

УДК: 619: 616.576.8.078
DOI:10.52419/issn2072-2419.2025.2.75

БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА И ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ *ORNITHOBACTERIUM RHINOTRACHEALE* IN VIVO и IN VITRO

Моторыгин А.В. – канд. ветеринар. наук, зав. научно-технологической лабораторией (ORCID 0000-0003-3374-2601); **Ленёв С.В.** – канд. биол. наук, вед. науч. сотр. (ORCID 0000-0002-0049-3728); **Пирожков М.К.** – д-р ветеринар. наук, гл. науч. сотр. (ORCID 0009-0000-7088-9456); **Прасолова О.В.*** – канд. ветеринар. наук, вед. науч. сотр. (ORCID 0000-0001-8924-2273); **Абросимова Н.С.** – ст. науч. сотр. (ORCID 0009-0001-8701-301X); **Бабичева О.В.** – зам. зав. отделом (ORCID 0009-0003-0435-2169); **Русанов И.А.** – ст. науч. сотр. (ORCID 0009-0008-3388-2990); **Литвинов Н.А.** – гл. специалист (ORCID 0009-0008-3787-5747); **Путинцева А.В.** – науч. сотр. (ORCID 0000-0002-7552-4816); **Кирсанова Н.А.** – науч. сотр. (ORCID 0000-0002-1666-3058)

Всероссийский государственный центр качества
и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов

*o.prasolova@vgnki.ru

Ключевые слова: орнитобактериоз, куриные эмбрионы, вирулентность, секвенирование

Keywords: ornithobacteriosis, chicken embryos, virulence, sequencing

Поступила: 12.05.2025

Принята к публикации: 06.06.2025

Опубликована онлайн: 20.06.2025



РЕФЕРАТ

Целью настоящего исследования являлось выбор оптимального алгоритма работы со штаммом *Ornithobacterium rhinotracheale* «OR-21», перспективным для использования в качестве производственного штамма с целью изготовления вакцины против орнитобактериоза птиц, на основе изучения его биологических свойств, вирулентности, и генетических характеристик, после проведения ряда его пассажей на питательных средах и куриных эмбрионах СПФ. При выборе питательных сред, ростовых добавок и условий культивирования для штамма учитывали состав, чувствительность, ингибирующие и дифференциальные свойства применяемых сред, скорость роста и сохранение стабильности биологических свойств культивируемого микроорганизма. При выборе питательных сред, ростовых добавок и условий культивирования для штамма учитывали состав, чувствительность, ингибирующие и дифференциальные свойства применяемых сред, скорость роста и сохранение стабильности биологических свойств культивируемого микроорганизма. В опытах по проведению пассажей культур штамма *O. rhinotracheale* «OR-21» в качестве лабораторной модели in vivo использовали 5-7 суточные куриные эмбрионы. Оценку вирулентных свойств проводили на лабораторных животных с использованием общепринятых методов. В опытах в качестве лабораторной модели использовали кур породы «Русская белая». В процессе выбора лабораторной модели для проведения пассажей было установ-

лено, что куриные эмбрионы обладают высокой чувствительностью к исследуемому штамму, и позволяют получить более высокую концентрацию микробных клеток *Ornithobacterium rhinotracheale* «OR-21», по сравнению с пассажами на питательных средах. Кроме того, использование куриных эмбрионов СПФ, в отличие от птицы, позволило исключить контаминацию посторонней микрофлорой при проведении пассажей. Для *O. rhinotracheale* было идентифицировано 2207 генов. Отличия при сравнении геномов культур 1 и 10 пассажей не были обнаружены. Наибольшая гомология изолята после 10 пассажа наблюдается с типовым штаммом *O. rhinotracheale* DSM 15997. Установлено, что, на питательных средах максимальное количество пассажей культуры штамма ограничено 6 пересевами, при этом, на куриных эмбрионах возбудитель орнитобактериоза продолжает размножаться, но утрачивает вирулентность по отношению к ним и курам 240-дневного возраста. Потеря вирулентности не оказывает влияния на другие биологические свойства штамма.

