» (контроль экстракции) и положительного контроля «*M. dispar*». Требования к контролям описаны в таблице 5.

Интерпретацию результатов для исследуемых образцов необходимо проводить согласно требованиям, представленным в таблице 6.

С использованием разработанной тест-системы исследовали 228 проб биоматериала, отобранного от КРС с клиническими признаками респираторной патологии, поступивших в ФГБУ «ВНИИЗЖ» в 2024 г. из 13 регионов РФ. Результаты представлены в таблице 7.

Установлено, что частота обнаружения ДНК *M. dispar* в образцах биоматериала составила 39,47%. Полученные данные свидетельствуют о достаточно широком распространении *M. dispar* среди КРС в российских хозяйствах в 2024 г.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в результате проведенных исследований были установлены основные валидационные параметры и доказана возможность применения тест-системы «МИК-ДИСПАР ПЦР-РВ» (ФГБУ «ВНИИЗЖ») для выявления ДНК *Mycoplasma dispar* методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени, которая продемонстрировала высокую аналитическую специфичность и чувствительность, сходимость и воспроизводимость в различных условиях проведения теста (диапазон коэффициента вариации: 0,66–0,91%). Эффективность амплификации (E) составила 99,01%,

а предел обнаружения – 100 копий ДНК/реакцию. Важно отметить, что данные показатели являются ключевыми в объективной оценке качества тест-систем ПЦР.

Использование экзогенного внутреннего контрольного образца позволяет исключить ложноотрицательные результаты. С применением разработанной тест-системы в 2024 г. ДНК *M. dispar* была выявлена в 39,47% исследованных проб, поступивших из разных регионов РФ в ФГБУ «ВНИИЗЖ», что свидетельствует об актуальности диагностических исследований на обнаружение ДНК *M. dispar*. При этом внутренний контрольный образец служит индикатором этапа выделения и присутствия возможных ингибиторов.

Следует отметить, что валидационная составляющая данного исследования может быть расширена за счет включения других родственных микоплазм, таких как *M. bovirhinis*, *M. flocculare* и *M. ovipneumoniae*, однако данные о выявлении указанных патогенов у крупного и мелкого рогатого скота на территории РФ отсутствуют. Более того, *M. ovipneumoniae* является возбудителем микоплазменной пневмонии овец и коз, и риски его циркуляции среди КРС ничтожно малы [58, 59, 60]. Учитывая высокую специфичность олигонуклеотидов при использовании ресурса BLAST, тест-система может применяться для диагностических исследований КРС на выявление ДНК *M. dispar*.

