



Оптимизация состава питательной среды и изучение стадий роста изолята «Калуга 2020» *Mycoplasma bovis*

Мохаммад Абед Алхуссен¹, А. А. Нестеров², А. В. Спрыгин³, И. Н. Шумилова⁴, М. С. Брянцева⁵, О. П. Бьядовская⁶

¹ ФГАУ ВО «Российский университет дружбы народов» (РУДН), г. Москва, Россия;

²⁻⁶ ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ»), г. Владимир, Россия

¹ <https://orcid.org/0000-0002-1210-0303>, e-mail: alhussenmohammed85@hotmail.com

² <https://orcid.org/0000-0002-4288-1964>, e-mail: nesterov@arriah.ru

³ <https://orcid.org/0000-0001-5982-3675>, e-mail: sprygin@arriah.ru

⁴ <https://orcid.org/0000-0001-6132-5771>, e-mail: shumilova@arriah.ru

⁵ e-mail: bryantseva@arriah.ru

⁶ <https://orcid.org/0000-0002-8326-7151>, e-mail: bjadovskaya@arriah.ru

РЕЗЮМЕ

Mycoplasma bovis является одним из возбудителей микоплазмозов крупного рогатого скота, вызывающим респираторные болезни, мастит, артрит и кератоконъюнктивит. В статье представлены результаты исследования по оптимизации компонентного состава питательной среды для культивирования изолята «Калуга 2020» *Mycoplasma bovis*, а также изучения стадий роста возбудителя. Для определения активности микоплазм использовали метод измерения цветоизменяющих единиц и культуральный метод с подсчетом колониеобразующих единиц. Установлено, что при культивировании в оптимизированной питательной среде на основе модифицированного бульона Хейфлика микроорганизм вступает в фазу логарифмического роста по истечении первых 24 ч роста, через 72 ч культура микоплазм переходит в стабильный период, а через 84 ч регистрируется фаза спада. Влияние процентного содержания глюкозы, свежего дрожжевого экстракта и сыворотки крови лошади в питательной среде на накопление изолята «Калуга 2020» *Mycoplasma bovis* оценивали с использованием метода «один фактор за раз». Было установлено, что наибольшее влияние на накопление микоплазм оказывало содержание в питательной среде таких факторов роста, как свежий дрожжевой экстракт и сыворотка крови лошади ($p < 0,05$), в то время как изменение количества глюкозы не стимулировало рост *Mycoplasma bovis*. В результате проведенных исследований определен подходящий состав и подобрано оптимальное содержание факторов роста в среде для культивирования изолята «Калуга 2020» *Mycoplasma bovis*: 12,5% свежего дрожжевого экстракта и 25% сыворотки крови лошади. Применение оптимизированной питательной среды на основе модифицированного бульона Хейфлика позволило увеличить накопление биомассы микоплазм в 5 раз ($3,98 \times 10^9$ КОЕ/мл) по сравнению со стандартной средой ($0,79 \times 10^9$ КОЕ/мл).

Ключевые слова: *Mycoplasma bovis*, крупный рогатый скот, изолят «Калуга 2020», оптимизация, питательные среды, колониеобразующие единицы (КОЕ), цветоизменяющая единица (ЦИЕ), биологическая активность

Для цитирования: 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. DOI: 10.29326/2304-196X-2022-11-3-262-267.

Конфликт интересов: Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Для корреспонденции: Абед Алхуссен Мохаммад, аспирант департамента ветеринарной медицины аграрно-технологического института ФГАУ ВО «Российский университет дружбы народов» (РУДН), 117198, Россия, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 6, e-mail: alhussenmohammed85@hotmail.com.

Optimization of medium composition and study of growth stages of *Mycoplasma bovis* “Kaluga 2020” isolate

Mohammad Abed Alhussen¹, A. A. Nesterov², A. V. Sprygin³, I. N. Shumilova⁴, M. S. Bryantseva⁵, O. P. Byadovskaya⁶

¹ People's Friendship University of Russia (RUDN University), Moscow, Russia

²⁻⁶ FGBI “Federal Centre for Animal Health” (FGBI “ARRIAH”), Vladimir, Russia

¹ <https://orcid.org/0000-0002-1210-0303>, e-mail: alhussenmohammed85@hotmail.com

