

Caracterización genotípica por MLST de *Ornithobacterium rhinotracheale* procedentes de aves de corral en el Perú

Genotypic characterization by MLST of *Ornithobacterium rhinotracheale* from poultry in Peru

Rony Yunior Cotaquispe Nalvarte^{1,5}, Alberto Manchego Sayan²,
Jorge Rodríguez Bailon³, Ysabel Koga Yanagui⁴

RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue la genotipificación de *Ornithobacterium rhinotracheale*. Se identificaron 36 cepas por pruebas moleculares y se realizó la genotipificación por Multilocus Sequence Typing (MLST). Los ensayos identificaron las secuencias tipo: N.T.1, N.T2 y N.T3, diferentes a la base de datos del NCBI y 19 alelos distintos con 229 sitios polimórficos. Además, 32 cepas pertenecen al genotipo común ST1. Los hallazgos identificaron al menos cuatro genotipos en pollos de varias regiones del Perú.

Palabras clave: genotipo, secuencia tipo, Multilocus Sequence Typing

¹ Laboratorio de Biología Molecular Bioservice SRL, Lima, Perú

² Laboratorio de Inmunología Molecular, Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú

³ Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima, Perú

⁴ Departamento de Investigación, Bioservice SRL, Lima, Perú

⁵ E-mail: r.cotaquispe.n@gmail.com

Recibido: 24 de noviembre de 2020

Aceptado para publicación: 15 de mayo de 2021

Publicado: 24 de agosto de 2021

©Los autores. Este artículo es publicado por la Rev Inv Vet Perú de la Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Este es un artículo de acceso abierto, distribuido bajo los términos de la licencia Creative Commons Atribución 4.0 Internacional (CC BY 4.0) [<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.es>] que permite el uso, distribución y reproducción en cualquier medio, siempre que la obra original sea debidamente citada de su fuente original

ABSTRACT

The aim of this study was the genotyping of *Ornithobacterium rhinotracheale*. For this, 36 strains were identified by molecular testing and genotyping was performed by Multilocus Sequence Typing (MLST). The tests identified the type sequences: N.T.1, N.T.2 and N.T.3, different from the NCBI database and 19 different alleles with 229 polymorphic sites. In addition, 32 strains belonged to the common ST1 genotype. The findings identified at least four genotypes in chickens from various regions of Peru.

Key words: genotype, type sequence, Multilocus Sequence Typing

INTRODUCCIÓN

Ornithobacterium rhinotracheale (ORT) es un patógeno aviar presente en el tracto respiratorio de diversas especies de aves domésticas y silvestres (Vandamme *et al.*, 1994; Hafez y Reinhard, 1999). La infección puede causar una alta mortalidad y pérdidas económicas para los avicultores (Vandamme *et al.*, 1994; Macagnan, 2006).

O. rhinotracheale pertenece al orden Flavobacteriales, familia Flavobacteriaceae y género *Ornithobacterium*, que tiene una única especie. *O. rhinotracheale* (Vandamme *et al.*, 1994; Van Empel y Hafez, 1999) y fue aislada por primera vez en 1983 por Vandamme *et al.* (1994). Se describió como un bacilo gramnegativo pleomórfico, de colonias convexas, lisas, hemolíticas (Van Empel y Hafez, 1999), habiéndose reportado en numerosos países (Amonsín *et al.*, 1997; Sakai *et al.*, 2000; Hung y Alvarado, 2001; Van Veen *et al.*, 2001; Turan y Ak, 2002; Koga y Zavaleta, 2005; Hassanzadeh *et al.*, 2010; Espinosa *et al.*, 2011). Actualmente se conocen 18 serotipos nombradas con letras de la A hasta la R, y son determinadas por métodos serológicos (Van Empel *et al.*, 1997; Turan y Ak, 2002). Algunos serovares (A, B, D, E) causan reacciones cruzadas a nivel serológico, indicando la posibilidad de que existan subespecies de esta bacteria (Macagnan, 2006; Hafez y Vandamme, 2011).

El uso del PCR para la detección molecular de *O. rhinotracheale* en el Perú ha mostrado buenos resultados (Hung y Alvarado, 2001), y además permite detectar las variaciones genéticas existentes por interacciones entre serotipos peruanos mediante análisis de ADN entre los aislados de *O. rhinotracheale* (Koga y Zavaleta, 2005; Macagnan, 2006). De otra parte, métodos de tipificación molecular como el Multilocus Sequence Typing - MLST están disponibles y son los métodos de elección para identificación de los genotipos existentes (Sakai *et al.*, 2000).

