

Caracterización fenotípica y genotípica de *Ornithobacterium rhinotracheale* procedentes de aves de corral con cuadros clínicos respiratorios en el Perú entre 2015 y 2017

Phenotypic and genotypic characterization of *Ornithobacterium rhinotracheale* from poultry with respiratory clinical signs in Peru between 2015 and 2017

Rony Yuniór Cotaquispe Nalvarte¹, Jorge Rodríguez Bailón^{1,2}, Ysabel Koga Yanagui¹, Robert Tinoco Romero¹, Irene Delgado De La Flor Montaubán², Alberto Manchego Sayán³

RESUMEN

Ornithobacterium rhinotracheale, al igual que otras bacterias asociadas a cuadros de orden respiratorio, viene siendo sometida a una exigente presión de selección debido al uso de desinfectantes y antibióticos, lo cual ha venido generando cepas multidrogo resistentes, así como un incremento en la variabilidad genética. El objetivo del estudio fue caracterizar 36 aislados de *O. rhinotracheale* provenientes de aves de corral de cinco regiones del Perú, mediante un perfil de ocho antibióticos (fosfomicina, amoxicilina, ciprofloxacina, enrofloxacin, norfloxacin, sulfatrimetopim, doxiciclina, oxitetraciclina), y genotipificación por técnicas de ERIC-PCR. Los resultados indican la presencia de multidrogo resistencia de 2 a 6 antibióticos en 94.4% (n=34) de las cepas y el 100% resistente al menos a una familia de antibióticos. La resistencia más común fue a la fosfomicina (77.8%) seguido del sulfatrimetopim (75.0%). Se encontraron 11 perfiles genéticos diferenciados (A-K), siendo el perfil D más frecuente en los aislados (55.6%). Los resultados sugieren la presencia de cepas de *O. rhinotracheale* con moderada variabilidad y perfiles de resistencia a los antibiótico fosfomicina y sulfatrimetopim.

Palabras clave: *Ornithobacterium rhinotracheale*; resistencia a antibióticos; genotipificación; ERIC-PCR

¹ Laboratorio Bioservice SRL, Lima, Perú

² Unidad de Biotecnología Molecular, Laboratorios de Investigación y Desarrollo (LID), Facultad de Ciencias y Filosofía, Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima, Perú

³ Laboratorio de Microbiología y Parasitología Veterinaria, Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú

⁴ E-mail: r.cotaquispe.n@gmail.com

Recibido: 25 de febrero de 2019

Aceptado para publicación: 23 de octubre de 2019

ABSTRACT

Ornithobacterium rhinotracheale, like other bacteria associated with respiratory conditions, has been subjected to a demanding selection pressure due to the use of disinfectants and antibiotics, which has been generating resistant multidrug strains, as well as an increase in its genetic variability. The objective of the study was to characterize 36 *O. rhinotracheale* isolates from poultry from five regions of Peru by a profile of eight antibiotics (fosfomicin, amoxicillin, ciprofloxacina, enrofloxacina, norfloxacina, sulfatrimetropin, doxiciclina, oxitetraciclina), and genotyping by ERIC-PCR techniques. The results indicate the presence of multidrug resistance of 2 to 6 antibiotics in 94.4% (n = 34) of the strains and 100% were resistant to at least one antibiotic family. The most common resistance was to fosfomicin (77.8%) and sulfatrimetropin (75.0%). At least, 11 differentiated genetic profiles (A-K) were found, being the most frequent the D profile in the isolates (55.6%). The results suggest the presence of *O. rhinotracheale* strains with moderate variability and antibiotic resistance profiles fosfomicin and sulfatrimetropin.

Key words: *Ornithobacterium rhinotracheale*; antibiotic resistance; genotyping; ERIC-PCR

INTRODUCCIÓN

Ornithobacterium rhinotracheale (ORT) es un bacilo gramnegativo pleomórfico, de colonias convexas, lisas, no hemolíticas (van Empel y Hafez, 1999), presente en el tracto respiratorio de varias especies de aves domésticas y silvestres (Vandamme *et al.*, 1994; Hafez y Sting, 2011). La infección por *O. rhinotracheale* se caracteriza principalmente por presentar signos respiratorios, disnea, estornudos, disminución en la producción de huevos; así mismo, en asociación con otros patógenos produce un aumento considerable de la mortalidad, conllevando a considerables pérdidas económicas (Macagnan, 2006).