Таким образом, данная тест-система может служить эффективным инструментом в ветеринарной лабораторной практике для выявления ДНК *M. dispar* в пробах биологического материала от КРС.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Tortorelli G., Carrillo Gaeta N., Mendonça Ribeiro B. L., Miranda Marques L., Timenetsky J., Gregory L. Evaluation of *Mollicutes* microorganisms in respiratory disease of cattle and their relationship to clinical signs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 2017; 31 (4): 1215–1220. <https://doi.org/10.1111/jvim.14721>
2. Chen S., Hao H., Yan X., Liu Y., Chu Y. Genome-wide analysis of *Mycoplasma dispar* provides insights into putative virulence factors and phylogenetic relationships. *G3: Genes, Genomes, Genetics*. 2019; 9 (2): 317–325. <https://doi.org/10.1534/g3.118.200941>
3. Абед Алхуссен М., Кирпиченко В. В., Яцентюк С. П., Нестеров А. А., Бьядовская О. П., Жбанова Т. В., Спрыгин А. В. Патогенные микоплазмы крупного рогатого скота *Mycoplasma bovis*, *M. bovirhinis* и *M. dispar*: краткая характеристика возбудителей (обзор). *Сельскохозяйственная биология*. 2021; 56 (2): 245–260. <https://doi.org/10.15389/agrobiology.2021.2.245rus>
4. Abed Alhussen M., Kirpichenko V. V., Yatsentyuk S. P., Nesterov A. A., Byadovskaya O. P., Zhbanova T. V., Sprygin A. V. *Mycoplasma bovis*, *M. bovirhinis* and *M. dispar* as bovine pathogens: brief characteristics of the pathogens (review). *Agricultural Biology*. 2021; 56 (2): 245–260. <https://doi.org/10.15389/agrobiology.2021.2.245eng>
5. Herrmann R. Genome structure and organization. In: *Mycoplasmas: Molecular Biology and Pathogenesis*. Ed. by J. Maniloff. Washington: American Society for Microbiology; 1992: 157–168.
6. Ter Laak E. A., Noordergraaf J. H. An improved method for the identification of *Mycoplasma dispar*. *Veterinary Microbiology*. 1987; 14 (1): 25–31. [https://doi.org/10.1016/0378-1135\(87\)90049-6](https://doi.org/10.1016/0378-1135(87)90049-6)
7. Nicholas R. A. J., Khan L. A., Houshaymi B., Miles R. J., Ayling R. D., Hotzel H., Sachse K. Close genetic and phenotypic relatedness between *Mycoplasma ovine/caprine* serogroup 11 and *Mycoplasma bovirhinis*. *Systematic and Applied Microbiology*. 2002; 25 (3): 396–402. <https://doi.org/10.1078/0723-2020-00121>
8. Ter Laak E. A., Noordergraaf J. H., Dijkstra P. J. W. Prevalence of mycoplasmas in the respiratory tracts of pneumonic calves. *Journal of Veterinary Medicine, Series B*. 1992; 39 (1–10): 553–562. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0450.1992.tb01205.x>
9. Nicholas R., Ayling R., McAuliffe L. *Mycoplasma* diseases of ruminants. Wallingford: CAB; 2008. 239 p. <https://doi.org/10.1079/9780851990125.0000>
10. Almeida R. A., Rosenbusch R. F. Capsule-like surface material of *Mycoplasma dispar* induced by *in vitro* growth in culture with bovine cells is antigenically related to similar structures expressed *in vivo*. *Infection and Immunity*. 1991; 59 (9): 3119–3125. <https://doi.org/10.1128/iai.59.9.3119-3125.1991>
11. Howard C. J., Gourlay R. N., Taylor G. Immunity to *Mycoplasma* infections of the calf respiratory tract. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 1981; 137: 711–726. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7331951>
12. Ayling R. D., Bashiruddin S. E., Nicholas R. A. J. *Mycoplasma* species and related organisms isolated from ruminants in Britain between 1990 and 2000. *Veterinary Record*. 2004; 155 (14): 413–416. <https://doi.org/10.1136/vr.155.14.413>
13. França Dias de Oliveira B. A., Carrillo Gaeta N., Mendonça Ribeiro B. L., Reyes Alemán M. A., Miranda Marques L., Timenetsky J., et al. Determination of bacterial aetiological factor on tracheobronchial lavage in relation to clinical signs of bovine respiratory disease. *Journal of Medical Microbiology*. 2016; 65 (10): 1137–1142. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000345>

