

Aus dem Institut für Geflügelkrankheiten
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

**Die Multilocus Sequenz Typisierung
als neue Methode zur
molekularen Charakterisierung
von *Ornithobacterium rhinotracheale***



Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Grades
eines Doktors der Veterinärmedizin
an der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Susann Thieme
Tierärztin aus Berlin

Berlin 2018
Journal-Nr.: 4018

Bibliografische Informationen der Deutschen Bibliothek

Die Deutsche Bibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie;
detaillierte bibliografische Daten sind im Internet abrufbar über
<http://dnb.ddb.de>

© 2018 by Verlag:

Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft Service GmbH, Gießen
Printed in Germany

ISBN 978-3-86345-412-8

1. Auflage 2018

Verlag:

DVG Service GmbH
Friedrichstraße 17
35392 Gießen
Tel.: 0641/24466
info@dvj.de
www.dvj.de

**Aus dem Institut für Geflügelkrankheiten
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin**

**Die Multilocus Sequenz Typisierung als neue Methode zur
molekularen Charakterisierung von *Ornithobacterium rhinotracheale***

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin**

**vorgelegt von
Susann Thieme
Tierärztin
aus Berlin**

**Berlin 2018
Journal-Nr.: 4018**

Gedruckt mit Genehmigung
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan:	Univ.-Prof. Dr. Jürgen Zentek
Erster Gutachter:	Univ.-Prof. Dr. Hafez Mohamed Hafez
Zweiter Gutachter:	Univ.-Prof. Dr. Marcus Fulde
Dritter Gutachter:	Prof. Dr. Monika Krüger

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus): poultry, Ornithobacterium rhinotracheale, epidemiology, animal health, multilocus sequence typing, databases

Tag der Promotion: 16.01.2018

INHALTSVERZEICHNIS

Inhaltsverzeichnis	
1 Einleitung	1
2 Literaturübersicht.....	3
2.1 <i>Ornithobacterium rhinotracheale</i> (ORT).....	3
2.2 Genotypisierung von Bakterien.....	9
3 Liste der Publikationen	29
4 Zusammenfassung der Ergebnisse	30
4.1 Molekulare Charakterisierung mittels Multilocus Sequenz Typisierung des Geflügelpathogens <i>Ornithobacterium rhinotracheale</i>	30
4.2 Multilocus Sequenz Typisierung von <i>Ornithobacterium rhinotracheale</i> , isoliert aus Tauben und Greifvögeln, eröffnet neue Einblicke in seine Populationsstruktur.....	31
5 Übergreifende Diskussion	32
6 Schlussfolgerungen.....	37
7 Zusammenfassung.....	38
8 Summary.....	40
9 Literaturverzeichnis	41
10 Anhang.....	51
10.1 Publikation 1.....	51
10.2 Publikation 2.....	64
11 Weitere Publikationen im Rahmen der Promotion	71
12 Danksagung.....	72
13 Selbstständigkeitserklärung.....	73

VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN

Abb.	Abbildung
AFLP	<i>engl.</i> amplified fragment length polymorphism
AGP	Agargelpräzipitationstest
AP-PCR	<i>engl.</i> arbitrarily primed polymerase chain reaction
bp	Basenpaar(e)
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
cDNA	komplementäre DNA (<i>engl.</i> complementary DNA)
cgMLST	<i>engl.</i> core genome multilocus sequence typing
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>engl.</i> Deoxyribonucleic acid)
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
eMLST	<i>engl.</i> extended multilocus sequence typing
engl.	Englisch
ET	Elektrophoresetypen
evtl.	eventuell
Fig.	Bild (<i>engl.</i> Figure)
g	Gramm
kbp	Kilobasenpaare
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
ml	Milliliter

VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN

MLEE	Multilocus Enzym Elektrophorese (<i>engl.</i> multilocus enzyme electrophoresis)
MLST	Multilocus Sequenz Typisierung (<i>engl.</i> multilocus sequence typing)
mRNA	Boten-RNA (<i>engl.</i> messenger RNA)
MVLST	Multi-Virulenz-Locus Sequenz Typisierung (<i>engl.</i> Multi-virulence-locus sequence typing)
ORT	<i>Ornithobacterium rhinotracheale</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>engl.</i> Polymerase chain reaction)
PFGE	Pulsfeld-Gelelektrophorese (<i>engl.</i> pulsed field gel electrophoresis)
PGNR	<i>engl.</i> pleomorphic gram negative rods
pmol	picomol
Publ.	Publikation
RAPD	<i>engl.</i> random amplified polymorphic DNA
Rep-PCR	<i>engl.</i> repetitive-element-PCR
RFLP	Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus (<i>engl.</i> restriction fragment length polymorphism)
RNA	Ribonukleinsäure (<i>engl.</i> Ribonucleic acid)
rrn	ribosomale RNA
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure (<i>engl.</i> ribosomal ribonucleic acid)
ST	Sequenztyp/en (<i>engl.</i> sequence type/s)
Tab.	Tabelle
USA	Vereinigte Staaten von Amerika (<i>engl.</i> United States of America)
wgMLST	<i>engl.</i> whole genome multilocus sequence typing
WGS	Gesamtgenomsequenzierung (<i>engl.</i> whole genome sequencing)

1 Einleitung

Die Erzeugung von Geflügelfleisch lag in Deutschland im Jahr 2015 bei über 1.500.000 t (Statistisches Bundesamt, 2016). Für eine hohe Produktivität, Effizienz und Wirtschaftlichkeit wird eine große Anzahl von Tiere zusammen gemästet. Die Besatzdichte bringt zahlreiche Herausforderungen in den Bereichen Tierschutz und Tiergesundheit mit sich. Die durch die Exkremete der Tiere bedingte feuchte Einstreu und hohe Ammoniakbelastung im Stall können Probleme für den Gesundheitszustand der Herde darstellen (Bessei, 2006). Für die Tierhalter hat jede Erkrankung der Tiere hohe wirtschaftliche Bedeutung.

Respiratorische Erkrankungen sind nach wie vor der bedeutendste Krankheitskomplex beim Geflügel. Unabhängig von ihrer Ursache führen sie zu hohen ökonomischen Verlusten durch erhöhte Medikamentenkosten, erhöhte Mortalität, erhöhte Verwurfraten bei der Schlachtung, geringere Gewichtszunahmen bzw. geringere Legeleistung und eine geringere Schlupfrate. Neben nicht-infektiösen Ursachen können verschiedene Viren, Bakterien oder Pilze kausal beteiligt sein. Zu einem Ausbruch der Erkrankung kommt es insbesondere, wenn Managementfaktoren, wie Lüftung, Besatzdichte und Hygiene nicht im optimalen Bereich liegen und/oder das Immunsystem der Tiere geschwächt ist.

Eine typische Faktorenkrankheit ist die Ornithobakteriose, hervorgerufen durch eine bakterielle Infektion mit *Ornithobacterium rhinotracheale* (ORT). ORT wurde erst 1994 klassifiziert, als Infektionen in verschiedenen Ländern Europas (Großbritannien, Frankreich, Belgien, Deutschland) (Dudouyt et al., 1995; Hafez et al., 1993), in den USA und in Südafrika beim Wirtschaftsgeflügel auftraten (Charlton et al., 1993; Vandamme et al., 1994). Bis heute wurde ORT in Geflügelhaltungen in zahlreichen Ländern und auf verschiedenen Kontinenten isoliert (Canal et al., 2005; Chou et al., 2009; Dudouyt et al., 1995; Ha et al., 2016; Joubert et al., 1999; Vandamme et al., 1994).

ORT ist nicht nur geografisch weit verbreitet, sondern zeigt auch ein breites Wirtsspektrum. Die Erkrankung tritt insbesondere bei Puten und Hühnern auf. Das Bakterium wurde auch bei zahlreichen Wild- und domestizierten Vogelarten isoliert, wie Wachteln, Rebhühnern, Fasanen, Chukarhühnern, Saatkrähen, Falken und Tauben (Charlton et al., 1993; Hafez & Lierz, 2010; Mirzaie & Hassanzadeh, 2013; Tsai & Huang, 2006; Vandamme et al., 1994). Die klinische Bedeutung von ORT ist bei diesen Vogelspezies unbekannt.

Da das klinische Bild einer ORT Infektion differentialdiagnostisch auch andere Erreger einschließt, ist eine Bestätigung durch ein Labor zwingend notwendig. Es ist möglich, ORT zu isolieren und über biochemische Testkits (API 20 NE, bioMérieux, Frankreich) zu identifizieren (Hafez, 2002). Eine sehr schnelle und spezifische Nachweismethode ist die PCR aus Probenmaterial über eine partielle Amplifizierung des 16S rRNA-Gens mit ORT-spezifischen

Primern (Van Empel et al., 1998a). Die weiterführende Sequenzierung und Sequenzanalyse ist wenig diskriminativ und daher für die Unterscheidung verschiedener ORT-Isolate nicht gut geeignet. Zum besseren Verständnis der Verwandtschaft der ORT-Isolate zueinander und zur weiteren Charakterisierung wurden in der Vergangenheit wiederholt Isolate phänotypisch und genetisch untersucht. Die ersten phänotypischen Untersuchungen umfassten neben Analysen der Kolonimorphologie und der biochemischen Eigenschaften auch Virulenz-, Sero- und Phagen-Typisierungen und antimikrobielle Empfindlichkeitstestungen. Um eng verwandte Isolate unterscheiden zu können, werden molekulargenetische Verfahren genutzt.

Für verschiedene Bakterienspezies wurden sogenannte DNA-Fingerprinting-Methoden etabliert. Verfahren wie Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus (RFLP), Ribotypisierung, und Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE) basieren auf der Auftrennung von verschieden großen DNA-Fragmenten eines Isolats. Die DNA-Fingerprints verschiedener Isolate können per Gelelektrophorese sichtbar gemacht und verglichen werden, um Verwandtschaftsverhältnisse zu analysieren. Die verschiedenen Methoden weisen je nach Bakterienspezies und Fragestellung Vor- und Nachteile in ihrer Durchführbarkeit, Reproduzierbarkeit und der Auswertbarkeit der Resultate auf. Bei einigen Bakterienspezies gilt die PFGE als „Gold-Standard“ (Gerner-Smidt et al., 2006; Olive & Bean, 1999), doch auch bei dieser Methode stellen insbesondere die Auswertung und die Übertragbarkeit der Ergebnisse zwischen verschiedenen Laboren gewisse Hindernisse dar.

Viele der oben genannten Methoden wurden zur Charakterisierung von ORT genutzt. Da aber meist nur wenige Isolate bzw. Isolate einer Herkunft oder Geflügelspezies untersucht wurden, sind die bisherigen Erkenntnisse stark begrenzt.

Die Multilocus Sequenz Typisierung (MLST) ist eine etablierte Methode in der Mikrobiologie, die für zahlreiche Bakterienspezies und einige Pilzarten erfolgreich zur Genotypisierung genutzt wird. Durch die sehr hohe Standardisierung und Reproduzierbarkeit und den einfachen Datenaustausch zwischen verschiedenen Laboren hat sich die MLST weltweit durchgesetzt (Feil & Enright, 2004).

Das Ziel dieser Arbeit war es, eine Multilocus Sequenz Typisierung für ORT zu entwickeln und anhand eines möglichst breit ausgewählten Spektrums an Isolaten die Methode für epidemiologische Untersuchungen zu etablieren. Das plötzliche Auftreten von ORT-Infektionen in Geflügelhaltungen, die hohe wirtschaftliche Bedeutung und schnelle weltweite Verbreitung werfen zahlreiche Fragen auf. In dieser Arbeit werden mittels der MLST 108 ORT-Stämme auf ihre Verwandtschaftsverhältnisse untersucht und die Ergebnisse mit Bezug zu Serotyp, Isolationsjahr, geografischer Herkunft und Vogelspezies diskutiert.

2 Literaturübersicht

2.1 *Ornithobacterium rhinotracheale* (ORT)

Geschichte

Ab September 1981 traten in verschiedenen Ländern Europas, in den USA und Südafrika respiratorische Erkrankungen bei Puten und Hühnern auf, die auf keinen bis dato bekannten Erreger zurückgeführt werden konnten (Charlton et al., 1993; Hafez et al., 1993; Hinz et al., 1994; Hinz & Hafez, 1997; van Beek et al., 1994). Es wurde bei diesen Fällen ein langsam wachsendes, Gram-negatives, pleomorphes Stäbchenbakterium aus Lunge und Luftsack isoliert. Biochemische Tests zeigten, dass es sich bei den Bakterienisolaten um eine neue Spezies handelte (Hafez et al., 1993), die anfänglich als Taxon 28 (van Beek et al., 1994), PNGR (*engl.* pleomorphic gram-negative rod) (Charlton et al., 1993), *Pasteurella*-ähnlich (Hafez et al., 1993) und *Kingella*-ähnlich (van Beek et al., 1994) bezeichnet wurde. 1994 erfolgte die taxonomische Klassifizierung von 21 Isolaten mit einer Neubeschreibung der Gattung und Spezies *Ornithobacterium rhinotracheale* gen. nov., sp. nov. (Vandamme et al., 1994). Seither ist ORT in zahlreichen Ländern weltweit nachgewiesen worden, darunter Brasilien, Peru, Kanada, Taiwan und Japan (Canal et al., 2005; Hung & Alvarado, 2001; Joubert et al., 1999; Sakai et al., 2000; Tsai & Huang, 2006).

Klassifikation

ORT gehört taxonomisch zur Familie der Flavobacteriaceae, die zwei weitere Bakterienspezies mit klinischer Bedeutung für das Geflügel (vor allem Enten und Gänse) beinhaltet: *Riemerella anatipestifer* und *Coenonia anatina* (Vandamme et al., 1994; Vandamme et al., 1999). Zu der Familie gehören die Genera *Flavobacterium*, *Bergeyella*, *Capnocytophaga*, *Chryseobacterium*, *Ornithobacterium*, *Riemerella* und *Weeksella* (Hafez & Vandamme, 2011). Bisher ist die Spezies der einzige Vertreter in der Gattung *Ornithobacterium*.

Wirtsspektrum

ORT konnte aus zahlreichen Vogelspezies isoliert werden, darunter vor allem Vertreter der Ordnung der Hühnervögel, wie Huhn, Pute, Chukarhuhn, Perlhuhn, Rebhuhn, Fasan und Wachtel. Die Isolierung gelang auch aus Vögeln verschiedener anderer Ordnungen, wie Ente, Gans (beide Ordnung Gänsevögel), Möwe (Regenpfeiferartige), Strauß (Laufvögel), Taube (Taubenvögel), Saatkrähe (Sperlingsvögel) und aus verschiedenen Greifvogelspezies

(Ordnung Greifvögel und Falkenartige) (Charlton et al., 1993; Gutzer et al., 2013; Szabo et al., 2015; Van Empel & Hafez, 1999; Vandamme et al., 1994). Die klinische Bedeutung von ORT als Krankheitserreger ist für Pute und Huhn hoch, für andere Vogelspezies bisher meist ungeklärt. Hier sind nur wenige Fallberichte von erkrankten Vögeln bekannt, bei denen ORT nachgewiesen werden konnte (Hafez & Lierz, 2010; Welchman et al., 2013). Ein Zusammenhang zwischen Isolat und Wirt in der Virulenz von ORT scheint bei Wirtschaftsgeflügel nicht zu bestehen. Die klinische Ausprägung der ORT-Stämme in Tierversuchen war vergleichbar, unabhängig ob sie aus Puten oder Hühnern isoliert worden waren und damit Puten oder Hühner infiziert wurden (Van Empel et al., 1996).

Übertragung

Die Übertragung erfolgt vor allem horizontal direkt oder indirekt mit einer Aufnahme der Bakterien über die Atemwege oder das Trinkwasser (Chin et al., 2013). Auch eine vertikale Übertragung erscheint möglich. ORT konnte bereits aus Ovarien, Ovidukt, unbefruchteten Eiern und Bruteiern, toten Embryos und „dead-in-shell“-Hühner- und Putenküken isoliert werden (Back et al., 1998; Tanyi et al., 1995; Van Empel, 1998). In einer Studie wurden Eier aus Broiler- und Puten-Elterntierherden mit ORT-Hintergrund bebrütet. Bei den geschlüpften Küken konnte ORT im Versuch trotz spezifisch-pathogenfreier Haltung nachgewiesen werden – allerdings nur, wenn die Tiere vorher mit lentogenem Newcastle Disease-Virus (Hühnerküken) oder Turkey Rhinotracheitis-Virus (Putenküken) infiziert wurden (Van Empel et al., 1998b). Van Veen et al. (2004) fanden in ihren Experimenten weitere klare Hinweise darauf, dass eine vertikale Übertragung möglich ist. Sie konnten bei Puten, die von ORT-ungeimpften Elterntieren stammten und die ab Eintagskükenalter in Isolatoren gehalten wurden, ORT bakteriologisch und immunhistochemisch nachweisen.

Klinische Symptomatik

Die Infektion mit ORT wird im Allgemeinen als Faktorenenerkrankung beschrieben. Der Ausbruch der Krankheit und die Art und Schwere der klinischen Symptome hängen sehr stark von Umgebungsfaktoren ab, wie Management, Ventilation, Besatzdichte, Einstreuqualität, Hygiene und Vorerkrankungen (Chin et al., 2013). In experimentellen Studien war eine Infektion oft nur erkennbar, wenn die Tiere vorher viral infiziert wurden (Travers, 1996; Van Empel et al., 1998b). Bei intratrachealer Applikation von ORT zeigten Broiler-Elterntiere und Fasane auch ohne virale Begleitinfektion histopathologische Veränderungen im

Respirationstrakt, die aber überwiegend keine klinischen Symptome bei den Tieren verursachten (Gavrilovic et al., 2016).

Bei einer Erkrankung der Tiere werden verschiedene Symptome sichtbar. Diese sind häufig unspezifisch und sehr variabel. Mögliche Krankheitssymptome sind ein leichter Anstieg der Mortalität, reduzierte Futtermittelaufnahme, respiratorische Symptome wie Schnupfen und Schnabelatmung, eine verringerte Legeleistung und verminderte Eischalenqualität (Hafez, 1996). Bei älteren Hühnern treten auch Arthritis, Osteitis und Osteomyelitis auf (Van Empel & Hafez, 1999). In einem Fallbericht wird von einer Osteomyelitis der Kopfknochen und einer eitrigen Entzündung der Ohren beim Rothuhn (*Alectoris rufa*) berichtet (Moreno et al., 2009). Im Iran konnte aus Broiler-Elterntieren mit ZNS-Symptomen ORT aus dem Gehirn isoliert werden (Banani et al., 2014). In Deutschland ist ein Fall beschrieben, in dem Puten eine Blepharokonjunktivitis zeigten (Korbel & Hafez, 2001).

Pathologisch-anatomische Untersuchung

Der Schwerpunkt der pathologischen Befunde liegt auf Veränderungen im Respirationstrakt. Es werden vor allem ein- oder beidseitige fibrinopurulente Pneumonien, Lungenödeme und Aerosacculitiden festgestellt (Hafez et al., 1993), begleitet von einer Perikarditis und Peritonitis.

Broiler-Elterntiere mit ZNS-Symptomen zeigten in der pathologischen Untersuchung eine Enzephalomeningitis (Banani et al., 2014). In einem anderen Fall wurden hochgradige Augenveränderungen beschrieben; u.a. periokulare Schwellungen, hochgradige Konjunktivitis und Blepharitis crustosa (Korbel & Hafez, 2001). In der experimentellen Infektion war einer der Hauptbefunde retardiertes Wachstum, während Veränderungen im Respirationstrakt nicht bei allen Tieren auftraten (Van Empel et al., 1996).

Diagnose

Aufgrund der variablen und unspezifischen Symptome einer ORT-Infektion muss für eine sichere Diagnose das Bakterium isoliert und identifiziert werden (Hafez, 2002). Für die Isolierung ist die richtige Probennahme entscheidend, da Begleitkeime wie z.B. *Escherichia coli*, *Proteus* und *Pseudomonas* spp. häufig schneller wachsen als ORT und dieses so nicht isoliert werden kann (Hafez, 2002). Für eine Isolierung eignen sich Proben von Trachea, Lunge und Luftsäcken. Experimentell konnte ORT nach der Infektion auch aus Leber, Milz, Ovarien und Ovidukt isoliert werden (Back et al., 1998).

In der Routinediagnostik ist der PCR-Nachweis von ORT-DNA im Probengut die sensitivste Nachweismöglichkeit und erfolgt über eine partielle Amplifizierung des 16S rRNA-Gens. Es wird ein 784 bp großes Fragment amplifiziert, das spezifisch für ORT ist (Van Empel et al., 1998a). Da die PCR eine einfache, kostengünstige und spezifische Methode ist, findet sie als diagnostisches Mittel zum Nachweis sehr häufig Anwendung. Die kulturelle Anzucht von ORT gelingt hingegen nicht immer und kann zu falsch-negativen Bewertungen führen. Die Unterschiede in der Sensitivität verschiedener Verfahren beim Nachweis vom ORT zeigte auch eine experimentelle Studie (Van Empel et al., 1999). Während ORT mittels einer Immunhistologie in 70% der Gewebeschnitte von Atemwegserkrankungen bei Broilerküken nachgewiesen wurde, bestätigten sich nur 30% der Fälle über eine Bakteriologie bzw. Serologie (Van Empel et al., 1999).

Erregerisolierung

Die Anzucht erfolgt auf 5%igem Schafblutagar unter mikroaerophilen Bedingungen bei 37°C über 48 Stunden (Van Empel & Hafez, 1999). Neuere Kultivierungsergebnisse haben gezeigt, dass einige Stämme einen höheren Blutanteil von mind. 7-10% in den Nährmedien für ein gutes Wachstum benötigen (Mühldorfer, persönliche Mitteilung). Ein weiteres Problem ist das Überwachsen durch andere Bakterien, die als Begleit- oder Kontaminationskeime im Probengut enthalten sind. Da ORT-Isolate eine hohe Gentamicin-Resistenz aufweisen (Hafez et al., 1993), kann durch die Zugabe von 5 µg/ml Gentamicin zu bluthaltigen Medien das Wachstum anderer Bakterien reduziert werden (Hafez, 2002).

Die Kolonien auf Schafblutagar sind klein, grau bis grau-weiß, rund und meist nicht hämolysierend (Van Empel & Hafez, 1999). In Nord-Amerika war bei ORT-Isolaten nach 48-stündiger, mikroaerophiler Inkubation bei 37°C und weiterer aerober Inkubation bei Raumtemperatur eine deutliche Hämolyse erkennbar (Tabatabai et al., 2010). ORT-Isolate weisen einen typischen Buttersäure-ähnlichen Geruch auf (Vandamme et al., 1994). Einige Isolate sind durch ein sehr feines und langsames Wachstum mit bis zu 72 Stunden Inkubationszeit charakterisiert und werden auch als small-colony variants bezeichnet, da sie nur nadelspitzengroße Kolonien bilden (Zahra et al., 2013).

