



# Влияние сыворотки крови крупного рогатого скота на ростовые свойства питательной среды для культивирования *Mycoplasma gallisepticum* и *Mycoplasma synoviae*

Д. А. Козлов<sup>1</sup>, М. С. Волков<sup>2</sup>, Т. Ю. Черняева<sup>3</sup>, М. И. Сорокина<sup>4</sup>, В. Н. Ирза<sup>5</sup>

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

<sup>1</sup> <https://orcid.org/0000-0002-4893-6567>, e-mail: kozlov\_da@arriah.ru

<sup>2</sup> <https://orcid.org/0000-0002-8819-0720>, e-mail: volkov\_ms@arriah.ru

<sup>3</sup> e-mail: chernyayeva@arriah.ru

<sup>4</sup> e-mail: sorokina@arriah.ru

<sup>5</sup> <https://orcid.org/0000-0001-7489-1772>, e-mail: irza@arriah.ru

## РЕЗЮМЕ

Ростовые свойства питательных сред для культивирования патогенных микоплазм зависят от вида сыворотки крови в их составе. Проведены сравнительные испытания двух бесклеточных питательных сред с добавлением сывороток крови свиней и крупного рогатого скота для культивирования штаммов «S6» *Mycoplasma gallisepticum* и «WVU 1853» *Mycoplasma synoviae*. Изучение ростовых свойств испытуемых питательных сред проводили путем определения активности полученной биомассы в реакции геагглютинации и реакции агглютинации, а также оценки концентрации жизнеспособных клеток после 9-го пассажа культивирования. Показано, что бесклеточная питательная среда с сывороткой крови свиней является оптимальной для культивирования патогенных видов микоплазм, вызывающих инфекционные заболевания у птиц. Геагглютинирующая активность культуры *Mycoplasma gallisepticum* достигала 5 ГАЕ log, после 72 ч культивирования, агглютинирующая активность *Mycoplasma synoviae* – 5 АЕ log<sub>2</sub> за 88-часовой период инкубации, концентрация жизнеспособных клеток обоих штаммов была на уровне 10<sup>6</sup> КОЕ/см<sup>3</sup>. Низкие ростовые свойства среды, приготовленной с добавлением сыворотки крови крупного рогатого скота, вероятнее всего, связаны с ее биохимическим составом, которая содержит в 5–20 раз больше провитамина А, нежели сыворотка крови свиней, а холестерин в основном представлен липопротеинами высокой плотности. Напротив, в сыворотке крови свиней большая часть липопротеинов имеет низкую плотность, содержащих большое количество жирных кислот и холестерина, которые и являются основными структурными элементами клеток микоплазм. Полученные результаты исследований имеют практическую ценность и могут быть использованы в технологии культивирования патогенных видов микоплазм птиц при производстве средств диагностики и профилактики.

**Ключевые слова:** *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma synoviae*, питательная среда, культивирование, сыворотка крови

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

**Для цитирования:** Козлов Д. А., Волков М. С., Черняева Т. Ю., Сорокина М. И., Ирза В. Н. Влияние сыворотки крови крупного рогатого скота на ростовые свойства питательной среды для культивирования *Mycoplasma gallisepticum* и *Mycoplasma synoviae*. *Ветеринария сегодня*. 2022; 11 (2): 156–162. DOI: 10.29326/2304-196X-2022-11-2-156-162.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Для корреспонденции:** Козлов Дмитрий Александрович, аспирант, ведущий ветеринарный врач лаборатории профилактики болезней птиц ФГБУ «ВНИИЗЖ», 600901, Россия, г. Владимир, мкр. Юрьеvec, e-mail: kozlov\_da@arriah.ru.

## Influence of bovine blood serum on growth properties of nutrient media for *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* cultivation

D. A. Kozlov<sup>1</sup>, M. S. Volkov<sup>2</sup>, T. Yu. Chernyayeva<sup>3</sup>, M. I. Sorokina<sup>4</sup>, V. N. Irza<sup>5</sup>

FGBI "Federal Centre for Animal Health" (FGBI "ARRIAH"), Vladimir, Russia

<sup>1</sup> <https://orcid.org/0000-0002-4893-6567>, e-mail: kozlov\_da@arriah.ru

<sup>2</sup> <https://orcid.org/0000-0002-8819-0720>, e-mail: volkov\_ms@arriah.ru

<sup>3</sup> e-mail: chernyayeva@arriah.ru

<sup>4</sup> e-mail: sorokina@arriah.ru

<sup>5</sup> <https://orcid.org/0000-0001-7489-1772>, e-mail: irza@arriah.ru

**SUMMARY**

The growth properties of the nutrient medium for the cultivation of pathogenic mycoplasmas depend on the type of blood serum it is supplemented with. Comparative tests of two cell-free nutrient media supplemented with bovine and porcine blood sera for the cultivation of strains "S6" *Mycoplasma gallisepticum* and "WVU 1853" *Mycoplasma synoviae* were performed. Growth properties of the tested nutrient media were assessed by determining the activity of the resulting biomass in the hemagglutination and agglutination assays, as well as by determining the concentration of viable cells after the 9<sup>th</sup> passage. It has been shown that a cell-free nutrient medium supplemented with the porcine blood serum is optimal for the cultivation of pathogenic mycoplasma species causing infectious diseases in birds. The hemagglutinating activity of the *Mycoplasma gallisepticum* culture reached 5 HAU log<sub>2</sub> after 72 hours of cultivation, the agglutinating activity of *Mycoplasma synoviae* reached 5 AU log<sub>2</sub> during the 88-hour incubation period, the concentration of viable cells of both strains was 10<sup>6</sup> CFU/cm<sup>3</sup>. The low growth properties of the medium prepared with the addition of bovine blood serum are most likely associated with its biochemical composition, which contains 5–20 times more provitamin A than the porcine blood serum, and high density lipoprotein cholesterol. On the contrary, in the porcine blood serum, most of the lipoproteins have a low density, containing a large amount of fatty acids and cholesterol, which are the main structural elements of mycoplasma cells. The obtained test results are of practical value and can be used in the technology of cultivation of pathogenic species of avian mycoplasmas in the production of diagnostic and preventive tools.