13. Bottinelli M., Passamonti F., Rampacci E., Stefanetti V., Pochiero L., Coletti M., et al. DNA microarray assay and real-time PCR as useful tools for studying the respiratory tract *Mycoplasma* populations in young dairy calves. *Journal of Medical Microbiology*. 2017; 66 (9): 1342–1349. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000571>
14. Mosier D. Review of BRD pathogenesis: the old and the new. *Animal Health Research Reviews*. 2014; 15 (2): 166–168. <https://doi.org/10.1017/S1466252314000176>
15. Taylor G. Immunity to *Mycoplasma* infections of the respiratory tract: a review. *Journal of the Royal Society of Medicine*. 1979; 72 (7): 520–526. <https://doi.org/10.1177/014107687907200711>
16. Абед Алхуссен М., Нестеров А. А., Кирпиченко В. В., Яцентюк С. П., Спрыгин А. В., Бьядовская О. П., Кононов А. В. Распространение микоплазмозов крупного рогатого скота на животноводческих фермах в Российской Федерации в период с 2015 по 2018 год. *Ветеринария сегодня*. 2020; (2): 102–108. <https://doi.org/10.29326/2304-196X-2020-2-33-102-108>
17. Abed Alhussen M., Nesterov A. A., Kirpichenko V. V., Yatsentyuk S. P., Sprygin A. V., Byadovskaya O. P., Kononov A. V. Bovine mycoplasmosis occurrence on livestock farms in the Russian Federation for 2015–2018. *Veterinary Science Today*. 2020; (2): 102–108. <https://doi.org/10.29326/2304-196X-2020-2-33-102-108>
18. Bernier Gosselin V., Francoz D., Babkine M., Desrochers A., Nichols S., Doré E., et al. A retrospective study of 29 cases of otitis media/interna in dairy calves. *The Canadian Veterinary Journal*. 2012; 53 (9): 957–962. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23450859>
19. Parker A. M., Sheehy P. A., Hazelton M. S., Bosward K. L., House J. K. A review of *Mycoplasma* diagnostics in cattle. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 2018; 32 (3): 1241–1252. <https://doi.org/10.1111/jvim.15135>
20. Ter Laak E. A., Noordergraaf J. H., Verschure M. H. Susceptibilities of *Mycoplasma bovis*, *Mycoplasma dispar*, and *Ureaplasma diversum* strains to antimicrobial agents *in vitro*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1993; 37 (2): 317–321. <https://doi.org/10.1128/AAC.37.2.317>
21. Tegtmeyer C., Utenthal A. A., Friis N. F., Jensen N. E., Jensen H. E. Pathological and microbiological studies on pneumonic lungs from Danish calves. *Journal of Veterinary Medicine, Series B*. 1999; 46 (10): 693–700. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0450.1999.00301.x>
22. Bottinelli M., Merenda M., Gastaldelli M., Picchi M., Stefani E., Nicholas R. A. J., Catania S. The pathogen *Mycoplasma dispar* shows high minimum inhibitory concentrations for antimicrobials commonly used for bovine respiratory disease. *Antibiotics*. 2020; 9 (8):460. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9080460>
23. DeDonder K. D., Apley M. D. A literature review of antimicrobial resistance in Pathogens associated with bovine respiratory disease. *Animal Health Research Reviews*. 2015; 16 (2): 125–134. <https://doi.org/10.1017/S146625231500016X>
24. Anholt R. M., Klima C., Allan N., Matheson-Bird H., Schatz C., Ajitkumar P., et al. Antimicrobial susceptibility of bacteria that cause bovine respiratory disease complex in Alberta, Canada. *Frontiers in Veterinary Science*. 2017; (4):207. <https://doi.org/10.3389/fvets.2017.00207>
25. Dabo S. M., Taylor J. D., Confer A. W. *Pasteurella multocida* and bovine respiratory disease. *Animal Health Research Reviews*. 2007; 8 (2): 129–150. <https://doi.org/10.1017/S1466252307001399>
