

Veterinaria México

Volumen 34
Volume

Número 3
Number

Julio-Septiembre 2003
July-September

Artículo:

Aislamiento y caracterización de
Ornithobacterium rhinotracheale
obtenido de pavos con enfermedad
respiratoria

Derechos reservados, Copyright © 2003:
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM

Otras secciones de
este sitio:

- 👉 Índice de este número
- 👉 Más revistas
- 👉 Búsqueda

*Others sections in
this web site:*

- 👉 *Contents of this number*
- 👉 *More journals*
- 👉 *Search*



Medigraphic.com

Aislamiento y caracterización de *Ornithobacterium rhinotracheale* obtenido de pavos con enfermedad respiratoria

Isolation and characterization of *Ornithobacterium rhinotracheale* from respiratory diseased turkeys

Edgardo Soriano Vargas*
Manuel Longinos Garduño**
Pomposo Fernández Rosas**

Abstract

Ornithobacterium rhinotracheale, a Gram-negative bacterium, was isolated from 8-week-old turkeys with respiratory disease. The flock suffered 30% mortality and the main lesions included pneumonia and liver congestion. Both isolates had a biocode: 0-2-2-0-0-4 according to the commercial API 20NE system, and agglutinated chicken glutaraldehyde-fixed erythrocytes. Likewise, isolates were recognized by an antisera raised against a previously typed *O. rhinotracheale* isolate by plate agglutination and inhibition-hemagglutination tests. Isolates were included in an ERIC-PCR assay, showing the same amplicon patterns that were isolated from two broilers and one layer with *O. rhinotracheale*. Results obtained indicate that *O. rhinotracheale* could be an important agent in respiratory disease outbreaks in Mexican turkey farms.

Key words: *ORNITHOBACTERIUM RHINOTRACHEALE*, GRAM-NEGATIVE BACTERIUM, POULTRY DISEASES, TURKEYS.

Resumen

Se aisló *Ornithobacterium rhinotracheale*, bacteria gramnegativa, de pavos de ocho semanas de edad con enfermedad respiratoria. La parvada sufrió 30% de mortalidad y las principales lesiones incluyeron neumonía y congestión hepática. Ambos aislamientos tuvieron el biocódigo: 0-2-2-0-0-4 del sistema comercial API 20NE y aglutinaron eritrocitos de pollo fijados con glutaraldehído. Asimismo, los aislamientos fueron reconocidos por un antisuero elaborado para un aislamiento previamente tipificado de *O. rhinotracheale* mediante pruebas de aglutinación en placa e inhibición de la hemoaglutinación. Los aislamientos se incluyeron en un ensayo de ERIC-PCR, que mostró el mismo patrón de amplicones que el de dos aislamientos de *O. rhinotracheale* obtenido de pollos de engorda y uno de gallinas de postura. Los resultados obtenidos indican que *O. rhinotracheale* puede ser un agente importante de brotes de enfermedad respiratoria en explotaciones de pavos en México.

Palabras clave: *ORNITHOBACTERIUM RHINOTRACHEALE*, BACTERIA GRAMNEGATIVA, ENFERMEDADES DE LAS AVES, PAVOS.

Recibido el 5 de septiembre de 2002 y aceptado el 17 de febrero de 2003.

* Departamento de Investigación y Desarrollo, Biosíntesis Laboratorios, S. A., 50130, Toluca, Estado de México, México. E-mail: soriano@uaemex.mx

** Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma del Estado de México, 50000, Toluca, Estado de México, México.

The *Ornithobacterium rhinotracheale* bacterium has been associated with respiratory disease in wild birds and poultry. Infection is characterized by coryza-type signs, decreased growth and greater mortality in both broilers and turkeys. The main lesions encountered include pneumonia, pleuritis, and airsacculitis. Economic losses can be considerable when breeders are involved.¹

O. rhinotracheale was first described as a *Pasteurella*-like organism or as a pleomorphic, gram-negative, rod-shaped bacterium.² In 1994, Vandamme *et al.*³ proposed the new genus and species *O. rhinotracheale*. Since then, this bacterium has been recognized in the United States, France, Germany, United Kingdom, Belgium, Hungary, South Africa,³ Spain,⁴ Italy, The Netherlands, Israel,⁵ Austria,⁶ Canada,^{7,8} Japan,⁹ Peru¹⁰ and Turkey.¹¹ Recently, isolation of *O. rhinotracheale* from both broilers and layer hens in Mexico was reported.¹²

In the present study, two isolates of *O. rhinotracheale* from turkeys with respiratory disease were characterized by biochemical, phenotypic, serologic, and genetic tests, using an ERIC-PCR technique.