² <https://orcid.org/0000-0002-4288-1964>, e-mail: nesterov@arriah.ru

³ <https://orcid.org/0000-0001-5982-3675>, e-mail: sprygin@arriah.ru

⁴ <https://orcid.org/0000-0001-6132-5771>, e-mail: shumilova@arriah.ru

⁵ e-mail: bryantseva@arriah.ru

⁶ <https://orcid.org/0000-0002-8326-7151>, e-mail: bjadovskaya@arriah.ru

SUMMARY

Mycoplasma bovis is considered one of bovine mycoplasmosis pathogens responsible for respiratory diseases, mastitis, arthritis and keratoconjunctivitis. The paper presents results of the study on optimizing the component composition of the culture medium for *Mycoplasma bovis* "Kaluga 2020" isolate, as well as the study of this pathogen's growth stages. The color-changing units assay and the culture method combined with colony-forming unit quantification were used for determination of *Mycoplasma* activity. It was found that when cultured in an optimized nutrient medium based on modified Hayflick broth, the microorganism enters a logarithmic growth phase after first 24 hours of growth, in 72 hours the *Mycoplasma* culture enters a stability phase, and a decline phase is recorded in 84 hours. The effect of percentage content of glucose, fresh yeast extract and horse serum in the nutrient medium on accumulation of *Mycoplasma bovis* "Kaluga 2020" isolate was evaluated using the one-factor-at-a-time approach. It was found that the greatest effect on *Mycoplasma* accumulation was exerted by such growth factors as fresh yeast extract and horse serum in the nutrient medium ($p < 0.05$), while changes in the amount of glucose did not stimulate *Mycoplasma bovis* growth. Based on results of the conducted studies, the appropriate composition was determined and the optimal content of growth factors in the medium for culturing *Mycoplasma bovis* "Kaluga 2020" isolate was selected: 12.5% of fresh yeast extract and 25% of horse serum. The use of the optimized nutrient medium based on modified Hayflick broth allowed 5-fold increase in accumulation of *Mycoplasma* biomass (3.98×10^9 CFU/ml) compared to the standard medium (0.79×10^9 CFU/ml).

Keywords: *Mycoplasma bovis*, cattle, "Kaluga 2020" isolate, optimization, nutrient media, colony-forming units (CFU), color-changing unit (CCU), biological activity

For citation: 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. DOI: 10.29326/2304-196X-2022-11-3-262-267.

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

For correspondence: Mohammad Abed Alhussen, Post-Graduate Student, Department of Veterinary Medicine, Agrarian and Technological Institute, People's Friendship University of Russia (RUDN University), 117198, Russia, Moscow, ul. Miklukho-Maklay, 6, e-mail: alhussenmohammed85@hotmail.com.

ВВЕДЕНИЕ

Возбудитель микоплазмозов крупного рогатого скота – *Mycoplasma bovis* (*M. bovis*) – широко распространен во всем мире, в том числе в Российской Федерации [1, 2]. Данный патоген является одним из этиологических агентов респираторных болезней крупного рогатого скота, он также вызывает такие заболевания, как мастит, артрит и кератоконъюнктивит [3, 4].

Впервые *M. bovis* была выделена в США в 1961 г. от крупного рогатого скота с тяжелой формой мастита [5, 6]. Считается, что на долю *M. bovis* приходится от четверти до трети всех экономических потерь от респираторных заболеваний в животноводстве [7].

Лабораторная диагностика микоплазмозов крупного рогатого скота включает культуральные, серологические и молекулярные методы исследования [8, 9]. При этом выделение возбудителя путем культивирования на питательных средах – один из самых надежных методов диагностики заболевания. В настоящее время для культивирования *M. bovis* широко используют различные виды питательных сред, в том числе Хейфлика [10], модифицированный PPLO [11], Eaton's [12] и другие.

Оптимизация состава питательной среды является одним из важнейших аспектов для усовершенствования технологии культивирования микоплазм, в том числе и при проведении диагностических исследований методом выделения [13]. При этом сложность компонентного состава питательных сред и длительный период роста микоплазм обуславливает необходимость проведения многоэтапных исследований [14].

Определение скорости роста и активности микоплазм проводят несколькими методами: измерением цветоизменяющих единиц (ЦИЕ), подсчетом колониеобразующих единиц (КОЕ), измерением мутности, восстановлением солей тетразолия до формазана,

определением клеточных концентраций аденозинтрифосфата (АТФ) с помощью люминометрии люциферин-люциферазы и др. [15].

Целью исследования явилось изучение динамики роста *M. bovis nru* культивировании *in vitro* и оптимизация компонентного состава питательной среды Хейфлика.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Изолят. В работе использовали изолят «Калуга 2020» *M. bovis*, выделенный в 2020 г. из проб биологического материала, отобранных от телят с клиническими признаками респираторной патологии. Идентификацию изолята *M. bovis* проводили методом полимеразной цепной реакции в реальном времени.

