JOURNAL OF VETERINARY CLINICAL RESEARCH

دوره دوم، شماره سوم، تابستان ۱۳۹۰
صفحات ۱۵۴-۱۴۷

بررسی شیوع سرمی آلودگی به مایکوپلاسما سینوویه در مزارع تخمگذار تجاری استانهای البرز و قزوین

پیام حقیقی خوشخو[1*]، گیتا اکبری آزاد[1]، جواد اینانلو[2]، مهران معصومی[2]

۱- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کرج، دانشکده دامپزشکی، گروه علوم درمانگاهی، کرج، ایران

۲ - دانش آموخته دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کرج، کرج، ایران

** نویسنده مسئول: pkhoshkho@kiau.ac.ir*

چکیده

این مطالعه به منظور تعیین شیوع سرمی آلودگی با مایکوپلاسما سینوویه در سطح مزارع تخمگذار تجاری استان البرز و قزوین صورت گرفت. تعداد کل ۲۰۵۰ نمونه ی سرمی بطور تصادفی از ۴۱ مزرعه تخمگذار تجاری (پنجاه نمونه خون از هر مزرعه) که اکثریت آنها سن بیش از ۴۰ هفته داشتند در طول فصول زمستان و بهار جمع آوری شد. نمونه های سرمی جهت شناسایی آنتی بادی علیه MS بوسیله آنتی ژن تجاری MS (Soleil Co,France) به روش آگلوتیناسیون سرمی روی صفحه (SPA) آزمایش شدند. آزمایش مجددا بر روی نمونه های مثبت با رقت $\frac{1}{8}$ انجام شد و مزارعی که بیش از ۱۰% نمونه‌های سرمی آنها مثبت بودند از نظر آلودگی با MS مثبت قلمداد شدند. نتایج نشان داد که از مجموع ۲۰ فارم مورد بررسی در استان البرز، ۱۰ مزرعه (۵۰%) مثبت و ۱۰ مزرعه دیگر (۵۰%) نیز منفی بودند. همچنین از مجموع هزار سرم مورد مطالعه نیز، ۱۷۰ نمونه (۱۷%) مثبت، ۶ نمونه (۰/۶%) مشکوک و ۸۲۴ نمونه (۸۲/۴%) منفی بود. از مجموع ۲۱ فارم مورد بررسی در استان قزوین، ۷ مزرعه (۳۳/۳%) مثبت و ۱۴ مزرعه (۶۶/۷%) منفی شدند. از مجموع ۱۰۵۰ سرم مورد مطالعه نیز، ۲۰۱ نمونه سرمی (۱۹/۱۴%) مثبت، ۶ نمونه سرمی (۰/۵۷%) مشکوک و ۸۴۳ نمونه سرمی (۸۰/۲۸%) منفی بودند. آنالیز آماری نشان داد ارتباط مثبت معنی داری بین گله‌های مثبت و سویه مرغ تخمگذار تجاری (سویه LSL نسبت به سویه Hy-Line) ظرفیت و تعداد سالن مرغداری وجود دارد ($P<0.05$). به نظر می رسد شیوع سرمی MS در مزارع تخمگذار تجاری این دو استان بالا باشد و توجه بیشتر به امنیت زیستی در این مزارع قابل توجیه باشد.

واژه های کلیدی: مایکوپلاسما سینوویه، شیوع سرمی، تخمگذار، تست آگلوتیناسیون سرمی روی صفحه، البرز، قزوین.