In der Gram-Färbung zeigt sich ORT als Gram-negatives, pleomorphes Stäbchenbakterium (Van Empel & Hafez, 1999).

Phänotypisierung

In der Routinediagnostik wird jedes Bakterium einer Phänotypisierung unterzogen, die anhand der von den Mikroorganismen exprimierten Eigenschaften (Koloniemorphologie, Wachstum auf verschiedenen Nährmedien und unter verschiedenen Bedingungen) erfolgt (Bochner, 2009). Der Vorteil liegt in der leichten Durchführbarkeit und den geringen Kosten (Tenover et al., 1994), doch meist ist nur eine Unterscheidung auf Gattungs- oder Speziesebene möglich (geringe Diskriminationsfähigkeit) (Tenover et al., 1997). Zur Phänotypisierung von ORT eignen sich Reaktionen wie der Nachweis des Enzyms Cytochrom-c-Oxidase und das biochemische Testverfahren API 20 NE (bioMérieux, Frankreich). Die Reaktion zum Nachweis der β -Galactosidase ist bei allen Isolaten positiv. Die Oxidase-Reaktion fällt meist positiv aus und die Urease-Reaktion kann positiv sein (Codes 0220004, 0020004 und 0020000) (Günther et al., 2002; Van Empel et al., 1997).

Die Resistenztestung mittels Agardiffusion oder Bouillon-Mikrodilutionsverfahren gehört zur phänotypischen Charakterisierung, bei denen das Empfindlichkeitsmuster von ORT gegenüber verschiedenen Antibiotika dargestellt wird. Die Resistenztestung ist in der Regel einfach, preiswert und schnell durchführbar (Tenover et al., 1994), aber für ORT gibt es bisher aufgrund der anspruchsvollen Kulturbedingungen kein etabliertes und standardisiertes Verfahren (Gasche et al., 2015). Aus dem Resistenzverhalten der Isolate untereinander lassen sich keine Verwandtschaftsverhältnisse ableiten (Tenover et al., 1997).

Da der Phänotyp nicht grundsätzlich Rückschlüsse auf den Genotyp ermöglicht und phänotypische Marker nicht stabil exprimiert werden oder sich schnell durch Einflüsse auf die Genexpression (z.B. durch Wachstumsbedingungen) ändern, (Tenover et al., 1997) werden zur Charakterisierung von Isolaten Nukleinsäure-assoziierte Techniken phänotypischen Typisierungsmethoden vorgezogen (van Belkum et al., 2001).

Serotypisierung

Die am häufigsten genutzte Typisierungsmethode für ORT ist die Serotypisierung. Achtzehn Serotypen (A-R) werden bislang mit spezifischen Referenzseren nachgewiesen (Hafez, 2002; Van Empel et al., 1997). Die Serotypisierung wird im Agargelpräzipitationstest (AGP) durchgeführt (Hafez & Sting, 1999; Van Empel et al., 1997). Dabei wird das zu bestimmende Antigen auf einer Agarplatte in ein Stanzloch gegen definierte antikörperhaltige Seren aufgetragen. Bei einer positiven Reaktion wird eine Präzipitationslinie zwischen Antigen und Serum sichtbar. Serotyp A kommt bei ORT-Isolaten von Puten und Hühnern am häufigsten vor. Bei Hühnern wurden bis zu 94% der Isolate als Serotyp A identifiziert, bei Puten waren es

57% (Van Empel et al., 1997). Serotypen B, E und I treten öfter in Erscheinung, während andere Serotypen nur selten nachgewiesen werden (Van Empel et al., 1997). Das Verhältnis der Serotypen innerhalb der getesteten Isolate von Puten und Hühnern ist über die Jahre sehr konstant geblieben (Hafez, persönliche Mitteilung).

Die Serotypisierung von Bakterienisolaten ermöglicht keine Rückschlüsse für phylogenetische oder epidemiologische Studien, da durch horizontalen Gentransfer nicht verwandte Bakterienstämme identische Serotypen aufweisen können (Thieme et al., 2016b). Weitere Nachteile gegenüber einer Genotypisierung sind, dass manche Stämme mit den bisher vorhandenen Antiseren nicht typisiert werden können oder Kreuzreaktionen aufweisen (Van Empel et al., 1997).

2.2 Genotypisierung von Bakterien

Genetische Typisierungsmethoden umfassen DNA-Bandenmuster ergebende (=bandenbasierte) Verfahren, hybridisierungsbasierte und sequenzbasierte Verfahren (Li et al., 2009).

Nachfolgend werden mit Ausnahme der MLST die relevanten genetischen Verfahren zum besseren Verständnis stichpunktartig erläutert, um einen kurzen Überblick über das Prinzip und die Vor- und Nachteile zu geben.

A. Unterscheidung anhand der DNA-Bandenmuster („Fingerprints“)

Bei den folgenden Methoden werden verschiedene Isolate eines Bakteriums anhand der unterschiedlichen Größe von DNA-Fragmenten in der Gelelektrophorese unterschieden. „Fingerprint“-Methoden liefern wertvolle Erkenntnisse für epidemiologische Untersuchungen. Allerdings ist die Interpretation der Bandenmuster teilweise sehr schwierig und subjektiv und ein Austausch der Ergebnisse zwischen verschiedenen Laboren ist oft nicht möglich.

Methode: Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE)

Erste Beschreibung: Schwartz & Cantor (1984)

Ablauf:

- 1) Einbettung der Bakterien in Agarose mit anschließender Zellwandlyse
- 2) Fraktionierung der frei werdenden DNA mittels einer Endonuklease
- 3) Platzierung der Agarosestückchen in Agarosegel und Auftrennung der DNA-Fragmente mittels Gelelektrophorese

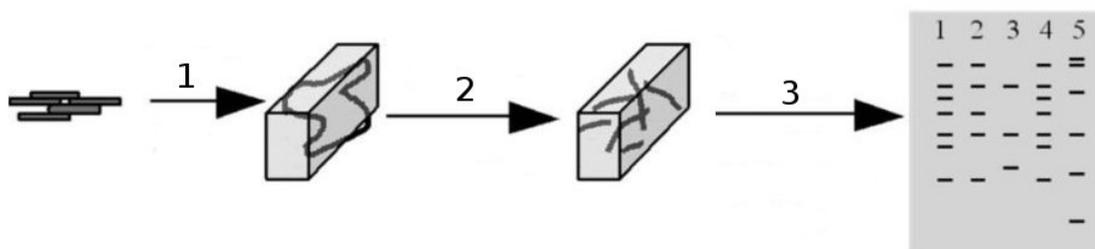


Abb. 1: Prinzip der Pulsfeld-Gelelektrophorese (modifiziert aus Foley et al., 2007, Fig. 3)

LITERATURÜBERSICHT

Vorteile:

- elektrophoretische Auftrennung 30-50 kbp großer Nukleinsäurefragmente (Schwartz & Cantor, 1984)
- sehr hohe Auflösung

Nachteile:

- Durchführung ist sehr zeit- und arbeitsaufwändig (Foley et al., 2007)
- Banden unter 10 kbp sind auf dem Gel nicht erkennbar
- Fragmente, die ähnlich weit wandern, aber unterschiedliches genetisches Material enthalten, können nicht unterschieden werden („Co-Migration“) (Davis et al., 2003)
- Verwandtschaften werden nach den Grundsätzen von Tenover (1995) nicht wahrgenommen, wenn zwei Isolate, die von einem gemeinsamen Vorgänger abstammen, sich jeweils geringfügig verändert haben (Davis et al., 2003)
- kleine Unterschiede in den Elektrophorese-Bedingungen (DNA-Konzentration im Agarosestanzloch, Agarosemenge im Gel, elektrische Spannung, Geltemperatur und Pufferkonzentration) können sich auf das Bandenmuster auswirken (Chung et al., 2000)
- Zusammenspiel der einzelnen Faktoren mindert die Reproduzierbarkeit und die Vergleichbarkeit der Ergebnisse (van Belkum et al., 1998)

Nutzen:

- Ausbruchdiagnostik (1995)
- häufig Gold-Standard in der Typisierung von Bakterienisolaten (Gerner-Smidt et al., 2006; Goering, 2010; Olive & Bean, 1999)

Methode: Amplified fragment length polymorphism (AFLP)

Erste Beschreibung: Vos et al. (1995)

Ablauf:

- 1) Zerschneiden der DNA durch zwei Restriktionsenzyme (*EcoRI* und *MseI*)
- 2) Ligation am überstehenden Ende mit entsprechenden Doppelstrang-Adapttern
- 3) PCR mit Ligator-Sequenz-Primer mit selektivem Nukleotid → Reduktion der Fragmentanzahl
(ohne Abbildung): PCR mit Primer mit 3 selektiven Nukleotiden → Gelelektrophorese

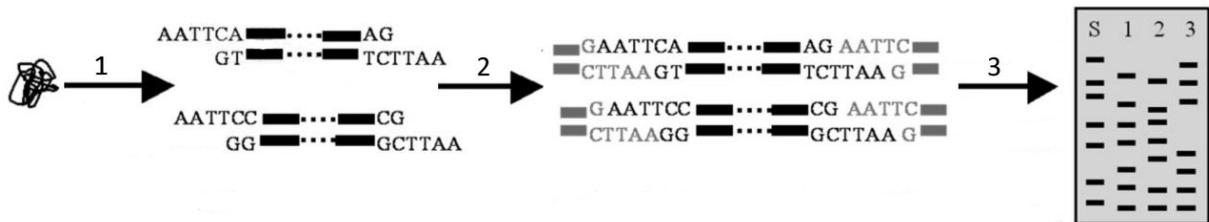


Abb. 2: Prinzip des Amplified fragment length polymorphism (modifiziert aus Foley et al., 2007, Fig. 4)

Vorteile:

- Unterschiede werden auf der gesamten Länge des Genoms erfasst und kleine Intraspezies-Unterschiede erkannt → Einsatz bei Genomanalysen von kürzlich entdeckten, wenig diversen Arten (Meudt & Clarke, 2007)
- kostengünstig (außer Anschaffung)
- einfach zu interpretieren (Vos et al., 1995)
- kein Vorwissen über die Sequenz des Templates nötig

Nachteile:

- DNA muss sehr rein sein, Kontaminationen werden detektiert
- Übertragbarkeit und Reproduzierbarkeit der Daten abhängig von der Nutzung gleicher Gerätschaften (Mortimer & Arnold, 2001)

Nutzen:

- Untersuchungen in der Populationsgenetik → Erstellen eines genetischen Fingerabdrucks
- phylogenetische Studien und evolutionäre Untersuchungen, insbesondere an Pflanzen, aber auch Tieren, Bakterien und Pilzen

Methode: Random amplification of polymorphic DNA (RAPD)

Erste Beschreibung: Williams et al. (1990)

Ablauf:

- 1) PCR mit 8-12 bp langen Primern mit zufälliger Sequenz; Amplifikation bei niedriger Temperatur (36°C) erlaubt unspezifische Bindung der Primer
- 2) Gelelektrophorese: Banden sind erkennbar, wenn die Primer an komplementären Strängen mit Abstand von 0,1-3 kbp liegen (Sabat et al., 2013)

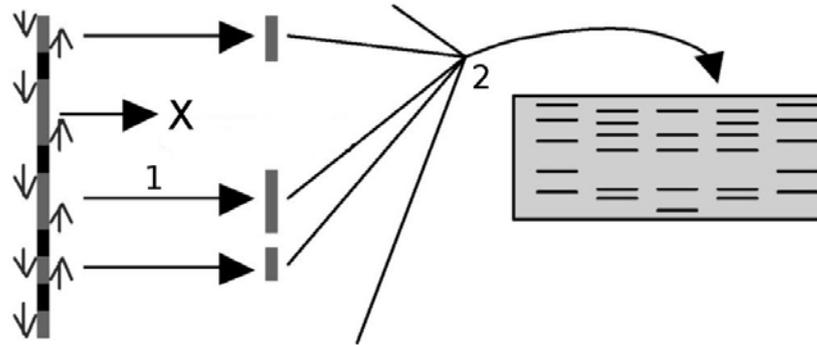


Abb. 3: Prinzip der Random amplification of polymorphic DNA-Methode (modifiziert aus Foley et al., 2007, Fig. 5);

X: kein PCR-Produkt, da die Primer an Stellen binden, die zu weit voneinander entfernt liegen.

Vorteile:

- einfach durchzuführen, schnell, günstig (Sabat et al., 2013)
- keine Kenntnis der Sequenz des Templates nötig

Nachteile:

- sehr anfällig für geringfügige Änderungen der Temperatur (Olive & Bean, 1999), Abweichungen der Salzkonzentrationen, der Konzentration und Reinheit des Templates (Welsh & McClelland, 1990), der Art von Thermocycler und *Taq*-Polymerase (Meunier & Grimont, 1993)
- Reproduzierbarkeit und Vergleichbarkeit der Ergebnisse abhängig von standardisierten Versuchsbedingungen → z.B. durch die Verwendung von Ready-To-Go RAPD analysis beads (Amersham Pharmacia Biotech, Deutschland) (Vogel et al., 1999)

Nutzen:

- für umschriebene Probleme (wie Krankheitsausbrüche) bei strikt definierten Bedingungen
- bei größeren Studien für den Austausch und Vergleich der Daten zwischen Laboren nicht geeignet

Methode: Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus (RFLP)

Erste Beschreibung: Thibodeau (1987)

Ablauf:

- 1) Verdau der DNA mit häufig schneidenden Restriktionsenzymen → hunderte kurze DNA-Fragmente → Gelelektrophorese
- 2) Verfahren nach Southern (Southern, 1975) → Sichtbarmachen weniger Banden (früher: radioaktive Markierung; heute: Enzym-Markierung oder Sichtbarmachen durch Chemilumineszenz oder Kolometrie) (Olive & Bean, 1999)

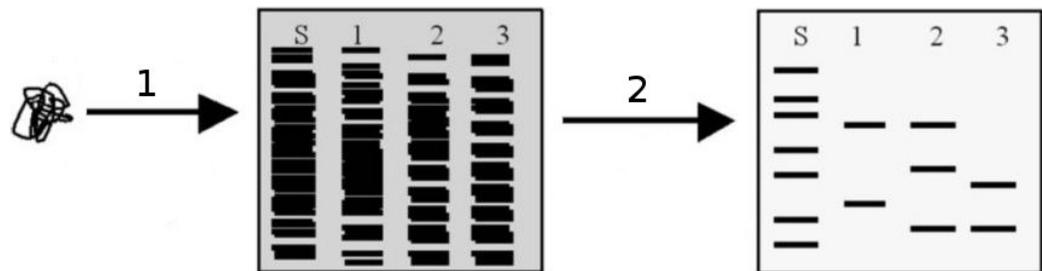


Abb. 4: Prinzip des Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus (modifiziert aus Foley et al., 2007, Fig. 2)

Vorteile:

- kostengünstig
- reproduzierbar
- einfach zu interpretieren
- kein Vorwissen über Sequenzen nötig

Nachteile:

- zeit- und arbeitsaufwändig
- große Mengen hoch qualitativer DNA nötig

Nutzen:

- Unterscheidung von Stämmen
- Ermittlung der genetischen Verwandtschaft von bakteriellen Erregern
- Gold-Standard für epidemiologische Studien von Bakterien des *Mycobacterium tuberculosis*-Komplexes (Jagielski et al., 2014; Kanduma et al., 2003)

Methode: Arbitrarily primed polymerase chain reaction (AP-PCR)

Erste Beschreibung: Welsh & McClelland (1990)

Ablauf:

- Variante der RAPD, wird heute nicht mehr von dieser differenziert (Li et al., 2009)
- zwei PCR-Zyklen bei geringer Annealing-Temperatur (35-50°C) über eine längere Zeitspanne (5 min) mit hoher Primerkonzentration
- 40 Zyklen unter Standardbedingungen (60°C, 60 sec) (Welsh & McClelland, 1990)

Die Vor- und Nachteile sind aufgrund des gleichen Versuchsaufbaus identisch mit denen der RAPD-Analyse.

Methode: Ribotypisierung

Erste Beschreibung: Grimont und Grimont (1986)

Grundlage:

- ribosomales RNA (*rrn*)-Operon: das rRNA-Gen ist selbst hochkonserviert und umgeben von variableren DNA-Regionen

Ablauf:

- Variante der RFLP
- sichtbar gemacht werden Fragmente des rRNA-Operons

Die Vorteile und Nachteile entsprechen denen der RFLP, die Diskriminationsfähigkeit mittels Ribotypisierung ist nicht sehr gut (Tenover et al., 1997).

Methode: Repetitive-element polymerase chain reaction (rep-PCR), auch repetitive sequence-based PCR

Erste Beschreibung: Versalovic et al. (1991)

Grundlage:

- sich wiederholende palindromische DNA im nicht-kodierenden Teil der DNA (Gilson et al., 1984; Hulton et al., 1991; Koeuth et al., 1995; Stern et al., 1984): 33-40 bp große REP (repetitive extragenic palindromic)-Elemente (Stern et al., 1984), 124-127 bp lange ERIC (enterobacterial repetitive intergenic consensus)-Sequenzen (Hulton et al., 1991; Sharples & Lloyd, 1990) und 154 bp große BOX-Elemente (Koeuth et al., 1995)
- genetisch sehr stabil, aber Anzahl und Lage auf dem Genom variieren (Sabat et al., 2013)

Ablauf:

- 1) PCR mit Primer für sich wiederholende Sequenzen
- 2) Gelelektrophorese

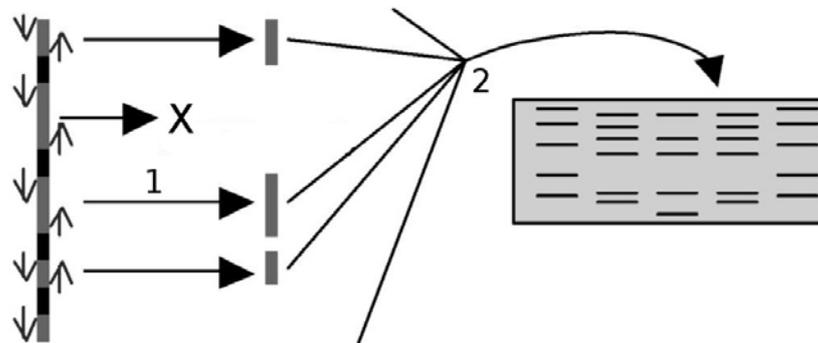


Abb. 5: Prinzip der Repetitive-element polymerase chain reaction (rep-PCR) (modifiziert aus Foley et al., 2007, Fig. 6);

X: kein PCR-Produkt, da die Primer an Stellen binden, die zu weit voneinander entfernt liegen

Vorteile:

- einfache und schnelle Durchführbarkeit
- geringe Kosten

Nachteile:

- Reproduzierbarkeit schlecht

Methode: Plasmid-Analyse

Grundlage:

- Plasmide = mobile extrachromosomale DNA-Moleküle, die spontan verloren gehen und leicht erworben werden können
- stehen häufig unter Selektionsdruck und verändern sich schnell
- Träger von Resistenz- und Virulenzgenen (Carattoli et al., 2014)

Ablauf:

- 1) Isolierung der Plasmide von anderen Zellfragmenten und der chromosomalen DNA
- 2a) Gelelektrophorese
- 2b) geringe Anzahl an Plasmiden → Verdau mit Restriktionsenzymen (Mayer, 1988) mit nachfolgender Gelelektrophorese

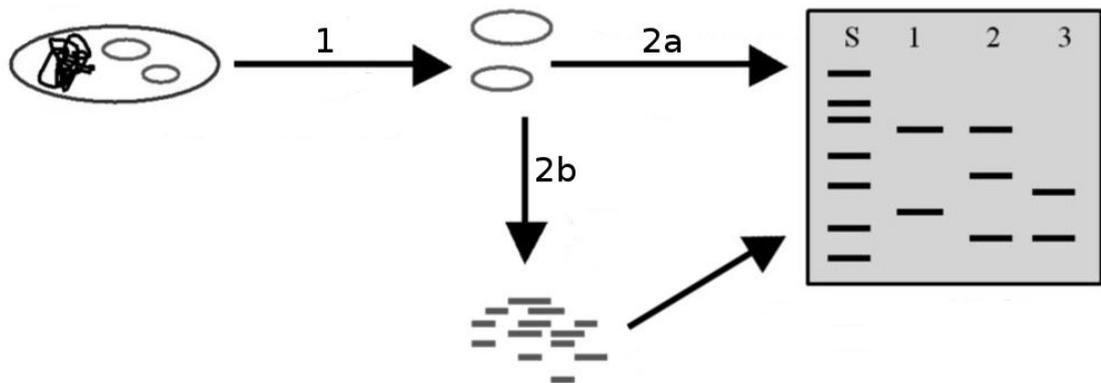


Abb. 6: Prinzip der Plasmid-Analyse (modifiziert aus Foley et al., 2007, Fig. 1)

Vorteile:

- einfach, schnell, kostengünstig

Nachteile:

- Herleitung von verwandtschaftlichen Beziehungen schwierig aufgrund des Plasmidcharakters

Nutzen:

- Analyse phänotypischer Merkmale, z.B. Antibiotika-Resistenz und Toxigene

B. Unterscheidung anhand hybridisierungsbasierter Methoden

Methode: Makro- und Mikroarray

Ablauf:

- Aufbringen von DNA-Oligonukleotiden bekannter Sequenz (=Sonden) auf einem Chip oder einem Objektträger
- positive Reaktion → Hybridisierung von Fluoreszenz-markierter Sonde und Zielsequenz (Aussage vorhanden/nicht vorhanden)
- Makroarray: bis zu 5000 Oligonukleotide; Mikroarray: bis zu einer Million „spots“ → Auflösung Mikroarray höher (aber teurer) (Li et al., 2009)

Vorteile:

- Analyse großer Abschnitte der DNA zu einem Zeitpunkt

Nachteile:

- Diversität innerhalb einer Spezies nicht immer ausreichend groß für eine Differenzierung (Garaizar et al., 2006)
- Bakteriengenom muss bekannt sein
- geringe Verfügbarkeit
- hohe Kosten → keine Etablierung in Routinediagnostik (Garaizar et al., 2006)

Nutzen:

- Untersuchung zur Genstruktur und Genexpression von Bakterien (Bier & Kleinjung, 2001)
- Untersuchung auf Resistenzgene (Zhang et al., 2007)
- Microarray z.B. für cDNA-Analysen (DNA, die mittels reverser Transkriptase aus RNA synthetisiert wird, z.B. mRNA um damit Expressionsmuster abzubilden) (Bier & Kleinjung, 2001); auch zur mikrobiologischen Diagnostik (Bodrossy & Sessitsch, 2004).
- Detektion von Bakterien allgemein bzw. spezieller Gene oder Transkriptome
- Typisierung von Bakterien durch Gesamtgenom-Analysen

C. Unterscheidung anhand Sequenzmethoden

Bei den folgenden Methoden werden Sequenzunterschiede zwischen Bakterienisolaten einer Spezies als Unterscheidungsmerkmale genutzt. Es werden unabhängig von der Fragmentgröße spezifische Veränderungen in der Sequenz analysiert (Foley et al., 2007). Da die Daten eine einfache Basenfolge darstellen, liegt bei gegebener Qualität die Reproduktion bei 100%. Die Auswertung kann objektiv erfolgen und die Übertragbarkeit ist einfach und eindeutig (Li et al., 2009). Große, öffentlich zugängliche Datenbanken (z.B. GenBank, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) mit zahlreichen Sequenzen stehen für Ähnlichkeitsuntersuchungen zur Verfügung. Nutzer können über das Internet weltweit darauf zugreifen und eigene Daten ergänzen (Li et al., 2009).