La tipificación molecular basada en secuencias multilocus (MLST) permite caracterizar aislados de especies bacterianas utilizando secuencias conservadas de siete genes housekeeping: (*adk*): Adenylato kinasa, (*aroE*): Shikimate 5-dehydrogenase, (*fumC*): Fumarase class II, (*gdhA*): Glutamate dehydrogenase, (*pgi*): Glucose-6-phosphate isomerase, (*pmi*): Phosphomannose isomerase (Coll *et al.*, 2005; Thieme *et al.*, 2016a). Las bases de datos disponibles para secuencias MLST permiten la fácil comparación de perfiles alélicos entre aislados y/o clonas (Thieme *et al.*, 2016a,b; Pubmlst.org, 2018).

En el Perú se carece de estudios de tipificación actuales que permitan determinar la variabilidad genética y la presencia de

variantes genéticas en *O. rhinotracheale*. El objetivo del trabajo fue genotipificar 36 cepas de *O. rhinotracheale* procedentes de cinco regiones del Perú mediante MLST.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material Biológico

Se utilizaron 36 cepas de *O. rhinotracheale*, aisladas de muestras clínicas de aves con signos clínicos y lesiones histopatológicas compatibles con la infección bacteriana entre 2015 y 2017, provenientes de Lima, Libertad, Arequipa, Ica y Ucayali. Las muestras correspondieron a pulmón, hígado, sacos aéreos, corazón y cerebro. Las cepas fueron aisladas de gallinas de postura (Hyline) (n=9), broilers (n=4), gallinas reproductoras (n=22) y de gallos de pelea (n=1).

Se realizó una impronta de cada órgano e hisopado en una placa de agar sangre y luego, con un asa de siembra se agotó la muestra por estrías en el medio de cultivo, incubándose a 37 °C durante 24-48 h en jarra con cuatro velas (microaerófilo), aunque se reconoce que existen ORT que necesitan más de 48 horas de cultivo. Se consideraron como colonias sospechosas aquellas que eran puntiformes, pequeñas, grises a grises-blancas, opacas, de 1-3 mm de diámetro, convexas, de superficie lisa, hemolítica o no hemolítica (Soriano *et al.*, 2003). Las cepas con características microbiológicas idénticas a *O. rhinotracheale* fueron liofilizadas y almacenadas en el banco de cepas del laboratorio de Bioservice.

Extracción de ADN de *O. rhinotracheale*

Se extrajo el ADN genómico de las 36 cepas utilizando el método de membranas de sílica gel con el GF-1 Tissue DNA Extraction Kit (Vivantis), de acuerdo con las indicaciones del laboratorio fabricante.

Detección Molecular de *O. rhinotracheale*

Las cepas de *O. rhinotracheale* fueron detectadas mediante amplificación de PCR. Se utilizó un fragmento de 784 bp del gen 16S *rRNA*, utilizando los cebadores forward: OR16S - F1 (5'GAGAATTAATTACGGATTAAG) y reverse: OR16S-R1 (5'TTCGCTTGGTCTCCGAAGAT). La reacción de PCR se realizó en un volumen final de 20 µl conteniendo 10X Buffer PCR, 25 mM de dNTPs, 25 mM de MgCl₂, 10 pmol de cada cebador, 1 U Taq DNA polimerasa (Fermentas) y 30 ng de ADN genómico. Se emplearon los siguientes ciclos termales: Un ciclo de desnaturalización inicial de 95 °C durante 4 min, 35 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 30 s, alineamiento de 58 °C durante 60 s, 1 extensión de 72 °C durante 90 s y 1 ciclo de extensión final de 72 °C durante 5 min, en un termociclador Veriti Thermal Cycler (Life Technologies) (Espinosa *et al.*, 2011; Koga y Zavaleta, 2005, Soriano *et al.*, 2003).