JOURNAL OF VETERINARY CLINICAL RESEARCH

J.Vet.Clin.Res 2(3)147-154, 2011

Seroperivalence of Mycoplasma synoviae infection in commercial layer farms of Alborz and Qazvin provinces

Haghighi Khoshkhoo, P.[1*], Akbari-Azad, G.[1], Inanlo, J. [2], Masomi, M.[2]

1. Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Karaj Branch, Islamic Azad University,Karaj, Iran

2. Graduated from Faculty of Veterinary Medicine, Karaj Branch, Islamic Azad University,Karaj, Iran

**** Corresponding author:** pkhoshkho@kiau.ac.ir*

Abstract

This survey was carried out to determine the seroprevalence of Mycoplasma synoviae (MS) infection through commercial layer farms in Alborz and Qazvin provinces. A total of 2050 serum samples from 21 commercial layer flocks (50 samples from each farm), mostly over 40- week- old were collected during winter and spring seasons randomly. The sera were experimented for detecting the antibody against Ms by Serum Plate Agglutination (SPA) Test using commercial M. Synoviae antigen (Soleil Co., France). Positive reactions retested by SPA on 1/8 dilution and the flocks with more than 10% of positive reactions were considered positive serologically.

The results showed that in Alborz province: 10 out of 20 (50%) farms were positive and 10 out of 20 (50%) farms were negative. Also, 170 out of 1000 (17%) serum samples were positive, 6 out of 1000 (0.6%) were suspect and 824 out of 1000 (82.4%) were negative. In Qazvin province: 7 out of 21 flocks (33.3%) were positive and 14 out of 21 flocks (66.7%) were negative. Also, 201 out of 1050 sera (19.14%) were positive, 6 sera (0.57%) were suspect and 843 sera (80.28%) were negative. Statistical analysis showed significant positive correlation between positive flocks and strain (LSL strain serologically showed higher positive reaction rate compared to Hy-Line strain), capacity of flocks and the number of houses in the farms ($P<0.05$).

It seems that the seroprevalence of Ms in layer flocks is high. However using MS live vaccine as intervention strategy requires more detailed studies.

Key words: Mycoplasma synoviae, Seroprevalence, Layer, SPA, Alborz, Qazvin

مقدمه

عفونت مایکوپلاسما سینوویه (MS) اغلب به صورت یک عفونت تحت بالینی بخش فوقانی دستگاه تنفس نمایان می‌شود و هنگامی که با بیماری‌های نیوکاسل، برونشیت عفونی یا هر دو آنها توأم شود، می‌تواند ضایعاتی را در کیسه‌های هوایی ایجاد کند. عفونت با MS می تواند به صورت سیستمیک در آید و منجر به سینوویت عفونی شده و غشاهای سینوویال مفاصل و غلاف تاندون‌ها را درگیر و سینوویت اکسوداتیو، تنوواژینیت و یا بورسیت ایجاد نماید (۷).

آلودگی تجربی مرغ‌ها با مایکوپلاسما سینوویه کاهش معنی داری در تولید تخم‌مرغ در هفته اول بعد از عفونت می دهد که تا ۴ هفته ادامه دارد. با این حال در آلوده شدن طبیعی بالغ‌ها عموماً میزان تولید یا کیفیت تخم‌مرغ‌ها در مرغ‌های تخم گذار تجاری تغییر ناچیزی می کند. خسارات اقتصادی بدلیل افزایش تلفات، هزینه درمان دارویی، کاهش کیفیت لاشهٔ جوجه های گوشتی، کاهش تولید تخم مرغ و کاهش جوجه درآوری می تواند باشد (۱، ۷) که برای کنترل و پیشگیری این بیماری، رعایت اصول امنیت زیستی در مزارع و واکسیناسیون با واکسن زنده پیشنهاد شده است. با اینحال برای روشن تر شدن ضرورت استفاده از واکسن زنده، بایستی وضعیت آلودگی به این پاتوژن در مزارع مربوطه مشخص شود. هدف از این مطالعه تعیین شیوع سرمی آلودگی به مایکوپلاسما سینوویه در تعدادی از مزارع تخمگذار تجاری استانهای البرز و قزوین بود تا مقدمه ای برای شروع مطالعات کامل تر و ارائه راهکارهای کنترلی مناسب تر علیه این بیماری باشد.