**Keywords:** *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma synoviae*, nutrient medium, cultivation, blood serum

**Acknowledgements:** The study was funded by the FGBI "ARRIAH" within the framework of "Veterinary Welfare" research work.

**For citation:** Kozlov D. A., Volkov M. S., Chernyayeva T. Yu., Sorokina M. I., Irza V. N. Influence of bovine blood serum on growth properties of nutrient media for *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* cultivation. *Veterinary Science Today*. 2022; 11 (2): 156–162. DOI: 10.29326/2304-196X-2022-11-2-156-162.

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

**For correspondence:** Dmitry A. Kozlov, Post-Graduate Student, Leading Veterinarian, Laboratory for Avian Diseases Prevention, FGBI "ARRIAH", 600901, Russia, Vladimir, Yur'evets, e-mail: kozlov\_da@arriah.ru.

**ВВЕДЕНИЕ**

Микоплазмы – бактерии, ключевое отличие которых от других представителей прокариот заключается в отсутствии клеточной стенки, что и объясняет их резистентность к ряду антибактериальных препаратов. Данные микроорганизмы могут приобретать разнообразные формы: шаровидную, дисковидную, палочковидную, нитевидную. Размер молликут варьируется от 0,1 до 1,5 мкм. Другая особенность микоплазм заключается в том, что при росте на питательных средах и делении клеток их размеры меньше теоретического предела самостоятельного воспроизводства. Микоплазмы размножаются почкованием, бинарным делением, фрагментацией, делятся на неравноценные по размеру клетки, вследствие чего одна из новообразованных клеток может быть нежизнеспособна. Многие виды микоплазм являются труднокультивируемыми и плохо адаптируются к питательным средам, что создает определенные трудности в технологии производства диагностических систем и вакцинных препаратов [1, 2].

В процессе роста они нуждаются в отдельных аминокислотах (аргинине, изолейцине, метионине, фенилаланине, аспарагине), отмечена потребность в солях желчных и жирных кислот. Одной из сред, способных обеспечить рост многих видов молликут, является модифицированная среда Фрея, в состав которой входит PPLO-бульон, декстроза, сыворотка крови свиней, β-никотинамидадениндинуклеотид и L-цистеина гидрохлорид. Указанная среда является источником аминокислот, углеводов, различных витаминов, необходимых для роста микоплазм [2, 3]. Сыворотку крови для питательной среды получают преимущественно от свиней или лошадей, так как сыворотки крови других животных могут не только замедлить рост, но и полностью его ингибировать. Сыворотка крови, как стиму-

лятор роста микоплазм, является важной составной частью среды, без которой культивирование на бесклеточных питательных средах становится невозможным.

Изучение возможности использования сывороток крови от разных видов животных в составе питательных сред для микоплазм может принести положительный опыт в вопросе их лабораторного или производственного культивирования.

По отношению к кислороду микоплазмы принадлежат либо к строгим аэробам, либо к облигатным анаэробам. На этапах первых посевов период роста молликут составляет от 3 до 7 сут, затем в процессе пересевания скорость роста может значительно увеличиваться.

Культивирование данных микроорганизмов является важным звеном в создании средств диагностики, специфической профилактики, которая является альтернативой антибиотикотерапии в вопросе искоренения инфекций микоплазменной этиологии в промышленных птицеводческих хозяйствах [4].

Введение на предприятиях интенсивной технологии выращивания птицы привело к широкому распространению микоплазмозов среди производственной птицы [5, 6]. Таким инфекциям, как респираторный микоплазмоз и инфекционный синовит, подвержены куры, индейки, голуби, перепела и куропатки. Клиническими проявлениями респираторного микоплазмоза (возбудитель – *Mycoplasma gallisepticum*) является поражение органов дыхания (ринит, ларингит, аэросаккулит, пневмония), конъюнктивит, синусит, среди системных поражений организма выделяют бурсит, анемию, тендовагинит [7–9].

Экономический ущерб при данных заболеваниях складывается из снижения яичной продуктивности птицы, замедленного роста, снижения выводимости

яиц. Также для инфекции, обусловленной *Mycoplasma synoviae*, характерно снижение качества яичной скорлупы – проявление синдрома стекловидной вершины яйца [10]. Иммуносупрессивные свойства микоплазм делают неэффективными мероприятия по специфической профилактике других экономически значимых заболеваний, не давая развиваться иммунному ответу при введении живых вакцин [11–13].

Изучение влияния обязательных компонентов в среде, влияющих на рост микоплазм, в данном случае сыворотки крови крупного рогатого скота (КРС), является актуальной проблемой в микоплазмологии при создании средств диагностики и профилактики рассматриваемых инфекций.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В ходе работы использовали штаммы «WVU 1853» *Mycoplasma synoviae* и «S6» *Mycoplasma gallisepticum*, полученные из ФГБУ «ВГНКИ» (г. Москва).