Secuenciamiento del Gen 16S

Se realizó la amplificación del gen 16S mediante los cebadores: 27 F (5'AGAGTTTGATCMTGGCTC AG'3) y 1492 R (5'AAAGGAGGTGWTCCAR CC'3). Los dos productos de PCR fueron separados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % en buffer TBE 1X (Tris, Borato, EDTA) durante 45 min a 100 v y visualizados bajo luz UV. Los productos se enviaron a secuenciar a la empresa Macrogen Inc. (Corea del Sur) (Lillo *et al.*, 2006).

Multilocus Sequence Typing (MLST)

Un total de siete genes *housekeeping* fueron utilizados para MLST de *O. rhinotracheale*. Estos fueron seleccionados de estudios previos en aves de corral y aves silvestres por su alta semejanza con los genes de *O. rhinotracheale* (Cuadro 1). Así, dos genes (*aroE* y *fumC*) fueron seleccionados

Cuadro 1. Genes *Housekeeping*, cebadores y tamaños de fragmentos usados por Multilocus Sequence Typing – MLST

Gen	Síntesis	Cebador (5'-3') ¹	MLST (pb)
<i>adk</i>	Adenylato kinasa	F: GGCAGTGGAAAAGGAACTCA R: TCTAAACTTCCTTCGCCGTTT	393
<i>aroE</i>	Shikimate 5-dehydrogenase	F: GGAATCATCGGCAGAAACAT R: TGATGTTGGCATCTTGTGCT	486
<i>fumC</i>	Fumarase, class II	F: CACGCCACAAGGTTATGATG R: TAAACGCACGGCTTCTTCTT	489
<i>gdhA</i>	Glutamate dehydrogenase/ Leucine dehydrogenase	F: TCTGGTAGAGCACCAAACCA R: GCTTGTTTTGCAACCACTCA	480
<i>mdh</i>	Malate dehydrogenase (NAD)	F: CGCGAAGAATTAATCGGAAC R: CTCTTACTTGCGCAACAGCA	519
<i>pgi</i>	Glucose-6-phosphate isomerase	F: AAAGCGACATTGCCAAACAT R: TTTCGAGTTCGCTCTCACT	492
<i>pmi</i>	Phosphomannose isomerase	F: TGATGTGCAAGGCAATGTTT R: CTGTGTCGAGCGAAATGCTA	489

¹F- Cebador forward, R- Cebador reverse

a partir de estudios de análisis de MLEE de *O. rhinotracheale* (Amonsin *et al.*, 1997) y cinco genes (*adk*, *mdh*, *pgi*, *gdhA* y *pmi*) a partir del análisis de MLST de *Pasteurella multosida* (Thieme *et al.*, 2016a). Las secuencias de los cebadores, las condiciones de amplificación por PCR, secuencias alélicas, tipos de secuencias y aislados de referencia fueron obtenidos a partir la base de datos MLST de la Universidad de Oxford (Pubmlst.org., 2018). Los productos de PCR fueron separados por 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) y visualizados mediante luz UV. Los productos de PCR fueron analizados en base a su tamaño de acuerdo con lo reportado en la base de datos de MLST. Los productos de PCR fueron secuenciados por ambas hebras mediante BigDye v. 3.1 *sequencing terminator kit* (Life Technologies) y un analizador

genético ABI 3137 XL (Life Technologies). El servicio fue proveído por la empresa Macrogen Inc. (Corea del Sur) (Subaaharan *et al.*, 2010).

Curado y Alineamiento de las Secuencias MLST

Las 504 secuencias de los siete genes (36 cepas) por *forward* y *reverse* se analizaron y se realizó (curado) el control de calidad de cada secuencia para garantizar los SNPs correctos y no producto de un error durante el secuenciamiento (gaps o solapamientos de nucleótidos) y eliminar los extremos cortos de secuencias que normalmente presentan errores. Se utilizó el software Chromas Lite v. 2.6.6. Luego se realizó el alineamiento de las secuencias por cada gen *Housekeeping* y se hizo una comparación de los sitios variables obtenidos median-