مواد و روش کار

زمان و مکان انجام مطالعه: نمونه های سرمی از دی ماه ۱۳۸۸ تا خرداد ماه ۱۳۸۹ بطور تصادفی به مدت ۶ ماه از مزارع تخمگذار تجاری با بیش از ۴۰ هفته سن اخذ شد. از ۲۰ مزرعه استان البرز ۱۰۰۰ نمونه خون از مناطق مختلف شامل: کرج، هشتگرد، کردان، نظرآباد و اشتهارد و از ۲۱ مزرعه استان قزوین ۱۰۵۰ نمونه خون از مناطق آبیک، میرپنجی، ناصر آباد، اسلام آباد و دودهه جمع آوری شد. خونگیری از ورید بال اخذ و سرم های جداشده در عرض کمتر از ۲۴ ساعت در آزمایشگاه مرکزی بیمارستان شماره یک دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج آزمایش شدند. همزمان با خونگیری اطلاعاتی مبنی بر سن گله، سویه تجاری پرندگان، ظرفیت مرغداری، آنتی بیوتیک مصرفی در سه ماه اخیر، درصد تولید، نتیجه آزمایش سرولوژیک MS به روش آگلوتیناسیون سرم روی صفحه در سن یک روزگی و سابقه واکسیناسیون گله مورد مطالعه و گله مادر آن با واکسن MS نیز اخذ شد. آزمایش آگلوتیناسیون سرم روی صفحه SPA (Serum Plate Agglutination Test): به منظور شناسایی آنتی بادی MS در سرم های اخذ شده، از آنتی ژن آبی رنگ مایکوپلاسما گالی سپتیکوم (Soleil Co, France) استفاده شد که سوسپانسیونی از اجرام کشته شده MS سویه WVU 1853 با رنگ کریستال ویوله است. ۲۵ میکرولیتر از سرم و از آنتی ژن در دمای اتاق روی صفحه شیشه ای مخلوط و بعد از گذشت ۲ دقیقه از نظر وجود یا عدم وجود آگلوتیناسیون در مقایسه با کنترل منفی قرائت شد. نمونه های مثبت بعد از رقیق سازی به نسبت ۸: ۱ با بافر PBS مجدد آزمایش شده و در صورت آگلوتیناسیون یا عدم آگلوتیناسیون، به ترتیب مثبت یا مشکوک قلمداد شدند. مزارعی که ۱۰% نمونه های سرمی رقیق شده آن در آزمایش مجدد SPA مثبت بود، طبق دستورالعمل سازمان جهانی بهداشت حیوانات (OIE)، مثبت در نظر گرفته شدند (۶).

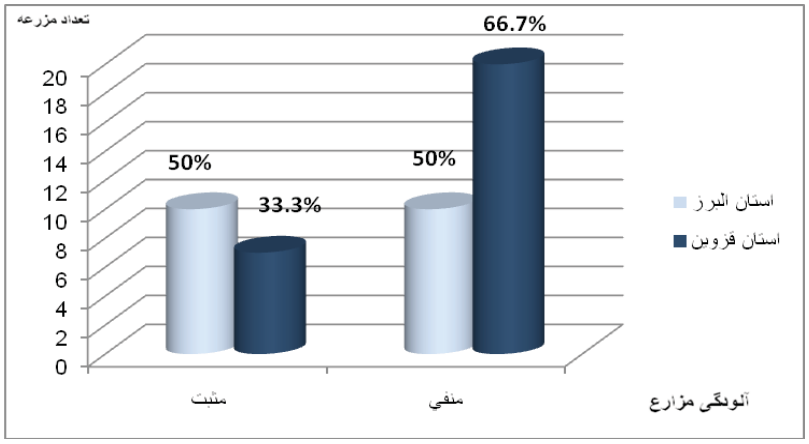
جمع آوری اطلاعات: متغیر های مورد بررسی به دو دسته کمی و کیفی تقسیم شدند که متغیرهای کیفی شامل استفاده از آنتی‌بیوتیک، سیستم پرورش (تک سنی، چند سنی)، سویه مرغ تخمگذار، منطقه جغرافیایی و متغیرهای کیفی نیز شامل درصد تولید، تعداد سالن‌ها، ظرفیت و سن بود.