Питательные среды. В качестве стандартной жидкой питательной среды использовали модифицированный бульон Хейфлика [16]. Для его приготовления применяли BBL™ *Mycoplasma* Broth Base (BD, США). Основу бульона BBL™ *Mycoplasma* в количестве 20 г растворяли в 1 л дистиллированной воды, тщательно перемешивали и стерилизовали автоклавированием при температуре $(121 \pm 0,5)$ °C в течение 15 мин, после чего охлаждали до (50 ± 2) °C. На 100 мл среды добавляли 20 мл ненагретой сыворотки крови лошади, 0,5 мл 40%-го раствора глюкозы, 10 мл свежего 25%-го раствора дрожжевого экстракта, 1,5 мл 0,5%-го раствора фенолового красного, 1 мл раствора пенициллина (200 000 ЕД/мл) и 0,04 мл 10%-го раствора ацетата таллия. Параметр pH готового бульона доводили до 7,8 ед. с помощью 1,0 М раствора NaOH.

Для приготовления твердой питательной среды к модифицированному бульону Хейфлика добавляли 6,7 г агара Vacto™ Agar (BD, США). После автоклавирования полуфабрикат охлаждали до температуры

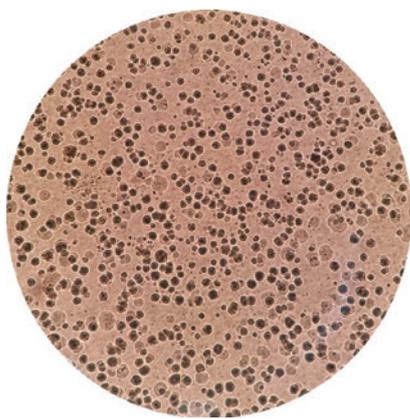


Рис. 1. 3-суточная культура *M. bovis* на твердой питательной среде (увеличение 20×)

Fig. 1. 3-day-old *M. bovis* culture grown in solid nutrient medium (magnification 20×)

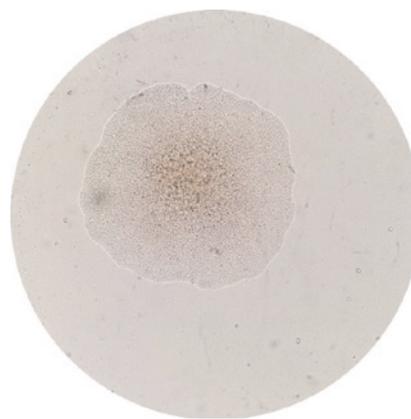


Рис. 2. 4-суточная культура *M. bovis* на твердой питательной среде (увеличение 40×)

Fig. 2. 4-day-old *M. bovis* culture grown in solid nutrient medium (magnification 40×)

(50 ± 2) °C, после чего вносили дополнительные компоненты среды согласно описанной выше прописи. Подготовленную питательную среду разливали по чашкам Петри, охлаждали до полного затвердевания и хранили при температуре (4 ± 2) °C.

Определение активности изолята «Калуга 2020» *M. bovis*. Для определения активности микоплазм использовали методы измерения ЦИЕ и культуральный с подсчетом КОЕ. В солевом растворе Хенкса готовили ряд десятикратных последовательных разведений суспензии, содержащей изолят «Калуга 2020» *M. bovis* (10^{-1} – 10^{-5}). По 10 мкл микробной суспензии из каждого разведения высевали на поверхность твердой питательной среды в трех повторностях. Посевы культивировали в термостате при температуре ($37 \pm 0,5$) °C в присутствии 5% CO₂ в течение 9 сут. Учет результатов титрования проводили путем подсчета количества одиночных колоний, высчитывая среднее количество КОЕ в 10 мкл наибольшего разведения суспензии, в котором наблюдался рост колоний *M. bovis*. Полученный результат использовали для вычисления количества КОЕ в 1 мл исходной суспензии испытуемого материала.

Оценку активности изолята «Калуга 2020» *M. bovis* с использованием метода измерения цветоизменя-

ющих единиц [17, 18] проводили в 96-луночных культуральных планшетах. В первых лунках планшета смешивали 20 мкл исходной суспензии *M. bovis* со 180 мкл модифицированного бульона Хейфлика с феноловым красным, далее приготовили серии десятикратных разведений исследуемой суспензии (10^{-1} – 10^{-10}). В качестве контроля питательной среды использовали лунки без добавления *M. bovis*. Планшеты инкубировали при температуре ($37 \pm 0,5$) °C в присутствии 5% CO₂ в течение 14 сут. Накопление продуктов метаболизма *M. bovis* приводит к смещению pH в кислую сторону, что вызывает изменение цвета индикатора с красного на желтый. Учет изменения цвета питательной среды и определение активности *M. bovis* в культуральной суспензии проводили каждые 24 ч.