Methode: 16S rRNA-Genanalyse

Grundlage:

- 16S rRNA wird in allen Zellen für die Proteinsynthese benötigt → essentiell für das Überleben → codierendes Gen hochkonserviert (Clarridge, 2004)

Ablauf:

- PCR mit 16S rRNA-Primern → Sequenzierung
- Voll- (etwa 1500 bp) oder Teilsequenzierung

Vorteile:

- Universal-Primer für alle Bakterien
- einfach, schnell, kostengünstig
- hohe Sensitivität (Harmsen & Karch, 2004)

Nachteile:

- Identifizierung und Charakterisierung von Bakterienstämmen abhängig von der Qualität der Datenbank (Harmsen & Karch, 2004); zum Teil ausgeprägte Sequenzhomologien innerhalb einer Bakterienfamilie
- Diskriminationsfähigkeit eingeschränkt; ein einzelnes hochkonserviertes Gen kann nicht das ganze Genom eines Bakteriums abbilden

Nutzen:

- Verwandtschaftsverhältnisse innerhalb von Familien, einer Gattung und teilweise auch auf Speziesebene ermittelbar
- Identifizierung von klinischen Isolaten (Clarridge, 2004)
- Standard in der Charakterisierung von neuen Bakterienspezies (Stackebrandt et al., 2002)
- Differenzierungsmethode für phänotypisch schwer identifizierbare Bakterien oder für schwer kultivierbare Spezies, z.B. Mykobakterien (Harmsen & Karch, 2004)

Methode: Whole genome sequencing (WGS)

Erste Beschreibung: Fleischmann et al. (1995): *Haemophilus influenzae*

Ablauf:

- DNA-shearing: Fragmentierung genomischer DNA eines Bakterienisolats mechanisch oder mittels Ultraschall in Millionen kleine Sequenzteile (ca. 35-700 bp)
- Aufbau einer DNA-Bibliothek und Vervielfältigung der DNA Fragmente
- Sequenzierung: Zusammenfügen der Fragmente entweder anhand ihrer überlappenden Regionen (*de novo* assembly) oder durch den Vergleich mit bekannten „Referenzgenomen“ (Resequenzierung)
- bioinformatische Datenanalyse

Vorteile:

- gesamtes Genom eines Bakteriums wird bis ins Detail untersucht (Fournier et al., 2007)

Nachteile:

- zeitaufwendig und teuer, aber die Weiterentwicklung zu einer günstigen und schnellen Durchführung schreitet rasant voran (Koser et al., 2012; Loman et al., 2012)
- Auswertung der komplexen Datenmengen erfordert bioinformatische Kenntnisse

Nutzen:

- liefert umfassende Erkenntnisse zum Genomaufbau und dem Austausch von Gensequenzen
- ermöglicht Einblicke in die Physiologie, Virulenz- und Resistenzeigenschaften von Bakterien und in viele weitere Felder (Field et al., 2004)

Multilocus Sequenz Typisierung (MLST)

Für die MLST wird eine bestimmte Anzahl an Haushaltsgenen („housekeeping genes“) sequenziert. Haushaltsgene kommen im Genom von allen Bakterienspezies vor. Sie codieren für Enzyme und Strukturproteine, die für das Überleben von Bakterien essentiell sind (Maiden, 2006). Bereits eine veränderte Base in der Gensequenz kann eine Änderung der Tertiärstruktur des Proteins bewirken und zu einem Verlust der Enzymfähigkeit führen. Bakterien mit einer entsprechenden Mutation sterben und im Laufe der Zeit akkumulieren sich fast nur stille Mutationen in der Bakterienpopulation. Auf Haushaltsgene wird kein starker Selektionsdruck ausgeübt, der eine schnelle Sequenzänderung bewirken könnte, daher verändern sich die Sequenzen über längere Zeit relativ langsam („stabilisierende Selektion“) (Bennett et al., 2007; Spratt, 1999). Die bleibende Variabilität in einem Gen und die Kombination mehrerer Haushaltsgene ermöglicht die Unterscheidung (Foley et al., 2007) und einen globalen Vergleich von Isolaten (Enright & Spratt, 1999; Spratt, 1999). Die Anzahl der analysierten Haushaltsgene der MLST variiert. Die meisten etablierten MLSTs umfassen sieben Gene, da hier der Zeit-Kosten-Nutzen-Faktor am höchsten ist (Enright & Spratt, 1999; Maiden, 2006). Zur Typisierung werden Polymorphismen an verschiedenen Stellen des Genoms genutzt. Die Gene sollen dabei möglichst weit über das Genom verteilt sein und so das Bakterium repräsentieren (Caugant, 2001; Cooper & Feil, 2004; Struelens, 1996). Als Untersuchungsmaterial am besten geeignet ist die von Isolaten gewonnene saubere DNA. Es ist auch eine Analyse direkt aus Probenmaterial möglich (Caugant, 2001), was vor allem für schwer kultivierbare Bakterien genutzt wird und eine Zeitersparnis bis zum Erhalt der Ergebnisse ermöglicht. Jedes Haushaltsgen eines Isolates wird mittels PCR amplifiziert und das entstandene Produkt vorwärts und rückwärts sequenziert. Der aus beiden Sequenzierungen übereinstimmende Teil wird für die Auswertung genutzt. Die Fragmentlänge von meist 450-500 bp kann sicher von einem einzelnen Primerpaar erreicht werden und ermöglicht eine gute Auflösung (Enright & Spratt, 1999).

Unterschiedliche Sequenzen zwischen den Isolaten in einem Haushaltsgen werden als Allele bezeichnet. Die verschiedenen Allele eines Haushaltsgens werden in der MLST aufsteigend nummeriert, übereinstimmende Sequenzen erhalten identische Allelnummern. Jedes unterschiedliche Allel, egal ob die Unterschiede in nur einer Base oder zahlreichen Basen liegen, bekommt eine fortlaufende Nummer. Die Allelnummer ist ungewichtet (Enright & Spratt, 1998; Spratt, 1999). Die Allele der verschiedenen Haushaltsgene werden in der MLST als Einheit betrachtet und bilden das Allelprofil eines Isolats. Jedes Allelprofil bekommt abschließend einen Sequenztyp zugewiesen, der ebenfalls fortlaufend nummeriert wird und alle Isolate mit identischem Allelprofil repräsentiert. Die Variationen innerhalb der Gene

können teilweise Milliarden verschiedener Allelprofile erzeugen (Enright & Spratt, 1999; Urwin & Maiden, 2003).

In der Analyse werden die verschiedenen Allelprofile miteinander verglichen und die Verwandtschaftsverhältnisse mit eBURST dargestellt (Spratt et al., 2004). Das Programm ermittelt den vermutlichen Ursprungstamm, der die meisten Isolate mit nur einem abweichenden Allel (SLVs: single locus variants) beinhaltet (<http://eburst.mlst.net/>). Bei einer geringen Anzahl an Isolaten bietet es sich an, die Sequenzen der Haushaltsgene aneinanderzureihen und über einen Sequenzvergleich die Verwandtschaftsverhältnisse in einem phylogenetischen Baum darzustellen.

Die MLST wurde erstmals 1998 für *Neisseria meningitidis* beschrieben (Maiden et al., 1998). Da es bei diesem Bakterium häufig zu einer genetischen Rekombination kommt, die eine Aufschlüsselung der Verwandtschaftsverhältnisse schwierig macht, werden für epidemiologische Analysen Haushaltsgene genutzt, welche kaum einer Rekombination ausgesetzt sind. Die ungewichtete Allel-Nummerierung bewirkt, dass durch Rekombination veränderte Allele genauso bewertet werden, wie durch Mutation unterschiedene (Spratt, 1999). Entwickelt wurde die MLST aus der Multilocus Enzym Elektrophorese (MLEE). In diesem Verfahren wurden die Proteinprodukte der Haushaltsgene anhand ihrer Molekülgröße mittels Gelelektrophorese aufgetrennt (Selander et al., 1986). Genetische Unterschiede wurden dabei nur indirekt erkannt. Stille Mutationen konnten nicht festgestellt werden, sondern nur jene, die einen Einfluss auf die elektrophoretische Mobilität des Genprodukts hatten (Caugant, 2001). Nachteilig war, dass Enzyme mit derselben elektrophoretischen Mobilität nicht unterschieden werden konnten. Die Methode war technisch sehr anspruchsvoll und schwierig zu standardisieren, so dass ein Vergleich von Daten zwischen verschiedenen Laboren und eine Etablierung in der Routinediagnostik nicht realisiert werden konnte (Enright & Spratt, 1999; Urwin & Maiden, 2003). Aus der MLEE wurde die MLST abgeleitet, die häufig Enzym-codierende Gene nutzt (Caugant, 2001). Die Auflösung bei gleicher Anzahl an Gen-Loci ist im Vergleich zur MLEE bei der MLST um ein Vielfaches höher (Feil & Enright, 2004; Urwin & Maiden, 2003).

Die Ergebnisse der MLST sind hoch reproduzierbar, da etablierte PCR-Protokolle und resultierende Gensequenzen für die Auswertung genutzt werden (Enright & Spratt, 1999). Die Sequenzen werden durch einfache Buchstaben- und Zahlenkombinationen bewertet und sind über öffentliche Datenbanken sehr leicht übertragbar (Feil & Enright, 2004). Die beiden größten Datenbanken (<http://pubmlst.org> und www.mlst.net) enthalten MLST-Verfahren für eine Vielzahl an verschiedenen Bakterien, deren Allelprofile teilweise bereits weit über 100.000 Isolate beinhalten (Jolley & Maiden, 2010). Jede Einrichtung, die MLST-Daten generiert, kann weitere Isolate hinzufügen. Neue MLST-Schemata können ebenfalls sehr einfach in den

Datenbanken ergänzt werden. Die webbasierten Datenbanken ermöglichen somit einen einfachen weltweiten Vergleich von Isolaten einer Bakterienspezies (Jolley & Maiden, 2010). Weitere Parameter, wie z.B. Wirtsspezies, Untersuchungsmaterial, Herkunftsland und -region, Serotyp und Virulenzeigenschaften können wertvolle Erkenntnisse für epidemiologische Fragestellungen liefern (Cooper & Feil, 2004; Spratt, 1999). Die Grenzen der MLST liegen in der Bewertung lokaler, kurzfristiger Krankheitsausbrüche und der Möglichkeit einer lokalen Bestandsüberwachung (Foley et al., 2007), da mehrere Einzelgene untersucht werden und diese nicht so hoch auflösend sind wie das Gesamtgenom.

Die MLST wurde bereits erfolgreich für zahlreiche Bakterienspezies und einige Eukaryoten etabliert, wie z.B. verschiedene *Candida*-Arten, *Trichomonas vaginalis* oder höhere Lebewesen, wie *Clonorchis sinensis* (chinesischer Leberegel) (Jolley & Maiden, 2010). Für *Enterococcus faecium* gilt sie bereits als Gold-Standard in der Typisierung (Homan et al., 2002; Leavis et al., 2006).

MLST-Abwandlungen

Für erweiterte Analysen, mit höherer Auflösung, können zusätzliche Gene mit eingeschlossen werden. So wurde z.B. von Clark et al. (2005) für *Campylobacter jejuni* das Antigen-kodierende und damit variabelere Gen *fla-SVR* zusätzlich zur MLST sequenziert.

Bei der Multi-Virulenz-Locus Sequenz Typisierung (*engl.* multi-virulence-locus sequence typing, MVLST oder MLST-v) handelt es sich um eine MLST, die auf einer Sequenzanalyse von verschiedenen Virulenzgenen und nicht auf Haushaltsgenen basiert. Die MVLST ermöglicht eine feinere Differenzierung über Virulenzfaktoren, bei der auch kurzfristige Änderungen im Genom erkennbar sind. Das Verfahren wurde erfolgreich für *Listeria monocytogenes* etabliert, nachdem mit der MLST dort keine ausreichende Trennschärfe erreicht werden konnte (Zhang et al., 2004). Für *Salmonella enterica* subsp. *enterica* versuchte man über eine MVLST die Serotypisierung zu ersetzen (Tankouo-Sandjong et al., 2007). Die Kombination von vier spezifischen Genen bietet eine gute Alternative zur klassischen Serotypisierung und zeigt teilweise sogar Vorteile, da sich beispielsweise durch die genetische Differenzierung der Gentransfer („Serotypen-switching“) zwischen Isolaten besser nachvollziehen lässt (Tankouo-Sandjong et al., 2007).

Neuere Ansätze basieren auf den Daten der Genomsequenzierung und nutzen zur Typisierung erweiterte Verfahren, wie extended MLST (eMLST) (Larsen et al., 2012), core genome MLST (cgMLST) oder whole genome MLST (wgMLST) (Maiden et al., 2013). Der Vorteil liegt in der enorm hohen Auflösung, da eine Vielzahl von Genloci (>500) zur

Feintypisierung genutzt werden können. Allerdings sind diese Analysen sehr zeit- und kostenintensiv und können nicht von allen Einrichtungen umgesetzt werden.

Für welche Typisierungsmethode entscheidet man sich?

Immer wieder werden neue Typisierungsmethoden entwickelt, um Krankheitserreger standardisiert in kurzer Zeit, mit geringem Aufwand und hohem Nutzen zu charakterisieren (Achtman, 1996; Maiden et al., 2013; Medini et al., 2008). Folgende grundlegende Eigenschaften werden bei der Entwicklung einer geeigneten Methode angestrebt: eine universelle Anwendbarkeit und Validität, eine hohe Diskriminierungsfähigkeit, eine hohe Reproduzierbarkeit und eine kostengünstige, schnelle und einfache Durchführbarkeit (Li et al., 2009). Da bisher keine Typisierungsmethode alle Parameter erfüllt, muss je nach Untersuchungsgrund, der Dringlichkeit der Ergebnisse und finanziellen und technischen Möglichkeiten zwischen etablierten Methoden gewählt werden (Struelens, 1998; van Belkum et al., 2001).

Phänotypische Eigenschaften, wie die Erregermorphologie, biochemische Profile, antimikrobielle Empfindlichkeitstestungen und Serotypisierungen können erste Anhaltspunkte zur Identifizierung und Unterscheidung von Isolaten geben (Tenover et al., 1994). Für eine detaillierte, weiterführende Charakterisierung von Isolaten einer Spezies und zur Ermittlung von Verwandtschaftsverhältnissen sind genetische Verfahren entscheidend. Die Gesamtgenomsequenzierung stellt dabei eine sehr hoch auflösende Technik dar (Li et al., 2009), die trotz neuer Innovationen nach wie vor in der Anschaffung des Equipments, in der Durchführung und Auswertung sehr zeit- und preisintensiv ist (Loman et al., 2012). Die PFGE ist eine für epidemiologische Analysen häufig genutzte Methode und wird für viele Bakterien standardmäßig eingesetzt (Gerner-Smidt et al., 2006; Olive & Bean, 1999). Die Auflösung ist hoch, teilweise sogar zu diskriminativ für Langzeituntersuchungen (Maiden et al., 1998) und ihre Reproduzierbarkeit im Vergleich zu sequenzbasierten Verfahren ist begrenzt.

Die MLST eignet sich sehr gut für große länder- und kontinentübergreifende epidemiologische Untersuchungen. Die Reproduzierbarkeit ist sehr hoch, die Übertragung und fortlaufende Ergänzung der Daten kann einfach über das Internet vorgenommen werden, weshalb die Methode in der Anwendung sehr attraktiv ist (Li et al., 2009; Maiden, 2006).

Für ORT etablierte Methoden und Ergebnisse

Seit der Erstbeschreibung von ORT in 1994 wurden zahlreiche Typisierungsverfahren entwickelt und genutzt, um ein besseres Verständnis für diesen neuartigen Krankheitserreger zu bekommen. Tabelle 1 zeigt eine Übersicht über die bisher durchgeführten Untersuchungen von ORT durch verschiedene Typisierungsverfahren.

Die bisherigen Untersuchungen basieren teilweise auf gering auflösenden Methoden, wie der 16S rRNA-Genanalyse oder auf verschiedenen bandenbasierten Methoden, deren Ergebnisse häufig nicht bzw. schlecht auf andere Labore übertragbar sind, wodurch die Auswertung zahlreicher Isolate in verschiedenen Laboren nicht miteinander in Verbindung gebracht werden kann. Diese Möglichkeit ist aber insbesondere für ORT von entscheidender Bedeutung, da die rasante weltweite Verbreitung und die hohe wirtschaftliche Relevanz beim Geflügel epidemiologische Fragestellungen aufwerfen und ein weltweiter Vergleich von Isolaten erstrebenswert ist.

LITERATURÜBERSICHT

Tabelle 1: Untersuchungen zur molekulargenetischen Typisierung von *Ornithobacterium rhinotracheale*

Studie	Land	Anzahl der Isolate	Tierart ¹	Methode	Ergebnisse und Schlussfolgerung
Van Empel et al., 1997	NL	443	Huhn (248), Pute (192), Ente (1), Perlhuhn (1), Rebhuhn (1)	Serotypisierung	sieben verschiedene Serotypen, Serotyp-Kreuzreaktionen und fünf nicht typisierbare Isolate; Putenisolate heterogener in der Serotypzugehörigkeit als Hühnerisolate; Herleitung möglicher Beziehungen zwischen Serotyp und Herkunft, keine Wirtsspezifität der Serotypen ersichtlich
Amonsin et al., 1997	USA	55	Pute (42), Huhn (8), Saatkrähe (3), Perlhuhn (1), Rebhuhn (1)	MLEE	sechs Elektrophoresetypen (ET), 85,5% der Isolate gehören zu ET1, Isolate von Saatkrähen und Perlhühnern nicht in der Hauptgruppe
				rep-PCR	zwei Typen dominierend (beinhalten 90,9% der Isolate), Isolate von Saatkrähen und Perlhühnern nicht in der Hauptgruppe
				16S rRNA-Genanalyse	alle Isolate über 99% identisch
				Schlussfolgerung	Isolate aus Wirtschaftsgeflügel erscheinen eng verwandt, Isolate aus anderen Vogelspezies weniger nah verwandt; evtl. zirkuliert ORT bereits länger in Wildvögeln, Eintrag in Wirtschaftsgeflügel wird vermutet
Van Empel et al., 1998a	NL	56	Pute (42), Huhn (11), Ente (1), Perlhuhn (1), Rebhuhn (1)	AFLP	Tendenz zu bestimmten Serotypen in bestimmten Clustern; mögliche Einteilung von ORT in drei (Sub-) Spezies wird diskutiert

LITERATURÜBERSICHT

Studie	Land	Anzahl der Isolate	Tierart ¹	Methode	Ergebnisse und Schlussfolgerung
Leroy-Setrin et al., 1998	Fr	23	Pute (15), Huhn (4), Fasan (2), Perlhuhn (1), Rebhuhn (1)	Plasmid-Analyse	keine Detektion von Plasmiden → ungeeignete Methode
				Ribotypisierung	15 der 23 Isolate nicht voneinander unterscheidbar
				RAPD	gutes Unterscheidungs-niveau
Popp, 2003	D	120	Pute (77), Huhn (24), Fasan (2), unbekannt (17)	PFGE	hohe Auflösung, enge Verwandtschaft der Isolate, Isolate mit gleichen Serotypen sind trotz unterschiedlicher geographischer Herkunft häufig zusammen in Clustern angeordnet
Koga & Zavaleta, 2005	Peru	25	Huhn (25)	rep-PCR	alle 25 Isolate identisch
Ozbey et al., 2005	Türkei	11	Huhn (6), unbekannt (5)	RAPD	keine eindeutige Korrelation zwischen Serotyp und RAPD-Muster
Tsai & Huang, 2006	Taiwan	31 ²	Huhn (17), Taube (7), Pute (4), Saatkrähe (2), Perlhuhn (1)	16S rRNA-Genanalyse	hohe Ähnlichkeit mit bekannten GenBank-Sequenzen Stammbaum enthält drei Cluster: 1) Taubenisolate; 2) taiwanesische Hühnerisolate; 3) verschiedene Isolate (Hühner, Puten, Saatkrähe und Perlhuhn)

LITERATURÜBERSICHT

Studie	Land	Anzahl der Isolate	Tierart ¹	Methode	Ergebnisse und Schlussfolgerung
Thachil et al., 2007	USA	58	Pute (50), unbekannt/ Serotyp-Referenzstämme (8)	Serotypisierung	32 Isolate mit Serotyp A, 11 Isolate mit Serotyp C, sieben Isolate mit Serotyp I; acht Serotyp-Referenzstämme
				ERIC-PCR (spezielle Form der rep-PCR)	fünf verschiedene Fingerprints für acht Serotyp-Referenzstämme sechs verschiedene Fingerprints für 58 Isolate
				RAPD	sieben verschiedene Fingerprints für acht Serotyp-Referenzstämme; neun verschiedene Fingerprints für 58 Isolate
Waldow, 2009	D	134	Pute (117), unbekannt/ Serotyp-Referenzstämme (17)	RAPD	nicht alle Serotyp-Referenzstämme können voneinander unterschieden werden; Isolate desselben Serotyps zeigten häufig sehr unterschiedliche Bandenmuster → keine eindeutige Korrelation zwischen Serotyp und RAPD-Muster
Chou et al., 2009	Taiwan	94	Huhn (57), Pute (15), Taube (13), Wachtel (6), Strauß (2), Schopfabicht (1)	RAPD	deutliche Unterscheidungsfähigkeit, Tendenz zu wirtsspezifischen Clustern
				SE-AFLP	deutliche Unterscheidungsfähigkeit, Tendenz zu wirtsspezifischen Clustern
				16S rRNA-Genanalyse (n=50)	hohe genetische Ähnlichkeit

LITERATURÜBERSICHT

Studie	Land	Anzahl der Isolate	Tierart ¹	Methode	Ergebnisse und Schlussfolgerung
Numee et al., 2012	D	17 ³	Ohne klare Zuordnung	16S rRNA-Genanalyse	hohe Ähnlichkeit der Isolate; Cluster mit verschiedenen Serotypen, keine Unterscheidung der Serotypen anhand der Sequenzen möglich
Mirzaie & Hassanzadeh, 2013	Taiwan	20	Pute (6), Huhn (6), Taube (3), Saatkrähe (2), Wachtel (1), Perlhuhn (1), Rebhuhn (1)	16S rRNA-Genanalyse	hohe Ähnlichkeit der Isolate; Taubenisolate größtenteils abgegrenzt; Isolate verschiedener geografischer Herkunft und verschiedener Vogelspezies zusammen in einem Cluster
Pena-Vargas et al., 2016	Mexiko	9 Serotyp-Referenzstämme + 23 mexikanische Isolate	Huhn (23), Pute (7), Pfau (2)	Serotypisierung, ERIC-PCR (spezielle Form der rep-PCR)	alle mexikanischen Isolate wurden Serotyp A zugeordnet; alle mexikanischen Isolate wurden ERIC-PCR-Genotyp VIII (Referenzstämme zu I-VII) zugeordnet

¹ Die Anzahl in Klammern gibt jeweils die Nummer der Isolate an.