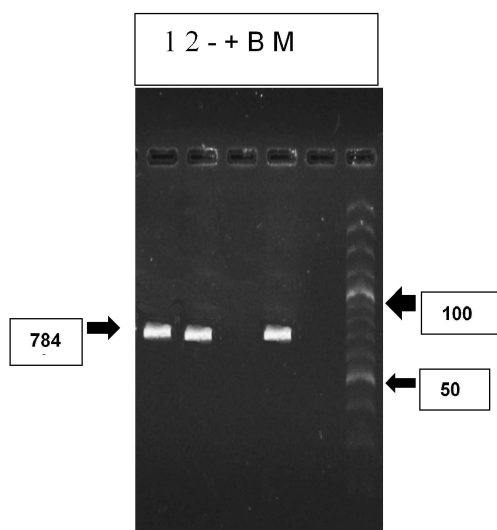


Figura 1. Detección de *Ornithobacterium rhinotracheale* del gen 16S rRNA. Línea 1 al 2: *O. rhinotracheale*, Línea 3 (control negativo): *P. multocida* ATCC, línea 4 (control positivo): *O. rhinotracheale* ATCC 51464, línea 5: Blanco; M, GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder Thermo Scientific (Thermo Scientific)

te el software MEGA v. 6.0. Las secuencias en formato FASTA se llevaron a la base de datos (Pubmlst.org., 2018).

Análisis de Secuencias de MLST

Los perfiles alélicos fueron determinados a partir de secuencias de siete genes *Housekeeping* de las cepas de *O. rhinotracheale* y su comparación con las secuencias tipo (ST) presentes en la base de datos MLST.

El nivel de recombinación entre secuencias fue calculado mediante el índice de asociación (IA) descrito por Maynard Smith

(Smith *et al.*, 1993), usando el software START.2 (Jolley *et al.*, 2001; Jolley y Maiden, 2010). Un árbol filogenético fue construido utilizando los perfiles alélicos para los siete genes concatenados, mediante el método de Neighbor Joining, disponible en el software MEGA v. 6.0 (Tamura *et al.*, 2013; Thieme *et al.*, 2016a,b; Pubmlst.org., 2018).

RESULTADOS

Los resultados de las muestras secuenciadas fueron comparados con los datos de la base de datos del GenBank (Fig. 1). Los genes *Housekeeping* obtenidos por PCR muestran en la Figura 2.

Los 504 cromatogramas obtenidos del secuenciamiento fueron analizados mediante el software Chromas Lite a fin de discriminar y corregir las secuencias durante el curado. Posteriormente, mediante el software Mega v. 6.0 se determinaron los sitios variables y se seleccionaron alelos polimórficos, obteniéndose los sitios tipos (ST) por comparación con los perfiles alélicos almacenados en la base de datos del NCBI. Un total de cuatro ST fueron encontrados (ST1, ST NT 1, ST NT 2 y ST NT 3), siendo el perfil alélico ST1 (1, 1, 1, 1, 1, 1, 1) el más frecuente con presencia en 32 muestras de ORT, representando un 88.89% del total (Cuadro 2, Figura 3).

La diferenciación de los ST se logra mediante la similitud en los perfiles alélicos. El ST N.T1 (1, 17, 7, 8, 7, 25, 1) difiere al perfil ST10 (7, 9, 7, 8, 7, 8, 8) en 4 alelos. El ST N.T2 (24, 2, 26, 6, 23, 25, 25) y N.T3 (24, 2, 26, 6, 2, 1, 25) son distintos al ST32 (24, 2, 26, 24, 23, 25, 25) en 3 y 1 alelo. Esta información determinaría tres nuevas secuencias tipo (ST) dentro de esta investigación (Cuadro 3).