Eight-week-old, broiler turkeys from a farm located in Toluca, State of Mexico, Mexico, were submitted for diagnosis to the Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma del Estado de México. Turkeys showed anorexia, nasal discharge, and facial swelling (Figure 1), recording almost 100% morbidity and 30% mortality in the flock. At necropsy, facial swelling, and both liver and lung congestion were observed. Histopathologic lesions included pneumonia and diffuse coagulative necrosis in the liver, both of which had severe heterophilic infiltration, among other findings.

Bacteriologic study was carried out from infraorbital sinuses by plating onto 10% sheep blood agar at 37°C under microaerobic conditions (approximately 5-10% CO₂), obtaining two isolates of gram-negative, pleomorphic, rod-shaped bacteria (Figure 2). Both isolates showed oxidase positive, indole negative, and catalase negative activity and no growth on MacConkey plates. Biochemical properties were obtained by using a commercial API 20NE system,* as per manufacturer recommendations. Both isolates reacted positively in the urease, PNPG (*p*-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside) and oxidase tests, showing an API 20NE code of 0-2-2-0-0-4. No reactions were seen after 72 h of incubation at 37°C for the following tests: nitrate reduction, indole, arginine dihydrolase, β-glucosidase, protease, acidification of glucose, assimilation of glucose, mannose, mannitol, N-acetyl-glucosamine, maltose, gluconate, caprate, adipate, malate, citrate, and phenyl-

La bacteria *Ornithobacterium rhinotracheale* ha sido asociada con enfermedades respiratorias en aves silvestres y domésticas. La infección se caracteriza por producir un cuadro de coriza con disminución del crecimiento y mortalidad en pollos y pavos. Las lesiones principales que se presentan son: neumonía, pleuritis y aerosaculitis. Las pérdidas económicas pueden ser considerables en parvadas de reproductores.¹

O. rhinotracheale fue descrito originalmente como un microorganismo tipo *Pasteurella multocida*, o simplemente como una bacteria gramnegativa pleomórfica.² En 1994, Vandamme *et al.*³ propusieron el género y especie *O. rhinotracheale*. Desde entonces, esta bacteria ha sido reconocida en Estados Unidos de América, Francia, Alemania, Reino Unido, Bélgica, Hungría, Sudáfrica,³ España,⁴ Italia, Holanda, Israel,⁵ Austria,⁶ Canadá,^{7,8} Japón,⁹ Perú¹⁰ y Turquía.¹¹ Recientemente se informó que en México se encontró *O. rhinotracheale* en pollos de engorda y gallinas de postura.¹²

En el presente trabajo de investigación se caracterizaron dos aislamientos de *O. rhinotracheale*, obtenidos de pavos con enfermedad respiratoria, mediante pruebas bioquímicas, fenotípicas, serológicas y genéticamente, mediante una prueba de ERIC-PCR.

Para realizar el diagnóstico se remitieron pavos de engorda de ocho semanas de edad, procedentes de una granja localizada en Toluca, Estado de México, México, al Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal, de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, de la Universidad Autónoma del Estado de México. Se presentó anorexia, descarga nasal e inflamación facial en la parvada (Figura 1), que registró casi 100% de morbilidad y 30% de mortalidad. A la necropsia se observó inflamación facial, congestión pulmonar y hepática. Al estudio histopatológico, se observó neumonía, y en hígado, necrosis coagulativa difusa, en ambos casos con infiltración heterofílica severa, entre otros hallazgos.

El estudio bacteriológico se realizó a partir de senos infraorbitarios en placas de base de agar con 10% de sangre de ovino a 37°C bajo condiciones de microaerobiosis (aproximadamente 5%-10% de CO₂), con el cual se obtuvieron dos aislamientos de bacterias gramnegativas pleomórficas (Figura 2). Ambos aislamientos mostraron actividad oxidasa positiva, indol negativo y catalasa negativa, sin crecimiento en placas de MacConkey. Las propiedades bioquímicas de los aislamientos se obtuvieron mediante el sistema comercial API 20NE,* de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Los aislamientos dieron reacción positiva en las pruebas de ureasa, PNPG (*p*-nitrofenil-β-D-galactopiranosido) y oxidasa, con un biocódigo API 20NE de 0-2-2-0-0-4. En las siguientes pruebas incluidas en este sistema, no se observaron reacciones

* BioMérieux, Francia.