ВВЕДЕНИЕ / INTRODUCTION

Орнитобактериоз (ОРТ) – высококонтагиозная болезнь диких и сельскохозяйственных птиц, которая характеризуется поражением инфраорбитальных синусов, трахеи, воздушных мешков и развитием азросаккулита, плеврита и одно или двухсторонней пневмонии. Орнитобактериозом болеют гуси, фазаны, перепела, утки, голуби, цесарки, страусы. Среди сельскохозяйственной птицы заболеванию ОРТ наиболее подвержены цыплята-бройлеры и индейки мясного направления выращивания. Орнитобактерии широко распространены в промышленных птицеводческих хозяйствах. В частности, 100% родительских стад кур в Германии и Голландии являются серопозитивными по орнитобактериозу, а у 80% стад бактерии выделена бактериологическими методами. В Российской Федерации возбудитель орнитобактериоза выделен в 10 регионах. Специфические антитела обнаружены в 83% сывороток крови птиц, исследованных на ОРТ [1,2]. Источником инфекции служит больная птица, передача возбудителя в основном происходит горизонтально. В связи с тем, что *O. rhinotracheale* вызывает гибель эмбрионов, в промышленных условиях вертикальной передачи возбудителя практически не происходит.

Как правило, для возникновения болезни необходимы первичные предрасполагающие факторы. Чаще всего орнитобактериоз развивается на фоне метопневмовирусной инфекции или болезни Ньюкасла. Пушковым механизмом может слу-

жить и вирус анемии цыплят, и вирус инфекционной бурсальной болезни, приводящие к снижению резистентности птицы. Нарушение параметров микроклимата также может способствовать развитию болезни.

Диагностика инфекции затруднена, так как клинические симптомы и смертные изменения не специфичны и вызывают трудности дифференциации от других инфекций, а сама бактерия может быть изолирована из биологического материала путем бактериологического анализа только на ранней стадии заболевания, пока не произошло обсеменение вторичной микрофлорой [3].

Возбудитель болезни - *Ornithobacterium rhinotracheale* представляет собой грамотрицательные, плеоморфные, неподвижные палочки, не образующие спор и капсул. Относится к семейству *Flavobacteriaceae*. Известно 18 серотипов возбудителя (от А до L). У кур наиболее распространён серотип А (более 90% случаев). У индеек свыше 90% заболеваний связано с серотипами А, В, Д и Е [2,4].

Для лечения орнитобактериоза используют антибиотики с предварительной проверкой чувствительности к ним выделенного возбудителя, так как, чувствительность полевых изолятов *Ornithobacterium rhinotracheale* к антибактериальным препаратам быстро меняется. При выборе антибактериального средства необходимо понимать и соотносить место локализации возбудителя и биодоступность препарата. Лечение орнитобактериоза антими-

робными препаратами связано с определенными трудностями, так как большинство штаммов орнитобактерий невосприимчивы к широко распространенным антибиотикам.

В связи с тем, что заболевания сельскохозяйственных птиц в условиях промышленных комплексов вызывают немногие из серотипов возбудителя, перспективным направлением контроля орнитобактериоза является разработка средств специфической иммунопрофилактики.

Целью настоящего исследования являлось выбор оптимального алгоритма работы со штаммом *Ornithobacterium rhinotracheale* «OR-21», перспективным для использования в качестве производственного штамма для изготовления вакцины против орнитобактериоза птиц, на основе изучения его биологических свойств, вирулентности, и генетических характеристик, после проведения ряда его пассажей на питательных средах и куриных эмбрионах СПФ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ / MATERIALS AND METHODS

Все процедуры, выполненные с участием животных, соответствовали этическим стандартам, принятым Европейской конвенцией ETS № 123.

В работе использовали следующие материалы: штамм *O. rhinotracheale* «OR-21» полученный из Государственной коллекции штаммов микроорганизмов ФГБУ «ВНИИЗЖ»; куриные эмбрионы СПФ 5-7 суточного возраста; кур породы «Русская белая» 240-дневного возраста. Питательные среды реактивы и диагностикумы: шоколадный агар (среда CM331, Oxoid, с добавлением 5% дефибрированной крови барана и специальной ростовой добавки FD025 фирмы Himedia); среда CM331, Oxoid, с добавлением 5% стерильной сыворотки крови лошади; среда триптозо – соевый агар, Himedia, с добавлением 5% стерильной сыворотки крови лошади; среда M428 «Эугоник», Himedia; мясопептонный бульон (МПБ), Himedia; бульон Хоттингера M1425, Himedia; бульон «Эугоник» M429, Hime-

dia; набор реактивов для окраски по Граму; тест-система API® 20 NE («bioMérieux, С.А», Франция).