Концентрацию в ЦИЕ/мл (титр) определяли как максимальное разведение содержащей *M. bovis* суспензии, в котором наблюдалось изменение цвета [19].

Контроль pH среды проводили с помощью pH-метра согласно инструкции по эксплуатации прибора.

Статистический анализ. Для анализа экспериментальных данных использовали программу Minitab/Statistics (версия 19.1, США). Полученные результаты были определены как достоверные ($p < 0,05$).

Таблица 1
Корреляция биологической активности *M. bovis* и значения ЦИЕ

Table 1
Correlation between *M. bovis* biological activity and CCU value

Время культивирования, ч	Изменение цвета среды	Биологическая активность микоплазм		pH
		Ig КОЕ/мл	Ig ЦИЕ/мл	
24	с красного на красно-оранжевый	7,0	5,0	7,4
72	с красно-оранжевого на оранжевый	8,9	10,0	7,2
96	с оранжевого на оранжево-желтый	8,0	9,0	7,1
168	с оранжево-желтого на желтый	6,4	4,0	6,8

градиент изменения цвета питательной среды

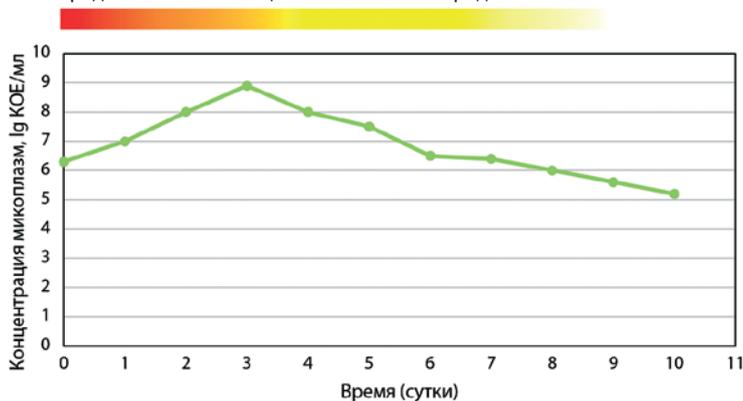


Рис. 3. Фазы роста и накопление изолята «Калуга 2020» *M. bovis* при культивировании в модифицированном бульоне Хейфлика

Fig. 3. Growth phases and accumulation of *M. bovis* “Kaluga 2020” isolate when cultivated in modified Hayflick broth

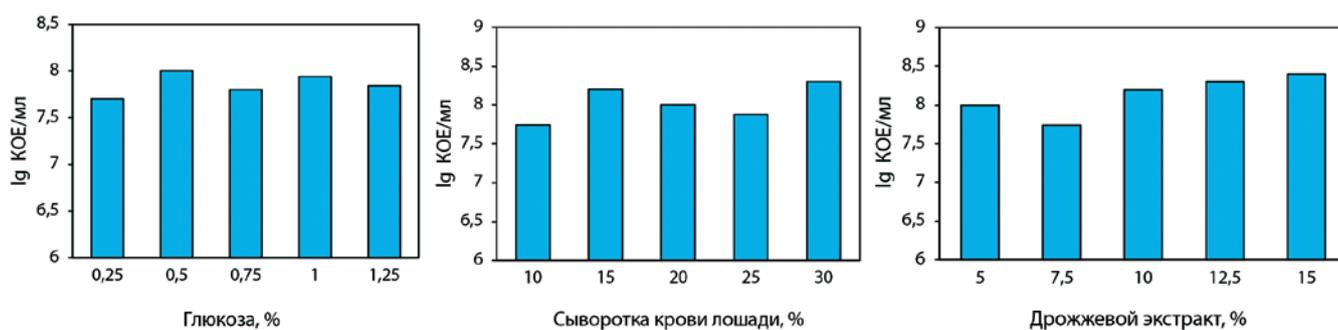


Рис. 4. Влияние различных компонентов питательной среды на накопление изолята «Калуга 2020» *M. bovis*

Fig. 4. Effect of various components of nutrient medium on accumulation of *M. bovis* "Kaluga 2020" isolate

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

При культивировании *M. bovis* на твердой модифицированной среде Хейфлика наблюдали формирование колоний с неровными краями и приподнятой в виде соска серединой, что придает им вид «яичницы-глазуньи» (рис. 1, 2).