Se han reportado varios casos de infecciones respiratorias asociados a esta bacteria en Perú (Hung y Alvarado, 2001), Japón (Sakai *et al.*, 2000), Turquía (Turan, 2002), Canadá (Joubert *et al.*, 1999), Estados Unidos (Amonsin *et al.*, 1997), Israel (El-Sukhon *et al.*, 2002) y México (Soriano *et al.*, 2002).

Actualmente se han aislado 18 serotipos nombrados de A hasta la R (Ha *et al.*, 2016; Turan y Ak, 2002). Algunos de estos serovares (A, B, D, E) producen reacciones cruzadas a nivel serológico, dando indicios sobre la existencia de subespecies de *O. rhinotracheale* (Hafez y Vandamme, 2011; Macagnan, 2006).

La aplicación de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la detección molecular de *O. rhinotracheale* en el Perú ha sido eficiente, rápida y confiable (Hung y Alvarado, 2001), siendo útil, además, para detectar la diversidad genética de estos aislados (Koga y Zavaleta, 2005). Métodos de tipificación molecular basados en PCR (ERIC-PCR) han dado buenos resultados como modelo para tipificación bacteriana (Vargas *et al.*, 2003). La técnica de ERIC-PCR se basa en la amplificación de regiones intergénicas palindrómicas consecutivas dentro del cromosoma bacteriano, permitiendo incluso discriminar líneas clonales mutantes circulantes a nivel de bacterias (Espinoza *et al.*, 2011; Peña *et al.*, 2016; Rêka *et al.*, 2017).

El incremento de la exposición de microorganismos a sustancias desinfectantes o antimicrobianas ha generado un proceso adaptativo en las bacterias debido a un incremento en la presión de selección (Chou *et al.*, 2009). Cambios en el medio ambiente donde se desarrollan las bacterias requiere un incremento en variabilidad genética intra e interespecífica que permitan la aparición y posterior selección de variantes genéticas con mayor adaptación y patogenicidad (Soriano *et al.*, 2003; Macagnan, 2006).

En el Perú, no existe suficiente información sobre tipificación molecular que permitan determinar la variabilidad genética y la potencial presencia de variantes genéticas de *O. rhinotracheale*, siendo de utilidad para estudios epidemiológicos y la aplicación de estrategias de prevención y control. El objetivo del presente estudio fue caracterizar cepas circulantes de *O. rhinotracheale* procedentes de cinco regiones del Perú, mediante técnicas de tipificación molecular ERIC-PCR y perfiles de resistencia antimicrobiana.

MATERIALES Y MÉTODOS

Treinta y seis cepas de *Ornithobacterium rhinotracheale* fueron aisladas de senos infraorbitarios, cornetes nasales, tráquea y sacos aéreos de aves afectadas con sintomatología y lesiones compatibles con infección por *O. rhinotracheale*, provenientes de los departamentos de Lima, Ica, Arequipa, La Libertad y Ucayali (Perú) entre 2015 y 2017.

Se determinó el perfil de resistencia antimicrobiana para ocho antibióticos de importancia veterinaria distribuidos en cinco familias (sulfonamidas potenciadas: sulfatrimetopim; quinolonas: norfloxacina, enrofloxacin, ciprofloxacina; tetraciclinas: oxitetraciclina, doxiciclina; penicilinas: amoxicilina; y fosfonatos: fosfomicina). El perfil fue determinado mediante el método de difusión en

agar Mueller Hinton-sangre al 5%, descrito por el Comité Nacional de Estándares Clínicos de Laboratorio (NCCLS, 2017).

El ADN genómico de las 36 cepas fue extraído mediante el método de membranas de sílica gel utilizando el kit de extracción de ADN *GF-1 Tissue DNA Extraction* (Vivantis), siguiendo las indicaciones del fabricante. El ADN genómico fue almacenado a -20 °C hasta su procesamiento.