Методы исследования

Определение оптимальных условий культивирования штаммов

При выборе питательных сред, ростовых добавок и условий культивирования для штамма *O. rhinotracheale* «OR-21» учитывали состав, чувствительность, ингибирующие и дифференциальные свойства применяемых сред, скорость роста и сохранение стабильности биологических свойств культивируемого микроорганизма. Показатель ростаобеспечивающих свойств и скорости роста в различных условиях культивирования (с использованием CO₂ инкубатора или анаэроба с газогенераторными пакетами для штамма и *O. rhinotracheale* «OR-21») определяли по минимальному времени инкубации посевов, за которое наблюдался отчетливый, видимый невооруженным глазом рост культур микроорганизмов на питательных средах. При выборе оптимальной лабораторной модели для проведения пассажей *in vivo* или *in vitro* учитывали количество максимально возможных пересевов испытуемых штаммов на питательных средах, при сохранении стабильности биологических свойств, а также восприимчивость лабораторных животных, куриных эмбрионов и кур к штаммам. При проведении пассажей *in vitro* на плотных питательных средах учитывали интенсивность накопления и культуральные свойства колоний.

Методика проведения пассажей штаммов *in vivo* и *in vitro*.

В опытах по проведению пассажей культур штамма *O. rhinotracheale* «OR-21» в качестве лабораторной модели *in vivo* использовали 5-7 суточные куриные эмбрионы (n=50). Эмбрионы помещали в овоскоп в вертикальном положении, делали отверстие в скорлупе над центром воздушной камеры и заражали через пугу в желточный мешок суспензией суточной культуры. После заражения на отверстие в скорлупе наносили каплю расплавленного парафина, эмбрионы маркировали и

помещали в инкубатор. Проводили ежедневный осмотр с использованием овоскопа, наблюдение вели в течение 3-4 суток. В случае гибели, эмбрионы исключали из опыта и помещали в холодильник до момента вскрытия. Если эмбрион погиб в течение первых 14-18 часов, его также исключали из опыта в связи с возможной гибелью, вызванной механическим повреждением органов. На 3-4 сутки зараженные эмбрионы вскрывали и проводили контрольный высеv на питательные среды. Помимо опытов *in vivo* на куриных эмбрионах, параллельно проводили пассажи указанных культур на питательных средах. Посевы культивировали в анаэробе и в CO₂ инкубаторе в микроаэрофильных условиях при температуре 37 °C в течении 24-72 ч для последующих пересевов.

Методы изучения культуральных, морфологических и биохимических свойств.

Первичную идентификацию исследуемых культур проводили методами времяпролетной масс-спектрометрии (MALDI-ToF-MS) и ускоренной биохимической идентификации на анализаторе VITEK 2 Compact. При изучении культуральных, морфологических и тинкториальных свойств микроорганизмов, применяли общепринятые микробиологические методы исследования. Ферментативные свойства определяли с использованием набора API® 20 NE. Оценку вирулентных свойств проводили на лабораторных животных с использованием общепринятых методов. В опытах в качестве лабораторной модели использовали кур породы «Русская белая». Для определения вирулентных свойств *O. rhinotracheale* «OR-21», кур 240-дневного возраста заражали смывом агаровой культуры.

Молекулярно-генетические методы, программное обеспечение и используемые ресурсы

Выделение ДНК осуществляли с использованием набора реагентов «PureLink Genomic DNA» (Invitrogen, Германия) в соответствии с инструкцией производителя. Концентрацию ДНК измеряли на флу-

ориметре Quantus (Promega) с использованием набора реагентов QuantiFluor®ONE dsDNA System (Promega). Подготовку ДНК-библиотеки для секвенирования, оценку их качества и массивное параллельное секвенирование проводили по стандартной операционной процедуре на платформе MiSeq (Illumina).