Определение фаз роста и времени максимального накопления изолята «Калуга 2020» *M. bovis* при культивировании в модифицированном бульоне Хейфлика. Культивирование изолята «Калуга 2020» *M. bovis* проводили при температуре ($37 \pm 0,5$) °C в течение 10 сут, при этом каждые 24 ч отбирали пробы культуральной суспензии и изучали активность *M. bovis* методами титрования с подсчетом КОЕ (культуральный способ) и определения цветоизменяющих единиц. Результаты исследования показали, что культура изолята «Калуга 2020» входила в логарифмическую фазу роста после 24 ч культивирования и максимальный уровень накопления биомассы микоплазм регистрировали к 72 ч, после чего наступала фаза спада со снижением биологической активности культивируемого материала (рис. 3).

Корреляция значений биологической активности микоплазм, определенных методом выявления цветоизменяющих единиц и культуральным способом. Анализ полученных результатов показал, что максимальное накопление изолята наблюдалось на 72-й ч культивирования (8,9 lg КОЕ/мл). Указанное значение концентрации микоплазм коррелировало с изменением цвета питательной среды (10 lg ЦИЕ/мл), что соответствовало показателю pH, равному 7,2. При более длительном культивировании регистрировали снижение биологической активности культурального материала до 6,4 lg КОЕ/мл, что было сопоставимо с концентрацией микроорганизмов, равной 4 lg ЦИЕ/мл (табл. 1).

Определение оптимального состава питательной среды для культивирования изолята «Калуга 2020» *M. bovis*. На первом этапе работы устанавливали наиболее значимые для накопления изолята «Калуга 2020» *M. bovis* компоненты модифицированной среды Хейфлика. Исследования проводили путем изменения стандартного состава среды по трем компонентам: глюкоза, свежий дрожжевой экстракт и сыворотка крови лошади. При этом в каждой серии опытов изменяли процентное содержание только одного из трех компонентов при сохранении стандартных параметров других факторов роста.

Для определения влияния глюкозы на рост *M. bovis* использовали питательную среду с содержанием

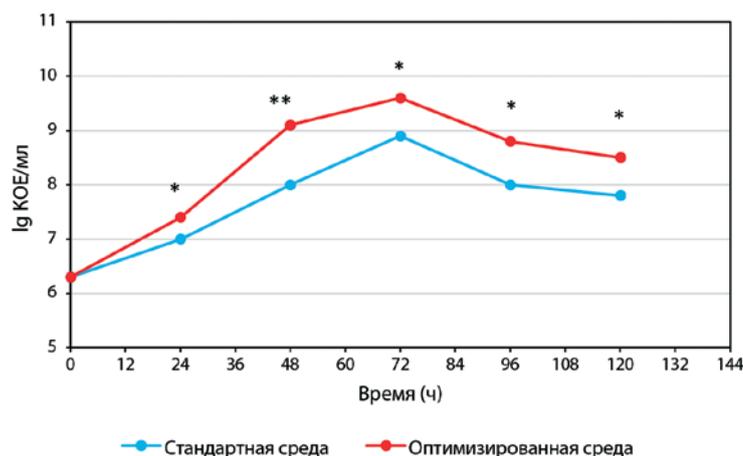
Таблица 2

Влияние состава питательных сред на накопление изолята «Калуга 2020» *M. bovis*

Table 2

Effect of nutrient medium composition on accumulation of *M. bovis* "Kaluga 2020" isolate

Номер эксперимента	Содержание исследуемых компонентов		lg КОЕ/мл
	свежий дрожжевой экстракт, %	сыворотка крови лошади, %	
1	5,0	10	7,80
2	7,5	10	7,90
3	10,0	10	8,00
4	12,5	10	8,20
5	15,0	10	7,90
6	5,0	15	7,70
7	7,5	15	7,90
8	10,0	15	8,00
9	12,5	15	8,20
10	15,0	15	7,80
11	5,0	20	7,70
12	7,5	20	7,90
13	10,0	20	8,10
14	12,5	20	8,00
15	15,0	20	7,80
16	5,0	25	8,10
17	7,5	25	7,90
18	10,0	25	8,00
19	12,5	25	9,60
20	15,0	25	7,79
21	5,0	30	7,50
22	7,5	30	7,85
23	10,0	30	8,00
24	12,5	30	7,80
25	15,0	30	7,60



* $p < 0,05$; ** $p < 0,001$.