26. Almeida R. A., Wannemuehler M. J., Rosenbusch R. F. Interaction of *Mycoplasma dispar* with bovine alveolar macrophages. *Infection and Immunity*. 1992; 60 (7): 2914–2919. <https://doi.org/10.1128/iai.60.7.2914-2919.1992>
27. Friis N. F. *Mycoplasma dispar* as a causative agent in pneumonia of calves. *Acta Veterinaria Scandinavica*. 1980; 21: 34–42. <https://doi.org/10.1186/bf03546898>
28. Ross R. F. *Mycoplasma* – animal pathogens. In: *Rapid Diagnosis of Mycoplasmas*. Ed. by I. Kahane, A. Adoni. Boston: Springer; 1993: 69–109. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-2478-6_7
29. Jasper D. E. Bovine mycoplasmal mastitis. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 1979; 175 (10): 1072–1074. <https://doi.org/10.2460/javma.1979.175.101072>
30. Gourlay R. N., Howard C. J., Thomas L. H., Wyld S. G. Pathogenicity of some *Mycoplasma* and *Acholeplasma* species in the lungs of gnotobiotic calves. *Research in Veterinary Science*. 1979; 27 (2): 233–237. [https://doi.org/10.1016/S0034-5288\(18\)32836-4](https://doi.org/10.1016/S0034-5288(18)32836-4)
31. George T. D., Horsfall N., Sullivan N. D. A subclinical pneumonia of calves associated with *Mycoplasma dispar*. *Australian Veterinary Journal*. 1973; 49 (12): 580–586. <https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.1973.tb06738.x>
32. Shilan Faqe Muhammad Salih. Detection of *Mycoplasma dispar* in bovine respiratory disease by polymerase chain reaction assay in Sulaimaniyah city. *Iraqi Journal of Agricultural Sciences*. 2024; 55 (2): 703–710. <https://doi.org/10.36103/p6042k98>
33. Andersson A.-M., Aspán A., Wisselink H. J., Smid B., Ridley A., Pelkonen S., et al. A European inter-laboratory trial to evaluate the performance of three serological methods for diagnosis of *Mycoplasma bovis* infection in cattle using latent class analysis. *BMC Veterinary Research*. 2019; 15:369. <https://doi.org/10.1186/s12917-019-2117-0>
34. Dudek K., Nicholas R. A. J., Szacawa E., Bednarek D. *Mycoplasma bovis* infections – occurrence, diagnosis and control. *Pathogens*. 2020; 9 (8):640. <https://doi.org/10.3390/pathogens9080640>
35. Абед Алхуссен М. Молекулярно-биологические методы диагностики микоплазмозов крупного рогатого скота: дис. ... канд. вет. наук. Владимир: ФГБУ «ВНИИЗЖ»; 2023. 194 с.
36. Abed Alhussen M. Molecular and biological methods for bovine mycoplasmosis diagnostics: Author's thesis for degree of Cand. Sci. (Veterinary Medicine). Vladimir: Federal Centre for Animal Health; 2023. 194 p. (in Russ.)
37. Howard C. J. Mycoplasmas and bovine respiratory disease: studies related to pathogenicity and the immune response – a selective review. *Yale Journal of Biology and Medicine*. 1983; 56 (5–6): 789–797. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6382831>
38. Martin S. W., Bateman K. G., Shewen P. E., Rosendal S., Bohac J. E. The frequency, distribution and effects of antibodies, to seven putative respiratory pathogens, on respiratory disease and weight gain in feedlot calves in Ontario. *Canadian Journal of Veterinary Research*. 1989; 53 (3): 355–362. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2766158>
39. Martin S. W., Bateman K. G., Shewen P. E., Rosendal S., Bohac J. G., Thorburn M. A group level analysis of the associations between antibodies to seven putative pathogens and respiratory disease and weight gain in Ontario feedlot calves. *Canadian Journal of Veterinary Research*. 1990; 54 (3): 337–342. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2165846>