Для биоинформатического анализа данных полногеномного секвенирования и сборки геномов *de novo* использовались следующие программы: FastQC 0.11.17 [6], Trimmomatic v.0.36 [7], SPAdes 2.11.1 [8], QUAST 4.6.3 [9], MAUVE v.20150226 [10]. Определение видовой принадлежности бактерии проводили на онлайн-сервисе Центра геномной эпидемиологии Датского технического университета (CGE) (обновления на апрель 2022) с помощью KmerFinder server (версия 3.0.2) [11]. Аннотация геномов бактерий была выполнена с помощью сервера RAST [12]. Для поиска «коровых генов» аминокислотные последовательности аннотированных генов были кластеризованы с помощью программы CD-HIT (идентичность 95%, пересечение 90%).

РЕЗУЛЬТАТЫ / RESULTS

Определение оптимальных условий культивирования и лабораторной модели для проведения пассажей in vivo и in vitro.

Для определения оптимальных условий для культивирования штамма *O. rhinotracheale* «OR-21» проводили посевы на плотные питательные среды (шоколадный агар (среда CM331, Oxoid, с добавлением 5% дефибрированной крови барана и специальной ростовой добавки FD025 фирмы Himedia), среду CM331 с добавлением 5% стерильной сыворотки крови КРС, Himedia, Триптозо – соевый агар с добавлением 5% стерильной сыворотки крови КРС, M428 «Эугоник», Himedia) и жидкие питательные среды (МПБ, бульон Хоттингера M1425, Himedia, бульон «Эугоник» M429, Himedia).

Культивирование посевов проводили при 37°C двумя методами: - в CO₂ инкубаторе с концентрацией углекислого газа – 7%; и - в анаэробе с использованием газогенераторных пакетов для микроаэро-

фильных микроорганизмов с итоговой концентрации CO_2 – 5-7%.

Наиболее высокие ростообеспечивающие свойства были у среды CM331 при добавлении 5% сыворотки крови лошади и бульона Хоттингера M1425 при культивировании в анаэробных условиях в CO_2 инкубаторе или в анаэроостате с использованием для поддержания газовой смеси газогенераторных пакетов. Визуальный рост культур на плотной и жидкой питательных средах наблюдался через 48 ч. При этом на указанных средах, накопление культуры *O. rhinotracheale* «OR-21» было выше по сравнению со средами CM331 при добавлении 5% дефибрированной крови барана с добавлением ростовой добавки FD025, агаром M428 «Эугоник», триптозо – соевым агаром, бульоном M429 «Эугоник».

В результате проведенных исследований, для культивирования штамма *O. rhinotracheale* «OR-21» были определены питательные среды: среда CM331 с добавлением 5% сыворотки крови лошади и бульон Хоттингера M1425 и условия выращивания путем термостатирования при температуре 37°C в течении 48 ч в CO_2 инкубаторе или анаэроостате с использованием газогенераторных пакетов для более стабильного поддержания газовой смеси.

С учетом специфики роста и накопления культур на питательных средах, пассажи штаммов и *O. rhinotracheale* «OR-21» было решено проводить двумя методами: на питательных средах CM331 с добавлением 5% сыворотки крови лошади и бульоне Хоттингера M1425, и с использованием 5-7 суточных куриных эмбрионов СПФ.

В процессе выбора лабораторной модели для проведения пассажей было установлено, что куриные эмбрионы обладают высокой чувствительностью к исследуемому штамму, и позволяют получить более высокую концентрацию микробных клеток *O. rhinotracheale* «OR-21», по сравнению с пассажами на питательных средах.

Кроме того, использование куриных эмбрионов СПФ, в отличие от птицы,

позволило исключить контаминацию посторонней микрофлорой при проведении пассажей.

Проведение пассажей штамма O. rhinotracheale методами in vivo и in vitro.

При проведении пассажей штамма *O. rhinotracheale* «OR-21» на куриных эмбрионах после каждого заражения на 3-4 сутки проводили вскрытие эмбриона и посев на плотные питательные среды, после культивирования изучали чистоту роста, культуральные, морфологические свойства колоний и готовили суспензию культуры для следующего пассажа на куриных эмбрионах. С целью сохранения резервной культуры для совершения повторного посева, на случай отсутствия роста, от 1-2 зараженных куриных эмбрионов, с каждого пассажа, отбирали желток и хранили в замороженном состоянии.