آنالیز داده‌ها: از نرم افزار SPSS (ویرایش ۱۶) برای آنالیز

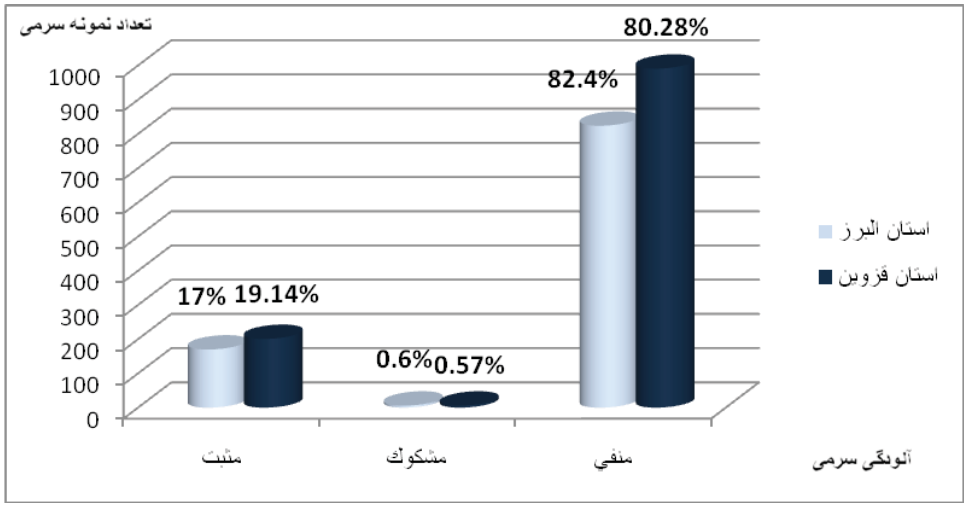
داده ها استفاده شد. برای متغیرهای کیفی از آزمون مربع کای و برای متغیرهای کمی از آزمون t-student استفاده گردید. سطح معناداری برابر ۰/۰۵٪ در نظر گرفته شد.

نتایج

نتایج نشان داد که از نظر آلودگی سرمی به MS، در استان البرز ۱۰ از ۲۰ مزرعه (۵۰ ٪) مثبت و ۱۰ مزرعه (۵۰ ٪) نیز منفی بودند. از مجموع هزار سرم مورد مطالعه این استان، ۱۷۰ نمونه (۱۷٪) مثبت، ۶ نمونه (۰/۶٪) مشکوک و ۸۲۴ نمونه (۸۲/۴٪) منفی بود. در استان قزوین۷ از ۲۱ مزرعه (۳۳/۳٪) مثبت و ۱۴ از ۲۱ مزرعه (۶۶/۷٪) منفی بودند. از ۱۰۵۰ نمونه سرم اخذ شده نیز، ۲۰۱ نمونه سرمی (۱۹/۱۴٪) مثبت، ۶ نمونه (۰/۵۷٪) مشکوک و ۸۴۳ نمونه (۸۰/۲۸٪) منفی بود (جداول شماره ۱ و ۲). آنالیز آماری نشان داد که در بین متغیرهای کیفی تنها متغیر معنادار، سویه بود. بطوری که میزان ابتلا به MS در سویه LSL بطور معناداری از سویه هایلاین بیشتر بود (P<0.05). در بقیه متغیرهای کیفی (مانند مصرف یا عدم مصرف آنتی بیوتیک، تک سنی یا چند سنی بودن مزرعه و منطقه جغرافیایی) این ارتباط غیرمعنی دار بود (P>0.05). در بین متغیرهای کمی تعداد سالن و ظرفیت سالن معنادار بود (P>0.05) بدین معنی که هر چه متوسط تعداد سالن‌ها بیشتر بود یا ظرفیت یک فارم بالاتر بود، میزان ابتلای به MS افزایش یافت (P>0.05).