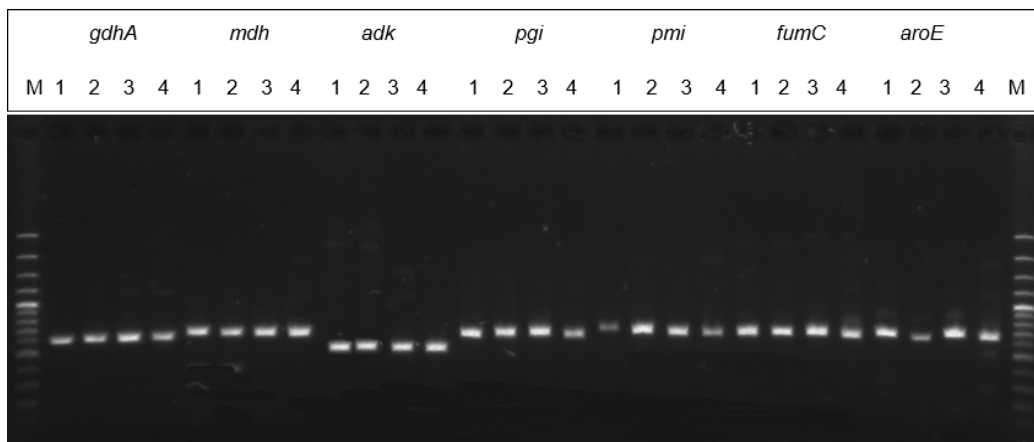


Figura 2. Los siete 7 genes *Housekeeping* obtenidos por PCR. Línea 1, 2, 3 y 4: *Ornithobacterium rhinotracheale*, (*adh*): Adenylato kinasa, (*aroE*): Shikimate 5-dehydrogenase, (*fumC*): Fumarase, class II, (*gdhA*): Glutamate dehydrogenase, (*pgi*): Glucose-6-phosphate isomerase, (*pmi*): Phosphomannose isomerase; (*mdh*) Malate dehydrogenase (NAD), M, GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder Thermo scientific (Fermentas, EEUU)

DISCUSIÓN

La variabilidad genética de *O. rhinotracheale* es mayor que en otros microorganismos (Amonsin *et al.*, 1997; Soriano *et al.*, 2003; Montes de Oca *et al.*, 2018), lo cual complica la identificación eficaz de linajes clonales. En este caso, se logra una mejor caracterización molecular y agrupamiento con el método MLST (Amonsin *et al.*, 1997; Montes de Oca *et al.*, 2018; Tabatabai *et al.*, 2010). Los resultados del MLST corroboran lo reportado por Thieme *et al.* (2016a,b), quienes identifican la prevalencia del perfil alélico ST1 en aves domésticas, en varios continentes, en tanto que Smith *et al.* (1993) y Thieme *et al.* (2016b) reportan una alta heterogeneidad de perfiles alélicos en aves silvestres. En base a estos hallazgos, este estudio apoya la probable introducción de nuevos perfiles alélicos (ST) a partir de poblaciones de aves silvestres a domésticas (Amonsin *et al.*, 1997; Chou *et al.*, 2009).

Los resultados del presente estudio sugieren la presencia de moderada variabilidad genética presente en cepas de *O. rhinotracheale* provenientes de sistemas de producción avícola en el Perú, con la presencia de cuatro perfiles alélicos ST (ST1, ST N.T 1, ST N.T 2 y ST N.T 3), tres de los cuales no ha sido reportado previamente. Además, se encontró 19 alelos únicos y 229 sitios polimórficos. El menor número de sitios de polimorfismo con el estudio de Thieme *et al.* (2016a) se debería a la cantidad de cepas dispuestas en el trabajo. El índice de asociación (IA) calculado para las 36 cepas analizadas fue de 4.7327 (Jolley *et al.*, 2001, 2010). Se detectó un desequilibrio de ligamiento significativo que indica estructuras de población clonal. Los resultados son comparables al estudio de Thieme *et al.* (2016a) donde las 36 cepas de *O. rhinotracheale* son clones que están estrechamente relacionadas genéticamente, pero no tienen relación con el tipo de hospedero (gallinas, pollos y gallos); por otro lado, no se podría inferir una relación geográfica debido a la cantidad de muestras analizadas.

Cuadro 2. Perfiles alélicos de Multilocus Sequence Typing (MLST), hospedero, origen geográfico y año de aislamiento de 36 cepas de *Ornithobacterium rhinotracheale*