При работе только на питательных средах максимальное количество пассажей для *O. rhinotracheale* «OR-21» составило – 6, после указанного количества пересевов культура уже не высевалась на плотные среды и дальнейшие исследования проводили только с использованием куриных эмбрионов. Гибель эмбрионов при заражении культурой *O. rhinotracheale* «OR-21» отмечали до 6-го пассажа. При заражении смывами культуры с 6-го по 10-й пассаж гибель куриных эмбрионов не наблюдали.

Изучение культуральных, морфологических и биохимических свойств O. rhinotracheale

Культуральные свойства *O. rhinotracheale* на среде CM331, с добавлением 5% дефибрированной крови барана в микроаэрофильных условиях, при температуре 37°C характеризовались ростом (по ходу петли) в течении 24-48 ч круглых, выпуклых, мелких гладких, диаметром менее 1 мм колоний полупрозрачного цвета, с ровными краями зоны гемолиза отсутствовали. При культивировании на бульоне Хоттингера M1425 с добавлением 1% сыворотки крови КРС наблюдался слабый диффузный рост, бульон оставался полупрозрачным. При микроскопии

мазков, окрашенных по Граму, наблюдали мелкие грамтрицательные полиморфные палочки овоидной формы, редко наблюдались палочки нитевидной формы, споры и капсулы отсутствовали.

Биохимические свойства, по результатам исследований 1-го и 10-го пассажей исследуемых культур, так же оставались одинаковыми. Культуры ферментировали глюкозу, сахарозу, мальтозу, маннит, были оксидазоположительными, не утилизировали цитрат и мочевины, не образовали индол и сероводород, не обладали лизиндегидролазой и аргининдегидролазой, имели орнитиндекарбоксилазу.

Изучение вирулентных свойств штаммов

Вирулентные свойства 1-го, 6-го и 10-го пассажей культур *O. rhinotracheale* определяли, заражая взрослых кур (по 20 птиц в группе). Заражение проводили смывом свежей агаровой культуры с концентрацией 3×10^8 КОЕ/мл интраназально, в объеме 0,1 мл. Вирулентные свойства оценивали по наличию характерных признаков заболевания у птицы.

У всей зараженной культурой 1-го пассажа *O. rhinotracheale* птицы отмечали поражение инфраорбитальных синусов, воздушных мешков, гибель птицы не наблюдали. Зараженные взрослые куры смывом культуры *O. rhinotracheale* 6-го и 10-го пассажа оставались живыми и клинически здоровыми в течение 14 суток наблюдения.

Результаты секвенирования генома культур *O. rhinotracheale* 1 и 10 пассажей

Данные, полученные при бионформатическом анализе полногеномных последовательностей систематизированы в таблицах 1-3. В качестве лучшей выбрана сборка с наименьшим количеством контигов и наибольшим значением N50, характеристики представлены в таблице 1.

Для *O. rhinotracheale* было идентифицировано 2207 генов. Отличия при сравнении геномов культур 1 и 10 пассажей не были обнаружены. Наибольшая гомология изолята после 10 пассажа наблюдается с типовым штаммом *O. rhinotracheale* DSM 15997 [13, 14]. В других мировых коллекциях, кроме немецкой, входящих во всемирную ассоциацию коллекций культур (WDCM) штамм представлен под следующими номерами: ATCC 51463 (США); CCUG 23171 (Швеция); LMG 9086 (Бельгия). Образцом штамма располагает институт Пастера (Франция) под номером CIP 104009T. Штамм изолирован от индейки с респираторной патологией в Великобритании в 1988 году. Свойства штамма описаны Vandamme et al. 1994 г., что способствовало выделению отдельной таксономической группы [15] Идентификационный номер в NCBI – сборка полного генома NC_018016.1 (2012), идентификация по 16S РНК - L19156 [16, 17].