Figura 1. Pavo. Inflamación de senos infraorbitario y secreción nasal por la infección con *Ornithobacterium rhinotracheale*. Turkey. Swelling of the infraorbital sinus with nasal discharge caused by *Ornithobacterium rhinotracheale* infection.



Figura 2. Tinción de Gram. 100x. *Ornithobacterium rhinotracheale*. Gram stain. 100x. *Ornithobacterium rhinotracheale*.

acetate. This code was obtained for isolates of *O. rhinotracheale* from turkeys and chickens.⁵ Likewise, in a previous study that included ten Mexican isolates of *O. rhinotracheale* obtained from broilers and

después de 72 h de incubación a 37°C: Reducción de nitratos, indol, dihidrolasa de arginina, β-glucosidasa, proteasa, acidificación de glucosa, asimilación de glucosa, arabinosa, manosa, manitol, N-acetil-glucosamina, mal-

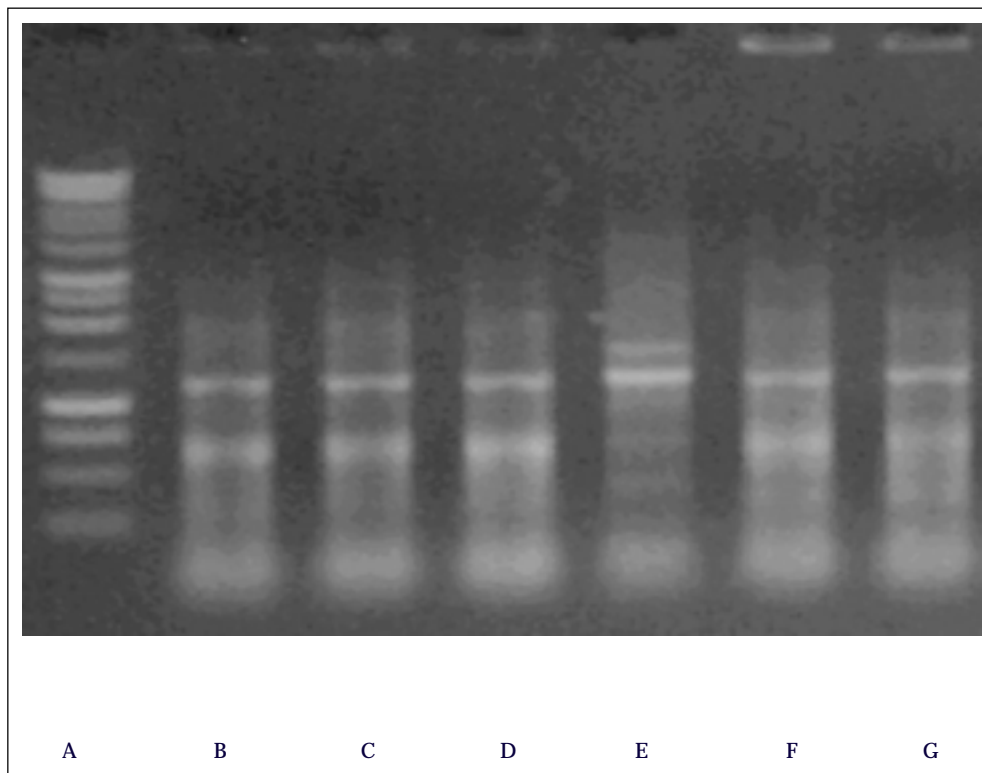


Figura 3. ERIC-PCR de *Ornithobacterium rhinotracheale*. Carril A, Marcadores de peso molecular, escala de 1 kbp. Carril B, aislamiento (C4) de *O. rhinotracheale* obtenido de pollo de engorda. Carril C, aislamiento (Teotihuacan) de *O. rhinotracheale* obtenido de pollo de engorda. Carril D, aislamiento (SY) de *O. rhinotracheale* obtenido de gallinas de postura. Carril E, cepa de referencia (221, serovar A-1) de *Haemophilus paragallinarum*. Carril F y G, aislamientos de *O. rhinotracheale* obtenidos de pavo.