ID	Hospedero	Origen	Año de aislamiento	Perfil alélico MLST							
				ST	<i>adk</i>	<i>aroE</i>	<i>fumC</i>	<i>gdhA</i>	<i>mdh</i>	<i>pgi</i>	<i>pml</i>
ORT1	Gallo	Arequipa	LBM007-15	1	1	1	1	1	1	1	1
ORT2	Gallina	Huaral	LBM 030-15		1	1	1	1	1	1	1
ORT3	Pollo	Huaral	LBM 053-15		1	1	1	1	1	1	1
ORT4	Gallina	Libertad	LBM 065-15		1	1	1	1	1	1	1
ORT5	Pollo	Ucayali	LBM 065-15		1	1	1	1	1	1	1
ORT6	Gallina	Libertad	LBM 075-15		1	1	1	1	1	1	1
ORT7	Pollo	Huaral	LBM 126-15		1	1	1	1	1	1	1
ORT8	Gallina	Lima	LBM 134-15		1	1	1	1	1	1	1
ORT9	Gallina	Lima	LBM 134-15		1	1	1	1	1	1	1
ORT10	Gallina	Lima	LBM 135-15		1	1	1	1	1	1	1
ORT11	Gallina	Lima	LBM 135-16		1	1	1	1	1	1	1
ORT12	Gallo	Libertad	LBM 172-15		1	1	1	1	1	1	1
ORT13	Pollo	Libertad	LBM 172-15		1	1	1	1	1	1	1
ORT14	Pollo	Lima	LBM 283-15		1	1	1	1	1	1	1
ORT15	Pollo	Lima	LBM 283-15		1	1	1	1	1	1	1
ORT16	Gallina	Lima	LBM 042-16		1	1	1	1	1	1	1
ORT17	Gallina	Arequipa	LBM 162-16	N.T 1	1	17	7	8	7	25	1
ORT18	Gallina	Libertad	LBM 163-16	1	1	1	1	1	1	1	1
ORT19	Gallina	Lima	LBM 002-17		1	1	1	1	1	1	1
ORT20	Pollo	Ica	LBM 265-16		1	1	1	1	1	1	1
ORT21	Pollo	Huaral	LBM 032-16		1	1	1	1	1	1	1
ORT22	Pollo	Ica	LBM 265-16		1	1	1	1	1	1	1
ORT23	Pollo	Trujillo	LBM 308-16	N.T 1	1	17	7	8	7	25	1
ORT24	Gallina	Libertad	LBM 286-16	1	1	1	1	1	1	1	1
ORT25	Gallina	Lima	LBM 168-16		1	1	1	1	1	1	1
ORT26	Pollo	Libertad	LBM 316-16		1	1	1	1	1	1	1
ORT27	Pollo	Lima	LBM 44-16		1	1	1	1	1	1	1
ORT28	Pollo	Ucayali	LBM 176-16		1	1	1	1	1	1	1
ORT29	Gallina	Libertad	LBM 286-16		1	1	1	1	1	1	1
ORT30	Pollo	Lima	LBM 44-16		1	1	1	1	1	1	1
ORT31	Pollo	Libertad	LBM 214-16		1	1	1	1	1	1	1
ORT32	Gallina	Libertad	LBM298-16		1	1	1	1	1	1	1
ORT33	Pollo	Huaral	LBM 032-16		1	1	1	1	1	1	1
ORT34	Gallina	Lima	LBM 249-16		1	1	1	1	1	1	1
ORT35	Gallina	Libertad	LBM 270-17	N.T 2	24	2	26	6	23	25	25
ORT36	Gallina	Libertad	LBM 280-17	N.T 3	24	2	26	6	2	1	25