Культивирование *Mycoplasma gallisepticum* и *Mycoplasma synoviae* осуществляли на жидкой и плотной модифицированной питательной среде Фрея, в состав которой входили дистиллированная вода, среда для культивирования плевропневмониеподобных организмов (PPLO broth base), дрожжевой экстракт, глюкоза, ацетат талия и сыворотка крови свиной или КРС [14]. Ранее проведенные исследования показали, что 12%-я концентрация сыворотки крови свиной в составе среды обеспечивает оптимальный рост *Mycoplasma gallisepticum* и *Mycoplasma synoviae*, поэтому концентрацию данного компонента при проведении эксперимента не изменяли. При выращивании *Mycoplasma synoviae* в питательную среду в качестве V-фактора роста также добавляли β-никотинамидадениндинуклеотид (1%-й раствор) и L-цистеина гидрохлорид (1%-й раствор). Феноловый красный служил индикатором контроля роста биомассы. Так как микоплазмы чувствительны к кислотности среды, то кислотно-щелочной баланс при приготовлении среды уравнивали до pH 7,8–8,0. Для предупреждения роста посторонних микроорганизмов в среду вносили антибиотики (бензилпенициллина натриевую соль) и ацетат талия (10%-й раствор) [15].

Культивирование микоплазм производили в термостате при температуре (37,5 ± 0,5) °С. Время культивирования зависит от вида микоплазм. Так, оптимальная

продолжительность культивирования *Mycoplasma gallisepticum* составляла от 48 до 96 ч, а *Mycoplasma synoviae* – от 3 до 7 сут. Рост биомассы отслеживали по изменению цвета индикатора и прозрачности питательной среды. В процессе роста среда изменяла цвет с красно-коричневого на желто-коричневый и незначительно мутнела или опалесцировала. Рост *Mycoplasma synoviae* сопровождался образованием масляной пленки на поверхности среды.

Концентрацию живых клеток микоплазм определяли методом титрования на плотных питательных средах в чашках Петри. Для этого готовили 10-кратные разведения для культуры *Mycoplasma gallisepticum* и 5-кратные для культуры *Mycoplasma synoviae*, которые инкубировали в течение 5 сут при температуре (37,5 ± 0,5) °С. Затем чашки просматривали под микроскопом Micros MC 50 X (Австрия) при 200-кратном увеличении для обнаружения характерных колоний, имеющих вид «яичницы-глазуньи». Средняя арифметическая величина колоний в нескольких неперекрывающихся полях зрения соответствует количеству колониеобразующих единиц (КОЕ).

Подсчет КОЕ в поле зрения микроскопа производили по формуле:

$$T = N \times 10^d \times K / V,$$

где  $T$  – титр КОЕ в 1 см<sup>3</sup>;

$N$  – среднее арифметическое число колоний в одном поле зрения микроскопа;

$d$  – степень разведения культуры;

$K$  – коэффициент, равный отношению площади чашки к площади поля зрения микроскопа (площадь поля зрения микроскопа определяли с помощью мерного стекла);

$V$  – объем культуральной биомассы, добавленной на плотную питательную среду.

При оценке ростовых свойств бесклеточной питательной среды (БКПС) внимание уделялось также определению гемагглютинирующей активности *Mycoplasma gallisepticum* и агглютинирующей активности *Mycoplasma synoviae* в реакциях гемагглютинации (РГА) и агглютинации (РА) соответственно [16, 17].

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Основным критерием при подборе сыворотки крови для приготовления питательной среды является

**Таблица 1**  
Ростовые свойства БКПС с добавлением сыворотки крови КРС для культивирования *Mycoplasma gallisepticum*

**Table 1**  
Growth properties of the cell-free nutrient medium supplemented with the bovine blood serum for *Mycoplasma gallisepticum* cultivation

Образцы БКПС	Содержание сыворотки крови КРС (%)	Время роста биомассы (ч), 1–3-й пассажи	Время роста биомассы (ч), 1–3-й пассажи после клонирования	Время роста биомассы (ч), 1–3-й пассажи после повторного клонирования	Активность культуры на 9-м пассаже в РГА (ГАЕ log <sub>2</sub> )	Ростовые свойства на 9-м пассаже (КОЕ/см <sup>3</sup> )
1	12	118–120	115–120	94–96	2,0	10 <sup>3,5</sup>
2	15	118–120	115–120	94–96	2,5	10 <sup>6</sup>
3	20	117–120	114–120	92–94	3,0	10 <sup>5</sup>
4	25	115–120	112–120	90–94	3,0	10 <sup>5</sup>
Контроль (БКПС с сывороткой крови свиной)	12	72–78	68–72	68–72	5,0	10 <sup>6</sup>

получение максимального количества биомассы культивируемых культур с максимально возможной гемагглютинирующей (для *Mycoplasma gallisepticum*) и агглютинирующей (для *Mycoplasma synoviae*) активностью.

В процессе опыта было проведено 9 пассажей и 2 процедуры клонирования обеих культур на уровне 3-го и 6-го пассажей. Полученные после последнего пассажа культуры исследовали в РА и РГА для установления активности и ростовых свойств после адаптации к питательной среде, параллельно проводились пассажи с контрольной БКПС (с сывороткой крови свиней) для сравнения результатов.

Критерий выбора типа сыворотки крови для приготовления питательной среды основывался на подсчете КОЕ для *Mycoplasma gallisepticum* и *Mycoplasma synoviae* при микроскопии на плотной питательной среде. Результаты проведенного исследования представлены в таблицах 1 и 2.