ERIC-PCR fingerprints of *Ornithobacterium rhinotracheale*. Lane A, molecular weight markers, 1-kb DNA ladder. Lane B, isolate (C4) of *O. rhinotracheale* obtained from a broiler chicken. Lane C, isolate (Teotihuacan) of *O. rhinotracheale* obtained from a broiler chicken. Lane D, isolate (SY) of *O. rhinotracheale* obtained from a layer. Lane E, reference strain (221, serovar A-1) of *Haemophilus paragallinarum*. Lanes F and G, isolates of *O. rhinotracheale* obtained from turkeys.

layer hens, the same code was recorded.¹² Based on biochemical and enzymatic characteristics, both isolates were identified as *O. rhinotracheale*. These results suggest that biochemical properties in isolates of *O. rhinotracheale* are uniform, and that identification of this bacterium by using this system can be achieved.

For maintenance and production of the hemagglutinating antigen, brain-heart infusion broth supplemented with 1% heat-inactivated horse serum was used.¹² Cultures were incubated at 37° C for 18 to 24 h. Isolates obtained showed hemagglutinating activity using chicken glutaraldehyde-fixed erythrocytes. Hemagglutination tests were performed in 96-well, rounded-bottom microplates. The hemagglutination titers were obtained from antigen stocks with 512 units (expressed as the reciprocal of the highest dilution of antigen causing complete hemagglutination). Fitzgerald *et al.*, in 1998,¹³ first described the hemagglutinating activity of *O. rhinotracheale*. This feature was also seen in ten Mexican isolates of this bacterium obtained from broilers and layer hens.¹² These results suggest that the hemagglutination test could be an additional laboratory tool for *O. rhinotracheale* identification. On the other hand, the nature of the hemagglutinating determinant and its role in the pathogenesis of *O. rhinotracheale* are unknown.

Based on hemagglutinating activity of the isolates, hemagglutination-inhibition tests were performed by

tosa, gluconato, caprato, adipato, malato, citrato y fenilacetato. Este código se obtuvo de aislamientos de *O. rhinotracheale* de pavos y pollos.⁵ Asimismo, en un estudio que incluyó diez aislamientos de *O. rhinotracheale*, obtenidos de pollos de engorda y gallinas de postura en México, se registró el mismo biocódigo.¹² Con base en las características bioquímicas y enzimáticas, ambos aislamientos fueron identificados como *O. rhinotracheale*. Estos resultados sugieren que las propiedades bioquímicas en aislamientos de *O. rhinotracheale* son estables, y que es posible la identificación de dicha bacteria mediante el empleo de este sistema.

Para el mantenimiento y producción de antígeno hemoaglutinante, se empleó caldo infusión cerebro-corazón suplementado con 1% de suero inactivado de caballo.¹² Los cultivos fueron incubados a 37° C por 18 a 24 h. Los aislamientos obtenidos mostraron actividad hemoaglutinante empleando eritrocitos de pollo fijados con glutaraldehído. Las pruebas se realizaron en microplacas de 96 pozos de fondo redondeado. Los títulos hemoaglutinantes obtenidos de los concentrados de antígeno alcanzaron 512 unidades (expresado como el recíproco de la dilución más alta con hemoaglutinación completa). La actividad hemoaglutinante de *O. rhinotracheale* fue descrita originalmente por Fitzgerald *et al.* en 1998.¹³ En México también se observó esta característica en diez aislamientos de la bacteria, obtenidos de pollos de engorda y gallinas de postura.¹² Estos resultados sugieren que la prueba de hemoaglutinación puede ser una herramienta de labora-

using a previously produced antiserum raised for typification of an *O. rhinotracheale* isolate from broilers.¹² Both isolates were recognized by using this antiserum in slide agglutination tests. These results suggest that an antigenic relationship between these isolates could exist. A hemagglutination-inhibition test for identifying *O. rhinotracheale* isolates was recently described and appears to be a confident laboratory tool for this purpose.¹²