Рис. 5. Активность изолята «Калуга 2020» *M. bovis* при культивировании в стандартной и оптимизированной питательной среде Хейфлика

Fig. 5. Activity of *M. bovis* "Kaluga 2020" isolate when cultivated in standard and optimized Hayflick medium

данного компонента в количестве 0,25; 0,50; 0,75; 1,00; 1,25%, свежего дрожжевого экстракта – 5,0; 7,5; 10,0; 12,5; 15,0%, сыворотки крови лошади – 10, 15, 20, 25, 30%. Контроль изменения биологической активности микоплазм проводили путем подсчета КОЕ методом титрования.

Полученные результаты показали, что наибольшее значение для накопления *M. bovis* имеет содержание в питательной среде двух факторов роста: свежего дрожжевого экстракта и сыворотки крови лошади, в то время как глюкоза не оказывает значительного влияния (рис. 4).

Выявив наиболее значимые факторы роста питательной среды, необходимо было определить их оптимальное соотношение. Для этого провели испытания 25 экспериментальных питательных сред с различным количеством указанных компонентов. Накопление *M. bovis* определяли методом титрования и выражали в lg КОЕ/мл.

Согласно данным таблицы 2, максимальная активность *M. bovis* (9,60 lg КОЕ/мл) наблюдается при культивировании в питательной среде, содержащей 12,5% свежего дрожжевого экстракта и 25% сыворотки крови лошади.

Полученные результаты подтверждают данными изменения биологической активности изолята «Калуга 2020» *M. bovis* при культивировании в стандартной и оптимизированной питательной среде Хейфлика (рис. 5).

Биологическая активность *M. bovis* при культивировании в оптимизированной среде в среднем составляла $3,98 \times 10^9$ КОЕ/мл, что в 5 раз больше, чем при культивировании в стандартной питательной среде Хейфлика ($0,79 \times 10^9$ КОЕ/мл).

ОБСУЖДЕНИЕ

На основании результатов проведенных исследований можно заключить, что существует связь между фазой роста, накоплением микоплазм, показателем КОЕ и цветом питательной среды (ЦИЕ).

Переход от красного к оранжевому соответствовал фазе экспоненциального роста микоплазм, а при достижении ростового пика наблюдалось изменение цвета среды с красно-оранжевого на оранжевый. При дальнейшем культивировании цвет среды последовательно изменялся до оранжево-желтого и желтого, что соответствовало фазе спада в результате лизиса клеток и истощения внутриклеточного запаса АТФ. Подобные результаты подтверждаются данными, опубликованными зарубежными коллегами [15, 20].

Известно, что культивирование микоплазм – процесс трудоемкий [18] и поиск оптимальных сред для получения качественного биологического материала данных микроорганизмов имеет актуальное значение, в том числе и для производства средств специфической иммунопрофилактики микоплазмозов [21].

Установлено незначительное влияние глюкозы на рост и накопление *M. bovis*, что согласуется с литературными данными [22, 23].

Применение оптимизированной питательной среды на основе модифицированного бульона Хейфлика, содержащей 12,5% свежего дрожжевого экстракта и 25% сыворотки крови лошади, позволило увеличить накопление изолята «Калуга 2020» *M. bovis* в 5 раз ($3,98 \times 10^9$ КОЕ/мл) по сравнению со стандартной средой ($0,79 \times 10^9$ КОЕ/мл). Результаты, полученные при проведении аналогичных исследований по оптимизации состава питательной среды для культивирования *M. hyopneumoniae*, свидетельствуют только о трехкратном увеличении накопления микоплазм по сравнению со стандартной средой [13, 24].

Изучение роста *M. bovis*, а также определение периода лог-фазы может сыграть важную роль в будущих исследованиях по выделению микоплазм данного вида, культивированию и разработке вакцин.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты исследований показали, что по истечении первых 24 ч культивирования в жидкой среде изолят «Калуга 2020» *M. bovis* переходил в фазу логарифмического роста и через 72 ч достигал максимального уровня накопления. При более длительном культивировании начиная с 84-го ч наступала фаза спада, а биологическая активность получаемого материала снижалась.