Таблица 1 – Характеристики сборки геномов

Образец	Кол-во контигов > 500 п.н.	Максимальная длина контига	Общая длина контигов	N50
ОРТ 1пасс	54	217366	2298146	90599
ОРТ 10пасс	56	219274	2297491	97318

Таблица 2 – Аннотация геномов с помощью сервера RAST

Образец	Кол-во подсистем	CDS	RNA
ОРТ 1пасс	217	2259	43
ОРТ 10пасс	217	2269	42

Таблица 3 – Результаты генотипирования исследуемых штаммов

Образец	Результаты поиска по KmerFinder
OPT 1пасс	NC_018016.1 <i>Ornithobacterium rhinotracheale</i> DSM 15997
OPT 10пасс	

ВЫВОДЫ / CONCLUSION

Оптимальными питательными средами, обеспечивающими максимальный рост культуры штамма *O. rhinotracheale* «OR-21», являются среда CM331 с добавлением 5% сыворотки крови лошади и бульон Хоттингера M1425 и условия выращивания путем термостатирования при температуре 37°C в течении 48 ч в CO₂ инкубаторе или анаэробе с использованием газогенераторных пакетов для более стабильного поддержания газовой смеси. Штамм также, хорошо размножается на куриных эмбрионах СПФ 5-7 дневного возраста. Установлено что, на питательных средах максимальное количество пассажей культуры штамма ограничено 6 пересевами, при этом, на куриных эмбрионах возбудитель орнитобактериоза продолжает размножаться, но утрачивает вирулентность по отношению к ним и курам 240-дневного возраста. Потеря вирулентности не оказывает влияния на другие биологические свойства штамма. Отличий между культуральными, морфологическими, ферментативными свойствами и генетическими характеристиками между культурами штамма 1-го и 10-го пассажа не обнаружено.

BIOLOGICAL PROPERTIES AND GENETIC CHARACTERISTICS ORNITHOBACTERIUM RHINOTRACHEALE IN VIVO И IN VITRO

Motorygin A.V. – Candidate of Sciences (Veterinary medicine) head of the science and technology laboratory, (orcid.org/0000-0003-3374-2601); **Lenev S.V.** – Candidate of Sciences (Biology), Leading researcher of the science and technology laboratory (orcid.org/0000-0002-0049-3728); **Pirozhkov M.K.** – Doctor of Sciences (Veterinary medicine), Chief Researcher of the science and technology laboratory, (orcid.org/0009-

0000-7088-9456); **Prasolova O.V.*** – Candidate of Sciences (Veterinary medicine), Leading researcher of the Molecular Biology Department (orcid.org/0000-0001-8924-2273); **Abrosimova N.S.** – Senior Researcher of the science and technology laboratory (orcid.org/0009-0001-8701-301X); **Babicheva O.V.** – Deputy Head of Department sanitary and clinical microbiology (orcid.org/0009-0003-0435-2169); **Rusanov I.A.** – Senior Researcher of the science and technology laboratory (orcid.org/0009-0008-3388-2990); **Litvinov N.A.** – chief specialist of the science and technology laboratory (orcid.org/0009-0008-3787-5747); **Putintseva A.V.** – research fellow of the Molecular Biology Department (orcid.org/0000-0002-7552-4816); **Kirsanova N.A.** – research fellow of the Molecular Biology Department (orcid.org/0000-0002-1666-3058)

The Russian State Center for Animal Feed and Drug Standardization and Quality

*o.prasolova@vgnki.ru

ABSTRACT

The aim of this study was to select the optimal algorithm for working with the *Ornithobacterium rhinotracheale* OR-21 strain, which is promising for use as a production strain for the manufacture of a vaccine against ornithobacteriosis in birds, based on the study of its biological properties, virulence, and genetic characteristics after a series of its passages on nutrient media and SPF chicken embryos. When selecting nutrient media, growth additives, and cultivation conditions for the strain, the composition, sensitivity, inhibitory and differential properties of the media used, the growth rate, and the preservation of the stability of the biological properties of the cultured microorganism were taken into account. When selecting nutrient media, growth additives, and

cultivation conditions for the strain, the composition, sensitivity, inhibitory and differential properties of the media used, the growth rate, and the preservation of the stability of the biological properties of the cultured microorganism were taken into account. In experiments on conducting passages of *O. rhinotracheale* OR-21 strain cultures, 5–7-day old chicken embryos were used as a laboratory model in vivo. The virulence properties were assessed on laboratory animals using generally accepted methods. In the experiments, Russian White chickens were used as a laboratory model. In the process of choosing a laboratory model for conducting passages, it was found that chicken embryos are highly sensitive to the studied strain and allow obtaining a higher concentration of *Ornithobacterium rhinotracheale* OR-21 microbial cells, compared to passages on nutrient media. In addition, the use of SPF chicken embryos, unlike poultry, made it possible to exclude contamination with foreign microflora during passages. 2207 genes were identified for *O. rhinotracheale*. No differences were found when comparing the genomes of cultures of passages 1 and 10. The highest homology of the isolate after 10 passages is observed with the typical strain *O. rhinotracheale* DSM 15997. It was found that, on nutrient media, the maximum number of passages of the strain culture is limited to 6 transfers, while on chicken embryos, the causative agent of ornithobacteriosis continues to multiply, but loses virulence in relation to them and 240-day-old chickens. The loss of virulence does not affect other biological properties of the strain.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Махмутова Л. Р., Макаров В. В. *Ornithobacterium rhinotracheale*: бактериология, патология, эпизоотология // Ветеринарная патология 2006. № 4. С. 181–185.
2. Шурахова Ю.Н., Кононенко А.Б., Виткова О.Н. *Ornithobacterium rhinotracheale*: распространение и диагностика // III Междунар. вет. конгр. по птицеводству. М., 2007. - С. 181–183.
3. Banani M., Pourbakhsh S.A., Khaki P. Characterization of *Ornithobacterium rhinotracheale* isolates from commercial chickens // Arch. Inst. Razi.-2001.-Vol. 52.-P. 27-34.
4. Шурахова Ю. Н. Биологические особенности популяции *Ornithobacterium rhinotracheale* и перспективы ее обнаружения в объектах птицеводства // Ветеринарная патология. 2008. № 1. С. 95–99.
5. Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of the Institute for Laboratory Animal Research. 2011 Division on Earth and Life Studies, National Research Council. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals; National Academy Press: Washington, DC, USA. Retrieved from: <https://grants.nih.gov/grants/olaw/guide-for-the-care-and-use-of-laboratory-animals.pdf>. Retrieved on 12-10-2022
6. Andrews, S. (2010). FastQC: A Quality Control Tool for High Throughput Sequence Data [Online]. Available online at: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>
7. Bolger, A. M., Lohse, M., & Usadel, B. (2014). Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 30 (15), 2114–2120.
8. Bankevich, A., Nurk, S., Antipov, D., Gurevich, A. A., Dvorkin, M., Kulikov, A. S., & Pevzner, P. A. (2012). SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *Journal of computational biology*, 19(5), 455–477.
9. Gurevich, A., Saveliev, V., Vyahhi, N., & Tesler, G. (2013). QUAST: quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics*, 29(8), 1072–1075.
10. Darling, A. C., Mau, B., Blattner, F. R., & Perna, N. T. (2004). Mauve: multiple alignment of conserved genomic sequence with rearrangements. *Genome research*, 14 (7), 1394–1403.
11. Hasman H. et al. Rapid whole-genome sequencing for detection and characterization of microorganisms directly from clinical samples // *Journal of clinical microbiology*. – 2014. – Т. 52. – № 1. – С. 139–146.]
12. Brettin T. et al. RASTtk: a modular and extensible implementation of the RAST al-

- algorithm for building custom annotation pipelines and annotating batches of genomes // Scientific reports. – 2015. – Т. 5. – С. 8365. 13.<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=867902&lvl=3&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock> (дата обращения 16.10.23)
14. Leibniz Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH ; Curators of the DSMZ; DSM 15997 14
15. Vandamme P, Segers P, Vancanneyt M, van Hove K, Muters R, Hommez J, Dewhirst F, Paster B, Kersters K, Falsen E, et al. *Ornithobacterium rhinotracheale* gen. nov., sp. nov., isolated from the avian respiratory tract. *Int J Syst Bacteriol.* 1994 (1):24-37. doi: 10.1099/00207713-44-1-24. PMID: 8123560.
16. Kastelic S, Berčič RL, Cizelj I, Benčina M, Makrai L, Zorman-Rojs O, Narat M, Bisgaard M, Christensen H, Benčina D. *Ornithobacterium rhinotracheale* has neuraminidase activity causing desialylation of chicken and turkey serum and tracheal mucus glycoproteins. *Vet Microbiol.* 2013 Mar 23;162(2-4):707-712. doi: 10.1016/j.vetmic.2012.09.018. Epub 2012 Sep 26. PMID: 23062950
17. Verslyppe, B., De Smet, W., De Baets, B., De Vos, P., Dawyndt P.: StrainInfo introduces electronic passports for microorganisms. *Syst Appl Microbiol.* 37: 42 - 50 2014 (DOI 10.1016/j.syapm.2013.11.002 , PubMed 24321274)
- REFERENCES**
1. Makhmutova L. R., Makarov V. V. *Ornithobacterium rhinotracheale*: bacteriology, pathology, epizootology // *Veterinary pathology* 2006. No. 4. P. 181–185.
2. Shurakhova Yu.N., Kononenko A.B., Vitkova O.N. *Ornithobacterium rhinotracheale*: distribution and diagnostics // III Int. veterinary congress on poultry farming. Moscow, 2007. - P. 181-183.
3. Banani M., Pourbakhsh S.A., Khaki P. Characterization of *Ornithobacterium rhinotracheale* isolates from commercial chickens // *Arch. Inst. Razi.* -2001.-Vol. 52.-P. 27-34.
4. Shurakhova Yu. N. Biological characteristics of the *Ornithobacterium rhinotracheale* population and prospects for its detection in poultry farming facilities // *Veterinary pathology*. 2008. No. 1. P. 95–99.
5. Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of the Institute for Laboratory Animal Research. 2011 Division on Earth and Life Studies, National Research Council. *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*; National Academy Press: Washington, DC, USA. Retrieved from: <https://grants.nih.gov/grants/olaw/guide-for-the-care-and-use-of-laboratory-animals.pdf>. Retrieved on 12-10-2022
6. Andrews, S. (2010). FastQC: A Quality Control Tool for High Throughput Sequence Data [Online]. Available online at: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>
7. Bolger, A. M., Lohse, M., & Usadel, B. (2014). Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 30 (15), 2114-2120.
8. Bankevich, A., Nurk, S., Antipov, D., Gurevich, A. A., Dvorkin, M., Kulikov, A. S., & Pevzner, P. A. (2012). SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *Journal of computational biology*, 19(5), 455-477.
9. Gurevich, A., Saveliev, V., Vyahhi, N., & Tesler, G. (2013). QUAST: quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics*, 29(8), 1072-1075.
10. Darling, A. C., Mau, B., Blattner, F. R., & Perna, N. T. (2004). Mauve: multiple alignment of conserved genomic sequence with rearrangements. *Genome research*, 14 (7), 1394-1403.
11. Hasman H. et al. Rapid whole-genome sequencing for detection and characterization of microorganisms directly from clinical samples // *Journal of clinical microbiology*. – 2014. – Т. 52. – №. 1. – С. 139-146.]
12. Brettin T. et al. RASTtk: a modular and extensible implementation of the RAST algorithm for building custom annotation pipelines and annotating batches of genomes // *Scientific reports*. – 2015. – Т. 5. – С. 8365.

13. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=867902&lvl=3&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock> (дата обращения 16.10.23)
14. Leibniz Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH ; Curators of the DSMZ; DSM 15997 14
15. Vandamme P, Segers P, Vancanneyt M, van Hove K, Muters R, Hommez J, Dewhirst F, Paster B, Kersters K, Falsen E, et al. *Ornithobacterium rhinotracheale* gen. nov., sp. nov., isolated from the avian respiratory tract. *Int J Syst Bacteriol.* 1994 (1):24-37. doi: 10.1099/00207713-44-1-24. PMID: 8123560.
16. Kastelic S, Berčič RL, Cizelj I, Benčina M, Makrai L, Zorman-Rojs O, Narat M, Bisgaard M, Christensen H, Benčina D. *Ornithobacterium rhinotracheale* has neuraminidase activity causing desialylation of chicken and turkey serum and tracheal mucus glycoproteins. *Vet Microbiol.* 2013 Mar 23;162(2-4):707-712. doi: 10.1016/j.vetmic.2012.09.018. Epub 2012 Sep 26. PMID: 23062950
17. Verslyppe, B., De Smet, W., De Baets, B., De Vos, P., Dawyndt P.: StrainInfo introduces electronic passports for microorganisms. *Syst Appl Microbiol.* 37: 42 - 50 2014 (DOI 10.1016/j.syapm.2013.11.002 , PubMed 24321274)