O. rhinotracheale fue detectada mediante amplificación por PCR específica de un fragmento de 784 pares de bases pertenecientes al gen 16S rRNA utilizando los cebadores descritos por Espinoza *et al.* (2017): OR16S - F1 (5'-GAGAA-TTAATTTACGGATTAAG-3') y OR16S-R1 (5'-TTCGCTTGGT CTCCGAAGAT-3').

La reacción de PCR se realizó en un volumen final de 20 µl conteniendo 10 X Buffer PCR, 0.25 mM de dNTPs, 2.5 mM de MgCl₂, 10 pmol de cada cebador, 1 U Taq DNA polimerasa (Fermentas) y 30 ng de ADN genómico. Los ciclos termales fueron los siguientes: 1 ciclo de desnaturalización inicial PCR de 95 °C por 4 min; 35 ciclos de PCR: desnaturalización de 94 °C por 30 s, alineamiento de 58 °C por 60 s y extensión de 72 °C por 90 s; 1 ciclo de extensión final de PCR de 72 °C por 5 min. La amplificación se llevó a cabo en un termociclador Veriti Thermal Cycler (Life Technologies).

Los productos de PCR fueron separados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% en buffer TBE 1X (Tris 0.89 M, Borato 0.02 M, EDTA 0.89 M, pH 8.3) durante 45 min a 100 v y visualizados bajo luz UV. Adicionalmente, los productos de PCR fueron secuenciados por ambas hebras utilizando *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Thermo Scientific) utilizando un analizador genético ABI 3137 XL (Life Technologies). El servicio de secuenciamiento fue proveído por la empresa Macrogen Inc.

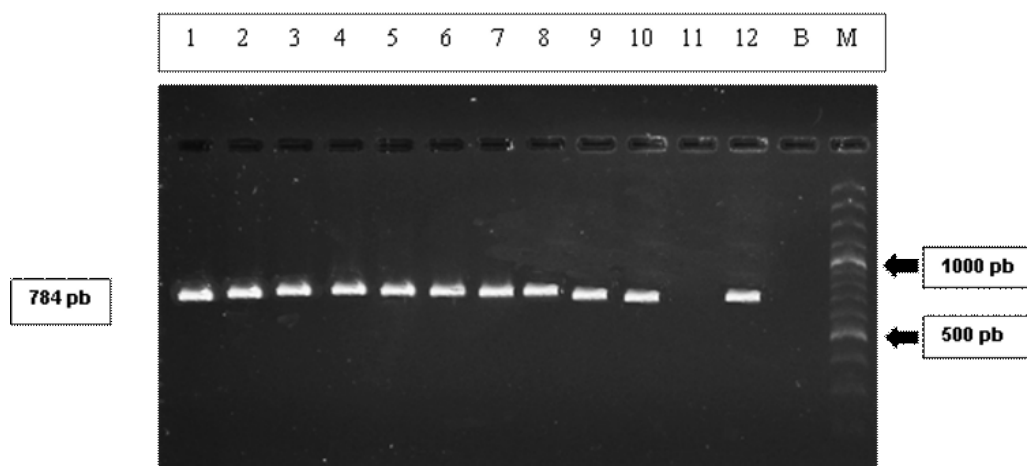


Figura 1. Amplificación específica para detección de *Ornithobacterium rhinotracheale* por PCR del gen 16S rRNA. Carril 1 a 10: ADN obtenido de cepa de *O. rhinotracheale*; Carril 11. Control negativo, ADN de *Pasteurella multocida* ATCC® 12945; Carril 12. Control positivo, ADN de *O. rhinotracheale* ATCC® 51464, Carril B: Blanco de PCR; Carril M, Marcador de peso molecular GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder (Thermo Scientific)

Cuadro 1. Perfiles de resistencia a ocho antibióticos en 36 cepas aisladas de *Ornithobacterium rhinotracheale* en aves comerciales del Perú con infecciones respiratorias.