Установлено, что БКПС, содержащая сыворотку крови КРС в концентрации от 12 до 25%, обеспечивала рост и накопление *Mycoplasma gallisepticum* на протяжении 3 пассажей в диапазоне от 115 до 120 ч. При этом концентрация сыворотки крови КРС в среде не оказывала существенного влияния на ее ростовые свойства. При использовании в составе БКПС сыворотки крови свиней в концентрации 12% уже на 1-м пассаже время культивирования сокращалось на 40–45 ч, что является важным фактором в технологии производства средств диагностики и профилактики инфекционных заболеваний птиц микоплазменной этиологии.

Для получения аксенической культуры микроорганизма на 3-м пассаже было произведено клонирова-

ние на плотной питательной среде Фрея с ацетатом таллия. Использование клона *Mycoplasma gallisepticum* способствует повышению адаптации микроорганизма к таким новым условиям, как изменение состава среды для культивирования, что, в свою очередь, сокращает время культивирования и увеличивает концентрацию клеток микоплазм в объеме биомассы. Так, после повторного клонирования на 3-м пассаже время роста значительно уменьшилось с 120 до 96 ч.

При оценке гемагглютинирующих свойств культуры *Mycoplasma gallisepticum* в РГА установлено, что после 9-го пассажа активность культуры, выросшей на среде с сывороткой крови КРС, находилась в пределах от 2,0 до 3,0  $\log_2$ , что является относительно низким показателем по сравнению с ростом культуры на контрольной среде с сывороткой крови свиней, где титр ГАЕ составил 5,0  $\log_2$ .

Подсчет живых клеток в 1 см<sup>3</sup> питательной среды показал, что наименьшая их концентрация ( $10^{3.5}$  КОЕ/см<sup>3</sup>) наблюдалась при использовании среды, содержащей 12% сыворотки крови КРС, в то время как при использовании в составе БКПС сыворотки крови свиней (12%) концентрация клеток микоплазм была максимальной и составляла  $10^6$  КОЕ/см<sup>3</sup>. Увеличение концентрации сыворотки крови КРС в среде от 15 до 25% положительно влияло на ее ростовые свойства, при этом титр КОЕ находился в диапазоне  $10^5$ – $10^6$  на 1 см<sup>3</sup>. Однако качество получаемого антигена определяется не только концентрацией клеток в объеме среды, но и совокупностью показателей, включающих время роста, гемагглютинирующую и агглютинирующую активность, КОЕ. Таким образом, сыворотка крови свиней в составе

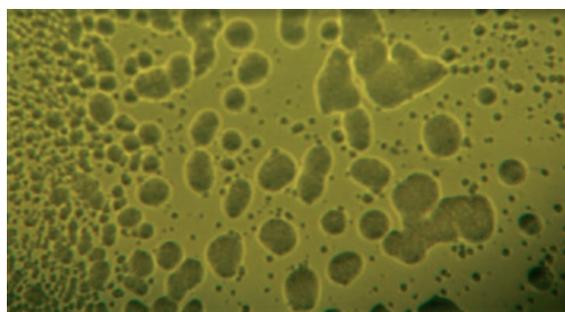
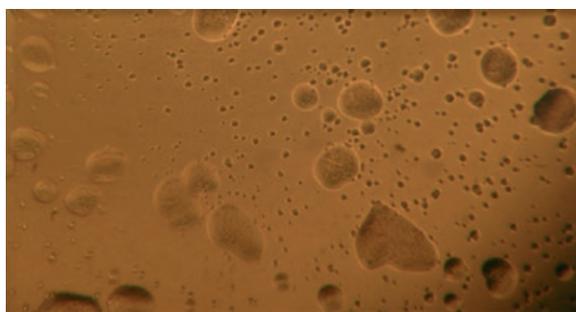


Рис. 1. Колонии *Mycoplasma gallisepticum*, выращенные на БКПС с добавлением сыворотки крови КРС (увеличение 200 $\times$ )

Fig. 1. *Mycoplasma gallisepticum* colonies, grown on the cell-free nutrient medium supplemented with the bovine blood serum (magnification 200 $\times$ )

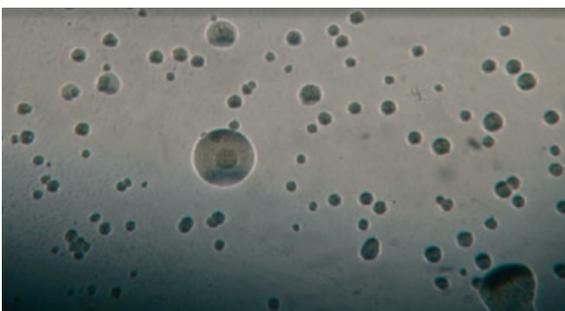
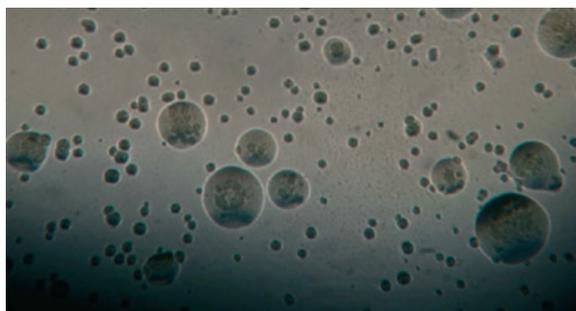


Рис. 2. Колонии *Mycoplasma gallisepticum*, выращенные на БКПС с добавлением сыворотки крови свиней (увеличение 200 $\times$ )

Fig. 2. *Mycoplasma gallisepticum* colonies, grown on the cell-free nutrient medium supplemented with the porcine blood serum (magnification 200 $\times$ )