² 23 eigene Isolate, 8 Sequenzen aus der GenBank

³ Anzahl der in die 16S rRNA-Genanalyse einbezogenen Isolate

D – Deutschland, Fr – Frankreich, NL – die Niederlande, USA – United States of America (Vereinigte Staaten von Amerika)

3 Liste der Publikationen

Diese kumulative Dissertation basiert auf zwei Publikationen, welche in wissenschaftlich anerkannten Zeitschriften mit Gutachtersystem veröffentlicht wurden. Die Originalversionen dieser Publikationen liegen im Anhang vor.

Publikation 1:

Titel Molecular characterization of the recently emerged poultry pathogen *Ornithobacterium rhinotracheale* by multilocus sequence typing

Autoren Susann Thieme, Kristin Mühldorfer, Wael Gad, Dörte Lüscho, Hafez M. Hafez

Jahr 2016

Zeitschrift PLoS ONE 11(2): e0148158

DOI 10.1371/journal.pone.0148158

Publikation 2:

Titel Multilocus sequence typing of *Ornithobacterium rhinotracheale* isolated from pigeons and birds of prey revealed new insights into its population structure

Autoren Susann Thieme, Hafez M. Hafez, Stefanie Gutzer, Nadine Warkentin, Dörte Lüscho, Kristin Mühldorfer

Jahr 2016

Zeitschrift Veterinary and Animal Science 1–2, 15–20

DOI 10.1016/j.vas.2016.10.002

4 Zusammenfassung der Ergebnisse

4.1 Molekulare Charakterisierung mittels Multilocus Sequenz Typisierung des Geflügelpathogens *Ornithobacterium rhinotracheale*

Publikation 1: Thieme S, Mühldorfer K, Gad W, Lüscho D, Hafez HM. Molecular characterization of the recently emerged poultry pathogen *Ornithobacterium rhinotracheale* by multilocus sequence typing. PLoS ONE. 2016;11(2):e0148158

Eigener Anteil an der Publikation:

Erstellen der sieben Primerpaare (Größe 503-647 bp) für die MLST, kulturelle Anzucht und DNA-Gewinnung von 87 ORT-Isolaten, Sequenzierung der sieben Haushaltsgene der Isolate, Auswertung der Ergebnisse und Erstellung des Manuskriptes

Zusammenfassung:

In dieser Studie wurde die Multilocus Sequenz Typisierung für *Ornithobacterium rhinotracheale* anhand von 87 verschiedenen Isolaten entwickelt und erstmals erfolgreich durchgeführt. Die Isolate wurden sorgfältig ausgewählt, um möglichst umfassende Aussagen über die phylogenetische Verwandtschaft zwischen Isolaten verschiedener geographischer Herkunft und Geflügelspezies treffen zu können. In die Untersuchung einbezogen wurden 17 Referenzstämme für die Serotypen A-Q, ein ORT-Typstamm (DSM 15997) und 69 Feldisolate aus fünf verschiedenen europäischen Ländern von insgesamt vier Kontinenten. Die Isolate stammten aus den Jahren 1983-2014. Von allen Isolaten wurden sieben Haushaltsgene partiell sequenziert und miteinander verglichen. Es konnten 14 verschiedene Sequenztypen (ST) detektiert werden, wobei 77% der Isolate ST1 oder ST9 repräsentierten. Beide ST enthielten Isolate von Puten und Hühnern, die aus verschiedenen Ländern und von verschiedenen Kontinenten stammten. Auch enthielten beide ST Isolate der im AGP häufig kreuzreagierenden Serotypen A, E und I. Neun weitere ST wurden jeweils durch nur ein einziges Isolat repräsentiert und könnten mögliche Beziehungen zu bestimmten Wirtsspezies, Krankheiten oder Serotypen zeigen. Sehr häufig wurden Unstimmigkeiten zwischen der Serotyp-Zugehörigkeit und der phylogenetischen Verwandtschaft der Isolate gefunden und Isolate eines Serotyps wiesen verschiedene ST auf. Die geringe genetische Diversität zwischen den verschiedenen Puten- und Hühnerisolaten unabhängig von ihrer geographischen Herkunft, die auch durch die geringe Trennschärfe („discriminatory power“) von 0.6937 in der MLST deutlich wird, unterstützt die Annahme, dass ORT erst vor kurzer Zeit in Geflügelbestände eingetragen wurde und sich anschließend sehr schnell weltweit verbreitet hat.

4.2 Multilocus Sequenz Typisierung von *Ornithobacterium rhinotracheale*, isoliert aus Tauben und Greifvögeln, eröffnet neue Einblicke in seine Populationsstruktur

Publikation 2: Thieme S., Hafez H. M., Gutzer S., Warkentin N., Lüscho D. & Mühldorfer K. Multilocus sequence typing of *Ornithobacterium rhinotracheale* isolated from pigeons and birds of prey revealed new insights into its population structure. *Veterinary and Animal Science*. 2016; 1-2, 15-20.

Eigener Anteil an der Publikation:

Design von zusätzlichen Primersequenzen für die Isolate von Tauben, kulturelle Anzucht, DNA-Gewinnung und Sequenzierung von 108 ORT-Isolaten, Auswertung der Ergebnisse, Erstellung des Manuskriptes

Zusammenfassung:

Die weltweite Verbreitung von *Ornithobacterium rhinotracheale* in kommerziell gehaltenen Geflügelbeständen und die Isolierung von ORT aus nicht-hühnerartigen Vogelspezies wirft epidemiologische Fragen zur Herkunft und der Übertragung des Bakteriums auf. In dieser Studie wurden 21 ORT-Isolate aus Tauben und Greifvögeln mittels Multilocus Sequenz Typisierung untersucht. Die Ergebnisse wurden mit Sequenzdaten von ORT-Isolaten der ersten Studie verglichen, die vor allem aus Puten und Hühnern stammten.

Die aus Tauben gewonnenen ORT-Isolate (n=11) waren nah miteinander verwandt und formten ein eigenes Cluster, das sich von den Clustern anderer ORT-Isolate klar abgegrenzte. Die ORT-Isolate der Greifvögel (n=10) wiesen eine höhere genetische Heterogenität auf als die Taubenisolate und gruppierten sich entsprechend ihrer Herkunft aus verschiedenen Greifvogelspezies auf Ebene der Greifvogelfamilie innerhalb der zwei Puten- und Hühnerbasierten Cluster ein. Keines der Isolate hatte einen identischen Sequenztyp zu den aus Hühnervögeln analysierten ORT-Isolaten. Allerdings wiesen drei Isolate von Turmfalken einen identischen Genlocus und ein einzelnes Isolat von einem Truthahngerier zwei identische Genloci mit Isolaten von Puten bzw. Hühnern auf.

Die MLST Ergebnisse für ORT-Isolate von Tauben und Greifvögeln reflektieren wahrscheinlich evolutionäre Anpassungen zwischen Bakterium und Wirt. Die Verwandtschaftsbeziehung der Greifvogelisolat zu Geflügelisolaten könnte aber auch auf die Möglichkeit für eine Übertragung zwischen verschiedenen Vogelspezies hinweisen. Genaue Schlussfolgerungen können nur sehr vorsichtig aus den Ergebnissen gezogen werden, da nur wenige Isolate aus anderen Vogelspezies als Puten und Hühnern untersucht wurden. Die Erweiterung der MLST-Datenbank um Isolate von verschiedenen Wirtsspezies kann als wertvolle Ressource zum besseren Verständnis möglicher Übertragungswege des Bakteriums beitragen.

5 Übergreifende Diskussion

Bisherige Erkenntnisse zu ORT basieren auf einer Vielfalt an Charakterisierungsmethoden, wodurch der Vergleich der Ergebnisse untereinander deutlich erschwert ist. Daher war es das Ziel der vorliegenden Arbeit, die MLST als standardisiertes molekulargenetisches Typisierungsverfahren für ORT zu etablieren (Thieme et al., 2016b). Basierend auf der MLEE für ORT (Amonsin et al., 1997) und der MLST für *Pasteurella multocida* (Subaaharan et al., 2010) wurden sieben verschiedene Haushaltsgene ermittelt, die an verschiedenen Stellen auf dem Genom von ORT liegen. Das Gesamtgenom des ORT-Typstammes DSM 15997 diente als Vorlage für das Primerdesign. Im Verlauf der PCR-Analysen wurden für einzelne Gene (*adk*, *gdhA*, *pgi* and *pml*) zusätzliche Primer nachdesignt, da Gensequenzen einzelner Isolate mit den ersten Primerpaaren nicht erfolgreich amplifiziert werden konnten. Ein zusätzlicher reverse Primer (*adk*) wurde für die PCR-Analyse des ORT Serotyp F Referenzstammes genutzt (Thieme et al., 2016b) und jeweils ein zusätzliches Primerpaar (*gdhA*) sowie einzelne reverse Primer (*pgi* and *pml*) für ORT-Isolate von Tauben (Thieme et al., 2016a).

Zur Etablierung der Methode wurden 108 verschiedene ORT-Isolate mit der MLST analysiert, die möglichst große Einblicke in die genetische Vielfalt geben können. Die Auswahl umfasste Isolate verschiedener geographischer Herkunft über einen breiten Isolationszeitraum (1983-2015), wobei der größte Anteil der Isolate (n=72) aus den Jahren 2010-2013 stammte und die aktuell zirkulierende ORT-Population repräsentiert. Die Mehrzahl der Isolate (n=70) stammte aus Deutschland, während andere Länder und Staaten wie Frankreich (n=10), Großbritannien (n=9), Chile (n=6), die Niederlande (n=4), China (n=4), USA (n=3), Belgien (n=1) und Südafrika (n=1) mit zehn und weniger Isolaten vertreten waren. Neben 90 Feldisolaten wurden auch der ORT-Typstamm DSM 15997 und je ein ORT-Referenzstamm für 17 verschiedene Serotypen (A-R) in die Studie mit einbezogen.

Ein weiteres wichtiges Kriterium war die Vogelart, aus der die Isolate gewonnen wurden. Da die Ornithobakteriose nur beim Wirtschaftsgeflügel von ökonomischer Bedeutung ist, stammten die meisten ORT-Isolate von Puten (n=67) und Hühnern (n=17) und wurden in der Routinediagnostik des Instituts für Geflügelkrankheiten der Freien Universität Berlin asserviert. Neben den klassischen Geflügelspezies waren auch andere Vogelarten in der MLST vertreten, wie Fasan, Perlhuhn und Krähe (je ein Isolat), Tauben (n=11) und verschiedene Greifvogelspezies (n=10). Die 11 Taubenisolate wurden von Brief-, Rasse- und Stadtauben aus Berlin und Umgebung kultiviert (Warkentin, Kohls und Hafez, unveröffentlicht). Die zehn Greifvogelisolate stammen aus Potsdam, Berlin und Umgebung (Gutzer, Lüschow und Hafez, unveröffentlicht). Es handelte sich um Wildvögel, die in der Kleintierklinik der FU Berlin versorgt wurden oder um Falknervögel bzw. Vögel in Volierenhaltung. Die Mehrzahl der Greifvögel war klinisch unauffällig, nur bei drei Tieren in Volierenhaltung/Falknerhaltung wurde eine

Aspergillose (Wüstenbussard und Saker-Gerfalke) oder eine Pasteurellose (Mäusebussard) als Primärerkrankung und Todesursache diagnostiziert.

Der Serotyp war ein weiteres Kriterium für die Auswahl der Isolate, da die Serotypisierung für ORT gut etabliert ist und häufig durchgeführt wird. Entsprechend der unterschiedlichen Nachweishäufigkeiten waren die Serotypen A, B, E und I in den untersuchten Isolaten vorherrschend (Nume et al., 2012; Van Empel et al., 1997), während andere Serotypen in geringer Anzahl oder nur einmal in der MLST vertreten waren. In die Analyse wurden auch Isolate mit einbezogen, die mit mehreren Serotypen kreuzreagieren oder keinem bekannten Serotyp zugeordnet werden können.

Für die 108 ORT-Isolate wurden in der MLST insgesamt 31 verschiedene ST definiert, wobei 17 ST allein durch die 21 ORT-Isolate von Greifvögeln und Tauben repräsentiert wurden. Die häufigsten ST waren ST1 und ST9, die nur ORT-Isolaten von Puten und Hühnern zugeordnet und bei 67 (62%) der 108 untersuchten Isolate nachgewiesen wurden. Diese Ergebnisse spiegeln die Diskriminationsfähigkeit („discriminatory power“) der MLST wieder. Der Gesamtwert unter Einbeziehung aller Isolate beträgt 0.8008. Er steigt auf 0,9784, wenn nur ORT-Isolate von Tauben, Greifvögeln und der Saatkrähe (also keine Hühnervögel) einbezogen werden. Für Isolate, die ausschließlich zur Ordnung der Hühnervögel gehören, ist die Diskriminationsfähigkeit mit 0.6865 wesentlich niedriger.

Das enge Verwandtschaftsverhältnis der ORT-Isolate des Wirtschaftsgeflügels zeigte sich auch in der phylogenetischen Analyse unabhängig von der geographischen Herkunft und der Vogelspezies (Figure 1, Thieme et al., 2016b). In guter Übereinstimmung mit den Ergebnissen anderer Studien (Amonsin et al., 1997; Chou et al., 2009; Leroy-Setrin et al., 1998; Mirzaie & Hassanzadeh, 2013) deuten die MLST Ergebnisse auf eine klonale Populationsstruktur hin mit wenigen Sequenztypen, die in Hühnern und Puten weltweit zirkulieren. Die beiden vordergründigen ST1 und ST9 unterscheiden sich nur in einem Allel voneinander (Thieme et al., 2016b). Infektionsversuche mit Hühnern und Puten bestätigten bereits, dass ORT-Isolate von beiden Geflügelspezies zur jeweils anderen übertragbar sind und eine Ornithobakteriose auslösen können (Van Empel et al., 1996).

Die MLST zeigte keine eindeutige Sequenztyp-Serotyp-Beziehung innerhalb der untersuchten ORT-Isolate (Thieme et al., 2016b). Die genetische Grundlage, die für die Ausprägung eines bestimmten Serotyps bei ORT verantwortlich ist, wurde bisher noch nicht identifiziert. Vermutlich handelt es sich um Oberflächenmoleküle, deren genetische Grundlage über einen Gentransfer ausgetauscht werden kann (Roberts, 1996; Thomas & Nielsen, 2005). Isolate eines Serotyps stehen daher in der MLST nicht zwingend in einem Verwandtschaftsverhältnis, wie die vorliegende Arbeit für drei Isolate vom Serotyp C und zwei Isolate vom Serotyp J sehr deutlich zeigt (Figure 1; Thieme et al., 2016b). Die Isolate eines Serotyps wurden zu

verschiedenen ST und im Stammbaum verschiedenen Subclustern zugeordnet und wiesen Sequenzunterschiede in den sieben untersuchten Genloci auf. Dennoch zeigte die phylogenetische Analyse gewisse Tendenzen und Gruppierungen von ST und Serotypen, die auch in vorangegangenen Studien erkennbar waren (Thieme et al., 2016b). Drei ORT-Isolate vom Serotyp F wurden unabhängig von der Vogelspezies (zweimal Pute, einmal Rotmilan) einem gemeinsamen Hauptcluster zugeordnet, das sich mit insgesamt sechs Isolaten von zwei Puten, einem Huhn und drei Greifvögeln der Familie der Habichtartigen deutlich von der Mehrzahl der untersuchten Isolate abgrenzte.

Innerhalb der zehn Greifvogelisolates war anhand der Phylogenie eine deutliche Aufteilung der ORT-Isolate auf Familienebene erkennbar. Isolate aus Habichtartigen (Hauptcluster A) und Isolate aus Falkenartigen (Hauptcluster B) bildeten klar abgegrenzte, eigene Subcluster (Figure 1; Thieme et al., 2016a). Vergleichbare Bakterium-Wirt-Beziehungen konnten beispielsweise für Vertreter der Familie der Pasteurellaceae gezeigt werden (Hansen, 2013). Das Isolat des Truthahngieiers wurde einem eigenen ST im Hauptcluster B zugeordnet. Es ist gegenwärtig das einzige ORT-Isolat aus der Familie der Neuweltgeier, was einen Rückschluss auf das Verwandtschaftsverhältnis von Isolaten aus dieser Vogelfamilie nicht ermöglicht.

Die ORT-Isolate von Wüstenbussard und Rotmilan (Familie der Habichtartigen) stimmten in den sieben Gensequenzen überein und wurden einem gemeinsamen ST zugeordnet. Weitere Vollgenomanalysen könnten zeigen, ob die beiden Isolate tatsächlich identisch sind. Eine Übertragung zwischen verschiedenen Greifvogelarten erscheint unwahrscheinlich, da diese auch in ihrer natürlichen Umwelt selten miteinander interagieren. Hingegen wären Infektionen bei Wildvögeln durch geschlagene Hühnervögel in Freilandhaltungen oder bei Greifvögeln in Volierenhaltung durch die Verfütterung von Eintagsküken denkbar, da diese ihnen als Nahrung dienen. Nachgewiesen wurde dies bereits bei Jungfalken in einer Zuchtstation, die unbewusst mit ORT infizierten Küken gefüttert wurden und an einer Ornithobakteriose erkrankten (Hafez & Lierz, 2010).

Die klare morphologische und phylogenetische Abgrenzung der Taubenisolates (Hauptcluster C) von ORT-Isolaten anderer Vogelspezies (Hauptcluster A und B) lässt vermuten, dass Tauben möglicherweise mit einer anderen *Ornithobacterium*-Spezies oder Subspezies besiedelt sind. Diese Beobachtung wird durch Ergebnisse anderer Studien unterstützt, wo Taubenisolates sich bereits sehr deutlich in der 16S rRNA-Genanalyse von Isolaten von Hühnervögeln abgrenzen (Mirzaie & Hassanzadeh, 2013; Tsai & Huang, 2006). Auch Taubenisolates aus verschiedenen Ländern (Iran und Taiwan) clustern zusammen (Mirzaie & Hassanzadeh, 2013). Da Tauben nicht klinisch erkranken, wurden taubenspezifische *Ornithobacterium*-Isolate vor dem Auftreten der Ornithobakteriose in Wirtschaftsgeflügel sehr wahrscheinlich nicht gefunden oder weiter differenziert, sondern erst als aktiv bei anderen

Vogelspezies nach ORT gesucht wurde. Erschwerend kommt hinzu, dass taubenspezifische Isolate im Vergleich zu Geflügelisolaten ein sehr feines und langsames Wachstum zeigen und teilweise erst nach 72 Stunden auf den Medien erkennbar sind. Diese Unterschiede könnten auf eine mögliche Anpassung an Taubenvogel hinweisen, wodurch das Risiko einer zwischenartlichen Übertragung und der wirtschaftlichen Relevanz für das Wirtschaftsgeflügel vermutlich gering ist. In der vorliegenden Arbeit konnten auch zwischen Taubenisolaten und Isolaten von Greifvögeln, wie beispielsweise Habicht- oder Falkenartigen, in der MLST keine Gemeinsamkeiten gefunden werden, obwohl Tauben zum Nahrungsspektrum der Greifvögel gehören und eine zwischenartliche Übertragung denkbar wäre.

Das Vorkommen von ORT in anderen Vogelarten und eine mögliche Übertragung von Wildvögeln auf Wirtschaftsgeflügel wurde in vorangegangenen Studien mehrmals diskutiert. Amonsin et al. (1997) zeigten in ersten molekularbiologischen Untersuchungen, dass Geflügelisolate im Vergleich zu Isolaten von passeriformen Vögeln (Saatkrähe) eine hohe Verwandtschaft aufweisen. Die Autoren nahmen eine kurze evolutionäre Entwicklung von ORT in Wirtschaftsgeflügel an und schlossen auf einen Ersteintrag über Wildvögel, die möglicherweise als Reservoirwirte für ORT dienen könnten. Übereinstimmende Ergebnisse zeigte eine nachfolgende Studie von Chou et al. (2009), in der ORT-Isolate von nicht-galliformen Vogelspezies im Vergleich zu Isolaten von Hühnervögeln ebenfalls eine höhere genetische Variation aufwiesen. Welchman et al. (2013) führten eine erkennbare Saisonalität von Ausbrüchen in Wintermonaten an, die auf eine bessere Überlebensfähigkeit des Erregers bei kälteren Temperaturen und einen stärkeren Kontakt zu Wildvögeln zurückzuführen sein könnte.

Es ist denkbar, dass Wildvögel am Erregereintrag, der Zirkulation und Aufrechterhaltung von Infektketten bei hoch empfänglichen Geflügelspezies beteiligt sind, ähnlich wie es für andere Geflügelpathogene wie Aviäre Inflenzaviren (Alexander, 2007) und *Pasteurella multocida* (Pedersen et al., 2003; Petersen et al., 2001) bekannt ist. Eine mögliche Beteiligung an der schnellen weltweiten Verbreitung mit Ausbrüchen auf drei verschiedenen Kontinenten (Nordamerika, Europa, Afrika) erscheint aber fraglich. In der vorliegenden Arbeit konnten Sequenzübereinstimmungen zwischen Isolaten von Hühnervögeln und Greifvögeln nur bei vier Isolaten (drei Turmfalken und ein Truthahngeier) und in einzelnen Genen nachgewiesen werden. Es gab keine Übereinstimmung im ermittelten ST.