Установлено, что наибольшее влияние на накопление изолята «Калуга 2020» *M. bovis* при культивировании в питательной среде Хейфлика оказывали факторы роста – свежий дрожжевой экстракт и сыворотка крови лошади. Подобрано оптимальное содержание данных компонентов в среде культивирования – 12,5 и 25% соответственно. Оптимизированная питательная среда на основе модифицированного бульона Хейфлика может быть использована для получения бактериального материала с целью разработки диагностических препаратов и средств специфической профилактики заболеваний, вызванных *M. bovis*.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. 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. DOI: 10.29326/2304-196X-2020-2-33-102-108.
2. Абед Алхуссен М., Нестеров А. А., Кирпиченко В. В., Яцентюк С. П., Спрыгин А. В., Бьядовская О. П., Кононов А. В. Bovine mycoplasmosis

- occurrence on livestock farms in the Russian Federation for 2015–2018. *Veterinary Science Today*. 2020; (2): 102–108. DOI: 10.29326/2304-196X-2020-2-33-102-108.
2. Parker A. M., Sheehy P. A., Hazelton M. S., Bosward K. L., House J. K. A review of mycoplasma diagnostics in cattle. *J. Vet. Intern. Med.* 2018; 32 (3): 1241–1252. DOI: 10.1111/jvim.15135.
3. Kurčić V., Doković R., Ilić Z., Petrović M. Etiopathogenesis and economic significance of bovine respiratory disease complex (BRDC). *Acta Agric. Serbica*. 2018; 23 (45): 85–100. DOI: 10.5937/AASer1845085K.
4. Niu J., Wang D., Yan M., Chang Z., Xu Y., Sizhu S., et al. Isolation, identification and biological characteristics of *Mycoplasma bovis* in yaks. *Microb. Pathog.* 2021; 150:104691. DOI: 10.1016/j.micpath.2020.104691.
5. Hale H. H., Helmboldt C. F., Plastring W. N., Stula E. F. Bovine mastitis caused by a *Mycoplasma* species. *Cornell Vet.* 1962; 52: 582–591. PMID: 13952069.
6. 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. bovis genitalium* и *M. dispar*: краткая характеристика возбудителей (обзор). *Сельскохозяйственная биология*. 2021; 56 (2): 245–260. DOI: 10.15389/agrobiol.2021.2.245rus.
- Abed Alhussen M., Kirpichenko V. V., Yatsentyuk S. P., Nesterov A. A., Byadovskaya O. P., Zhanova T. V., Sprygin A. V. *Mycoplasma bovis*, *M. bovis genitalium* and *M. dispar* as bovine pathogens: brief characteristics of the pathogens (review). *Agricultural Biology*. 2021; 56 (2): 245–260. DOI: 10.15389/agrobiol.2021.2.245eng.
7. Nicholas R. A., Ayling R. D. *Mycoplasma bovis*: disease, diagnosis, and control. *Res. Vet. Sci.* 2003; 74 (2): 105–112. DOI: 10.1016/s0034-5288(02)00155-8.
8. Andersson A. M., Aspán A., Wisselink H. J., Smid B., Ridley A., Pelkonen S., et al. 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 Vet. Res.* 2019; 15 (1): 369. DOI: 10.1186/s12917-019-2117-0.
9. Montagnani F., Rossetti B., Vannoni A., Cusi M. G., De Luca A. Laboratory diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* infections: data analysis from clinical practice. *New Microbiol.* 2018; 41 (3): 203–207. PMID: 29874388.
10. Pfützner H., Sachse K. *Mycoplasma bovis* as an agent of mastitis, pneumonia, arthritis and genital disorders in cattle. *Rev. Sci. Tech.* 1996; 15 (4): 1477–1494. DOI: 10.20506/rst.15.4.987.
11. Poumarat F., Longchambon D., Martel J. L. Application of dot immunobinding on membrane filtration (MF dot) to the study of relationships within “*M. mycoides* cluster” and within “glucose and arginine-negative cluster” of ruminant mycoplasmas. *Vet. Microbiol.* 1992; 32 (3–4): 375–90. DOI: 10.1016/0378-1135(92)90159-q.
12. Nicholas R., Baker S. Recovery of mycoplasmas from animals. *Methods Mol. Biol.* 1998; 104: 37–43. DOI: 10.1385/0-89603-525-5:37.
13. 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. *J. Vet. Sci.* 2010; 11 (4): 327–332. DOI: 10.4142/jvs.2010.11.4.327.
14. Duta F. P., De França F. P., Sérvulo E. F. C., De Almeida Lopes L. M., Da Costa A. C. A., Barros A. Effect of process parameters on production of a biopolymer by *Rhizobium* sp. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2004; 114: 639–652. DOI: 10.1385/abab:114:1-3:639.
15. Assunção P., Rosales R. S., Rifatbegović M., Antunes N. T., de la Fe C., Ruiz de Galarreta C. M., Poveda J. B. Quantification of mycoplasmas in broth medium with sybr green-I and flow cytometry. *Front. Biosci.* 2006; 11: 492–497. DOI: 10.2741/1812.
16. Hayflick L. Tissue cultures and mycoplasmas. *Tex. Rep. Biol. Med.* 1965; 23: Suppl 1:285–303. PMID: 5833547.
17. García-Morante B., Dors A., León-Kempis R., Pérez de Rozas A., Segalés J., Sibila M. Assessment of the *in vitro* growing dynamics and kinetics of the non-pathogenic J and pathogenic 11 and 232 *Mycoplasma hyopneumoniae* strains. *Vet. Res.* 2018; 49 (1):45. DOI: 10.1186/s13567-018-0541-y.
18. Friis N. F. Some recommendations concerning primary isolation of *Mycoplasma suis pneumoniae* and *Mycoplasma flocculare* a survey. *Nord. Vet. Med.* 1975; 27 (6): 337–339. PMID: 1098011.
19. Poveda J. B., Nicholas R. Serological identification of mycoplasmas by growth and metabolic inhibition tests. *Methods Mol. Biol.* 1998; 104: 105–111. DOI: 10.1385/0-89603-525-5:105.
20. Calus D., Maes D., Vranckx K., Villareal I., Pasmans F., Haesebrouck F. Validation of ATP luminometry for rapid and accurate titration of *Mycoplasma hyopneumoniae* in Friis medium and a comparison with the color changing units assay. *J. Microbiol. Methods*. 2010; 83 (3): 335–340. DOI: 10.1016/j.mimet.2010.09.001.
21. Jiang Z., Li S., Zhu C., Zhou R., Leung P. H. M. *Mycoplasma pneumoniae* infections: Pathogenesis and vaccine development. *Pathogens*. 2021; 10 (2):119. DOI: 10.3390/pathogens10020119.
22. Stemke G. W., Robertson J. A. The growth response of *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Mycoplasma flocculare* based upon ATP-dependent luminometry. *Vet. Microbiol.* 1990; 24 (2): 135–142. DOI: 10.1016/0378-1135(90)90061-y.
23. Cook B. S., Beddo J. G., Manso-Silván L., Maglennon G. A., Rycroft A. N. Selective medium for culture of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Vet. Microbiol.* 2016; 195: 158–164. DOI: 10.1016/j.vetmic.2016.09.022.
24. Friis N. F., Szancer J. Sensitivity of certain porcine and bovine mycoplasmas to antimicrobial agents in a liquid medium test compared to a disc assay. *Acta Vet. Scand.* 1994; 35 (4): 389–394. DOI: 10.1186/BF03548313.