Таблица 2

Ростовые свойства БКПС с добавлением сыворотки крови КРС для культивирования *Mycoplasma synoviae*

Table 2

Growth properties of the cell-free nutrient medium supplemented with the bovine blood serum for *Mycoplasma synoviae* cultivation

Образцы БКПС	Содержание сыворотки крови КРС (%)	Время роста биомассы (ч), 1–3-й пассажи	Время роста биомассы (ч), 1–3-й пассажи после клонирования	Время роста биомассы (ч), 1–3-й пассажи после повторного клонирования	Активность культуры на 9-м пассаже в РА (АЕ log <sub>2</sub> )	Ростовые свойства на 9-м пассаже (КОЕ/см <sup>3</sup> )
1	12	140–144	115–120	94–96	2,0	10 <sup>3</sup>
2	15	140–144	115–120	94–96	2,5	10 <sup>3</sup>
3	20	138–140	114–120	92–94	3,0	10 <sup>4</sup>
4	25	138–140	112–120	90–94	3,0	10 <sup>4</sup>
Контроль (БКПС с сывороткой крови свиней)	12	78–96	78–88	78–88	5,0	10 <sup>6</sup>

питательной среды Фрея обеспечивает максимальное накопление культуры *Mycoplasma gallisepticum* при минимальном времени культивирования.

На рисунке 1 представлены микрофотографии колоний *Mycoplasma gallisepticum*, выращенных на питательной среде с сывороткой крови КРС. Колонии возбудителя в поле зрения микроскопа распределены неравномерно, морфология их полиморфна, встречаются овальные, грушевидные, плохо оформленные колонии разного размера, центр не выражен или занимает большую часть колонии.

На рисунке 2 изображены колонии *Mycoplasma gallisepticum*, выращенные на питательной среде с сывороткой крови свиней. Несмотря на различные по размеру колонии, преобладают круглые формы с ровными краями и отчетливо оформленным и более плотным оптическим центром, что придает им характерный для микоплазм вид «яичницы-глазуньи».

Результаты исследований по изучению ростовых свойств БКПС, в состав которой входит сыворотка крови КРС, для выращивания *Mycoplasma synoviae* показали, что время культивирования составляет не менее 140 ч при концентрации сыворотки в среде 12 и 15% и 138 ч при концентрации 20–25% (табл. 2). При накоплении биомассы *Mycoplasma synoviae* также сле-

дует учитывать, что данный вид микоплазм относится к труднокультивируемым микроорганизмам и обладает меньшей адаптивной способностью по сравнению с *Mycoplasma gallisepticum*.

Аналогично результатам, полученным при изучении ростовых свойств БКПС для выращивания *Mycoplasma gallisepticum*, при использовании клона *Mycoplasma synoviae* на 7–9-м пассажах наблюдали сокращение времени культивирования до 96 ч. Агглютинирующая активность культуры *Mycoplasma synoviae* и концентрация жизнеспособных клеток повышалась с увеличением концентрации сыворотки крови КРС в среде от 12 до 20% и находились в диапазоне от 2,0 до 3,0 log<sub>2</sub> и 10<sup>3</sup>–10<sup>4</sup> КОЕ/см<sup>3</sup> соответственно. При этом активность культуры, выращенной на среде Фрея с сывороткой крови свиней (12%), составляла 5,0 log<sub>2</sub>, а значение КОЕ было равно 10<sup>6</sup> на 1 см<sup>3</sup>, что достоверно указывает на явные преимущества использования сыворотки крови свиней в БКПС для культивирования *Mycoplasma synoviae*.

На рисунке 3 представлен результат культивирования *Mycoplasma synoviae* на плотной БКПС с сывороткой крови КРС (6-е сут культивирования). Выросшие колонии имеют мелкие размеры, их диаметр не превышает 0,1 мм, оптически плотный центр в их структуре отсут-

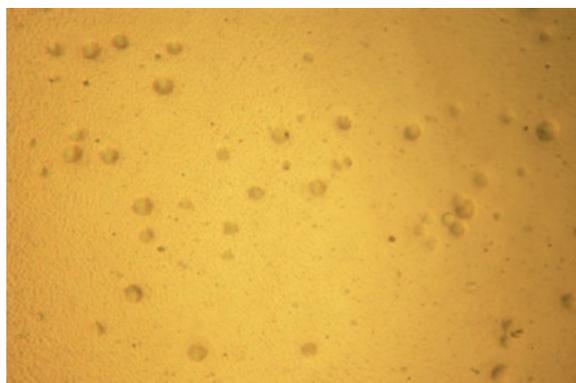
Рис. 3. Культура *Mycoplasma synoviae*, выращенная на БКПС с сывороткой крови КРС (увеличение 200×)

Fig. 3. *Mycoplasma synoviae* grown on the cell-free nutrient medium supplemented with bovine blood serum (200× magnification)

Рис. 4. Культура *Mycoplasma synoviae*, выращенная на БКПС с сывороткой крови свиней (увеличение 200×)

Fig. 4. *Mycoplasma synoviae* grown on the cell-free nutrient medium supplemented with porcine blood serum (200× magnification)

ствуется. На микрофотографии рисунка 4 изображены колонии *Mycoplasma synoviae*, выращенные на среде с сывороткой крови свиней (6-е сут после высева). Колониям свойственен вид «яичницы-глазуньи», они более крупные – до 0,2 мм в диаметре.