ID: identificación de la cepa; LBM: ficha de laboratorio de biología molecular

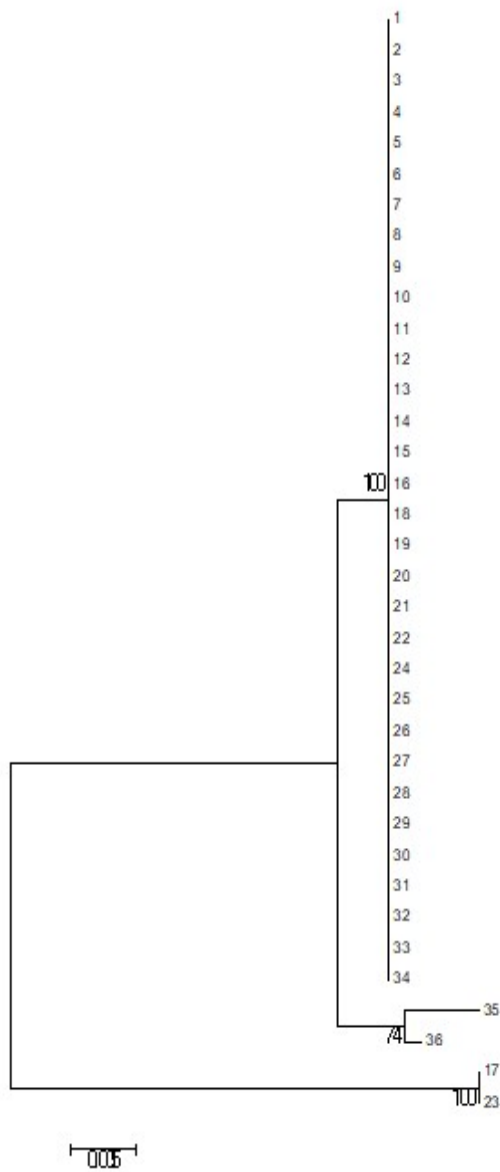


Figura 3. Árbol filogenético basado en el método estadístico (Neighbor joining) utilizando Maximum Composite Likelihood, a partir de los perfiles alélicos de MLST en 36 cepas representativas de *Ornithobacterium rhinotracheale*. El dendograma fue construido mediante el programa Mega 6.0

Los resultados podrían sugerir un incremento de la variabilidad genética en los últimos años con la presencia de al menos cuatro genotipos circulantes basados en el análisis de MLST. La mayor variabilidad intraespecífica observada en la región de Lima

Cuadro 3. Número de alelos y sitios variables en 229 alelos usando la base de datos pubmlst.org y Mega 6.0

Gene <i>Housekeeping</i>	Nº de alelos	Nº de sitios polimórficos diferentes
<i>adk</i>	2	4
<i>aroE</i>	3	14
<i>fumC</i>	3	37
<i>gdhA</i>	3	101
<i>mdh</i>	4	63
<i>pgi</i>	2	2
<i>pmi</i>	2	8
Total	19	229

(ST N.T1) guarda correspondencia con la mayor concentración de crianzas avícolas presentes en esta región; sugiriendo que la interacción entre tipos de crianza (carne / huevo) podría explicar la existencia de genotipos distintos, tal como es mencionado por otros autores (Van Empel *et al.*, 1998; Turan y Ak, 2002; Macagnan, 2006).

CONCLUSIONES

- El genotipo ST1 fue el más frecuente en los 36 aislados con 91.4%, siendo la región de Lima la que concentra la mayor variabilidad de genotipos.
- Los resultados sugieren la presencia de tres nuevos perfiles alélicos STN.T 1, ST N.T 2 y ST N.T 3 en referencia con la base de datos de MLST.
- Se identificaron 19 alelos únicos y 229 sitios polimórficos en los cuatro genotipos descritos.
- El índice de asociación (IA) calculado fue de 4.7327 para las 36 cepas analizadas.

Agradecimientos

El trabajo fue financiado y ejecutado en BIOSERVICE SRL. Los autores agradecen a MV Stephane Lovón Serrano y Rosario Condori por el apoyo logístico, sugerencias y revisión del manuscrito.

LITERATURA CITADA

1. **Amonsin A, Wellehan JF, Li LL, Vandamme P, Lindeman C, Edman M, Robinson RA, Kapur V. 1997.** Molecular epidemiology of *Ornithobacterium rhinotracheale*. J Clin Microbiol 35: 2894-2898. doi: 10.1128 / JCM.35.11.2894-2898.1997
2. **Chou CH, Lin SY, Chen CL, Tsai HJ. 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. **Coll P, Coque MT, Domínguez MA, Vázquez J, Vila J. 2005.** Procedimientos en microbiología clínica. Métodos moleculares de tipificación epidemiológica en Bacteriología. España: Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. 68 p.
4. **Espinosa 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 Salud Anim 33: 38-43.
5. **Hafez MH, Reinhard S. 1999.** Investigations on different *Ornithobacterium rhinotracheale* «ORT» isolates. Avian Dis 43.1: 1-7. doi:10.2307/1592755
6. **Hafez HM, Vandamme P. 2011.** Genus XXVI. *Ornithobacterium*. In: Bergey's manual of systematic bacteriology. 2nd ed. New York: Springer. p 250-314.
7. **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
8. **Hung AL, Alvarado A. 2001.** Phenotypic and molecular characterization of isolates of *Ornithobacterium Rhinotracheale* from Peru. Avian Dis 45. 4: 999-1005. doi: 10.2307/1592880
9. **Jolley KA, Maiden MC. 2010.** BIGSdb: scalable analysis of bacterial genome variation at the population level. BMC Bioinformatics 11: 595. doi: 10.1186/1471-2105-11-595
10. **Jolley KA, Feil EJ, Chan MS, Maiden MC. 2001.** Sequence type analysis and recombinational tests (START). *Bioinformatics* 17: 1230-1231. doi: 10.1093/bioinformatics/17.12.1230
11. **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
12. **Lillo A, Ashley FP, Palmer RM, Munson MA, Kyriacou L, Weightman AJ, Wade WG. 2006.** Novel subgingival bacterial phylotypes detected using multiple universal polymerase chain reaction primer sets. Oral Microbiol Immun 21: 61-68. doi: 10.1111/j.1399-302X.2005.00255.x
13. **Macagnan M. 2006.** Caracterización fenotípica y genotípica de aislados de *Ornithobacterium rhinotracheale* de Brasil. Tesis de Maestría. Porto Alegre, Brasil: Univ. Federal de Rio Grande. 50 p.
14. **Montes de Oca JR, Vega SV, Morales EV, Salgado MC, Blackhall JP, Soriano VE. 2018.** Phylogenetic relationship of *Ornithobacterium rhinotracheale* strains. J Vet Med Sci 80: 869-873. doi: 10.1292/jvms.17-0474
15. **Pubmlst.org. 2018.** *Ornithobacterium rhinotracheale*. [Internet]. Available in: <https://pubmlst.org/orhinotracheale/>