38. Miles K., McAuliffe L., Ayling R. D., Nicholas R. A. J. Rapid detection of *Mycoplasma dispar* and *M. bovirhinis* using allele specific polymerase chain reaction protocols. *FEMS Microbiology Letters*. 2004; 241 (1): 103–107. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2004.10.010>
39. McAuliffe L., Ellis R. J., Lawes J. R., Ayling R. D., Nicholas R. A. J. 16S rDNA PCR and denaturing gradient gel electrophoresis; a single generic test for detecting and differentiating *Mycoplasma* species. *Journal of Medical Microbiology*. 2005; 54 (8): 731–739. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.46058-0>
40. McAuliffe L., Ellis R. J., Ayling R. D., Nicholas R. A. J. Differentiation of *Mycoplasma* species by 16S ribosomal DNA PCR and denaturing gradient gel electrophoresis fingerprinting. *Journal of Clinical Microbiology*. 2003; 41 (10): 4844–4847. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.10.4844-4847.2003>
41. Baird S. C., Carman J., Dinsmore R. P., Walker R. L., Collins J. K. Detection and identification of *Mycoplasma* from bovine mastitis infections using a nested polymerase chain reaction. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 1999; 11 (5): 432–435. <https://doi.org/10.1177/104063879901100507>
42. Moalic P.-Y., Gesbert F., Kempf I. Utility of an internal control for evaluation of a *Mycoplasma meleagridis* PCR test. *Veterinary Microbiology*. 1998; 61 (1–2): 41–49. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(98\)00173-4](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(98)00173-4)
43. Maaroufi Y., de Bruyne J.-M., Duchateau V., Scheen R., Crokaert F. Development of a multiple internal control for clinical diagnostic real-time amplification assays. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. 2006; 48 (2): 183–191. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2006.00125.x>
44. Hymas W., Stevenson J., Taggart E. W., Hillyard D. Use of lyophilized standards for the calibration of a newly developed real time PCR assay for human herpes type six (HHV6) variants A and B. *Journal of Virological Methods*. 2005; 128 (1–2): 143–150. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2005.05.003>
45. Dingle K. E., Crook D., Jeffery K. Stable and noncompetitive RNA internal control for routine clinical diagnostic reverse transcription-PCR. *Journal of Clinical Microbiology*. 2004; 42 (3): 1003–1011. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.3.1003-1011.2004>
46. Stöcher M., Leb V., Berg J. A convenient approach to the generation of multiple internal control DNA for a panel of real-time PCR assays. *Journal of Virological Methods*. 2003; 108 (1): 1–8. [https://doi.org/10.1016/S0166-0934\(02\)00266-5](https://doi.org/10.1016/S0166-0934(02)00266-5)
47. OIE Quality Standard and Guidelines for Veterinary Laboratories: Infectious Diseases. 2nd ed. 2008. 70 p.
48. Frey J., Nicolet J. Molecular identification and epidemiology of animal mycoplasmas. *Wiener Klinische Wochenschrift*. 1997; 109 (14–15): 600–603. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9286067>
49. Абед Алхуссен М., Нестеров А. А., Спрыгин А. В., Шумилова И. Н., Брянцева М. С., Бьядовская О. П. Оптимизация состава питательной среды и изучение стадий роста изолята «Калуга 2020» *Mycoplasma bovis*. *Ветеринария сегодня*. 2022; 11 (3): 262–267. <https://doi.org/10.29326/2304-196X-2022-11-3-262-267>
- Abed Alhussen M., Nesterov A. A., Sprygin A. V., Shumilova I. N., Bryantseva M. S., Byadovskaya O. P. Optimization of medium composition and study of growth stages of *Mycoplasma bovis* "Kaluga 2020" isolate. *Veterinary Science Today*. 2022; 11 (3): 262–267. <https://doi.org/10.29326/2304-196X-2022-11-3-262-267>
50. Hwang M.-H., Damte D., Cho M.-H., Kim Y.-H., Park S.-C. Optimization of culture media of pathogenic *Mycoplasma hyopneumoniae* by a response surface methodology. *Journal of Veterinary Science*. 2010; 11 (4): 327–332. <https://doi.org/10.4142/jvs.2010.11.4.327>
51. Морозова Е. О., Кротова А. О., Садчикова А. С., Тенилилов Н. А., Бьядовская О. П., Иголкин А. С. и др. Методические рекомендации по получению экзогенного внутреннего контрольного образца для ПЦР в режиме реального времени при выявлении ДНК микроорганизмов: утв. ФГБУ «ВНИИЗЖ» 13.10.2023 № 81-23. Владимир: ФГБУ «ВНИИЗЖ»; 2023. 32 с.
- Morozova E. O., Krotova A. O., Sadchikova A. S., Tenitilov N. A., Byadovskaya O. P., Igolkin A. S., et al. Methodical recommendations on preparation of exogenous internal control sample for real-time PCR to detect microorganism DNA: approved by the Federal Centre for Animal Health 13.10.2023 No. 81-23. Vladimir: Federal Centre for Animal Health; 2023. 32 p. (in Russ.)
52. Bustin S. A., Benes V., Garson J. A., Hellemans J., Huggett J., Kubista M., et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical Chemistry*. 2009; 55 (4): 611–622. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797>
53. Yan L., Toohey-Kurth K. L., Crossley B. M., Bai J., Glaser A. L., Tallmadge R. L., Goodman L. B. Inhibition monitoring in veterinary molecular testing. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 2020; 32 (6): 758–766. <https://doi.org/10.1177/1040638719889315>
54. Cornelissen J. B. W. J., de Bree F. M., van der Wal F. J., Kooi E. A., Koene M. G. J., Bossers A., et al. *Mycoplasma* detection by triplex real-time PCR in bronchoalveolar lavage fluid from bovine respiratory disease complex cases. *BMC Veterinary Research*. 2017; 13:97. <https://doi.org/10.1186/s12917-017-1023-6>
55. Neilson J. W., Jordan F. L., Maier R. M. Analysis of artifacts suggests DGGE should not be used for quantitative diversity analysis. *Journal of Microbiological Methods*. 2013; 92 (3): 256–263. <https://doi.org/10.1016/j.jmimet.2012.12.021>
56. Marques L. M., Buzinhani M., Yamaguti M., Oliveira R. C., Ferreira J. B., Mettifo-go E., Timenetsky J. Use of a polymerase chain reaction for detection of *Mycoplasma dispar* in the nasal mucus of calves. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 2007; 19 (1): 103–106. <https://doi.org/10.1177/104063870701900118>
57. Zhang G., Brown E. W., González-Escalona N. Comparison of real-time PCR, reverse transcriptase real-time PCR, loop-mediated isothermal amplification, and the FDA conventional microbiological method for the detection of *Salmonella* spp. in produce. *Applied and Environmental Microbiology*. 2011; 77 (18): 6495–6501. <https://doi.org/10.1128/AEM.00520-11>
58. Deeney A. S., Collins R., Ridley A. M. Identification of *Mycoplasma* species and related organisms from ruminants in England and Wales during 2005–2019. *BMC Veterinary Research*. 2021; 17:325. <https://doi.org/10.1186/s12917-021-03037-y>
59. Chen J., Wang S., Dong D., Zhang Z., Huang Y., Zhang Y. Isolation and characterization of *Mycoplasma ovipneumoniae* infecting goats with pneumonia in Anhui Province, China. *Life*. 2024; 14 (2):218. <https://doi.org/10.3390/life14020218>
60. Wolfe L. L., Diamond B., Spraker T. R., Sirochman M. A., Walsh D. P., Machin C. M., et al. A bighorn sheep die-off in southern Colorado involving a *Pasteurella* strain that may have originated from synoptic cattle. *Journal of Wildlife Diseases*. 2010; 46 (4): 1262–1268. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-46.4.1262>