Таким образом, результаты проведенных исследований свидетельствуют о том, что ростовые свойства питательных сред для культивирования патогенных микоплазм зависят от вида сыворотки крови в их составе. Отмечено, что увеличение ее концентрации стимулировало рост биомассы при сокращении продолжительности времени культивирования. Использование сыворотки крови свиней в составе питательной среды в концентрации 12% обеспечило получение более активной биомассы как по концентрации жизнеспособных клеток, так и по гемагглютинирующей и агглютинирующей активности культуры при минимальном времени культивирования, равном 78–96 ч.

Для установления причины низких ростовых свойств питательной среды с добавлением сыворотки крови КРС провели сравнительный анализ некоторых биохимических показателей сыворотки крови свиней и КРС (табл. 3) [18].

Несмотря на то что в сыворотке крови свиней и КРС содержится сопоставимое количество холестерина, у КРС присутствует большое количество липопротеинов высокой плотности, характеризующихся значительно низким содержанием холестерина и фосфолипидов [19]. Таким образом, сыворотка с высоким содержанием указанных липопротеинов может не удовлетворять потребности микоплазм в жирных кислотах и холестерине. В сыворотке крови свиней, напротив, содержатся преимущественно липопротеины низкой плотности, которые активно переносят холестерин и жирные кислоты, способные частично осаждаться без участия внешнего воздействия. Известно, что возбудители микоплазмозов нуждаются в данных компонентах и сыворотка крови свиней восполняет необходимость в данных соединениях при культивировании микоплазм на БКПС [14, 20].

Также из представленных данных видно, что содержание каротина в сыворотке крови КРС превосходит его концентрацию в сыворотке крови свиней от 5 до 20 раз, а ретинола – в 3 раза. Учитывая, что рассматриваемые компоненты являются сильнейшими антиоксидантами, они могут замедлять окислительные процессы в клетках, тем самым увеличивая период интерфазы или замедляя процесс накопления ресурсов для нормального деления клетки, тем самым инициируя появление нежизнеспособных клеток микоплазм. Близкое к нулю значение содержания каротина в сыворотке крови свиней исключает риски, связанные с потенциальным его воздействием на рост и репродукцию молликут.

Результаты исследования указывают на то, что сыворотка крови свиней является значимым ростовым компонентом для культивирования *Mycoplasma gallisepticum* и *Mycoplasma synoviae* и обеспечивает получение более активной биомассы в среде.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных исследований установлено, что для оптимального роста культуры микроорганизмов *Mycoplasma synoviae* и *Mycoplasma gallisepticum* наиболее подходящими ростовыми свойствами обла-

**Таблица 3**  
**Биохимические показатели сыворотки крови КРС и свиней**

**Table 3**  
**Biochemical parameters of the bovine and porcine blood sera**

Показатели	Крупный рогатый скот	Свиньи
Холестерин в сыворотке: мг/100 мл ммоль/л	50–170 1,30–4,42	60–110 1,56–2,86
Каротин в сыворотке: мкг/100 мл мг/л	500–2000 5,0–20,0	0–10 0–0,1
Витамин А в сыворотке: мкг/100 мл мкмоль/л	30–90 1,05–3,14	10–35 0,35–1,22

дает БКПС, в состав которой входит сыворотка крови свиней. Среда с добавлением сыворотки крови КРС также может использоваться для культивирования данных видов молликут, но она не обеспечивает тех ростовых свойств, что БКПС с сывороткой крови свиней.

Низкие ростовые свойства среды, приготовленной с использованием сыворотки крови КРС, вероятнее всего, связаны с ее биохимическим составом, которая содержит в 5–20 раз больше провитамина А, нежели сыворотка крови свиней, а холестерин в основном представлен липопротеинами высокой плотности. Напротив, в сыворотке крови свиней большая часть липопротеинов имеет низкую плотность, содержащих большое количество жирных кислот и холестерина, которые и являются основными структурными элементами клеток микоплазм, в частности для цитоплазматической мембраны, которые обеспечивают ее текучесть. Высокое содержание каротина в сыворотке крови КРС может увеличивать период интерфазы при репродукции микоплазм.

Концентрация сыворотки крови свиней в БКПС на уровне 12% является оптимальной для получения культуры с высокой биологической активностью при непродолжительном времени культивирования (72–96 ч).

Адаптация *Mycoplasma gallisepticum* и *Mycoplasma synoviae* к БКПС с добавлением сыворотки крови КРС до 9-го пассажа не позволила получить биомассу с активностью, аналогичной для среды с сывороткой крови свиней, что следует учитывать при крупномасштабном культивировании данных видов молликут.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Борхсениус С. Н., Чернова О. А. Микоплазмы: Молекулярная и клеточная биология, патогенность, диагностика. Л.: Наука; 1989. 156 с.
2. Каган Г. Я., Раковская И. В. Микоплазма-инфекция в культурах ткани. Ленинград: Медицина; 1968; 161.
3. Прозоровский С. В., Раковская И. В., Вульфвич Ю. В. Медицинская микоплазмология. М.: Медицина; 1995. 286 с.
4. Прозоровский С. В., Пронин А. В., Санин А. В. Иммунологические механизмы персистенции микоплазм. *Вестник Академии медицинских наук СССР*. 1985; 10: 43–51. PMID: 4082756.
5. Yadav J. P., Tomar P., Singh Y., Khurana S. K. Insights on *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* infection in poultry: a systematic review. *Anim. Biotechnol.* 2021; DOI: 10.1080/10495398.2021.1908316.
6. Gautier-Bouchardon A. V. Antimicrobial resistance in *Mycoplasma* spp. *Microbiol. Spectr.* 2018; 6 (4). DOI: 10.1128/microbiolspec.ARBA-0030-2018.
7. Бессарабов Б. Ф. Болезни сельскохозяйственной птицы. М.: Колос; 1970; 80–82.
8. Малушко В. В. Борьба с инфекционными болезнями в промышленном птицеводстве. *Ветеринария*. 1982; 5: 36–37.