The obtained isolates were included in an ERIC-PCR (enterobacterial repetitive intergenic consensus-polymerase chain reaction). ERIC sequences are 126 base pairs long and appear to be restricted to transcribed regions of the bacterial genome in intergenic regions of polycistronic operons.¹⁴ Differences among amplified fragments represent polymorphism in the distances between repetitive elements of different bacterial genomes, and thus ERIC-PCR allows for the identification of interstrain genotypic diversity in a same bacterial species^{15,16} and has the potential to differentiate pathogens.¹⁷ This technique has been used in the genomic characterization of *O. rhinotracheale* isolates from Mexico. Results showed four patterns of amplicons among the ten isolates tested.¹⁸ In the current study three isolates were included: two recovered from broiler chickens and one from a layer. ERIC-PCR was performed as reported by Rafiee *et al.*¹⁹ The results obtained showed no differences in the amplicons of the five tested isolates (Figure 3). However, the amplicons were different to those from a *H. paragallinarum* isolate (221, serovar A-1)²⁰ included as control. These results suggest that *O. rhinotracheale* isolates, obtained from turkeys, could represent clones of isolates obtained from broilers and layers. Furthermore, the epidemiological relationship between these isolates is unknown. However, results obtained indicate that *O. rhinotracheale* causes respiratory disease in turkeys, as has been reported by others.¹

In conclusion, results obtained in this study indicate that *O. rhinotracheale* is present in Mexican poultry, and that it could be an important pathogen in turkey farms.

Referencias

1. Soriano VE, Fernández RP, Téllez IG. *Ornithobacterium rhinotracheale*: un agente patógeno emergente en avicultura. *Vet Méx* 2000;31:245-253.
2. Charlton BR, Channing-Santiago SE, Bickford A, Cardona CJ, Chin RP, Cooper GL, *et al.* Preliminary characterization of a pleomorphic gram-negative rod associated with avian respiratory disease. *J Vet Diagn Invest* 1993;5:47-51.
3. Vandamme P, Segers P, Vancanneyt M, van Hofe K, Muters R, Hommez J, *et al.* *Ornithobacterium rhinotrache-*

torio adicional para la identificación de *O. rhinotracheale*. Por otra parte, se desconoce la naturaleza del determinante hemoaglutinante, así como el papel de este antígeno en la patogenia de *O. rhinotracheale*.

Con base en la actividad hemoaglutinante de los aislamientos, se realizaron pruebas de inhibición de la hemoaglutinación, empleando un antisuero previamente elaborado para un aislamiento tipificado de *O. rhinotracheale* obtenido de pollos de engorda.¹² Ambos aislamientos fueron reconocidos por el antisuero en esta prueba y en pruebas de aglutinación en placa. Estos resultados sugieren que puede existir una relación antigénica entre estos aislamientos. La prueba de inhibición de la hemoaglutinación para identificar aislamientos de *O. rhinotracheale* fue descrita recientemente y parece ser una herramienta confiable para la identificación de esta bacteria.¹²

Los aislamientos obtenidos fueron incluidos en una prueba de ERIC-PCR (por sus siglas en inglés: *enterobacterial repetitive intergenic consensus-polymerase chain reaction*). Las secuencias ERIC son de 126 pares de bases de largo y parecen estar restringidas a regiones transcritas del genoma bacteriano, en regiones intergénicas de operones policistrónicos.¹⁴ Las diferencias en los fragmentos amplificados representan polimorfismo en las distancias entre los elementos repetitivos de diferentes genomas bacterianos, por lo que el ERIC-PCR permite la identificación de diversidad genotípica entre cepas de una misma especie bacteriana^{15,16} y tiene el potencial para diferenciar patógenos.¹⁷ Esta prueba ha sido empleada para la caracterización genómica de aislamientos de *O. rhinotracheale* en México. Los resultados mostraron cuatro patrones de amplicones en diez aislamientos estudiados.¹⁸ En el presente estudio se incluyeron tres aislamientos: dos obtenidos de pollo de engorda y uno de gallinas de postura. El protocolo de la prueba de ERIC-PCR se realizó de acuerdo con lo informado por Rafiee *et al.*¹⁹ Los resultados obtenidos no mostraron diferencias en los amplicones de los cinco aislamientos estudiados (Figura 3). Sin embargo, los amplicones fueron diferentes a los obtenidos para una cepa de *H. paragallinarum* (221, serovar A-1)²⁰ incluida como testigo. Estos resultados sugieren que los aislamientos de *O. rhinotracheale*, obtenidos de los pavos, pueden representar clones de los aislamientos obtenidos de pollos de engorda y gallinas de postura. Además, se desconoce la relación epidemiológica entre estos aislamientos. Sin embargo, los resultados obtenidos indican que *O. rhinotracheale* causa problemas de enfermedad respiratoria en los pavos, de acuerdo a lo informado en la literatura.¹

En conclusión, los resultados obtenidos en el presente estudio indican que *O. rhinotracheale* se encuentra presente en la avicultura comercial mexicana, y que puede ser un agente patógeno importante en explotaciones de pavos.