Antimicrobiano	Resistentes (%)	Intermedias (%)	Sensibles (%)
Fosfomicina	77.8	2.8	19.4
Amoxicilina	36.1	5.6	58.3
Ciprofloxacina	41.7	19.4	38.9
Enrofloxacina	52.8	5.6	41.7
Doxiciclina	58.3	27.8	13.9
Norfloxacina	63.9	11.1	25.0
Sulfatrimetopim	75.0	5.6	19.4
Oxitetraciclina	58.3	8.3	33.3

El perfil genético (*ADN fingerprinting*) fue realizado a partir de los patrones de bandas generadas por ERIC-PCR utilizando el programa GelAnalyzer 2010 (Peña *et al.*, 2016). Los patrones de bandeo de ERIC-PCR fueron transformados a una matriz de (dis)similaridad utilizando el coeficiente de Jaccard y Dice (Mendoza *et al.*, 2014) mediante el programa FAMD v1.25 (Schluter y

Harris, 2006). El análisis de la variabilidad genética intra e interespecífica para las 36 cepas de *O. rhinotracheale* fue realizado utilizando el método de máxima similitud del análisis de varianza molecular (AMOVA) y dendogramas generados mediante el método Neighbor Joining en base a una matriz de distancia genética con los programas FAMD v. 1.25 (Schlüter, 2006) y Mega v. 6.0 (Tamura *et al.*, 2013).

RESULTADOS

El total de los aislados (n=36) presentaron un patrón morfológico en agar Mueller-Hinton-sangre al 5% y perfil bioquímico compatible con *O. rhinotracheale*. Así mismo, la totalidad de aislados fue confirmada como *O. rhinotracheale* mediante amplificación y secuenciamiento de un fragmento de PCR del gen ribosomal 16S rRNA (Figura 1).

Los aislados mostraron una elevada resistencia antimicrobiana, siendo el 100% resistente al menos a una familia de antibióticos y el 94.4% fueron multidrogo resistentes (resistencia al menos a dos familias de antibióticos). Los aislados mostraron perfiles de resistencia principalmente para fosfomicina (77.8%), sulfatrimetopim (75.0%) y norfloxacina (63.9%), mientras que la mayor sensibilidad fue para la amoxicilina (58.3%) (Cuadro 1).

Se observaron siete bandas polimórficas (loci) comprendidas entre 200 y 2000 pares de bases con un total de 11 perfiles de ERIC-PCR identificados (A-K), siendo el más abundante el perfil D con 55.6% (20/36) de los aislados, seguido del perfil F (11.1%, 4/36) (Figura 2). Se apreció una moderada diferenciación entre las cepas de *O. rhinotracheale*, las cuales se agruparon en al menos dos clústeres genéticos sin correspondencia con el lugar de origen de los aislados, sugiriendo la posibilidad de un origen común dentro de las cepas provenientes de las cinco regiones del país. La región Lima presentó la mayor variabilidad genética con la presencia 6 de 11 patrones genéticos, de los cuales cinco fueron patrones únicos (B, E, F, J, K) (Cuadro 2).

DISCUSIÓN

Ornithobacterium rhinotracheale tiene una variabilidad genética más alta que otros microorganismos (Amonsin *et al.*, 1997;

Vargas *et al.*, 2003), lo cual dificulta la identificación de linajes clonales. Técnicas basadas en tipificación de ADN permiten una mejor caracterización molecular y agrupamiento de acuerdo con las relaciones clonales existentes (Amonsin *et al.*, 1997; Tabatabai *et al.*, 2010). La aplicación de ERIC-PCR para caracterización molecular de las 36 cepas de *O. rhinotracheale* demostró su utilidad en caracterización de la variabilidad genética y la determinación de linajes clonales en el presente estudio.

Réka *et al.* (2017) y Hassanzadeh *et al.* (2010) demostraron la existencia de diversificación clonal entre aislados de *O. rhinotracheale* en aves de corral en Hungría e Irán, respectivamente, utilizando similares metodologías (ERIC-PCR), mientras que otros autores lo demostraron en pavos comerciales (Zorman-rojs *et al.*, 2000; Vargas *et al.*, 2003).