نمودار شماره ۱: میزان آلودگی مزارع تخمگذار تجاری مورد مطالعه در استانهای البرز و قزوین به مایکوپلاسما سینویه



نمودار شماره ۲: میزان آلودگی سرمی مزارع تخمگذار تجاری مورد مطالعه در استانهای البرز و قزوین به مایکوپلاسما سینویه

بحث

از آنجا که سیاست اصولی در پیشگیری و کنترل عفونت MS حذف گله‌های آلوده می باشد تشخیص دقیق و سریع آلودگی با MS در پاکسازی صنعت طیور کشور از این آلودگی مسئله‌ای مهم می باشد. تست های سرولوژیکی برای شناسایی آنتی بادی علیه MG هر کدام مزایا و معایب خاص خود را دارند با اینحال سازمان جهانی بهداشت حیوانات (OIE) سه تست آگلوتیناسیون سرم روی صفحه، ممانعت از هماگلوتیناسیون و الایزا را برای بررسی آنتی بادی علیه MG در سرم ماکیان پیشنهاد داده است (۶). در این مطالعه ازSPA استفاده شد که نسبت به دو تست دیگر حساسیت بالاتر و ویژگی پایین تری دارد و لذا موارد مثبت کاذب در این آزمایش در مقایسه با تست های HI و الایزا بیشتر است. این مطلب در تجربیات لین و کلیون نیز آورده شده است (۸). باکستون معتقد است که تست SPA اگرچه دارای واکنش های مثبت کاذب است ولی به علت قابلیت انجام سریع و آسان و ارزان به عنوان یک آزمایش اولیه جهت ردیابی مایکوپلاسما ها در طیور مطلوب می باشد و استفاده از آنرا توصیه کرده است (۴). این تست سریع، کم هزینه و بسیار حساس می‌باشد. ممکن است در خلال ۷ تا ۱۰ روز پس از عفونت، آنتی بادی را شناسایی کند و در مواقعی بکار می‌رود که هدف تعیین تقریبی میزان آلودگی و یا شناسایی گله‌های آلوده می‌باشد (۱۳،۱۷). در مطالعه مقایسه ای که توسط عثمان روی ۲۷۹ نمونه انجام شد، نتیجه گرفت که در روش کشت ۱۹/۷% مثبت، در روش PCR ۴۷/۵ % مثبت، در روش SPA ۵۴/۸ % مثبت و در روش الایزا ۴۱/۹% مثبت بود که نشان دهنده بالا بودن مثبت کاذب آزمایش SPA بوده و باید با روش های مولکولی تأیید گردد (۱۱).