- ale* gen. nov., sp. nov., isolated from the avian respiratory tract. *Int J Syst Bacteriol* 1994;44:24-37.
4. Pagés A, Foix A, March R, Artigas C. Estudio bacteriológico de un agente asociado a problemas respiratorios en aves de producción: *Ornithobacterium rhinotracheale*. *Med Vet* 1995;12:585-588.
 5. Van Empel P, van den Bosh H, Loeffen P, Storm P. Identification and serotyping of *Ornithobacterium rhinotracheale*. *J Clin Microbiol* 1997;35:418-421.
 6. Hafez HM, Friedrich S. Isolation of *Ornithobacterium rhinotracheale* from meat turkey in Austria. *Tierarztl Umsch* 1998;53:500-502.
 7. Abdul-Aziz TA, Weber LJ. *Ornithobacterium rhinotracheale* infection in a turkey flock in Ontario. *Can Vet J* 1999;40:349-350.
 8. Joubert P, Higgins R, Laperle A, Mikaelian I, Venne D, Silim A. Isolation of *Ornithobacterium rhinotracheale* from turkeys in Quebec, Canada. *Avian Dis* 1999;43:622-626.
 9. Sakai E, Tokuyama Y, Nonaka F, Ohishi S, Ishikawa Y, Tanaka M, *et al.* *Ornithobacterium rhinotracheale* infection in Japan: preliminary investigations. *Vet Rec* 2000;146:502-503.
 10. Hung AL, Alvarado A. Phenotypic and molecular characterization of isolates of *Ornithobacterium rhinotracheale* from Peru. *Avian Dis* 2001;45:999-1005.
 11. Turan N, Ak S. 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* 2002;46:442-446.
 12. Soriano VE, Longinos MG, Navarrete PG, Fernandez RP. Identification and characterization of *Ornithobacterium rhinotracheale* isolates from Mexico. *Avian Dis* 2002;46:686-690.
 13. Fitzgerald SL, Greyling JM, Bragg RR. Correlation between ability of *Ornithobacterium rhinotracheale* to agglutinate red blood cells and susceptibility to fosfomicin. *Onderstepoort J Vet Res* 1998;65:317-320.
 14. Versalovic J, Koeuth T, Lupski JR. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res* 1991;19:6823-6831.
 15. Versalovic J, Woods CR, Georgiou PR, Hamill RJ, Lupski JR. DNA-based identification and epidemiologic typing of bacterial pathogens. *Arch Pathol Lab Med* 1993;117:1088-1098.
 16. Olive DM, Bean P. Principles and application of methods for DNA-based typing of microbial organisms. *J Clin Microbiol* 1999;37:1661-1669.
 17. Gomez-de-Leon P, Santos JI, Caballero J, Gómez D, Espinosa LE, Moreno I, *et al.* Genomic variability of *Haemophilus influenzae* isolated from Mexican children determined by using enterobacterial repetitive intergenic consensus sequences and PCR. *J Clin Microbiol* 2000;38:2504-2411.
 18. Soriano VE, Fernández RP, Blackall PJ. Caracterización genómica de *Ornithobacterium rhinotracheale* mediante la técnica de ERIC-PCR. 51st Western Poultry Disease Conference & XXVII Convención Anual de la Asociación de Especialistas en Ciencias Avícolas; 2002 mayo 1-4; Puerto Vallarta (Jalisco) México. México (DF): Asociación de Especialistas en Ciencias Avícolas, AC, 2002:57-58.
 19. Rafiee M, Bara M, Stephens CP, Blackall PJ. Application of ERIC-PCR for the comparison of isolates of *Haemophilus parasuis*. *Aust Vet J* 2000;78:846-849.
 20. Soriano VE, Blackall PJ, Dabo SM, Téllez G, Garcia-Delgado GA, Fernandez RP. Serotyping of *Haemophilus paragallinarum* isolates from Mexico by the Kume hemagglutinin scheme. *Avian Dis* 2001;45:680-683.