Die schnelle Verbreitung von Isolaten mit geringer genetischer Varianz in Geflügelhaltungen weltweit könnte hingegen auf eine feste Eintrags- oder Übertragungsquelle hindeuten. Verschiedene Infektionserreger können zum Beispiel über das Brutei verbreitet werden (Cobb, 2011), eine Möglichkeit, die auch für ORT denkbar wäre. Die Geflügelzucht hat sich zum Ende des 20. Jahrhunderts und mit Beginn des 21. Jahrhunderts zunehmend monopolisiert. Es gibt weltweit nur wenige große Zuchtunternehmen, die die Zahlen der gehandelten Bruteier unter

Verschluss halten (Anonymous, 2017). Die Bedeutung des weltweiten Bruteihandels für den Eintrag und die Zirkulation von Infektionserregern lässt sich nicht abschätzen. Erfahrungen in der Bekämpfung von Salmonellen zeigen, wie wichtig die Zusammenarbeit von Zucht- und Vermehrungsbetrieben, Brütereien und Aufzuchtstationen in der Geflügelwirtschaft ist (Hugas & Beloeil, 2014). In experimentellen Studien gelang bereits die Isolierung von ORT aus Ovar und Oviduct oder aus Hühnerembryonen und Eintagsküken; Ergebnisse, die die Hypothese einer möglichen vertikalen Übertragung stützen (Back et al., 1998; Van Empel, 1998; Van Veen et al., 2004). In Neuseeland wird die Eintragsmöglichkeit von ORT aus Europa und Nordamerika als nicht unbedeutend eingeschätzt. Hühnereier werden als möglicherweise infiziert betrachtet (Anonymous, 2008).

Um weitere Erkenntnisse zur Verbreitung und zu der Epidemiologie des Erregers zu erhalten, wären Untersuchungen zum Vorkommen von ORT in Wildvögeln (u.a. Zugvögel) erforderlich, um die Anzahl der in der MLST untersuchten Isolate und die Aussagekraft der Ergebnisse zu erhöhen. Wasservögel oder Singvögel wie Spatzen und andere Vogelarten, die sich in der unmittelbaren Umgebung von Geflügelhaltungen sammeln oder dicht mit dem Wirtschaftsgeflügel zusammenleben, könnten mögliche Eintrags- oder Übertragungsquellen darstellen. Bisherige Isolierungsversuche von ORT waren neben Hühnervögeln mit geringerer wirtschaftlicher Bedeutung, wie Fasan, Wachtel, Rot- und Rebhuhn (u.a. Mirzaie & Hassanzadeh, 2013; Welchman et al. 2013), auch bei zwei Straußen (Chou et al., 2009) und mehreren Saatkrähen (u.a. Amonsin et al., 1997; Hafez & Vandamme, 2011) erfolgreich, was die Breite an möglichen Wirtsspezies verdeutlicht. Untersuchungen zum Vorkommen von ORT bei Säugetieren sind aus der Literatur nicht bekannt, aber auch Nagetiere und andere Nutztiere könnten potentielle Überträger sein (Hinz et al., 1998).

6 Schlussfolgerungen

In dieser Dissertation wurde mit der MLST eine molekulargenetische Untersuchungsmethode für ORT entwickelt, die zukünftig durch die stete Erweiterung der öffentlichen Datenbank einen guten Überblick über die Populationsstruktur des Bakteriums geben kann.

ORT wurde 1994 taxonomisch klassifiziert, nachdem es mehrfach in Puten und Hühnern zu Erkrankungen mit hohen wirtschaftlichen Verlusten geführt hatte. Für die Klassifizierung wurden drei Isolate von Saatkrähen mit einbezogen, die bereits 1983 isoliert worden waren. Der Verdacht liegt daher nahe, dass ORT bereits vor der ersten Isolierung aus Wirtschaftsgeflügel in anderen Vogelspezies vorhanden war. Die vorliegende Arbeit zeigt, dass ORT Isolate von Puten und Hühnern unabhängig von ihrer Herkunft und dem ermittelten Serotyp eng miteinander verwandt sind. Isolate von anderen Vogelarten wie Taube, Greifvogel oder Saatkrähe erscheinen in der MLST deutlich diverser und clustern auf der Familienebene ihrer Wirtsspezies. Die Ergebnisse stützen die Vermutung anderer Autoren, dass ORT eine längere evolutionäre Entwicklung in anderen Vogelarten vollzogen hat und erst in jüngerer Zeit beim Wirtschaftsgeflügel als neuer Krankheitserreger der Ornithobakteriose in Erscheinung getreten ist.

Die MLST Datenbank bietet eine gute Grundlage, um aktuelle Sequenzdaten zu ergänzen und mit den bisher gewonnenen zu vergleichen. Die Hintergrundinformationen zu den Isolaten können zukünftig wichtige Einblicke in die Epidemiologie des Erregers, das Wirtsspektrum und mögliche regionale Unterschiede bei Krankheitsausbrüchen geben.

7 Zusammenfassung

Die Multilocus Sequenz Typisierung als neue Methode zur molekularen Charakterisierung von *Ornithobacterium rhinotracheale*

Ornithobacterium rhinotracheale (ORT) ist ein bedeutender respiratorischer Krankheitserreger beim Geflügel, insbesondere bei Puten. Verschiedene Typisierungsmethoden wurden für Isolate des Bakteriums genutzt, um diese voneinander differenzieren zu können. In der Routinediagnostik hat sich insbesondere die Serotypisierung etabliert. Bisher sind 18 ORT-Serotypen nachgewiesen worden; es können aber nicht alle Stämme mit den Referenzseren typisiert werden und es gibt zahlreiche Kreuzreaktionen zwischen verschiedenen Serotypen. Neben der Serotypisierung wurden auch bandenbasierte Typisierungsmethoden, wie die Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE), angewandt. Isolate von Puten und Hühnern sind in diesen Untersuchungen sehr homogen, während ORT-Isolate von anderen Vogelspezies deutlich diverser in den genetischen Fingerprints erscheinen. Nachteile der bandenbasierten Typisierungsmethoden liegen in der Standardisierung und dem schwierigen Austausch der Ergebnisse zwischen verschiedenen Laboren, weshalb Isolate nur begrenzt miteinander verglichen werden können. Demgegenüber stehen sequenzbasierte Methoden, bei denen die Weitergabe der Ergebnisse (z.B. über das Internet) schnell und einfach möglich ist.

In der hier beschriebenen Arbeit wurde die Multilocus Sequenz Typisierung (MLST) für ORT anhand von 90 Feldisolaten und 18 Referenzstämmen etabliert. Die Methode hat eine gute Diskriminationsfähigkeit, ist in der Durchführung hoch standardisierbar und wird für Bakterien häufig angewendet. Es wurden sieben Haushaltsgene für die MLST ausgewählt, teilsequenziert und Sequenzunterschiede miteinander verglichen. Bei Puten- und Hühnerisolaten zeigten sich in der MLST große Ähnlichkeiten unabhängig von der geographischen Herkunft, die auf eine klonale Populationsstruktur hinweisen. Fast 80% (67/84) der untersuchten ORT-Isolate von Puten und Hühnern gehören zu den zwei Sequenztypen ST1 und ST9, die sich nur in einem Allel voneinander unterscheiden. Achtzehn (58,1%) der insgesamt 31 definierten ST werden durch Isolate anderer Vogelarten repräsentiert, obwohl deren Anteil an der Gesamtzahl der untersuchten Stämme nur bei 22,2% (n=24) lag. ORT-Isolate von Greifvögeln und Isolate von Tauben grenzten sich phylogenetisch deutlich voneinander ab, zeigten aber eine nahe Verwandtschaft auf der Ebene der Vogelfamilie. Die Greifvogelisolat gruppieren sich innerhalb der beiden Hauptcluster der Geflügelisolat ein, während die Taubenstämme ein eigenes Cluster entfernt von anderen Vogelisolaten bildeten.

Die erstellte MLST Datenbank (<https://pubmlst.org/orhinotracheale/>) bietet eine gute Grundlage, um aktuelle Sequenzdaten zu ergänzen und mit den bisher gewonnenen zu vergleichen. Eingetragene Hintergrundinformationen zu den Isolaten können zukünftig

ZUSAMMENFASSUNG

wichtige Einblicke in die Epidemiologie des Erregers, das Wirtsspektrum und mögliche regionale Unterschiede bei Krankheitsausbrüchen geben.

8 Summary

A multilocus sequence typing scheme as new method for molecular characterization of *Ornithobacterium rhinotracheale*

Ornithobacterium rhinotracheale (ORT) is an important respiratory poultry pathogen that mainly affects turkeys. Different typing methods have been used for the characterization of ORT isolates. In routine diagnostics, serotyping is well established. Eighteen ORT serotypes have been detected so far. However, not all isolates can be typed with available reference antisera and cross-reactions often occur between different serotypes. Despite serotyping, banding pattern-based methods such as pulsed-field gel electrophoresis have been applied. ORT isolates of turkey or chicken origin appear very homogenous in those investigations, while ORT isolated from other bird species are more diverse in their genetic fingerprints. Disadvantages of banding pattern-based methods are difficulties in standardization and in the exchange of results between different laboratories limiting comparisons to other isolates and data sets. In contrast, the exchange of results from sequencing-based methods (e.g. via internet) is fast and simple.

In this work, a new multilocus sequence typing (MLST) scheme was established using 90 field isolates and 18 ORT serotype reference strains. The method has a good discriminatory ability, is highly standardizable and is frequently used for different bacterial species. Seven housekeeping genes were selected for MLST, were partly sequenced, and the obtained sequences were compared to each other. Isolates from turkeys and chickens showed high similarities within the MLST analysis independent of their geographical origin indicating a clonal population structure. Almost 80% (67/84) of the investigated ORT isolates of turkey and chicken origin belonged to two sequence types, ST1 and ST9, which differ only in one single allele. Eighteen (58,1%) of the 31 defined ST are represented by isolates from other bird species although their percentage among the 108 strains investigated was only 22,2% (n=24). ORT isolates from birds of prey and isolates from pigeons were placed into different phylogenetic clusters but showed a close relationship corresponding to the birds' family relationship of their hosts. Isolates from birds of prey grouped within the two poultry-based clusters, whereas the pigeon-derived isolates formed their own phylogenetic cluster well separated from ORT strains of other birds' origin.

The newly set up MLST database (<https://pubmlst.org/orhinotracheale/>) provides a reliable basis to add further sequence data and compare new results to already registered MLST data. Included background information from ORT strains will give important insights into the epidemiology of the pathogen, its host range and regional differences in disease outbreaks.

9 Literaturverzeichnis

MLST.net database. Available "<http://www.mlst.net>" (Accessed: 12.05.2017).

Achtman, M. (1996). A surfeit of YATMs? *J Clin Microbiol* **34**, 1870.

Amonsin, A., Wellehan, J. F. X., Li, L. L., Vandamme, P., Lindeman, C., Edman, M., Robinson, R. A. & Kapur, V. (1997). Molecular epidemiology of *Ornithobacterium rhinotracheale*. *J Clin Microbiol* **35**, 2894-2898.

Anonymous (2008). Import risk analysis: hatching eggs from chickens (*Gallus gallus*) from the European Union, Canada, the United States of America, and Australia. MAF, Wellington, New Zealand: Ministry of Agriculture and Forestry (MAF) Biosecurity New Zealand.

Anonymous (2017). Available "<http://extension.psu.edu/animals/poultry/links/breeder-companies>" (Accessed: 12.05.2017).

Back, A., Rajashekara, G., Jeremiah, R. B., Halvorson, D. A. & Nagaraja, K. V. (1998). Tissue distribution of *Ornithobacterium rhinotracheale* in experimentally infected turkeys. *Vet Rec* **143**, 52-53.

Banani, M., Hablolvarid, M. H., Momayez, R., Nouri, A., Ghodsian, N., Ashtari, A. & Mirzaei, S. G. (2014). Isolation of *Ornithobacterium rhinotracheale* from the brains of commercial broiler breeder chickens with meningitis and encephalitis. *Archives of Razi Institute* **70**, 203-209.

Bennett, J. S., Jolley, K. A., Sparling, P. F., Saunders, N. J., Hart, C. A., Feavers, I. M. & Maiden, M. C. (2007). Species status of *Neisseria gonorrhoeae*: evolutionary and epidemiological inferences from multilocus sequence typing. *BMC Biol* **5**, 35.

Bessei, W. (2006). Welfare of broilers: a review. *World Poultry Sci J* **62**, 455-466.

Bier, F. F. & Kleinjung, F. (2001). Feature-size limitations of microarray technology--a critical review. *Fresenius J Anal Chem* **371**, 151-156.

Bochner, B. R. (2009). Global phenotypic characterization of bacteria. *FEMS Microbiol Rev* **33**, 191-205.

Bodrossy, L. & Sessitsch, A. (2004). Oligonucleotide microarrays in microbial diagnostics. *Curr Opin Microbiol* **7**, 245-254.

Canal, C. W., Leao, J. A., Rocha, S. L. S., Macagnan, M., Lima-Rosa, C. A. V., Oliveira, S. D. & Back, A. (2005). Isolation and characterization of *Ornithobacterium rhinotracheale* from chickens in Brazil. *Res Vet Sci* **78**, 225-230.

Carattoli, A., Zankari, E., Garcia-Fernandez, A., Voldby Larsen, M., Lund, O., Villa, L., Moller Aarestrup, F. & Hasman, H. (2014). In silico detection and typing of plasmids using PlasmidFinder and plasmid multilocus sequence typing. *Antimicrob Agents Chemother* **58**, 3895-3903.

Caugant, D. A. (2001). From multilocus enzyme electrophoresis to multilocus sequence typing. In *New Approaches for the Generation and Analysis of Microbial Typing Data*, pp. 299-349. Edited by L. Dijkshoorn, K. J. Towner & M. J. Struelens: Elsevier Science.

Charlton, B. R., Channing-Santiago, S. E., Bickford, A. A., Cardona, C. J., Chin, R. P., Cooper, G. L., Droual, R., Jeffrey, J. S., Meteyer, C. U., Shivaprasad, H. L. & Walker, R. L. (1993). Preliminary characterization of a pleomorphic gram-negative rod associated with avian respiratory disease. *J Vet Diagn Invest* **5**, 47-51.

Chin, R. P., Van Empel, C. P. & Hafez, H. M. (2013). *Ornithobacterium rhinotracheale* Infection. In Diseases of Poultry, pp. 828-834. Edited by D. E. Swayne, J. R. Glisson, L. R. McDougald, L. K. Nolan, D. L. Suarez & V. L. Nair. Iowa State Press, Ames: IA.

Chou, C. H., Lin, S. Y., Chen, C. L. & Tsai, H. J. (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.

Chung, M., de Lencastre, H., Matthews, P., Tomasz, A., Adamsson, I., Aires de Sousa, M., Camou, T., Cocuzza, C., Corso, A., Couto, I., Dominguez, A., Gniadkowski, M., Goering, R., Gomes, A., Kikuchi, K., Marchese, A., Mato, R., Melter, O., Oliveira, D., Palacio, R., Sa-Leao, R., Santos Sanches, I., Song, J. H., Tassios, P. T. & Villari, P. (2000). Molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by pulsed-field gel electrophoresis: comparison of results obtained in a multilaboratory effort using identical protocols and MRSA strains. *Microb Drug Resist* **6**, 189-198.

Clark, C. G., Bryden, L., Cuff, W. R., Johnson, P. L., Jamieson, F., Ciebin, B. & Wang, G. (2005). Use of the oxford multilocus sequence typing protocol and sequencing of the flagellin short variable region to characterize isolates from a large outbreak of waterborne *Campylobacter* sp. strains in Walkerton, Ontario, Canada. *J Clin Microbiol* **43**, 2080-2091.

Clarridge, J. E., 3rd (2004). Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. *Clin Microbiol Rev* **17**, 840-862, table of contents.

Cobb, S. P. (2011). The spread of pathogens through trade in poultry hatching eggs: overview and recent developments. *Rev Sci Tech* **30**, 165-175.

Cooper, J. E. & Feil, E. J. (2004). Multilocus sequence typing--what is resolved? *Trends Microbiol* **12**, 373-377.

Davis, M. A., Hancock, D. D., Besser, T. E. & Call, D. R. (2003). Evaluation of pulsed-field gel electrophoresis as a tool for determining the degree of genetic relatedness between strains of *Escherichia coli* O157:H7. *J Clin Microbiol* **41**, 1843-1849.

Dudouyt, J., Léorat, J., Van Empel, P., Gardin, Y. & Doré, C. (1995). Isolement d'un nouvel agent pathogène chez la dinde: *Ornithobacterium rhinotracheale*; conduite à tenir. *Proceedings Journées de la Recherche Avicole, Angers*, 240-243.

Enright, M. C. & Spratt, B. G. (1998). A multilocus sequence typing scheme for *Streptococcus pneumoniae*: identification of clones associated with serious invasive disease. *Microbiology* **144** (Pt 11), 3049-3060.

Enright, M. C. & Spratt, B. G. (1999). Multilocus sequence typing. *Trends Microbiol* **7**, 482-487.

Feil, E. J. & Enright, M. C. (2004). Analyses of clonality and the evolution of bacterial pathogens. *Curr Opin Microbiol* **7**, 308-313.

- Field, D., Hughes, J. & Moxon, E. R. (2004).** Using the genome to understand pathogenicity. In *Methods Mol Biol*, pp. 261-287. Edited by N. Woodford & A. Johnson. Totowa, NJ: Humana Press Inc.
- Fleischmann, R. D., Adams, M. D., White, O., Clayton, R. A., Kirkness, E. F., Kerlavage, A. R., Bult, C. J., Tomb, J. F., Dougherty, B. A., Merrick, J. M. & et al. (1995).** Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science* **269**, 496-512.
- Foley, S. L., Zhao, S. & Walker, R. D. (2007).** Comparison of molecular typing methods for the differentiation of Salmonella foodborne pathogens. *Foodborne Pathog Dis* **4**, 253-276.
- Fournier, P. E., Drancourt, M. & Raoult, D. (2007).** Bacterial genome sequencing and its use in infectious diseases. *Lancet Infect Dis* **7**, 711-723.
- Garaizar, J., Rementeria, A. & Porwollik, S. (2006).** DNA microarray technology: a new tool for the epidemiological typing of bacterial pathogens? *FEMS Immunol Med Microbiol* **47**, 178-189.
- Gasche, S., Kaspar, H., Hauck, R., Wallmann, J. & Hafez, H. M. (2015).** Methodvalidierung und Standardisierung zur Empfindlichkeitsmessung von *Riemerella anatipestifer* und ORT. In 34. Tagung der DVG-Fachgruppe AVID Veterinärmedizinische Infektionsdiagnostik Schwerpunkt Bakteriologie, pp. 22. Bad Staffelstein.
- Gavrilovic, P., Gavrilovic, A., Vidanovic, D., Parunovic, J. & Jovanovic, M. (2016).** Comparative pathomorphological, bacteriological and serological examination of broiler breeders and pheasants, experimentally infected with *Ornithobacterium rhinotracheale*. *Avian Pathol* **45**, 513-519.
- Gerner-Smidt, P., Hise, K., Kincaid, J., Hunter, S., Rolando, S., Hyytia-Trees, E., Ribot, E. M. & Swaminathan, B. (2006).** PulseNet USA: a five-year update. *Foodborne Pathog Dis* **3**, 9-19.
- Gilson, E., Clement, J. M., Brutlag, D. & Hofnung, M. (1984).** A family of dispersed repetitive extragenic palindromic DNA sequences in *E. coli*. *Embo J* **3**, 1417-1421.
- Goering, R. V. (2010).** Pulsed field gel electrophoresis: a review of application and interpretation in the molecular epidemiology of infectious disease. *Infect Genet Evol* **10**, 866-875.
- Grimont, F. & Grimont, P. A. (1986).** Ribosomal ribonucleic acid gene restriction patterns as potential taxonomic tools. *Ann Inst Pasteur Microbiol* **137B**, 165-175.
- Günther, R., Ryll, M., Hinz, K. H. & Hafez, H. M. (2002).** New variety of *Ornithobacterium rhinotracheale*. In 4th International Symposium on Turkey Diseases. Edited by H. M. Hafez. Berlin: H. M. Hafez.
- Gutzer, S., Luschow, D. & Hafez, H. M. (2013).** Wild birds as source of *Ornithobacterium rhinotracheale* infections. In 7th "Hafez" International Symposium on Turkey Production, pp. 193-195. Edited by H. M. Hafez. Berlin, Germany: Hafez, H.M.
- Ha, H. J., 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.

- Hafez, H. M., Kruse, W., Emele, J. & Sting, R. (1993).** Eine Atemwegsinfektion bei Mastputen durch *Pasteurella*-ähnliche Erreger: Klinik, Diagnostik und Therapie. In International Conference on Poultry Diseases, pp. 105-112. Potsdam, Germany.
- Hafez, H. M. (1996).** Current status on the role of *Ornithobacterium rhinotracheale* (ORT) in respiratory disease complexes in poultry. *Arch Geflugelkd* **60**, 208-211.
- Hafez, H. M. & Sting, R. (1999).** Investigations on different *Ornithobacterium rhinotracheale* "ORT" isolates. *Avian Dis* **43**, 1-7.
- Hafez, H. M. (2002).** Diagnosis of *Ornithobacterium rhinotracheale*. *Int J Poult Sci* **1**, 114-118.
- Hafez, H. M. & Lierz, M. (2010).** *Ornithobacterium rhinotracheale* in nestling falcons. *Avian Dis* **54**, 161-163.
- Hafez, H. M. & Vandamme, P. (2011).** Genus XXVI..*Ornithobacterium*. In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, pp. 250-314. Edited by K. e. al.: Springer.
- Hansen, M. J. (2013).** Co-evolution of selected Pasteurellaceae species and their hosts. PhD Thesis: Faculty of Health and Medical Sciences, University of Copenhagen.
- Harmsen, D. & Karch, H. (2004).** 16S rDNA for diagnosing pathogens: a living tree. In ASM News, pp. 19-24: Herrero, I. A., Rouse, M. S., Piper, K. E.
- Hinz, K. H., Blome, C. & Ryll, M. (1994).** Acute exudative pneumonia and airsacculitis associated with *Ornithobacterium rhinotracheale* in turkeys. *Vet Rec* **135**, 233-234.
- Hinz, K. H. & Hafez, H. M. (1997).** The early history of *Ornithobacterium rhinotracheale* (ORT). *Arch Geflugelkd* **61**, 95-96.
- Hinz, K. H., Ryll, M., Kohler, B. & Glunder, G. (1998).** Phenotypic characteristics of *Riemerella anatipestifer* and similar micro-organisms from various hosts. *Avian Pathol* **27**, 33-42.
- Homan, W. L., Tribe, D., Poznanski, S., Li, M., Hogg, G., Spalburg, E., Van Embden, J. D. & Willems, R. J. (2002).** Multilocus sequence typing scheme for *Enterococcus faecium*. *J Clin Microbiol* **40**, 1963-1971.
- Hulton, C. S., Higgins, C. F. & Sharp, P. M. (1991).** ERIC sequences: a novel family of repetitive elements in the genomes of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and other enterobacteria. *Mol Microbiol* **5**, 825-834.
- Hung, A. L. & Alvarado, A. (2001).** Phenotypic and molecular characterization of isolates of *Ornithobacterium rhinotracheale* from Peru. *Avian Dis* **45**, 999-1005.
- Jagielski, T., van Ingen, J., Rastogi, N., Dziadek, J., Mazur, P. K. & Bielecki, J. (2014).** Current methods in the molecular typing of *Mycobacterium tuberculosis* and other mycobacteria. *Biomed Res Int* **2014**, 645802.
- Jolley, K. A. & Maiden, M. C. (2010).** BIGSdb: Scalable analysis of bacterial genome variation at the population level. *Bmc Bioinformatics* **11**, 595.
- 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.