در این مطالعه آلودگی سرمی مایکوپلاسما سینوویه در ۴۱ مزرعه تخمگذار به روش RSA در دو استان مهم در صنعت پرورش طیور (البرز و قزوین) از دیماه ۸۸ تا خرداد ماه ۸۹ صورت پذیرفت و نتایج نشان داد که بطور کلی در دو استان، ۱۷ مزرعه از ۴۱ (۴۱/۵ %) مزرعه مثبت و ۲۴ مزرعه از ۴۱ مزرعه (۵۸/۵ %) منفی بودند. از ۲۰۵۰ نمونه سرم نیز ۳۷۱ نمونه (۱۸/۱ %) مثبت، ۱۲ نمونه (۰/۶ %) مشکوک و ۱۶۶۷ نمونه (۸۱/۳ %) منفی بودند. این نتایج در هر استان به تفکیک تقریبا مشابه بود بطوری که در استان البرز ۵۰% مزارع و ۱۷ % سرم ها مثبت بود و در استان قزوین ۳۳% مزارع و ۱۹/۴% نمونه ها مثبت بود. در گله های تخمگذار جند سنی آنتی بادی علیه عفونت های مایکوپلاسمایی تا مدت ها می تواند دوام داشته باشد و مایکوپلاسما سینوویه از سرعت انتشار بالایی نیز برخوردار است، با اینحال چون شیوع بیماری در سن بالا و فصول سرد بیشتر اعلام شده است در مطالعه حاضر سن نمونه گیری ۴۰ هفته به بالا و فصل نمونه گیری زمستان و بهار در نظر گرفته شد (۷، ۹). بوتوس و همکاران شیوع سرمی MS و MG به روش الیزا را در گله‌های طیور کشور رومانی ۸۰% اعلام کردند و نشان دادند که در گله‌های بالای ۳۶ هفته MS نسبت به MG شیوع بیشتری داشته است (۲). فبروی و همکاران شیوع سرمی MS چندین گله تخمگذار را در هلند در طول مدت ۱۲ ماه از سال ۲۰۰۵ الی ۲۰۰۶ به روش RSA، ۷۳% اعلام کردند (۵). محامد و همکاران در سال ۱۹۸۵، شیوع سرمی MS را در کالیفرنیای مرکزی ۳۲% و جنوبی ۹۱% گزارش کردند (۱۰). در پرو در سال ۲۰۰۹، شیوع سرمی MS ۵۰% تخمین زده شد که با استفاده از آزمایش ELISA این میزان به ۵۳% افزایش یافت (۱۵). بیوم و همکاران در سال ۲۰۰۹ و با استفاده از PCR شیوع MS را بر روی ۱۰۴۶ سواب نایی، ۶۰/۶ % اعلام کردند (۳). بطور کلی آگلوتیناسیون روی صفحه خود بعنوان یک آزمون غربالگر (Screen test) مطرح است و در معرض واکنش‌های مثبت کاذب قرار دارد این تست در مقایسه با آزمون الیزا حساسیت بالاتر و ویژگی پائین تری دارد (۱۶، ۱۴، ۱۲، ۴). واکنش مثبت کاذب در مایکوپلاسما گالی سپتیکم متداول‌تر از مایکوپلاسما سینوویه است. واکنش‌های مثبت کاذب مربوط به اجزای

تشـکیل‌دهنده محیط و اصولاً سـرم می‌باشـند که به سطح مایکوپلاسماهای مورد استفاده برای تهیه آنتی‌ژن می‌چسبند، با این حال اغلب ممکن اسـت علت این واکنش‌های کاذب نامشخص باشد. از عوامل مؤثر در ایجاد واکنش مثبت کاذب مـی توان این موارد را نام برد: ۱) اسـتفاده از واکسـن‌های غیرفعال یا واکسـن‌های ویروسـی که از کشت‌های سلولی غنی شده با سرم پسـتانداران بدست آمده‌اند که بدین علت نمونه‌ها نمی‌بایسـتی بعد از واکسیناسـیون اخذ گردند. این واکنش‌های ممکن اسـت ۴ الی ۸ هفته بعد از واکسیناسیون تداوم داشـته باشد. ۲) آلودگی در سـرم که باعث کدورت سـرم شـود. ۳) نمونه‌های سـرمی منجمد شـده که قبل از اسـتفاده، سرم‌ها بایستی ذوب شـود. ۴) واکنش متقاطع بین آنتی‌بادی مایکوپلاسـما سـینوویه با آنتی‌ژن مایکوپلاسمای گالی سـپتیکوم، گالوپاوونیس یا آلودگی با اریزوپیلوتریکس رزیوپاتیـا، اسـترتپوکوکوس فکالیـس و اسـتافیلوکوکوس اورئـوس و عوامل آنتـی گلوبولیـن و ۵) واکنش‌های مثبت کاذب در مرغ‌هایی که دارای فاکتور روماتوئید آرتریت هستند بیشتر است (۱،۷،۹). معمولترین راهکار کاهش واکنش های مثبت کاذب، حرارت‌دهی سرم به میزان ۵۶ درجه سانتیگراد برای ۳۰ دقیقه و یا تهیه رقت‌های سـرم مانند ۱/۸ می‌باشد. در اینحالت اگر سـرم رقیق شـده نیز آگلوتینه شـود، نتیجه مثبت و در غیر اینصورت مشـکوک خواهد بود و بایسـتی با دیگر آزمایشـات تایید گردد. استفاده از رقت‌های مختلف سـرم در آزمایش آگلوتیناسیون سـرم روی صفحه، عملکرد خوبـی بهمـراه دارد اما باید بخاطر داشـت پرندگانی که در این آزمایش بطور ضعیـف ولی اختصاصی واکنش می‌دهند ممکن است هنگام آزمایش بر روی رقت‌های مختلف سرم منفی باشـند و پرندگانی که واکنش‌هـای مثبت کاذب قوی دارند ممکن اسـت در رقت‌های ۱/۸ به بالا نیز واکنش نشان دهند. بنابراین حتی در بهترین شـرایط نیز نباید این آزمایش را بـه عنوان تعیین آلودگی یک پرنده دانسـت بلکه آن را به عنوان مشخص‌کننده وضعیت آلودگی گله در نظر داشت(۹).