Поступила в редакцию / Received 18.05.2022

Поступила после рецензирования / Revised 23.06.2022

Принята к публикации / Accepted 15.07.2022

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ / INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Абед Алхуссен Мохаммад, аспирант департамента ветеринарной медицины аграрно-технологического института ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов», г. Москва, Россия.

Нестеров Александр Александрович, кандидат ветеринарных наук, старший научный сотрудник референтной лаборатории болезней крупного рогатого скота ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

Спрыгин Александр Владимирович, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник референтной лаборатории болезней крупного рогатого скота ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

Шумилова Ирина Николаевна, кандидат ветеринарных наук, старший научный сотрудник референтной лаборатории болезней крупного рогатого скота ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

Брянцева Мария Сергеевна, ведущий биолог лаборатории профилактики болезней свиней и рогатого скота ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

Бьядовская Ольга Петровна, кандидат биологических наук, заведующий референтной лабораторией болезней крупного рогатого скота ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

Mohammad Abed Alhussen, Post-Graduate Student, Department of Veterinary Medicine, Agrarian and Technological Institute, RUDN University, Moscow, Russia.

Alexander A. Nesterov, Candidate of Science (Veterinary Medicine), Senior Researcher, Reference Laboratory for Bovine Diseases, FGBI “ARRIAH”, Vladimir, Russia.

Alexander V. Sprygin, Candidate of Science (Biology), Senior Researcher, Reference Laboratory for Bovine Diseases, FGBI “ARRIAH”, Vladimir, Russia.

Irina N. Shumilova, Candidate of Science (Veterinary Medicine), Senior Researcher, Reference Laboratory for Bovine Diseases, FGBI “ARRIAH”, Vladimir, Russia.

Maria S. Bryantseva, Leading Biologist, Laboratory for Porcine and Horned Livestock Prevention, FGBI “ARRIAH”, Vladimir, Russia.

Olga P. Byadovskaya, Candidate of Science (Biology), Head of Reference Laboratory for Bovine Diseases, FGBI “ARRIAH”, Vladimir, Russia.