- Kanduma, E., McHugh, T. D. & Gillespie, S. H. (2003).** Molecular methods for *Mycobacterium tuberculosis* strain typing: a users guide. *J Appl Microbiol* **94**, 781-791.
- Koeuth, T., Versalovic, J. & Lupski, J. R. (1995).** Differential subsequence conservation of interspersed repetitive *Streptococcus pneumoniae* BOX elements in diverse bacteria. *Genome Res* **5**, 408-418.
- Koga, Y. & Zavaleta, A. I. (2005).** Intraspecies genetic variability of *Ornithobacterium rhinotracheale* in commercial birds in Peru. *Avian Dis* **49**, 108-111.
- Korbel, R. & Hafez, H. M. (2001).** Blepharokonjunktivitis in einem Putenbestand (*Meleagris gallopavo*). *Tierarztl Prax G N* **29**, 336-338.
- Koser, C. U., Ellington, M. J., Cartwright, E. J., Gillespie, S. H., Brown, N. M., Farrington, M., Holden, M. T., Dougan, G., Bentley, S. D., Parkhill, J. & Peacock, S. J. (2012).** Routine use of microbial whole genome sequencing in diagnostic and public health microbiology. *PLoS Pathog* **8**, e1002824.
- Larsen, M. V., Cosentino, S., Rasmussen, S., Friis, C., Hasman, H., Marvig, R. L., Jelsbak, L., Sicheritz-Ponten, T., Ussery, D. W., Aarestrup, F. M. & Lund, O. (2012).** Multilocus sequence typing of total-genome-sequenced bacteria. *J Clin Microbiol* **50**, 1355-1361.
- Leavis, H. L., Bonten, M. J. & Willems, R. J. (2006).** Identification of high-risk enterococcal clonal complexes: global dispersion and antibiotic resistance. *Curr Opin Microbiol* **9**, 454-460.
- Leroy-Setrin, S., Flaujac, G., Thenaisy, K. & Chaslus-Dancla, E. (1998).** Genetic diversity of *Ornithobacterium rhinotracheale* strains isolated from poultry in France. *Lett Appl Microbiol* **26**, 189-193.
- Li, W., Raoult, D. & Fournier, P. E. (2009).** Bacterial strain typing in the genomic era. *FEMS Microbiol Rev* **33**, 892-916.
- Loman, N. J., Constantinidou, C., Chan, J. Z., Halachev, M., Sergeant, M., Penn, C. W., Robinson, E. R. & Pallen, M. J. (2012).** High-throughput bacterial genome sequencing: an embarrassment of choice, a world of opportunity. *Nat Rev Microbiol* **10**, 599-606.
- Maiden, M. C., Bygraves, J. A., Feil, E., Morelli, G., Russell, J. E., Urwin, R., Zhang, Q., Zhou, J., Zurth, K., Caugant, D. A., Feavers, I. M., Achtman, M. & Spratt, B. G. (1998).** Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 3140-3145.
- Maiden, M. C. (2006).** Multilocus sequence typing of bacteria. *Annu Rev Microbiol* **60**, 561-588.
- Maiden, M. C., Jansen van Rensburg, M. J., Bray, J. E., Earle, S. G., Ford, S. A., Jolley, K. A. & McCarthy, N. D. (2013).** MLST revisited: the gene-by-gene approach to bacterial genomics. *Nat Rev Microbiol* **11**, 728-736.
- Mayer, L. W. (1988).** Use of plasmid profiles in epidemiologic surveillance of disease outbreaks and in tracing the transmission of antibiotic resistance. *Clin Microbiol Rev* **1**, 228-243.
- Medini, D., Serruto, D., Parkhill, J., Relman, D. A., Donati, C., Moxon, R., Falkow, S. & Rappuoli, R. (2008).** Microbiology in the post-genomic era. *Nat Rev Microbiol* **6**, 419-430.

- Meudt, H. M. & Clarke, A. C. (2007).** Almost forgotten or latest practice? AFLP applications, analyses and advances. *Trends Plant Sci* **12**, 106-117.
- Meunier, J. R. & Grimont, P. A. (1993).** Factors affecting reproducibility of random amplified polymorphic DNA fingerprinting. *Res Microbiol* **144**, 373-379.
- Mirzaie, S. & Hassanzadeh, M. (2013).** Molecular and phylogenetic characterization of *Ornithobacterium rhinotracheale* isolates from turkey, quail, partridge and domestic pigeon in Iran. *Journal of Animal and Poultry Sciences* **2**, 79-84.
- Moreno, B., Chacon, G., Villa, A., Fernandez, A., Vela, A. I., Fernandez-Garayzabal, J. F., Ferre, S. & Gracia, E. (2009).** Nervous signs associated with otitis and cranial osteomyelitis and with *Ornithobacterium rhinotracheale* infection in red-legged partridges (*Alectoris rufa*). *Avian Pathol* **38**, 341-347.
- Mortimer, P. & Arnold, C. (2001).** FAFLP: last word in microbial genotyping? *J Med Microbiol* **50**, 393-395.
- Numee, S., Hauck, R. & Hafez, H. M. (2012).** Detection and typing of *Ornithobacterium rhinotracheale* from German poultry flocks. *Avian Dis* **56**, 654-658.
- Olive, D. M. & Bean, P. (1999).** Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. *J Clin Microbiol* **37**, 1661-1669.
- Ozbey, G., Ertas, H. B. & Muz, A. (2005).** Random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis of *Ornithobacterium rhinotracheale* strains isolated from chickens in Turkey. *Vet Med-Czech* **50**, 526-530.
- Pedersen, K., Dietz, H. H., Jorgensen, J. C., Christensen, T. K., Bregnballe, T. & Andersen, T. H. (2003).** *Pasteurella multocida* from outbreaks of avian cholera in wild and captive birds in Denmark. *J Wildl Dis* **39**, 808-816.
- Pena-Vargas, E. R., Vega-Sanchez, V., Morales-Erasto, V., Trujillo-Ruiz, H. H., Talavera-Rojas, M. & Soriano-Vargas, E. (2016).** Serotyping, Genotyping, and Antimicrobial Susceptibility of *Ornithobacterium rhinotracheale* Isolates from Mexico. *Avian Dis* **60**, 669-672.
- Petersen, K. D., Christensen, J. P., Permin, A. & Bisgaard, M. (2001).** Virulence of *Pasteurella multocida* subsp. *multocida* isolated from outbreaks of fowl cholera in wild birds for domestic poultry and game birds. *Avian Pathol* **30**, 27-31.
- Popp, C. (2003).** *Ornithobacterium rhinotracheale*: Typisierung, Pathogenität, Resistenzverhalten und Bekämpfung, pp. 245. Freie Universität Berlin, Germany.
- Roberts, I. S. (1996).** The biochemistry and genetics of capsular polysaccharide production in bacteria. *Annu Rev Microbiol* **50**, 285-315.
- Sabat, A. J., Budimir, A., Nashev, D., Sa-Leao, R., van Dijk, J., Laurent, F., Grundmann, H. & Friedrich, A. W. (2013).** Overview of molecular typing methods for outbreak detection and epidemiological surveillance. *Euro Surveill* **18**, 20380.
- 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**, 502-503.

- Schwartz, D. C. & Cantor, C. R. (1984).** Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Cell* **37**, 67-75.
- Selander, R. K., Caugant, D. A., Ochman, H., Musser, J. M., Gilmour, M. N. & Whittam, T. S. (1986).** Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics. *Appl Environ Microbiol* **51**, 873-884.
- Sharples, G. J. & Lloyd, R. G. (1990).** A novel repeated DNA sequence located in the intergenic regions of bacterial chromosomes. *Nucleic Acids Res* **18**, 6503-6508.
- Southern, E. M. (1975).** Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* **98**, 503-517.
- Spratt, B. G. (1999).** Multilocus sequence typing: molecular typing of bacterial pathogens in an era of rapid DNA sequencing and the internet. *Curr Opin Microbiol* **2**, 312-316.
- Spratt, B. G., Hanage, W. P., Li, B., Aanensen, D. M. & Feil, E. J. (2004).** Displaying the relatedness among isolates of bacterial species -- the eBURST approach. *FEMS Microbiol Lett* **241**, 129-134.
- Stackebrandt, E., Frederiksen, W., Garrity, G. M., Grimont, P. A., Kampfer, P., Maiden, M. C., Nesme, X., Rossello-Mora, R., Swings, J., Truper, H. G., Vauterin, L., Ward, A. C. & Whitman, W. B. (2002).** Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *Int J Syst Evol Microbiol* **52**, 1043-1047.
- Statistisches Bundesamt, W. (2016).** Available
"<https://www.destatis.de/DE/ZahlenFakten/Wirtschaftsbereiche/LandForstwirtschaftFischerei/TiereundtierischeErzeugung/Tabellen/Gefluegelfleisch.html>" (Accessed: 10.11.2016).
- Stern, M. J., Ames, G. F., Smith, N. H., Robinson, E. C. & Higgins, C. F. (1984).** Repetitive extragenic palindromic sequences: a major component of the bacterial genome. *Cell* **37**, 1015-1026.
- Struelens, M. J. (1996).** Consensus guidelines for appropriate use and evaluation of microbial epidemiologic typing systems. *Clin Microbiol Infect* **2**, 2-11.
- Struelens, M. J. (1998).** Molecular epidemiologic typing systems of bacterial pathogens: current issues and perspectives. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **93**, 581-585.
- Subaaharan, S., Blackall, L. L. & Blackall, P. J. (2010).** Development of a multi-locus sequence typing scheme for avian isolates of *Pasteurella multocida*. *Vet Microbiol* **141**, 354-361.
- Szabo, R., Wehmann, E. & Magyar, T. (2015).** Antimicrobial susceptibility of *Bordetella avium* and *Ornithobacterium rhinotracheale* strains from wild and domesticated birds in Hungary. *Acta Vet Hung* **63**, 413-424.
- Tabatabai, L. B., Zimmerli, M. K., Zehr, E. S., Briggs, R. E. & Tatum, F. M. (2010).** *Ornithobacterium rhinotracheale* North American field isolates express a hemolysin-like protein. *Avian Dis* **54**, 994-1001.
- Tankouo-Sandjong, B., Sessitsch, A., Liebana, E., Kornschöber, C., Allerberger, F., Hachler, H. & Bodrossy, L. (2007).** MLST-v, multilocus sequence typing based on virulence genes, for molecular typing of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovars. *J Microbiol Methods* **69**, 23-36.

Tanyi, J., Bistyak, A., Kaszanyitzky, E., Vetesi, F. & Doboskovacs, F. (1995). Isolation of *Ornithobacterium rhinotracheale* from chickens, hens and turkeys showing respiratory symptoms - preliminary report. *Magy Allatorvosok* **50**, 328-330.

Tenover, F. C., Arbeit, R., Archer, G., Biddle, J., Byrne, S., Goering, R., Hancock, G., Hebert, G. A., Hill, B., Hollis, R. & et al. (1994). Comparison of traditional and molecular methods of typing isolates of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* **32**, 407-415.

Tenover, F. C., Arbeit, R. D., Goering, R. V., Mickelsen, P. A., Murray, B. E., Persing, D. H. & Swaminathan, B. (1995). Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* **33**, 2233-2239.

Tenover, F. C., Arbeit, R. D. & Goering, R. V. (1997). How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: a review for healthcare epidemiologists. Molecular Typing Working Group of the Society for Healthcare Epidemiology of America. *Infect Control Hosp Epidemiol* **18**, 426-439.

Thachil, A. J., Velayudhan, B. T., Lopes-Berkas, V. C., Halvorson, D. A. & Nagaraja, K. V. (2007). Application of polymerase chain reaction fingerprinting to differentiate *Ornithobacterium rhinotracheale* isolates. *J Vet Diagn Invest* **19**, 417-420.

Thibodeau, S. N. (1987). Use of restriction fragment length polymorphism analysis for detecting carriers of "fragile X" syndrome. *Clin Chem* **33**, 1726-1730.

Thieme, S., Hafez, H. M., Gutzer, S., Warkentin, N., Luschow, D. & Muhldorfer, K. (2016a). Multilocus sequence typing of *Ornithobacterium rhinotracheale* isolated from pigeons and birds of prey revealed new insights into its population structure. *Veterinary and Animal Science* **1-2**, 15-20.

Thieme, S., Muhldorfer, K., Luschow, D. & Hafez, H. M. (2016b). Molecular characterization of the recently emerged poultry pathogen *Ornithobacterium rhinotracheale* by multilocus sequence typing. *PLoS ONE* **11**, e0148158.

Thomas, C. M. & Nielsen, K. M. (2005). Mechanisms of, and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria. *Nat Rev Microbiol* **3**, 711-721.

Travers, A. F. (1996). Concomitant *Ornithobacterium rhinotracheale* and Newcastle disease infection in broilers in South Africa. *Avian Dis* **40**, 488-490.

Tsai, H. J. & Huang, C. W. (2006). Phenotypic and molecular characterization of isolates of *Ornithobacterium rhinotracheale* from chickens and pigeons in Taiwan. *Avian Dis* **50**, 502-507.

Urwin, R. & Maiden, M. C. J. (2003). Multi-locus sequence typing: a tool for global epidemiology. *Trends Microbiol* **11**, 479-487.

van Beek, P. N., van Empel, P. C., van den Bosch, G., Storm, P. K., Bongers, J. H. & du Preez, J. H. (1994). [Respiratory problems, growth retardation and arthritis in turkeys and broilers caused by a Pasteurella-like organism: *Ornithobacterium rhinotracheale* or 'Taxon 28']. *Tijdschr Diergeneesk* **119**, 99-101.

van Belkum, A., van Leeuwen, W., Kaufmann, M. E., Cookson, B., Forey, F., Etienne, J., Goering, R., Tenover, F., Steward, C., O'Brien, F., Grubb, W., Tassios, P., Legakis, N., Morvan, A., El Solh, N., de Ryck, R., Struelens, M., Salmenlinna, S., Vuopio-Varkila, J., Kooistra, M., Talens, A., Witte, W. & Verbrugh, H. (1998). Assessment of resolution and

intercenter reproducibility of results of genotyping *Staphylococcus aureus* by pulsed-field gel electrophoresis of *Sma*I macrorestriction fragments: a multicenter study. *J Clin Microbiol* **36**, 1653-1659.

van Belkum, A., Struelens, M., de Visser, A., Verbrugh, H. & Tibayrenc, M. (2001). Role of genomic typing in taxonomy, evolutionary genetics, and microbial epidemiology. *Clin Microbiol Rev* **14**, 547-560.

Van Empel, P., Van den Bosch, H., Goovaerts, D. & Storm, P. (1996). Experimental infection in turkeys and chickens with *Ornithobacterium rhinotracheale*. *Avian Dis* **40**, 858-864.

Van Empel, P., Van den Bosch, H., Loeffen, P. & Storm, P. (1997). Identification and serotyping of *Ornithobacterium rhinotracheale*. *J Clin Microbiol* **35**, 418-421.

Van Empel, P. (1998). *Ornithobacterium rhinotracheale*. The University of Utrecht, The Netherlands.

Van Empel, P., Savelkoul, P., Segers, R., Stoof, J., Loeffen, P. & Van der Bosch, H. (1998a). Molecular characterization of *Ornithobacterium rhinotracheale*. In *Ornithobacterium rhinotracheale*, pp. 37-48. Utrecht, the Netherlands.

Van Empel, P., Van den Bosch, H. & Storm, P. (1998b). *Ornithobacterium rhinotracheale* infection by egg transmission. In *Ornithobacterium rhinotracheale*, pp. 49-56. Utrecht, the Netherlands.

Van Empel, P., Vrijenhoek, M., Goovaerts, D. & Van den Bosch, H. (1999). Immunohistochemical and serological investigation of experimental *Ornithobacterium rhinotracheale* infection in chickens. *Avian Pathol* **28**, 187-193.

Van Empel, P. C. M. & Hafez, H. M. (1999). *Ornithobacterium rhinotracheale*: A review. *Avian Pathol* **28**, 217-227.

Van Veen, L., Vrijenhoek, M. & Van Empel, P. (2004). Studies of the transmission routes of *Ornithobacterium rhinotracheale* and immunoprophylaxis to prevent infection in young meat turkeys. *Avian Dis* **48**, 233-237.

Vandamme, P., Segers, P., Vancanneyt, M., van Hove, K., Mutters, R., Hommez, J., Dewhirst, F., Paster, B., Kersters, K., Falsen, E., Devriese, L. A., Bisgaard, M., Hinz, K. H. & Mannheim, W. (1994). *Ornithobacterium rhinotracheale* gen. nov., sp. nov., isolated from the avian respiratory tract. *Int J Syst Bacteriol* **44**, 24-37.

Vandamme, P., Vancanneyt, M., Segers, P., Ryll, M., Kohler, B., Ludwig, W. & Hinz, K. H. (1999). *Coenonia anatina* gen. nov., sp. nov., a novel bacterium associated with respiratory disease in ducks and geese. *Int J Syst Bacteriol* **49 Pt 2**, 867-874.

Versalovic, J., Koeuth, T. & Lupski, J. R. (1991). Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res* **19**, 6823-6831.

Vogel, L., Jones, G., Triep, S., Koek, A. & Dijkshoorn, L. (1999). RAPD typing of *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Serratia marcescens* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates using standardized reagents. *Clin Microbiol Infect* **5**, 270-276.

Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M. & et al. (1995). AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res* **23**, 4407-4414.

Waldow, K. (2009). Untersuchungen zur Embryoletalität, Genotypisierung und Resistenzlage aktueller *Ornithobacterium rhinotracheale*-Isolate, pp. 130. Freie Universität Berlin, Germany.

Welchman, D. d. B., Ainsworth, H. L., Jensen, T. K., Boye, M., King, S. A., Koylass, M. S., Whatmore, A. M., Manvell, R. J., Ayling, R. D. & Dalton, J. R. (2013). Demonstration of *Ornithobacterium rhinotracheale* in pheasants (*Phasianus colchicus*) with pneumonia and airsacculitis. *Avian Pathol* **42**, 171-178.

Welsh, J. & McClelland, M. (1990). Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res* **18**, 7213-7218.

Williams, J. G., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A. & Tingey, S. V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res* **18**, 6531-6535.

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.

Zhang, S. L., Shen, J. G., Xu, P. H., Li, D. X., Sun, Z. Q., Li, L., Yang, Z. R. & Sun, Q. (2007). A novel genotypic test for rapid detection of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates by a multiplex probe array. *J Appl Microbiol* **103**, 1262-1271.

Zhang, W., Jayarao, B. M. & Knabel, S. J. (2004). Multi-virulence-locus sequence typing of *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol* **70**, 913-920.

10 Anhang

10.1 Publikation 1

Thieme, S., Mühldorfer, K., Lüscho, D. & Hafez, H. M. (2016). Molecular characterization of the recently emerged poultry pathogen *Ornithobacterium rhinotracheale* by multilocus sequence typing. PLoS ONE 11(2), e0148158

Nach Veröffentlichung des Manuskripts wurde ein weiterer Autor in die Autorenzeile mit aufgenommen. Die entsprechende Zitierung lautet:

Thieme, S., Mühldorfer, K., Gad, W., Lüscho, D. & Hafez, H. M. (2016). Molecular characterization of the recently emerged poultry pathogen *Ornithobacterium rhinotracheale* by multilocus sequence typing. PLOS ONE 11(9), e0148158

RESEARCH ARTICLE

Molecular Characterization of the Recently Emerged Poultry Pathogen *Ornithobacterium rhinotracheale* by Multilocus Sequence Typing

Susann Thieme*, Kristin Mühldorfer[‡], Dörte Lüschow, Hafez M. Hafez

Institute of Poultry Diseases, Freie Universität Berlin, Berlin, Germany

[‡] Current address: Department of Wildlife Diseases, Leibniz Institute for Zoo and Wildlife Research, Berlin, Germany

* Susann.Thieme@fu-berlin.de



OPEN ACCESS

Citation: Thieme S, Mühldorfer K, Lüschow D, Hafez HM (2016) Molecular Characterization of the Recently Emerged Poultry Pathogen *Ornithobacterium rhinotracheale* by Multilocus Sequence Typing. PLoS ONE 11(2): e0148158. doi:10.1371/journal.pone.0148158

Editor: Patrick CY Woo, The University of Hong Kong, HONG KONG

Received: September 14, 2015

Accepted: January 13, 2016

Published: February 1, 2016

Copyright: © 2016 Thieme et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: The DNA sequences of the distinct alleles at the 7 loci of ORT strains used in this study have been deposited in GenBank under accession nos. KP775847-KP775856 (adk), KP775857-KP775868 (aroE), KP775869-KP775877 (fumC), KP775878-KP775888 (gdhA), KP775889-KP775897 (mdh), KP775898-KP775908 (pgi) and KP775909-KP775919 (pmi). Information about primer, PCR conditions, allele sequences, sequence types and isolates have been made publicly available in the ORT MLST database (<http://pubmlst.org/ornithotracheale/>) hosted at the University of Oxford

Abstract

Ornithobacterium rhinotracheale (ORT) is an economically important bacterial pathogen of turkeys and chickens worldwide. Since its first detection, a variety of typing methods have been used to gain basic knowledge about the bacterial population structure, an issue that still needs to be addressed. Serological characterization revealed at least 18 different serotypes (A-R) with ORT of serotype A to be predominate among poultry. This study aimed to establish a multilocus sequence typing (MLST) scheme for ORT that could easily be used by other laboratories and allows for worldwide comparison of sequence data. For this purpose, 87 ORT strains from different poultry hosts, geographical origins, years of isolation and serotypes were included in the analysis to identify correlations. Fourteen different sequence types (ST) were found. The most common ST1 was identified in 40 ORT strains from turkeys and chickens on 4 continents and in 3 different European countries. Together with ST9, both STs represented over three quarters (77%) of ORT strains used in the MLST analysis and included strains of frequently cross-reacting ORT serotypes A, E and I. Nine STs were only represented by one ORT strain and might indicate possible avian host, disease or serotype-specific relationships. In contrast, discrepancies between serotype and phylogenetic relatedness were clearly demonstrated by ORT strains that belonged to identical serotypes but differed in their ST. The overall identified low genetic diversity among strains isolated from turkeys and chickens independent of host and geographical origins suggests that ORT has only recently been introduced into domestic poultry and dispersed worldwide.