با اینحال برای انجام آزمایش بهتر اسـت ملاحظات خاصی صـورت گیرد ماننـد: آزمایش در محیط تمیز بـدور از نور مستقیم خورشـید و گرد غبار باشـد. درجه حرارت محیط آزمایش ۲۵-۲۰ درجه سـانتیگراد و سرم های مورد آمایش نیز تازه باشـد زیرا سـرم هـای منجمدی که ذوب شـده یا دمای بـالای محیط، احتمال بـروز واکنش‌های مثبت کاذب را افزایش می‌دهند. کنترل منفی نیز در هر پلیت لحاظ شود. از عوامل شیوع MS ضعف مدیریت و امنیت زیستی می‌باشند. همچنین نگهداری طولانی مدت گله مادر و جایگزینی گله توسط جوجه‌های همان مادر می‌تواند از علل دیگر شیوع MS باشد. تراکم زیاد گله و نزدیکی فارم‌ها موجب چرخش زیاد پاتوژن در بین مرغان یک گله و گله‌های مختلف می‌شود که منجر به شیوع بیشتر MS در منطقه می‌شود. تهویه ضعیف، عفونت بستر، عدم محدودیت در ورود و خروج کارگرها و بازدیدکنندگان در شیوع عفونت MS مؤثرند. در مطالعه حاضر، آنالیز آماری نشان داد که در بین متغیرهای کیفی تنها متغیر سویه معنادار بود ($P< 0.05$) بطوری که میزان ابتلا به مایکوپلاسما در سویه LSL بطور معناداری از سویه هایلاین بیشتر بود. در بقیه متغیرهای کیفی مانند مصرف یا عدم مصرف آنتی بیوتیک، تک سنی یا چند سنی بودن مزارع، منطقه جغرافیایی این ارتباط غیرمعنی دار بود ($P< 0.05$). در بین متغیرهای کمی تعداد سالن و ظرفیت سالن معنادار بود ($P< 0.05$) بدین معنی که هر چه متوسط تعداد سالن‌ها بیشتر بود یا ظرفیت یک مزرعه بالاتر بود، میزان ابتلای به MS افزایش یافت. شیوع سرمی MS در مطالعه حاضر بالا بود. بی تردید رعایت اصول امنیت زیستی در کنترل این بیماری در مزارع طیور بسیار حائز اهمیت است با اینحال ضرورت استفاده از واکسن زنده MS در مزارع تخمگذار تجاری با توجه به اطلاعات بدست آمده، نیاز به بررسی بیشتری دارد. بر این اساس مطالعات تکمیلی با روش های ملکولی در سطح مزارع تخمگذار تجاری پیشنهاد می‌شود.

References

1. Bradbury, J.M., Morrow, C. , Avian mycoplasmosis. In: Pattison, m., McMullin, P.F., Bardbury, J.M., Alexander, D.J. (2008) Poultry Disease, 6th ed., Bailliere Tindal, London,220-234

2. Botus, D., Popa, V., Stratulat, G.H., Catana, N. (2008) Epidemiological aspects of avian mycoplasmosis during 2007, Lucrari Scientific Veterinary Medicine, 536-543

3. Buim, M.R., Mettifogo, E., Timenetsky, J., Kleven, S., Ferreira, A.J.P. (2009) Epidemiological survey on Mycoplasma gallisepticum and Mycoplasma synoviae by multiplex PCR in commercial poultry, Pesquisa Veterinaria Brasileira, 29(7) 552-556

4. Buxton, A, Fraser, G. (1977) Mycoplasma, Acoloplasma and L-form of bacteria, Animal Microbiology,267-282 :9

5. Feberwee, A., Vriesa, T.S., Landmana, W.J.M. (2008) Seroprevalence of Mycoplasma synoviae in Dutch commercial poultry farm, Avian Pathology, 37(6) 629-633

6. Kleven, S.H., Bradbury, J.M. (2008) Avian mycoplasmosis (M. gallisepticum, M. synoviae). OIE Standards Commission eds. OIE manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals (mammals, birds and bees). Office International des Epizooties, Paris, 482-496.

7. Kleven, S.H. Mycoplasma synoviae infection, In: Saif, Y.M., Barnes, H.J., Glisson, J.R., Fadly, A.M., Dougald, M.C., Swayne D.E. (2003) Disease of Poultry, 11th ed., Iowa state press, USA, 759-766

8. Lin, M.Y., Kleven, S.H. (1984) Evaluation of the micro agglutination test in the diagnosis of MG infection in chickens, Avian Diseases, 28:286-294.

9. Kleven, S.H., Mycoplasmosis. In: Swayne, D.E., Glisson, J.R., Jackwood, M.W., Pearson, J.E., Read, W.M. (1998) A laboratory manual for the isolation and identification of avian pathogens, 4th ed., American Association for Avian Pathologists, USA, 74-80

10. Mohammed, H.O., Carpenter, T.E., Yamamoto R., McMartin D.A. (1983) Prevalence of Mycoplasma gallisepticum and M. synoviae in Commercial Layers in Southern and Central California, Avian Disease, 30(3) 519-526

11. Osman, K.M., Aly, M.M., Amin, Z.M.S. (2009) Mycoplasma gallisepticum: an emerging challenging to the poultry industry in Egypt. Rev. Sci. Tech. Int. Epiz , 28(3) 1015-1023

12. Roberts, D.H. (1970) Nonspecific agglutination reactions with Mycoplasma gallisepticum antigens. Veterinary Record, 87:125-126

13. Salami, J.O., Umoh, J.U., Adegboye, D.S. (1992) Chicken Mycoplasmosis, a review with special reference to Mycoplasmosis gallisepticum and M. Synoviae. Veterinary Bulletin, 62511-520 (6)

14. Stipkovits, L., Kempf, I. (1996) Animal mycoplasmosis and control: control of avian mycoplasmasis by vaccination, Rev. Science Technology, 15:1527-1553

15. Suzuki, K., Origlia, J., Alvarez, F., Faccioli, M., Silva, M., Caballero, J., Nunrez, L., Castro, L. (2009) Relative Risk Estimation for Mycoplasma synoviae in Backyard Chickens in Paraguay, International Journal of Poultry Science, 8(9) 842-847

16. Talkington, F.D., Kleven, SH., Brown, J. (1985) An Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for detection of antibodies to Mycoplasma gallisepticum in experimentally infected chickens, Avian Disease,

29 (1) 53-70.

17. Yoder, H.W.Jr., Hofstad, M.S. (1964) Characterization of avian mycoplasma, Avain Disease, 8:481-513.