Los hallazgos sugieren la presencia de moderada variabilidad genotípica interespecífica e intraespecífica diferenciada dentro de las 36 cepas de *O. rhinotracheale* procedentes de las cinco regiones con al menos 11 perfiles genéticos diferenciados (ERIC-PCR), a diferencia de lo reportado por Koga y Zavaleta (2005), que indican la existencia de un solo perfil genético circulante similar a una cepa control internacional (ATCC® 51463) utilizando similares técnicas (REP-PCR). Estos resultados sugieren un incremento de la variabilidad genética en esta bacteria en los últimos 13 años.

La mayor variabilidad intraespecífica observada en la región de Lima (7 de 11 perfiles y 5 perfiles únicos) podría explicarse por la mayor concentración de sistemas de producción avícola en esta región; sugiriendo que la presencia de genotipos distintos se debería a la interacción entre diferentes tipos de crianza (producción de carne y huevo comercial) y la posible contaminación por aves silvestres. Macagnan *et al.* (2006) demostró la presencia de al menos seis genotipos en Brasil

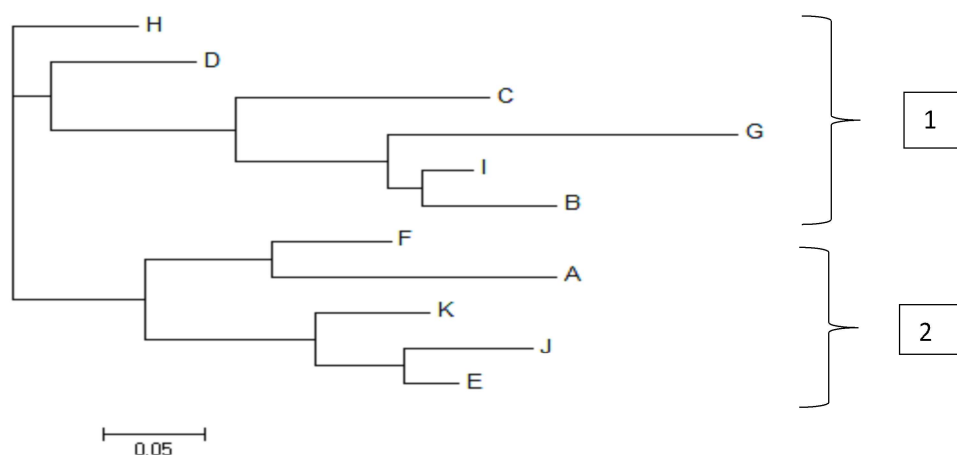


Figura 2. Árbol filogenético mediante método de Neighbor Joining obtenido a partir de una matriz de (Dis) similaridad utilizando el coeficiente de Jaccard y Dice (Mendoza *et al.*, 2014), de DNA fingerprinting (huella genética de ADN) de cepas de *O. rhinotracheale*. Los 11 genotipos presentes en las 36 cepas han sido denominados mediante letras (A-K) para visualizar las relaciones existentes entre los tipos de patrones de bandas

Cuadro 2. Aislados de *Ornithobacterium rhinotracheale* (n=36), según el origen de procedencia, y patrones *Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus*-PCR (ERIC-PCR) diferenciados

Patrón ERIC-PCR	n	%	Ubicación geográfica
A	1	2.78	Arequipa
B	1	2.78	Lima
C	1	2.78	La Libertad
D	20	55.56	Lima, La Libertad, Ica y Ucayali
E	1	2.78	Lima
F	4	11.11	Lima
G	2	5.56	La Libertad y Arequipa
H	1	2.78	La Libertad
I	3	8.33	Lima y La Libertad
J	1	2.78	Lima
K	1	2.78	Lima

mediante el *single-enzyme amplified fragment length polymorphism* (SAFLP), sugiriendo que el origen de la variabilidad podría ser contaminación vertical de aves comerciales con aves silvestres (King *et al.*, 2002; Turan y Ak, 2002; Jefferies *et al.*, 2004; Chou *et al.*, 2009).

La baja variabilidad intraespecífica observada en la región de Arequipa debe ser considerada con cuidado, ya que el número de cepas analizados no permitiría explicar la dispersión y presencia de clonas diferenciadas de *O. rhinotracheale* en esta región; sin embargo, los resultados podrían guardar re-

lación con la presión de selección a la que está sometida la bacteria ante el uso de antimicrobianos y vacunas comerciales (Smith *et al.*, 1993).