16. **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.
17. **Smith JM, Smith NH, O'Rourke M, Spratt BG. 1993.** How clonal are bacteria? *P Natl Acad Sci USA* 90: 4384-4388. doi: 10.1073/pnas.90.10.4384
18. **Soriano VE, Vera NA, Salado CR, Fernandez RP, Blackhall 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:IVSOOR]2.0.CO;2
19. **Subaaharan S, Blackall LL, Blackall PJ. 2010.** Development of a multi-locus sequence typing scheme for avian isolates of *Pasteurella multocida*. *Vet Microbiol* 141: 354-361. doi: 10.1016/j.vetmic.2010.01.017
20. **Tabatabai LB, Zimmerli MK, Zehr ES, Briggs RE, Tatum FM. 2010.** *Ornithobacterium rhinotracheale* North American field isolates express a hemolysin-like protein. *Avian Dis* 54: 994-1001. doi: 10.1637/9070-091409-Reg.1
21. **Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. 2013.** MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol Biol Evol* 30: 2725-2729. doi: 10.1093/molbev/mst197
22. **Thieme S, Mühldorfer K, Gad W, Lüschoff D, Hafez HM. 2016a.** Molecular characterization of the recently emerged poultry pathogen *Ornithobacterium rhinotracheale* by multilocus sequence typing. *PLoS One* 11(9): e0163401. doi: 10.1371/journal.pone.0163401
23. **Thieme S, Hafez HM, Gutzera S, Warkentina N, Lüschoff D, Mühldorfer K. 2016b.** Multilocus sequence typing of *Ornithobacterium rhinotracheale* isolated from pigeons and birds of prey revealed new insights into its population structure. *Vet Anim Sci* 1: 15-20. doi: 10.1016/j.vas.2016.10.002
24. **Turan N, Ak S. 2002.** Investigation of the presence of *Ornithobacterium rhinotracheale* in chickens in Turkey and determination of the seroprevalance 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
25. **Vandamme P, Segers P, Vancanneyt M, Van hove K, Mutters R, Hommez J, Dewhirst F, et al. 1994.** Description of *Ornithobacterium rhinotracheale* gen. nov. sp. nov. isolated from the avian respiratory tract. *Int J Syst Evol Microbiol* 44: 24-37 doi: 10.1099/00207713-44-1-24
26. **Van Empel P, Van den Bosch H, Loeffen P, Storm P. 1997.** Identification and serotyping of *Ornithobacterium rhinotracheale*. *J Clin Microbiol* 35: 418-421.
27. **Van Empel P, Savelkoul P, Segers R; Stoof J, Loeffen P, Van den Bosch H. 1998.** Molecular characterization of *Ornithobacterium rhinotracheale*. Utrecht: Universiteit Utrecht. 3B:37-48.
28. **Van Empel PC, Hafez HM. 1999.** *Ornithobacterium rhinotracheale*: a review. *Avian Pathol* 28: 217-227. doi: 10.1080/03079459994704
29. **Soriano VE, Longinos GM, Fernández RP. 2003.** Isolation and characterization of *Ornithobacterium rhinotracheale* from respiratory diseased turkeys. *Vet México* 34: 283-288.
30. **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