Introduction

Ornithobacterium rhinotracheale (ORT) has become an important pathogen of turkeys and chickens since its first detection and classification in the early 1990s [1, 2]. Clinical symptoms

[32]. Users are encouraged to upload their MLST data together with background information of ORT strains for comparison and epidemiological studies.

Funding: These authors have no support or funding to report.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

of infected birds range from respiratory disease, arthritis and increased mortality to growth retardation and decreased egg production. Main pathological findings are fibrinopurulent airsacculitis and pneumonia, sometimes paired with pericarditis and perihepatitis [3]. The severity of ORT infections increases strongly by predisposing factors, such as poor management, high stocking density and inadequate ventilation [3] as well as coinfections with other respiratory pathogens [4–6].

ORT is an emerging bacterial pathogen of global concern in poultry production and has already been isolated in the USA, Brazil, France, the Netherlands, Germany, South Africa, Israel, Japan, Taiwan and even more countries [7–10]. A wide variety of birds including economically important poultry species as well as wild birds like pigeons, pheasants, partridges, falcons and rooks [1, 7, 11, 12] are susceptible to ORT infection or have been found to carry ORT.

Different typing methods have been attempted for characterization of ORT strains and epidemiological investigations. Serological typing of ORT strains by agar gel precipitation test (AGP) is a very practical and common method that was established in 1997 for immunological purposes [9]. Since then 18 different serotypes (A–R) have been reported [13, 14], with A being the most predominate serotype of ORT in poultry. About 95% of ORT isolated from chickens and more than 50% of ORT strains from turkeys belong to serotype A [9, 15]. Cross-reactions between 2 or more ORT serotypes such as A, E and I are common and some strains are not typeable with available antisera [15, 16].

Amonsin et al. [17] were first to investigate the molecular epidemiology of 55 ORT strains from avian hosts in 8 countries on 4 continents by comparison of 3 different methods. The results of multilocus enzyme electrophoresis (MLEE), repetitive sequence based polymerase chain reaction (rep-PCR) and 16S ribosomal RNA (rRNA) gene analyses indicated that ORT strains were genetically closely related independent of hosts and geographic origins. This observation was confirmed by ribotyping results of Leroy-Setrin et al. [18], who characterized 23 ORT strains from 5 different poultry species in France also by plasmid and by random amplified polymorphic DNA (RAPD) analyses. Only RAPD analysis provided good level of discriminatory power indicating 3 different clusters of ORT strains without obvious host-specific differences. Due to the lack of serotype information, a possible relationship was not investigated [18]. A subsequent RAPD analysis of 6 field strains from chickens in Turkey [19] included strains of serotypes A to E (this study RefA–RefE), but did not find clear genotype-serotype correlations. Similar results were obtained for 117 field strains of different serotypes from France and Germany by comparing their RAPD profiles with those of different serotype reference strains (this study RefA–RefQ) [20]. The author concluded that only strains of serotype A might produce a reliable fingerprinting by RAPD-PCR. At least, the comparison of 16S rRNA and OR01 gene analyses [15] and pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) [21] results of several ORT field strains with those of ORT serotype reference strains (this study RefA–RefQ) showed consistent genotype-serotype relationships.

As indicated by the results of previous studies, different methods have been used for molecular characterization of ORT. Many included only small numbers of ORT strains, strains representing one poultry host or geographical origin or strains without serotype information, making comparisons between laboratories difficult. Consequently, relevant questions on the population genetic structure and epidemiology of ORT infections still need to be addressed, as for example, to understand the molecular basis of serotype cross-reactivity and their relevance for disease prevention [22, 23].

MLST has been frequently used as powerful tool for reliable molecular characterization of bacteria and fungi, and particularly to address epidemiological questions [24]. The analysis is highly standardized by targeting a set of different gene loci that are distributed on the whole

genome of the bacterium. MLST results are unambiguous, highly reproducible and portable, and easily allow the comparison of sequence data together with background information from bacterial strains on a broader context and between laboratories worldwide [25].

The present study aimed to establish MLST as an advanced alternative typing method for ORT. Relationships of possible importance in the epidemiology of ORT infections were investigated by molecular characterization of a variety of strains of different serotypes that have been collected between 1983 and 2014 from different avian hosts and geographical origins.

Materials and Methods

Bacterial strains

Eighty-seven strains of previously identified ORT were used for the development of MLST comprising 17 ORT reference strains of serotypes A–Q (RefA–RefQ), 69 field strains from turkeys and chickens of different serotypes, geographical origins and years of isolation as well as the ORT type strain DSM 15997 (complete genome available under accession number NC_018016). The ORT field strains have previously been serotyped using agar gel precipitation test as formerly described [14, 16]. Details of all 87 ORT strains are provided as S1 Table. As several ORT strains were identical in their partial gene sequences, 34 out of 87 ORT strains were selected as representatives for presentation of the MLST outcome (Table 1) and phylogenetic analysis (Fig 1). The 34 ORT strains included the ORT type strain DSM 15997, 17 ORT serotype reference strains (RefA–RefQ) and 16 ORT field strains to enable the comparison of different characteristics (serotype, host, geographical origin and year of isolation) possibly associated with MLST results.

DNA extraction

All ORT strains were cultured from frozen bacterial stocks onto Columbia agar plates with 7% sheep blood and were incubated at 37°C under a 5% CO₂ atmosphere for 24–48 hours. DNA extraction was performed by heat cell lysis for Gram-negative bacteria. A loopful of bacterial colonies dissolved in 200 µl of nuclease free water was heated at 98°C for 10 minutes followed by 10 minutes of centrifugation (20,000 × g). The supernatant was used as DNA template for PCR analysis and stored at -20°C until further use.

Selection of housekeeping genes for MLST

A set of 7 different housekeeping genes were selected for MLST of ORT (Table 2) based on previous studies of MLEE analysis of ORT [17] and MLST analysis of *Pasteurella multocida* [27] because of high similarities between both bacterial species [2]. Three genes (*adk*, *mdh*, *pgi*) were present in both studies, whereas genes *aroE* and *fumC* were selected from MLEE analysis and genes *gdhA* and *pmi* from MLST of *P. multocida* (Table 2). Gene loci are scattered across the main chromosome to ensure independence from each other.

Gene amplification and sequencing

PCR analysis and partial sequencing of 7 housekeeping genes was performed on 86 out of 87 ORT strains. Gene sequences from the ORT type strain DSM 15997 were taken directly from GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/index.html>).

The primer sets used for MLST analysis (Table 2) were created based on the genomic sequence of ORT type strain DSM 15997 using the primer designing tool Primer 3 [28]. For the ORT reference strain of serotype F (RefF), a different reverse primer (5'-TCRTTCC ATTTTGGTTCCTT-3') was used for PCR amplification and partial sequencing of the housekeeping gene *adk* to yield the desired amplicon.

Table 1. Details of 34 representative strains used for multilocus sequence typing of *Ornithobacterium rhinotracheale*.

ORT strain	Strain designation	Year of isolation	Host	Geographic origin	Serotype
Type strain	DSM 15997	1988	Turkey	United Kingdom	A, I
RefA	B3263/91	1991	Chicken	South Africa	A
RefB	GGD1261/91	1991	Turkey	Germany	B
RefC	ORV K91-201	1991	Chicken	USA	C
RefD	ORV 94084 nr.2	1994	Turkey	France	D
RefE	O-95029 nr.12229	1995	Chicken	France	E
RefF	ORV 94084 K858	1994	Turkey	The Netherlands	F
RefG	O-95029 nr.16279	1995	Chicken	France	G
RefH	E-94063 4.2.	1994	Turkey	The Netherlands	H
RefI	BAC-96-8334	1996	Turkey	USA	I
RefJ	O-97091 HEN81-2	1997	Chicken	The Netherlands	J
RefK	BAC970321101 5m	1997	Chicken	USA	K
RefL	O-97071 BUT 2237	1997	Turkey	United Kingdom	L
RefM	TOP 98036 98.4500	1998	Turkey	France	M
RefN	TOP 99023 LMG13114	1992	Guinea Fowl	Belgium	N
RefO	TOP 99023 LMG11553	1983	Rook	Germany	O
RefP	TOP 99090 may 71	1999	Turkey	United Kingdom	P
RefQ	O-95256 sp 1507	1995	Chicken	The Netherlands	Q
Field strains	GK 1112/96	1996	Pheasant	Germany	D
	GB 1312/05/1	2005	Turkey	France	J
	GB 1312/05/2	2005	Turkey	France	C
	GB 1312/05/3	2005	Turkey	France	A
	GB 978/14/1	2008	Turkey	Germany	F (H) ^a
	GB 371/09/5	2009	Turkey	Chile	I (J) ^a
	GB 371/09/6	2009	Turkey	Chile	I (J, L) ^a
	GB 137/10/2	2010	Chicken	Germany	n. t.
	GB 738/10/3	2010	Turkey	Germany	C
	GB 1573/11/17	2011	Turkey	Germany	n.t.
	GB 2221/11/2	2011	Turkey	Germany	A
	GB 1707/12/1	2012	Chicken	China	^b
	GB 1707/12/2	2012	Chicken	China	^b
	GB 2269/13	2013	Chicken	Germany	I
	GB 2399/13	2013	Chicken	Germany	A
	GB 1580/14/2	2014	Turkey	Germany	H

RefA-RefQ: ORT strains of serotypes A to Q that have been used for production of reference antisera for serological typing of ORT field strains [9]. n.t.:

ORT strain that could not be typed with available antisera A to L.

^a Slight serotype cross-reactions of ORT strains are given in parentheses.

^b The serotype of the respective ORT strain was not determined, as only DNA was available for MLST analysis.

doi:10.1371/journal.pone.0148158.t001

PCR was carried out using Ready-To-Go PCR beads (GE Healthcare, Freiburg, Germany) with 25 µl reaction volumes containing 1 µl of bacterial DNA and 1 µl of the respective forward and reverse primers (25 pmol/µl). PCR cyclor conditions for all genes were the following: initial denaturation at 94°C for 5 minutes followed by 30 cycles of denaturation at 94°C for 30 seconds, annealing at 52°C for 60 seconds and extension at 72°C for 90 seconds. The final extension at 72°C for 7 minutes completed the PCR. Clean-up of PCR products and Sanger

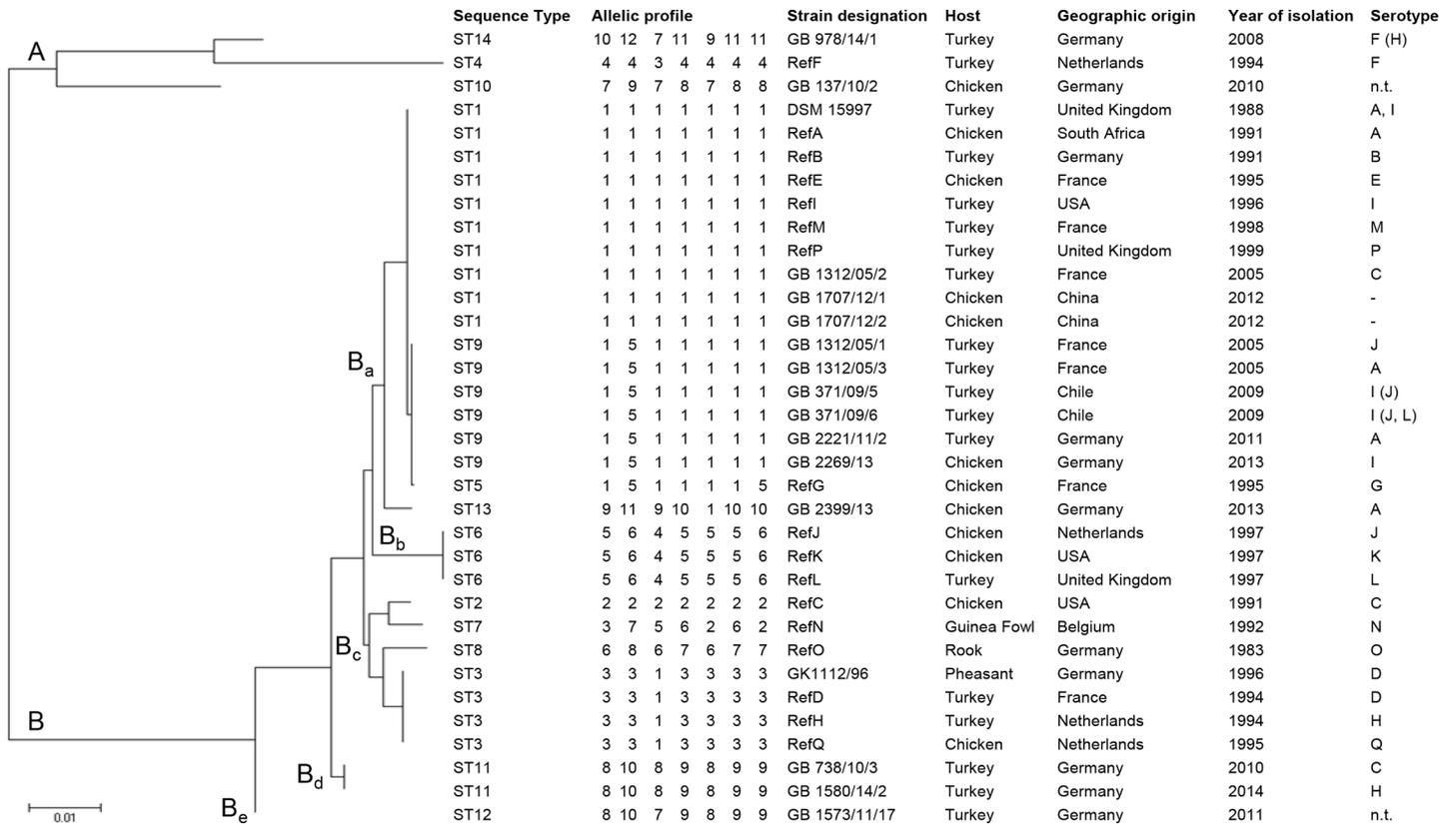


Fig 1. Phylogenetic tree showing the relatedness of 34 representative ORT strains generated from MLST sequences by using the maximum likelihood method of MEGA6 [26]. ORT strains included in the phylogenetic analysis comprised 17 reference strains of serotypes A-Q (RefA-RefQ), 16 field strains mainly from turkeys and chickens of different geographic origins and the ORT type strain DSM 15997. Two main clusters (A and B) and 5 subclusters (Ba-Be) were indicated. Details on sequence type (ST), allelic profile, strain identification (ID), host, geographic origin and serotype were provided. ORT strains that could not be typed with available antisera A to L were indicated by 'n.t.'. Slight serotype cross-reactions in the agar gel precipitation test are given in parentheses. For ORT field strains from China (GB 1707/12), only DNA was available for MLST analysis and the serotype has not yet been determined.

doi:10.1371/journal.pone.0148158.g001

sequencing in both directions were performed by microtitre plate sequencing at LGC Genomics, Berlin, Germany.

MLST analysis

Raw sequence chromatograms were visually screened for quality with the Chromas Lite software (version 2.01; Technelysium Pty Ltd, South Brisbane, Australia) and sequences were uploaded to BioNumerics (version 7.1.; Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium).

For each gene locus, nucleotide sequence differences between strains were identified by alignment and distinct alleles were numbered in ascending order. The composition of 7 allele numbers formed the allelic profile of the ORT strain and the subsequent ST in order of identification (ST1, ST2, . . .). Thus, each unique allelic profile represented a new ST.

Discriminatory power was calculated with the formula of Simpson's index of the discriminatory ability (D) as previously described [29] by using the tool http://insilico.ehu.es/mini_tools/discriminatory_power/index.php. The discriminatory ability describes the capability of a typing method to identify strains to be different from each other. The sum ranges from 0.0 to 1.0 and estimates the probability to obtain different types for two strains randomly selected from a sample. The higher the index the more discriminatory the method.

Table 2. Housekeeping genes, primers and corresponding gene fragments used for multilocus sequence typing of *Ornithobacterium rhinotracheale*.

Gene	Protein product	Primer (5'→3') ^a	Fragment size used for MLST	MLEE of ORT [17]	MLST of <i>P. multocida</i> [27]
<i>adk</i>	Adenylate kinase	F: GGCAGTGGAAAAGGAACTCA R: TCTAAACTTCCTTCGCCGTTT	393 bp	X	X
<i>aroE</i>	Shikimate 5-dehydrogenase	F: GGACTCATCGGCAGAAACAT R: TGATGTTGGCATCTTGTGCT	489 bp	X (SKD) ^b	
<i>fumC</i>	Fumarase, class II	F: CACGCCACAAGGTTATGATG R: TAAACGCACGGCTTCTTCTT	489 bp	X (FU2) ^b	
<i>gdhA</i>	Glutamate dehydrogenase/Leucine dehydrogenase	F: TCTGGTAGAGCACCAAACCA R: GCTTGTTTTGCAACCACTCA	480 bp		X
<i>mdh</i>	Malate dehydrogenase (NAD)	F: CGCGAAGAATTAATCGGAAC R: CTCTTACTTGCGCAACAGCA	519 bp	X	X
<i>pgi</i>	Glucose-6-phosphate isomerase	F: AAAGCGACATTGCCAAACAT R: TTTCGAGTTCGGCTCTCACT	492 bp	X	X
<i>pmi</i>	Phosphomannose isomerase	F: TGATGTGCAAGGCAATGTTT R: CTGTGTCGAGCGAAATGCTA	489 bp		X

^a F—forward primer; R—reverse primer.

^b Abbreviations used by Amonsin et al. [17] for the respective enzyme.

doi:10.1371/journal.pone.0148158.t002

The index of association (I_A) describes the level of genetic recombination and was calculated as described by Maynard Smith et al. [30] using the START2 software [31]. A value of zero reflects no association between gene loci (linkage equilibrium). If the index is significantly different from zero more recombination takes place in the population.

For each of the 34 representative ORT strains, partial sequences of the 7 alleles were concatenated and a phylogenetic tree was built with the MEGA software (version 6) using the maximum likelihood method [26].

Nucleotide sequence accession numbers

The DNA sequences of the distinct alleles at the 7 loci of ORT strains used in this study have been deposited in GenBank under accession nos. KP775847-KP775856 (*adk*), KP775857-KP775868 (*aroE*), KP775869-KP775877 (*fumC*), KP775878-KP775888 (*gdhA*), KP775889-KP775897 (*mdh*), KP775898-KP775908 (*pgi*) and KP775909-KP775919 (*pmi*).

Information about primer sequences, PCR conditions, allele sequences, sequence types and isolates have been made available at the ORT MLST website (<http://pubmlst.org/orhinotracheale/>) sited at the University of Oxford [32].

Results and Discussion

The purpose of this study was to enable the characterization of ORT strains under standardized conditions by developing a MLST scheme, which could easily be used and expanded by other laboratories, and finally allows for worldwide comparison of sequence data. To approach this idea, 7 housekeeping genes were identified from previous studies on ORT [17] and *P. multocida* [27], and newly developed primer pairs were used for partial sequencing of ORT strains representing different poultry hosts, geographical origins, years of isolation and serotypes.

MLST analysis

The length of the gene sequences used for MLST varied from 393 bp (*adk* gene) to 519 bp (*mdh* gene). No deletions or insertions were identified in any of the sequences. For 87 ORT strains, 9 to 12 alleles for each gene locus were distinguished with a mean number of 10.43.

The number of polymorphic sites varied notably between the 7 housekeeping genes. For example, a maximum number of 22 and 105 polymorphic sites were identified within the partial sequences of genes *pmi* and *gdhA*, respectively (Table 3). Most nucleotide polymorphisms were seen in 3 strains, namely RefF (turkey, the Netherlands), GB 978/14/1 (turkey, Germany) and GB 137/10/2 (chicken, Germany). The number of polymorphic sites among *gdhA* gene sequences decreased markedly from 105 to 10 if these 3 strains were excluded from the analysis (Table 3).

Fourteen different STs were identified among the 87 ORT strains by MLST, which is low compared to results of other bacterial species [27, 33–35]. Nine sequence types were only represented by one ORT strain (Fig 1). The most common ST1 was identified in 40 (46%) ORT strains and included 6 different serotype reference strains (RefA, RefB, RefE, RefI, RefM, RefP) as well as type strain DSM 15997. Together with the closely related ST9, which differed only in one allele from ST1, both STs represented 77% of ORT strains. Sequence types 3, 6 and 11 included 4, 3 and 4 strains, respectively. The value of the discriminatory power was 0.6937, which is low compared to MLST indices of other bacterial species that offered discriminatory powers close to 1.0 [27, 35, 36].

The index of association (I_A) calculated for all 87 strains analyzed was 4.86. Significant linkage disequilibrium was detected indicating clonal population structures. Limited genetic heterogeneity of ORT has been suggested by Amonsin et al. [17] who characterized different ORT strains from poultry hosts of various geographical origins by MLEE, rep-PCR and 16S rRNA gene analyses. The authors supposed that all strains from domesticated poultry belong to a single clonal complex. Similar results have also been shown by whole-cell protein analyses. Hung and Alvarado [37] analyzed 25 ORT strains from outbreaks of respiratory disease in chickens from Peru and found identical SDS-PAGE protein patterns.

Two distinct phylogenetic clusters A and B were identified in the phylogenetic tree generated from MLST sequences (Fig 1). Three ORT strains (RefF, GB 978/14/1 and GB 137/10/2) from turkeys and chicken in Germany and the Netherlands formed cluster A and differed considerably from the vast majority of ORT strains (all cluster B) included in this study. Interestingly, they represented 2 strains of the rarely identified serotype F and one field strain that was not typeable with available antisera. Thus, cluster B included 84 (96.6%) of the 87 investigated ORT strains and was divided into 5 closely related subclusters (Ba-Be).

Table 3. Maximum number of alleles and polymorphic sites per gene locus.

Gene	Number of different alleles	Number of polymorphic sites	Number of polymorphic sites without cluster A
<i>adk</i>	10	51	14
<i>aroE</i>	12	73	25
<i>fumC</i>	9	58	24
<i>gdhA</i>	11	105	10
<i>mdh</i>	9	73	18
<i>pgi</i>	11	59	12
<i>pmi</i>	11	22	12
Total	14 different STs	441	115

doi:10.1371/journal.pone.0148158.t003

Relationships between STs and hosts

Eighty-four out of 87 ORT strains (96.6%) were isolated from turkeys or chickens (S1 Table) and did not reveal clear species-specific correlations based on MLST results. Sequence types, which were identified more than once (ST1, ST3, ST6 and ST9), comprised strains from both turkey and chicken. The only exception was ST11 that solely included field strains from turkeys.

As mentioned before, high genetic similarity among ORT strains independent of poultry hosts has been reported by Amonsin et al. [17]. Van Empel et al. [38] showed that ORT strains isolated either from turkeys or chickens produce similar disease symptoms in cross-infection experiments. However, rep-PCR results of Amonsin et al. [17] indicated that ORT clones infecting passeriform birds were genetically distinct from clones infecting galliform birds. Clear host-specific differences between ORT strains from non-galliform birds such as pigeons and those from poultry species have also been shown by 16S rRNA analysis [7].

In this study, 3 ORT strains originated from pheasant, guinea fowl and rook. Both ORT strains from guinea fowl (RefN) and rook (RefO) formed unique STs (ST7 and ST8), while the pheasant-derived field strain (serotype D) belonged to ST3 together with reference strains of serotypes D, H and Q isolated from turkey or chicken. The 3 strains isolated from non-commercial-poultry host species or respective from a passeriform bird were included in subcluster Bc of the main cluster B (Fig 1).

Relationship between STs and geographic origin

The MLST analysis included strains from 9 different countries and 4 continents (S1 Table) that were widely distributed across STs and phylogenetic clusters (Fig 1). ORT strains from different geographical origins were assigned to identical STs, namely ST1, ST3, ST6 and ST9, indicating that a specific ST is not linked to geographical origin. For example, subcluster Ba included 68 (78.2%) ORT strains of 4 STs from 7 countries on 4 continents. Such a global distribution of few STs that grouped phylogenetically very close together provides further evidence of highly clonal bacterial population structures. Likewise, analyses of either outer membrane or total proteins demonstrated high similarities between polypeptide profiles of ORT strains originating from various countries worldwide [1, 13].

Interestingly, ST11 was identified in 4 field strains that have been isolated in different years from turkey flocks in Germany (S1 Table). This relationship to bacterial origin might be biased because of the randomized dataset used for the development of MLST. However, PFGE results of Popp [21] indicated a possible relation between geographical origin and genetic homogeneity of ORT strains. Her analysis included 11 field strains from Hungary that together with only one strain from Germany had identical PFGE patterns and represented a single clonal complex of only 41% similarity to other ORT strains.

Relationship between STs and year of isolation

The 87 ORT strains of this study were collected between 1983 and 2014. Four strains that have been isolated between 1994 and 1996, and 3 strains from 1997 were assigned to ST3 and ST6, respectively. Strains of ST3 clustered together with 3 strains of ST2, ST7 and ST8 (one strain each). All 7 ORT strains formed subcluster Bc and have been collected in a short period of time between 1991–1996 or rather in 1983 (ST8). In contrast, ORT strains of ST1 (n = 40) and ST9 (n = 27) ranged more widely in their years of isolation from 1988 to 2013 and 2005 to 2013, respectively (S1 Table). To date, there are no earlier studies that investigated a possible epidemiological relationship between ORT strains of different years.

Relationship between STs and serotypes

The ORT reference strains of serotypes A-Q (RefA-RefQ) were included in the MLST analysis as well as different field strains that have been characterized previously by serotyping. The predominant ORT serotypes A, B, E or I were identified in 58 (67%) strains investigated in this study. It has been shown that these 4 serotypes frequently cross-react in AGP tests ([15], Hafez et al., unpublished data). Based on MLST results, they belonged to 3 different STs (ST1, ST9 and ST13) and formed subcluster Ba (Fig 1). The serotype strain RefG alone formed ST5 but differed only in 1 or 2 alleles from strains of ST9 or ST1 and belonged to subcluster Ba. Both STs 9 and 1 included the majority of ORT field strains that slightly cross-reacted with 3 to 5 different serotypes including serotype G (S1 Table). In general, STs which were represented by 2 or more ORT strains such as ST1, ST3, ST6, ST9 and ST11, included more than one ORT serotype. Two ORT strains of serotype F from turkeys were investigated by MLST that clearly differed in their STs, but belonged both to cluster A. Strains RefN and RefO were the only representatives for ORT serotypes N and O and formed unique STs (ST7 and ST8, respectively) within the major cluster B.

Serotype-specific relationships have been indicated by previous studies using PFGE [21], 16S rRNA and Or01 [15] gene analyses or RAPD-PCR [19, 20] for characterization of ORT. In the PFGE analysis serotype strains A-Q were identical with RefA-RefQ used in the present study. Consistent with MLST results, strains of serotypes A, E, I and P (this study ST1) as well as strains RefD, RefH and RefQ (this study ST3) grouped together based on their PFGE patterns [21]. Analyses of partial 16S rRNA and Or01 gene sequences by Nume et al. [15] also included ORT serotype strains A-H (this study RefA-RefH) and were in agreement with both MLST and PFGE results. Again, strains RefA, RefB and RefE clustered together in the neighbor-joining tree, and strains RefD and RefH showed close relationship to each other. Likewise, Ozbey et al. [19] found that some strains of serotype A shared their RAPD profile with those of serotype B and E. Only the serotype reference strain C (this study RefC) had a unique RAPD profile. The relationship between strains of serotypes A and B as well as the distinct RAPD profile of serotype C were confirmed by Waldow [20].

This study included 3 ORT strains of serotype C that were assigned to distinct STs and subclusters Ba, Bc and Bd based on nucleotide differences in all 7 gene loci (Fig 1). RefC formed its own ST (ST2), whereas both field strains shared identical STs with other strains (ST1 and ST11). Consistent results were found for 2 strains of serotype J that belong to different STs and subclusters (Fig 1). As the molecular basis for serological variations of ORT remains unknown, the most likely explanation might be the transfer of genes between strains encoding serotype specificity. Horizontal spread of capsular genes leading to identical serotypes in genetically diverse bacterial strains has been discussed for other bacteria like *Streptococcus* species [39–41]. Based on MLST results and serotype information, it is most likely that serotype exchange frequently occurs among ORT strains from turkeys. Only 2 STs were identified by the MLST scheme that represented the majority of ORT and included most common serotypes as well as frequently cross-reacting strains.

Conclusion

The MLST scheme presented here can provide an unambiguous, reproducible and portable typing system to stepwise gain more insights into the population structure of ORT by identifying the extent of recombination. It has limited discriminatory power, which is most likely associated with the observed low genetic heterogeneity and clonal population structure of ORT that originated from poultry species. In general, ORT strains from turkeys or chickens in different geographical regions were not separated by MLST and assigned to identical STs. However, 3

strains differed markedly from the vast majority suggesting that ongoing analyses of more strains could increase the discriminating ability of this method. The inclusion of ORT strains from non-poultry host species will enhance our understanding whether these birds may act as vectors in disease transmission. On a future perspective, sequence data from laboratories worldwide together with background information on specific disease symptoms or virulence can be very helpful to address epidemiological questions and may lead to improvements for the control of ORT infections.

Supporting Information

S1 Table. Details of the 87 strains used for multilocus sequence typing of *Ornithobacterium rhinotracheale*. RefA-RefQ: ORT strains of serotypes A to Q that have been used for production of reference antisera for serological typing of ORT field strains [9]. Slight serotype cross-reactions of ORT strains are given in parentheses. n.t.: ORT strain that could not be typed with available antisera A to L. ^a The serotype of the respective ORT strain was not determined, as only DNA was available for MLST analysis.
(PDF)

Acknowledgments

We are grateful to Wael Gad for his support in the early MLST development stage.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: KM DL HMH. Performed the experiments: ST. Analyzed the data: ST. Wrote the paper: ST KM.

References

1. Vandamme P, Segers P, Vancanneyt M, van Hove K, Muters R, Hommez J, et al. *Ornithobacterium rhinotracheale* gen. nov., sp. nov., isolated from the avian respiratory tract. *Int J Syst Bacteriol*. 1994; 44(1):24–37. PMID: [8123560](#)
2. Hafez HM, Kruse W, Emele J, Sting R, editors. Eine Atemwegsinfektion bei Mastputen durch *Pasteurella*-ähnliche Erreger: Klinik, Diagnostik und Therapie. International Conference on Poultry Diseases; 1993; Potsdam, Germany.
3. Chin RP, Van Empel CP, Hafez HM. *Ornithobacterium rhinotracheale* Infection. In: Swayne DE, Glisson JR, McDougald LR, Nolan LK, Suarez DL, Nair VL, editors. *Diseases of Poultry*. 13th ed. Iowa State Press, Ames: IA; 2013. p. 828–834.
4. Marien M, Decostere A, Martel A, Chiers K, Froyman R, Nauwynck H. Synergy between avian pneumovirus and *Ornithobacterium rhinotracheale* in turkeys. *Avian Pathol*. 2005; 34(3):204–211. PMID: [16191703](#)
5. Pan Q, Liu AJ, Zhang FM, Ling Y, Ou CB, Hou N, et al. Co-infection of broilers with *Ornithobacterium rhinotracheale* and H9N2 avian influenza virus. *BMC Vet Res*. 2012; 8.
6. Pan Q, Liu AJ, He C. Co-infection of *Ornithobacterium rhinotracheale* with *Streptococcus zooepidemicus* in chickens. *Avian Dis*. 2012; 56(4):680–684. PMID: [23397838](#)
7. Tsai HJ, Huang CW. Phenotypic and molecular characterization of isolates of *Ornithobacterium rhinotracheale* from chickens and pigeons in Taiwan. *Avian Dis*. 2006; 50(4):502–507. PMID: [17274285](#)
8. Canal CW, Leao JA, Rocha SLS, Macagnan M, Lima-Rosa CAV, Oliveira SD, et al. Isolation and characterization of *Ornithobacterium rhinotracheale* from chickens in Brazil. *Res Vet Sci*. 2005; 78(3):225–230. PMID: [15766941](#)
9. Van Empel P, Van den Bosch H, Loeffen P, Storm P. Identification and serotyping of *Ornithobacterium rhinotracheale*. *J Clin Microbiol*. 1997; 35(2):418–421. PMID: [9003608](#)
10. 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(17):502–503. PMID: [10888000](#)

11. Hafez HM, Lierz M. *Ornithobacterium rhinotracheale* in nestling falcons. *Avian Dis.* 2010; 54(1):161–163. PMID: [20408418](#)
12. Welchman Dde B, Ainsworth HL, Jensen TK, Boye M, King SA, Koylass MS, et al. Demonstration of *Ornithobacterium rhinotracheale* in pheasants (*Phasianus colchicus*) with pneumonia and airsacculitis. *Avian Pathol.* 2013; 42(2):171–178. doi: [10.1080/03079457.2013.778387](#) PMID: [23581445](#)
13. Van Empel P. *Ornithobacterium rhinotracheale*. Ph.D. Thesis. The University of Utrecht, The Netherlands. 1998.
14. Hafez HM. Diagnosis of *Ornithobacterium rhinotracheale*. *Int J Poult Sci.* 2002; 1(5):114–118.
15. Numees S, Hauck R, Hafez HM. Detection and typing of *Ornithobacterium rhinotracheale* from German poultry flocks. *Avian Dis.* 2012; 56(4):654–658. PMID: [23397835](#)
16. Hafez HM, Sting R. Investigations on different *Ornithobacterium rhinotracheale* "ORT" isolates. *Avian Dis.* 1999; 43(1):1–7. PMID: [10216753](#)
17. Amonsin A, Wellehan JFX, Li LL, Vandamme P, Lindeman C, Edman M, et al. Molecular epidemiology of *Ornithobacterium rhinotracheale*. *J Clin Microbiol.* 1997; 35(11):2894–2898. PMID: [9350754](#)
18. Leroy-Setrin S, Flaujac G, Thenaisy K, Chaslus-Dancla E. Genetic diversity of *Ornithobacterium rhinotracheale* strains isolated from poultry in France. *Lett Appl Microbiol.* 1998; 26(3):189–193. PMID: [9569707](#)
19. Ozbey G, Ertas HB, Muz A. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis of *Ornithobacterium rhinotracheale* strains isolated from chickens in Turkey. *Vet Med-Czech.* 2005; 50(12):526–530.
20. Waldow K. Untersuchungen zur Embryonalität, Genotypisierung und Resistenzlage aktueller *Ornithobacterium rhinotracheale*-Isolate. Ph.D. Thesis. Freie Universität Berlin, Germany. 2009.
21. Popp C. *Ornithobacterium rhinotracheale*: Typisierung, Pathogenität, Resistenzverhalten und Bekämpfung. Ph.D. Thesis. Freie Universität Berlin, Germany. 2003.
22. Van Veen L, Vrijenhoek M, Van Empel P. Studies of the transmission routes of *Ornithobacterium rhinotracheale* and immunoprophylaxis to prevent infection in young meat turkeys. *Avian Dis.* 2004; 48(2):233–237. PMID: [15283409](#)
23. Schuijffel DF, van Empel PC, Pennings AM, van Putten JP, Nuijten PJ. Successful selection of cross-protective vaccine candidates for *Ornithobacterium rhinotracheale* infection. *Infect Immun.* 2005; 73(10):6812–6821. PMID: [16177359](#)
24. Maiden MC. Multilocus sequence typing of bacteria. *Annu Rev Microbiol.* 2006; 60:561–588. PMID: [16774461](#)
25. Spratt BG. Multilocus sequence typing: molecular typing of bacterial pathogens in an era of rapid DNA sequencing and the internet. *Curr Opin Microbiol.* 1999; 2(3):312–316. PMID: [10383857](#)
26. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipksi A, Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol Biol Evol.* 2013; 30(12):2725–2729. doi: [10.1093/molbev/mst197](#) PMID: [24132122](#)
27. Subaaharan S, Blackall LL, Blackall PJ. Development of a multi-locus sequence typing scheme for avian isolates of *Pasteurella multocida*. *Vet Microbiol.* 2010; 141(3–4):354–361. doi: [10.1016/j.vetmic.2010.01.017](#) PMID: [20129742](#)
28. Rozen S, Skaletsky HJ. Primer3. Code available at http://www-genome.wi.mit.edu/genome_software/other/primer3.html. 1998.
29. Hunter PR, Gaston MA. Numerical Index of the Discriminatory Ability of Typing Systems—an Application of Simpsons Index of Diversity. *J Clin Microbiol.* 1988; 26(11):2465–2466. PMID: [3069867](#)
30. Maynard Smith J, Smith NH, O'Rourke M, Spratt BG. How clonal are bacteria? *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993; 90:4384–4388. PMID: [8506277](#)
31. Jolley KA, Feil EJ, Chan MS, Maiden MCJ. Sequence type analysis and recombinational tests (START). *Bioinformatics.* 2001; 17(12):1230–1231. PMID: [11751234](#)
32. Jolley KA, Maiden MC. BIGSdb: Scalable analysis of bacterial genome variation at the population level. *BMC Bioinformatics.* 2010; 11:595. doi: [10.1186/1471-2105-11-595](#) PMID: [21143983](#)
33. Han JE, Kim JH, Choresca C Jr., Shin SP, Jun JW, Park SC. Sequence-based genotyping methods to assess the genetic diversity of *Riemerella anatipestifer* isolates from ducklings with tremor. *New Microbiol.* 2013; 36(4):395–404. PMID: [24177301](#)
34. Dingle KE, Colles FM, Wareing DR, Ure R, Fox AJ, Bolton FE, et al. Multilocus sequence typing system for *Campylobacter jejuni*. *J Clin Microbiol.* 2001; 39(1):14–23. PMID: [11136741](#)
35. Griffiths D, Fawley W, Kachrimanidou M, Bowden R, Crook DW, Fung R, et al. Multilocus sequence typing of *Clostridium difficile*. *J Clin Microbiol.* 2010; 48(3):770–778. doi: [10.1128/JCM.01796-09](#) PMID: [20042623](#)

36. Ruiz-Garbajosa P, Bonten MJ, Robinson DA, Top J, Nallapareddy SR, Torres C, et al. Multilocus sequence typing scheme for *Enterococcus faecalis* reveals hospital-adapted genetic complexes in a background of high rates of recombination. *J Clin Microbiol.* 2006; 44(6):2220–2228. PMID: [16757624](#)
37. Hung AL, Alvarado A. Phenotypic and molecular characterization of isolates of *Ornithobacterium rhinotracheale* from Peru. *Avian Dis.* 2001; 45(4):999–1005. PMID: [11785905](#)
38. Van Empel P, Van den Bosch H, Goovaerts D, Storm P. Experimental infection in turkeys and chickens with *Ornithobacterium rhinotracheale*. *Avian Dis.* 1996; 40(4):858–864. PMID: [8980818](#)
39. King SJ, Leigh JA, Heath PJ, Luque I, Tarradas C, Dowson CG, et al. 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.* 2002; 40(10):3671–3680. PMID: [12354864](#)
40. Coffey TJ, Pullinger GD, Urwin R, Jolley KA, Wilson SM, Maiden MC, et al. First insights into the evolution of *Streptococcus uberis*: a multilocus sequence typing scheme that enables investigation of its population biology. *Appl Environ Microbiol.* 2006; 72(2):1420–1428. PMID: [16461695](#)
41. Jefferies JM, Smith A, Clarke SC, Dowson C, Mitchell TJ. Genetic analysis of diverse disease-causing pneumococci indicates high levels of diversity within serotypes and capsule switching. *J Clin Microbiol.* 2004; 42(12):5681–5688. PMID: [15583299](#)

10.2 Publikation 2

Thieme, S., Hafez, H. M., Gutzer, S., Warkentin, N., Lüscho, D. & Mühdorfer, K. (2016). Multilocus sequence typing of *Ornithobacterium rhinotracheale* isolated from pigeons and birds of prey revealed new insights into its population structure. *Veterinary and Animal Science* 1-2, 15-20

<http://dx.doi.org/10.1016/j.vas.2016.10.002>

11 Weitere Publikationen im Rahmen der Promotion

Teile dieser Arbeit wurden bereits vorab als Vorträge (1-4) und Poster (5) auf internationalen wissenschaftlichen Kongressen vorgestellt:

1. Thieme, S., Mühldorfer, K., Gad, W. & Hafez, H. M.: **Multilocus Sequence Typing: A suitable method for molecular characterization of *Ornithobacterium rhinotracheale*?**
10th "Hafez" International Symposium on Turkey Diseases, 05.-07.06.2014, Berlin, Deutschland
2. Thieme, S., Mühldorfer, K., Lüscho, D. & Hafez, H. M.: **Vogel ist nicht gleich Vogel - Wie die Multilocus-Sequenz-Typisierung die Populationsstruktur des Geflügelpathogens *Ornithobacterium rhinotracheale* darstellt.**
Arbeits- und Fortbildungstagung der DVG-Fachgruppe AVID Veterinärmedizinische Infektionsdiagnostik, 09.-11.09.2015, Bad Staffelstein, Deutschland
3. Hafez, H. M., Thieme, S., Gasche, S., Lüscho, D. & Mühldorfer, K.: ***Ornithobacterium rhinotracheale*: Diagnose, Therapie und Kontrolle - eine unendliche Geschichte.**
89. Fachgespräch über Geflügelkrankheiten, 05.-06.11.2015, Hannover, Deutschland
4. Thieme, S., Mühldorfer, K., Gutzer, S., Warkentin, N., Lüscho, D. & Hafez, H. M.: **First insights into the population structure of *Ornithobacterium rhinotracheale* from various bird origins by Multilocus Sequence Typing.**
11th "Hafez" International Symposium on Turkey Diseases, 26.-28.05.2016, Berlin, Deutschland
5. Nisar, M., Thieme, S., Hafez, H.M. & Nagaraja, K.V.: **Genomic variation of *Ornithobacterium rhinotracheale* isolated from chicken and turkeys in the United States using Multilocus Sequence Typing.** Points of Pride Research Day, 04.10.2017, College of Veterinary Medicine, University of Minnesota, USA

12 Danksagung

Danke an alle (selbst wenn ihr nicht explizit erwähnt sein solltet, so seid ihr doch gemeint), die mir geholfen haben, diese Arbeit zu erstellen.

Zuallererst möchte ich mich bei meinem Doktorvater Univ.-Prof. Dr. Hafez Mohamed Hafez bedanken für die Vergabe des spannenden Themas, die Möglichkeit die Versuche durchzuführen und die Dissertation zu schreiben. Danke für die Hilfen und die stetige Unterstützung mit Ideen, Wissen und dem unglaublichen Veröffentlichungen-Schatz im Büro. Danke Kristin. Du hast mir immer sehr geholfen und auch nicht die Geduld verloren, wenn abermals richtig gedachtes, aber ungeschickt geschriebenes in wissenschaftlich klingendes umformuliert werden musste. Danke, dass du mich auf meinem Weg in die Forschung begleitest und ab und zu auf die gerade Strecke zurückbringst.

Danke Dörte. In der Anfangszeit der Dissertation warst du die wichtigste Bezugsperson und hast mich in die richtige Richtung gebracht. Auch später hast du immer wieder wertvolle Verbesserungen angeregt. Du hast auch in hektischen AI-Zeiten und nach Übernahme der kommissarischen Leitung des Instituts Geduld und gute Laune behalten.

Danke an alle technischen AssistentInnen. Die Zeit im Genlabor (Danke Gabi, Carola und Elke) war spannend. Ich habe vieles gelernt und wir haben den Spaß bei der Arbeit nicht verloren. Danke auch an Birgit, Michaela, Kay, Monika, Frau Schurich, Andrea, Dominic, Christina. Auch ohne euch wäre die Zeit nicht so lehrreich, spannend und fröhlich gewesen.

Danke auch an Stephan Hühn-Lindenbein und die Mitarbeiter des Instituts für Lebensmittelhygiene, dass ich immer willkommen war und meine Analysen bei euch durchführen konnte.

Vielen vielen Dank an alle DoktorandInnen. Danke Anne, Darja, Gerzon, Julia, Lara, Steffi und Steffi. Danke für die entspannten Spaziergänge, lehrreiche Mittagspausen, aufmunternde Worte, den leckeren Kuchen, lustige Videoschauerei, interessante Ausfahrten und daraus folgende neue Erkenntnisse in verschiedensten Bereichen des Lebens.

Danke an meine Familie: an meine Eltern, Großeltern und meinen Bruder für die zu jeder Zeit uneingeschränkte Unterstützung. Danke an meine Freunde, die immer hinter mir stehen. Jana. Sandra. Chris. Ohne euch wäre ich nicht so weit gekommen. Danke Robert. Wenn Worte meine Sprache wären, würde ich dir hier etwas schreiben.

Ich bin glücklich, dass es euch gibt.

13 Selbstständigkeitserklärung

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Berlin, den 16.01.2018

Susann Thieme

ISBN: 978-3-86345-412-8



Verlag der DVG Service GmbH
Friedrichstraße 17 • 35392 Gießen
Tel.: 0641 / 24466 • Fax: 0641 / 25375
E-Mail: info@dvg.de • Web: www.dvg.de