Los patrones de resistencia a cinco familias de antibióticos mostraron una elevada multidrogo resistencia (94.4%), lo cual podría sugerir una fuerte presión de selección con un incremento en la variabilidad genética de *O. rhinotracheale*, debido probablemente a la subdosificación o uso indiscriminado de los antibióticos en las aves de corral (Devriese *et al.*, 1995, 2001; Peña *et al.*, 2016). Resistencia a penicilinas (amoxicilina), tetraciclinas (doxiciclina y tetraciclina) y a quinolonas (enrofloxacina, ciprofloxacina y norfloxacina) variaron entre el 40 y 60%, similar a lo reportado para Brasil y Bélgica (Devriese *et al.*, 1995, 2001; van Veen *et al.*, 2001) y otros países (Zorman *et al.*, 2000; Soriano *et al.*, 2003).

El incremento en la resistencia antimicrobiana podría indicar una constante actividad genética presente en *O. rhinotracheale* observado como un incremento en la variación genética intraespecífica. La aparición de cepas con nuevas características fenotípicas no reportadas previamente (pequeñas colonias variables o la capacidad de hemolítica) (Hsiang-Jung y Chen-Wei, 2006; Tabatabai *et al.*, 2010; Mohammad *et al.*, 2013; Zahra *et al.*, 2013) reforzarían esta hipótesis.

CONCLUSIONES

- Los resultados indican la presencia de cepas de *Ornithobacterium rhinotracheale* multidrogo resistentes (94.4%), con moderada variabilidad genética no organizada a nivel geográfico y de hospedero.
- El patrón genético D fue el más frecuente con un 55.6% de presencia y distribuido en cuatro de las cinco regiones evaluadas en el país.

- La región Lima concentró la mayor variabilidad genética (7/11 patrones totales) con la presencia de cinco patrones únicos de ERIC-PCR.

Agradecimientos

El presente trabajo fue financiado y ejecutado en las instalaciones de la empresa Bioservice SRL. Los autores agradecen a los médicos veterinarios Rosario Condori, Stephane Lovón y Manuel Silvera por el apoyo logístico, sugerencias y revisión del manuscrito.

LITERATURA CITADA

1. **Amonsin A, Wellehan J, Li L, Vandamme P, Lindeman C, Edman M, Robinson R, et al. 1997.** Molecular epidemiology of *Ornithobacterium rhinotracheale*. J Clin Microbiol 35: 2894-2898.
2. **Chou C, Lin S, Chen C, Tsai H. 2009.** Use of random amplified polymorphic DNA analysis and single-enzyme amplified fragment length polymorphism in molecular typing of *Ornithobacterium rhinotracheale* strains. Avian Dis 53: 108-114. doi: 10.1637/8474-092708-Reg.1
3. **Devriese L, Hommez J, Vandamme P, Kersters K, Haesebrouck F. 1995.** In vitro antibiotic sensitivity of *Ornithobacterium rhinotracheale* strains from poultry and wild birds. Vet Rec 137: 435-436. doi: 10.1136/vr.137.17.435
4. **Devriese LA., de Herdt P, Haesebrouck F. 2001.** Antibiotic sensitivity and resistance in *Ornithobacterium rhinotracheale* strains from Belgian broiler chickens. Avian Pathol 30: 197-200. doi: 10.1080/03079450120054596
5. **El-Sukhon N, Musa A, Al-Attar M. 2002.** Studies on the bacterial etiology of airsacculitis of broilers in Northern and Middle Jordan with special reference to

- Escherichia coli*, *Ornithobacterium rhinotracheale*, and *Bordetella avium*. Avian Dis 46: 605-612. doi: 10.1637/0005-2086(2002)-046[0605:-SOTBEO]2.0.CO;2
6. **Espinoza I, Colas M, Vichi J, Báez M, Martínez S. 2011.** Isolation and identification of *Ornithobacterium rhinotracheale* from laying hens in farms of La Habana province. Rev Sa-lud Anim 33: 38-43.
 7. **Ha HJ, Christensen N, Humphrey S, Haydon T, Bernardi G, Rawdon T. 2016.** The first detection of *Ornithobacterium rhinotracheale* in New Zealand. Avian Dis 60: 856-859. doi: 10.1637/11457-062116-case
 8. **Hafez H, Sting R. 1999.** Investigations on different *Ornithobacterium rhinotracheale* «ORT» isolates. Avian Dis 43: 1-7.
 9. **Hafez M, Vandamme P. 2011.** Genus XXVI *Ornithobacterium*. In: Bergey's manual of systematic bacteriology. 2nd ed. New York: Springer. p 250-314.
 10. **Hassanzadeh M, Karrimi V, Fallah N, Ashrafi I. 2010.** Molecular characterization of *Ornithobacterium rhinotracheale* isolated from broiler chicken flocks in Iran. Turk J Vet Anim Sci 34: 373-378. doi: 10.3906/vet-0810-19
 11. **Hsiang-Jung T, Chen-Wei H. 2006.** Phenotypic and molecular characterization of isolates of *Ornithobacterium rhinotracheale* from chickens and pigeons in Taiwan. Avian Dis 50: 502-507. doi: 10.1637/7527-031906R.1
 12. **Hung A, Alvarado A. 2001.** Phenotypic and molecular characterization of isolates of *Ornithobacterium rhinotracheale* from Peru. Avian Dis 45: 999-1005. doi: 10.2307/1592880
 13. **Jefferies J, Smith A, Clarke S, Dowson C, Mitchell T. 2004.** Genetic analysis of diverse disease-causing pneumococci indicates high levels of diversity within serotypes and capsule switching. J Clin Microbiol 42: 5681-5688. doi: 10.1128/JCM.42.12.5681-5688.2004
 14. **Joubert P, Higgins R, Laperle A, Mikaelian I, Venne D, Silim A. 1999.** Isolation of *Ornithobacterium rhinotracheale* from turkeys in Quebec, Canada. Avian Dis 43: 622-626. doi: 10.2307/1592667
 15. **King S, Leigh J, Heath P, Luque I, Tarradas C, Dowson C, Whatmore AM. 2002.** Development of a multilocus sequence-typing scheme for the pig pathogen *Streptococcus suis*: identification of virulent clones and potential capsular serotype exchange. J Clin Microbiol 40: 3671-3680. doi: 10.1128/jcm.40.10.3671-3680.2002
 16. **Koga Y, Zavaleta A. 2005.** Intraspecies genetic variability of *Ornithobacterium rhinotracheale* in commercial birds in Peru. Avian Dis 49: 108-111. doi: 10.1637/7235-070804R
 17. **Macagnan M. 2006.** Caracterização fenotípica e genotípica de isolados de *Ornithobacterium rhinotracheale* do Brasil. Tesis de Maestría. Porto Alegre, Brasil: Universidad Federal do Rio Grande do Sul. 51 p.
 18. **Mendoza K, Zavaleta A, Koga Y, Rodríguez J, Alvarado A, Tinoco R. 2014.** Variabilidad genética de cepas de *Gallibacterium anatis* aisladas de aves comerciales del Perú con infecciones respiratorias. Rev Inv Vet Perú 25: 233-244. doi: 10.15381/rivep.v25i2.8496
 19. **Mohammad Z, Miro F, Rashad A, Jinhua Y, Bo H, Jingliang S. 2013.** Isolation and characterization of small-colony variants of *Ornithobacterium rhinotracheale*. J Clin Microbiol 51: 3228-3236. doi: 10.1128/JCM.01337-13
 20. **[NCCLS] Clinical and Laboratory Standard Institute. 2017.** Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility test for bacteria isolated from animals. 2nd ed NCCLS M31-A2. Vol 19(1): 1-87.
 21. **Peña E, Vega V, Morales V, Trujillo H, Talavera M, Soriano E. 2016.** Serotyping, genotyping, and antimicrobial susceptibility of *Ornithobacterium rhinotracheale* isolates from Mexico.