9. Бессарабов Б. Ф., Василевич Ф. И., Мельникова И. И. и др. Практикум по болезням птиц. М.: КолосС; 2005. 200 с.
10. Микоплазмозы животных. Под ред. Я. Р. Коваленко. М.: Колос; 1976. 304 с.
11. Kleven S. H. *Mycoplasma synoviae* infection. In: *Diseases of Poultry*. Ed. by Y. M. Saif, H. J. Barnes, J. R. Glisson, A. M. Fadly, L. R. McDougald, D. E. Swayne. 11<sup>th</sup> ed. Ames: Iowa State University Press; 2003; 756–766.
12. Ирза В. Н. Инфекционный синовит птиц – эпизоотология и профилактика. *Птицеводство*. 2009; 11: 39–40. eLIBRARY ID: 17089360.
13. Коровин Р. Н., Зеленский В. П., Грошева Г. А. Лабораторная диагностика болезней птиц: справочник. М.: Агропромиздат; 1989; 172–174.
14. Kulappu Arachchige S. N., Kanci Condello A., Zhu L., Shil P. K., Tivendale K. A., Underwood G. J., et al. Effects of immunosuppression on the efficacy of vaccination against *Mycoplasma gallisepticum* infection in chickens. *Vet. Microbiol.* 2021; 260:109182. DOI: 10.1016/j.vetmic.2021.109182.
15. Ирза В. Н., Сорокина М. И., Черняева Т. Ю., Волков М. С., Жалин М. В., Колотилов Г. А., Таланов Г. А., Пак В. В. Методика освежения и поддержания производственного штамма *Mycoplasma gallisepticum* «S6». Владимир: ФГУ «ВНИИЗЖ»; 2006. 7 с.
16. Ирза В. Н., Волков М. С., Черняева Т. Ю., Сорокина М. И., Колотилов А. Н. Методика освежения и поддержания производственного штамма *Mycoplasma synoviae* «WVU 1853». Владимир: ФГУ «ВНИИЗЖ»; 2006. 7 с.
17. Черняева Т. Ю., Сорокина М. И., Козлов Д. А., Волков М. С. Методические рекомендации по определению гемагглютинирующей активности возбудителя респираторного микоплазмоза птиц (*Mycoplasma gallisepticum*): утв. ФГБУ «ВНИИЗЖ» 23.12.2020 № 95-20. Владимир: ФГБУ «ВНИИЗЖ»; 2020. 29 с.
18. Гирин М. В., Борисов А. В., Кулаков В. Ю., Сорокина М. И., Ирза В. Н. Измерение роста *Mycoplasma gallisepticum*. *Достижения молодых ученых – в ветеринарную практику: материалы конференции молодых ученых (16–18 ноября 2000 г.)*. Владимир: ВНИИЗЖ; 2000; 38–42.
19. Кондрахин И. П., Таланов Г. А., Пак В. В. Внутренние незаразные болезни животных: учебник. М.: КолосС; 2003. 461 с.
20. Мотузко И. С., Хвостова О. В. Возрастная динамика липопротеидов сыворотки крови крупного рогатого скота. *Вестник Витебского государственного медицинского университета*. 2003; 2 (4): 116–118. Режим доступа: [https://www.elib.vsmu.by/bitstream/123/8975/1/vVG-MU\\_2003\\_4\\_116-118.pdf](https://www.elib.vsmu.by/bitstream/123/8975/1/vVG-MU_2003_4_116-118.pdf).
21. Липопротеины. Виды и физиология липопротеинов. *MedUniver*. Режим доступа: <https://meduniver.com/Medical/Physiology/1184.html> (дата обращения: 27.08.2021).
22. Borchsenius S. N., Chernova O. A. *Mycoplasmas: molecular and cellular biology, pathogenicity, diagnostics*. Leningrad: Nauka; 1989. 156 p. (in Russ.)
23. Kagan G. Ya., Rakovskaya I. V. *Mycoplasma* infection in tissue cultures. Leningrad: Meditsina; 1968; 161. (in Russ.)
24. Prozorovskii S. V., Rakovskaya I. V., Vulfovich Yu. V. *Medical mycoplasmaology*. Moscow: Meditsina; 1995. 286 p. (in Russ.)
25. Prozorovskii S. V., Pronin A. V., Sanin A. V. Immunologicheskie mekhanizmy persistentssii mikoplazm = Immunologic mechanisms of the persistence of *Mycoplasma*. *Vestnik Akademii Meditsinskikh Nauk SSSR*. 1985; 10: 43–51. PMID: 4082756. (in Russ.)
26. Yadav J. P., Tomar P., Singh Y., Khurana S. K. Insights on *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* infection in poultry: a systematic review. *Anim. Biotechnol.* 2021; DOI: 10.1080/10495398.2021.1908316.
27. Gautier-Bouchardon A. V. Antimicrobial resistance in *Mycoplasma* spp. *Microbiol. Spectr.* 2018; 6 (4). DOI: 10.1128/microbiolspec.ARBA-0030-2018.
28. Bessarabov B. F. *Poultry diseases*. Moscow: Kolos; 1970; 80–82. (in Russ.)
29. Malushko V. V. Bor'ba s infektsionnymi boleznymi v promyshlennom pitsevodstve = Infectious disease control in commercial poultry production. *Veterinariya*. 1982; 5: 36–37. (in Russ.)
30. Bessarabov B. F., Vasilevich F. I., Mel'nikova I. I., et al. *Guide on avian diseases*. Moscow: KolosS; 2005. 200 p. (in Russ.)
31. *Animal mycoplasmoses*. Ed. by Ya. R. Kovalenko. Moscow: Kolos; 1976. 304 p. (in Russ.)
32. Kleven S. H. *Mycoplasma synoviae* infection. In: *Diseases of Poultry*. Ed. by Y. M. Saif, H. J. Barnes, J. R. Glisson, A. M. Fadly, L. R. McDougald, D. E. Swayne. 11<sup>th</sup> ed. Ames: Iowa State University Press; 2003; 756–766.
33. Irza V. N. Infectious synovitis birds – epizootology and prevention. *Pitsevodstvo*. 2009; 11: 39–40. eLIBRARY ID: 17089360. (in Russ.)
34. Korovin R. N., Zelensky V. P., Grosheva G. A. *Laboratory diagnosis of avian diseases: Reference guide*. Moscow: Agropromizdat; 1989; 172–174. (in Russ.)
35. Kulappu Arachchige S. N., Kanci Condello A., Zhu L., Shil P. K., Tivendale K. A., Underwood G. J., et al. Effects of immunosuppression on the efficacy of vaccination against *Mycoplasma gallisepticum* infection in chickens. *Vet. Microbiol.* 2021; 260:109182. DOI: 10.1016/j.vetmic.2021.109182.
36. Irza V. N., Sorokina M. I., Chernyaeva T. Yu., Volkov M. S., Zhalin M. V., Kolotilov A. N. Methods for refreshing and maintaining the *Mycoplasma gallisepticum* "S6" production strain. Vladimir: FGI "ARRIAH"; 2006. 7 p. (in Russ.)
37. Irza V. N., Volkov M. S., Chernyaeva T. Yu., Sorokina M. I., Kolotilov A. N. Methods for refreshing and maintaining *Mycoplasma synoviae* "WVU 1853" production strain. Vladimir: FGI "ARRIAH"; 2006. 7 p. (in Russ.)
38. Chernyaeva T. Yu., Sorokina M. I., Kozlov D. A., Volkov M. S. Guidelines for the determination of hemagglutinating activity of the causative agent of avian mycoplasmosis (*Mycoplasma gallisepticum*): approved by FGBI "ARRIAH". December 23, 2020. No. 95-20. Vladimir: FGBI "ARRIAH"; 2020. 29 p. (in Russ.)
39. Girin M. V., Borisov A. V., Kulakov V. Yu., Sorokina M. I., Irza V. N. Izmerenie rosta *Mycoplasma gallisepticum* = *Mycoplasma gallisepticum* growth measurement. *Dostizheniya molodykh uchenykh – v veterinarnuyu praktiku: materialy konferentsii molodykh uchenykh (16–18 noyabrya 2000 g.) = Achievements of early carrier researchers – to veterinary practice: proceedings of the conference of early carrier researchers (November 16–18, 2000)*. Vladimir: ARRIAH; 2000; 38–42. (in Russ.)
40. Kondrakhin I. P., Talanov G. A., Pak V. V. Internal non-communicable diseases of animals: a textbook. Moscow: KolosS; 2003. 461 p. (in Russ.)
41. Motuzko I. S., Khvostova O. V. Lipoprotein age dynamics of bovine blood serum. *Vestnik of Vitebsk State Medical University*. 2003; 2 (4): 116–118. Available at: [https://www.elib.vsmu.by/bitstream/123/8975/1/vVG-MU\\_2003\\_4\\_116-118.pdf](https://www.elib.vsmu.by/bitstream/123/8975/1/vVG-MU_2003_4_116-118.pdf). (in Russ.)
42. Lipoproteiny. Vidy i fiziologiya lipoproteinov = Lipoproteins. Types and physiology of lipoproteins. *MedUniver*. Available at: <https://meduniver.com/Medical/Physiology/1184.html> (date of access: 27.08.2021). (in Russ.)