Поступила в редакцию / Received 11.03.2025

Поступила после рецензирования / Revised 29.04.2025

Принята к публикации / Accepted 03.06.2025

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ / INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Абед Алхуссен Мохаммад, канд. вет. наук, младший научный сотрудник референтной лаборатории болезней крупного рогатого скота ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия; <https://orcid.org/0000-0002-1210-0303>, alhussenmohammed85@hotmail.com

Федорова Ольга Евгеньевна, ведущий биолог референтной лаборатории болезней крупного рогатого скота ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия; <https://orcid.org/0009-0006-0498-2904>, fedorova@arriah.ru

Кротова Алена Олеговна, ведущий биолог референтной лаборатории болезней крупного рогатого скота ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия; <https://orcid.org/0000-0002-8311-4681>, krotova@arriah.ru

Бьядовская Ольга Петровна, канд. биол. наук, заведующий референтной лаборатории болезней крупного рогатого скота ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия; <https://orcid.org/0000-0002-8326-7151>, bjadovskaya@arriah.ru

Спрыгин Александр Владимирович, д-р биол. наук, старший научный сотрудник референтной лаборатории болезней крупного рогатого скота ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия; <https://orcid.org/0000-0001-5982-3675>, sprygin@arriah.ru

Mohammad Abed Alhussen, Cand. Sci. (Veterinary Medicine), Junior Researcher, Reference Laboratory for Bovine Diseases, Federal Centre for Animal Health, Vladimir, Russia; <https://orcid.org/0000-0002-1210-0303>, alhussenmohammed85@hotmail.com

Olga E. Fedorova, Leading Biologist, Reference Laboratory for Bovine Diseases, Federal Centre for Animal Health, Vladimir, Russia; <https://orcid.org/0009-0006-0498-2904>, fedorova@arriah.ru

Alena O. Krotova, Leading Biologist, Reference Laboratory for Bovine Diseases, Federal Centre for Animal Health, Vladimir, Russia; <https://orcid.org/0000-0002-8311-4681>, krotova@arriah.ru

Olga P. Byadovskaya, Cand. Sci. (Biology), Head of Reference Laboratory for Bovine Diseases, Federal Centre for Animal Health, Vladimir, Russia; <https://orcid.org/0000-0002-8326-7151>, bjadovskaya@arriah.ru

Alexander V. Sprygin, Dr. Sci. (Biology), Senior Researcher, Reference Laboratory for Bovine Diseases, Federal Centre for Animal Health, Vladimir, Russia; <https://orcid.org/0000-0001-5982-3675>, sprygin@arriah.ru

Вклад авторов: Авторы внесли равнозначный вклад при определении целей и задач исследования, сборе литературных данных; при разработке и проведении лабораторных исследований, анализе и систематизации полученных данных; при обобщении, интерпретации результатов и оформлении основных результатов исследования в виде статьи.

Contribution of the authors: All authors contributed equally to formulating the research objectives and aims, conducting literature reviews and data collection; designing and performing laboratory tests, analyzing and systematizing research data; interpreting results and drawing conclusions and preparing and writing the manuscript.