- Avian Dis 60: 669-672. doi: 10.1637/11333-112515-ResNote.1
22. **Réka S, Enikő W, László M, Csaba N, Éva G, Ákos T, Tibor M. 2017.** Characterization of *Ornithobacterium rhinotracheale* field isolates from Hungary. Avian Pathol 46: 506-514. doi: 10.1080/03079457.2017.1321104
 23. **Sakai E, Tokuyama Y, Nonaka F, Ohishi S, Ishikawa Y, Tanaka M, Taneno A. 2000.** *Ornithobacterium rhinotracheale* infection in Japan: preliminary investigations. Vet Rec 146: 502-504. doi: 10.1136/vr.146.17.502
 24. **Schlüter M, Harris SA. 2006.** Analysis of multilocus fingerprinting data sets containing missing data. Molecular. Mol Ecol Notes 6: 569-572. doi: 10.1111/j.1471-8286.2006.01225.x
 25. **Smith M, Smith H, O'Rourke M, Spratt G. 1993.** How clonal are bacteria? P Natl Acad Sci USA 90: 4384-4388. doi: 10.1073/pnas.90.10.4384
 26. **Soriano V, Longinos M, Navarrete P, Fernández R. 2002.** Identification and characterization of *Ornithobacterium rhinotracheale* isolates from Mexico. Avian Dis 46: 686-690. doi: 10.1637/0005-2086(2002)046-[0686:IACORR]2.0.CO;2
 27. **Soriano VE, Vera NA, Salado CR, Fernández RP, Blackall PJ. 2003.** *In vitro* susceptibility of *Ornithobacterium rhinotracheale* to several antimicrobial drugs. Avian Dis 47: 476-480. doi: 10.1637/0005-2086(2003)-047[0476:IVS-OOR]2.0.CO;2
 28. **Tabatabai B, Zimmerli K, Zehr S, Briggs E, Tatum M. 2010.** *Ornithobacterium rhinotracheale* North American field isolates express a hemolysin-like protein. Avian Dis 54: 994-1001. doi: 10.1637/9070-091409-Reg.1
 29. **Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filip A, Kumar S. 2013.** MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. Mol Biol Evol 30: 2725-2729. doi: 10.1093/molbev/mst197
 30. **Turan N, Ak S. 2002.** Investigation of the presence of *Ornithobacterium rhinotracheale* in chickens in Turkey and determination of the seroprevalence of the infection using the enzyme-linked immunosorbent assay. Avian Dis 46: 442-446. doi: 10.1637/0005-2086(2002)-046[0442:IOTPOO]2.0.CO;2
 31. **van Empel C, Hafez M. 1999.** *Ornithobacterium rhinotracheale*: a review. Avian Pathol 28: 217-227. doi: 10.1080/03079459994704
 32. **van Veen L, Hartman E, Fabri T. 2001.** *In vitro* antibiotic sensitivity of strains of *Ornithobacterium rhinotracheale* isolated in The Netherlands between 1996 and 1999. Vet Rec 149: 611-613. doi: 10.1136/vr.149.20.611
 33. **Vandamme P, Segers P, Vancaneyt M, van Hover K, Mutters R, Hommez J, Dewirst F, et al. 1994.** Description of *Ornithobacterium rhinotracheale* gen. Nov. sp. Nov. isolated from the avian respiratory tract. Int J Syst Evol Micr 44: 24-37. doi: 10.1099/00207713-44-1-24
 34. **Vargas S, Garduño L, Rosas F. 2003.** Isolation and characterization of *Ornithobacterium rhinotracheale* from respiratory diseased turkeys. Vet México 34: 283-288.
 35. **Zahra M, Ferreri M, Alkasir R, Yin J, Han B, Su J. 2013.** Isolation and characterization of small-colony variants of *Ornithobacterium rhinotracheale*. J Clin Microbiol 51: 3228-3236. doi: 10.1128/JCM.01337-13
 36. **Zorman-Rojs O, Zdovc I, Bencina D, Mrzel I. 2000.** Infection of turkeys with *Ornithobacterium rhinotracheale* and *Mycoplasma synoviae*. Avian Dis 44: 1017-1022. doi: 10.2307/1593082