Поступила в редакцию / Received 02.03.2022

Поступила после рецензирования / Revised 15.04.2022

Принята к публикации / Accepted 18.05.2022

## ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ / INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

**Козлов Дмитрий Александрович**, аспирант, ведущий ветеринарный врач лаборатории профилактики болезней птиц ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

**Волков Михаил Сергеевич**, кандидат ветеринарных наук, доцент, заведующий лабораторией эпизоотологии и мониторинга ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

**Черняева Татьяна Юльевна**, кандидат ветеринарных наук, ведущий научный сотрудник лаборатории профилактики болезней птиц ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

**Сорокина Марина Ивановна**, ведущий биолог лаборатории эпизоотологии и мониторинга ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

**Ирза Виктор Николаевич**, доктор ветеринарных наук, доцент, главный научный сотрудник информационно-аналитического центра ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

**Dmitry A. Kozlov**, Post-Graduate Student, Leading Veterinarian, Laboratory for Avian Diseases Prevention, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia.

**Mikhail S. Volkov**, Candidate of Sciences (Veterinary Medicine), Associate Professor, Head of Laboratory for Epizootology and Monitoring, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia.

**Tatyana Yu. Chernyaeva**, Candidate of Sciences (Veterinary Medicine), Leading Researcher, Laboratory for Avian Diseases Prevention, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia.

**Marina I. Sorokina**, Leading Biologist, Laboratory for Avian Diseases Prevention, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia.

**Viktor N. Irza**, Doctor of Sciences (Veterinary Medicine), Associate Professor, Chief Researcher, Information and Analysis Centre, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia.