Wpływ szczepów *Mycoplasma synoviae* izolowanych z układu oddechowego i rozrodczego kur na zarodki kurze SPF

OLIMPIA KURSA, GRZEGORZ TOMCZYK, ANNA SAWICKA

Zakład Chorób Drobiu, Państwowy Instytut Weterynaryjny – Państwowy Instytut Badawczy w Puławach,
Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

Otrzymano 07.03.2018

Zaakceptowano 18.06.2018

Kursa O., Tomczyk G., Sawicka A.

Effect of *Mycoplasma synoviae* strains isolated from the respiratory and reproductive tracts of chicken on SPF chicken embryos

Summary

Mycoplasma synoviae (MS) infections in poultry are an important epidemiological and economic problem in poultry production all over the world. The differences between *M. synoviae* strains are related to the pathogenicity and the course of the disease. In recent years, the pathogenicity of *M. synoviae* strains has increased, and some of them are capable of causing serious infections. Both horizontal and vertical transmission routes play an important role in MS infection in flocks. The aim of the study was to determine the impact of infection with selected MS strains obtained from chickens showing a clinical form of MS infection on SPF chicken embryos. Ten strains of *M. synoviae* were used for this purpose. The strains were isolated from the respiratory tract and the oviduct of chickens with symptoms typical of infection with this pathogen. Genetic material isolated from liquid cultures of these strains was confirmed by molecular (PCR and LAMP) and microbiological methods. The selected *M. synoviae* strains belonged to six different genotypes. Significant differences in virulence between the strains were demonstrated. In nine infected groups of embryos, *M. synoviae* strains caused weight loss, and in seven groups they produced anatomopathological changes characteristic of mycoplasma infections. The most pathogenic for SPF chicken embryos turned out to be strains characterized as genotype F isolated from the chicken oviduct and strains of genotype C isolated from the respiratory tract. One strain of genotype H isolated from the respiratory tract showed no pathogenic effect on SPF chicken embryos. The study showed that infections with *M. synoviae* can have a significant impact on the production of chicken chicks in commercial hatcheries and the economy of the poultry industry.

Keywords: SPF chicken embryos, *Mycoplasma synoviae*, strains, pathogenicity

Spośród wielu gatunków mykoplazm, jakie występują u ptaków, *Mycoplasma* (*M.*) *synoviae* (MS) obok *M. gallisepticum* (MG) i *M. meleagridis*, stanowią najważniejszy czynnik etiologiczny mykoplazmozy drobiu. Patogeny te sprawiają znaczne problemy nie tylko w immunoprofilaktyce, ale i w terapii, ponieważ długotrwale utrzymują się w organizmie gospodarza, mimo prawidłowo funkcjonującej odpowiedzi immunologicznej (20, 23). Omijając elementy układu odpornościowego, patogeny te mogą prowadzić do wystąpienia u ptaków zakażenia bezobjawowego (17). Poszczególne szczepy *M. synoviae* różnią się nie tylko zjadliwością, ale i tropizmem narządowo-tkankowym. Niektóre szczepy są w stanie wywoływać zmiany ze strony układu oddechowego, powodując

zapalenie worków powietrznych, zatok okołonosowych, wycieki z jamy nosowej oraz prychanie. Część szczepów *M. synoviae* wykazuje także predylekcję do kolonizacji innych układów narządów, w tym układu lokomotorycznego, wywołując zapalenie pochewek ścięgnistych oraz stawów skokowych i śródstopia (14, 18, 30, 31). Dodatkowo predylekcja *M. synoviae* do układu rozrodczego może wpływać na zaburzenia nieśności i pojawianie się zmian w budowie skorupy jaj charakterystycznych dla EAA (eggshell apex abnormalities), takich jak chropowatość powierzchni, przejaśnienia oraz przezroczystość skorupy (7).

W procesie zakażenia *M. synoviae* istotna jest droga transmisji zarazka. *M. synoviae* ulega rozprzestrzenieniu zarówno drogą poziomą – aerogennie, jak i pionowo

wo – poprzez jaja wylęgowe. W następstwie zakażenia *M. synoviae* stwierdza się spadek odsetka zapłodnienia, a także podwyższoną zamieralność zarodków, co skutkuje spadkiem wylęgowości. Kongenitalne zakażenia zarodków mykoplazmą mogą również powodować występowanie u nich szeregu zmian patologicznych oraz wad rozwojowych ujawniających się dopiero w okresie postnatalnym. Pisklęta z takich lęgów gorzej się odchowują i uzyskują gorsze wyniki produkcyjne (4, 7, 8, 14). Wzmożony poziom produkcji drobiarskiej oraz szeroka wymiana międzynarodowa sprzyjają rozprzestrzenianiu się zakażeń MS, o czym świadczy wzrost liczby zakażeń w wielu krajach Europy, także w Polsce (7, 15). Z tego powodu istotne wydaje się określenie patogennego wpływu zakażeń MS na zarodki kurze oraz genotypu MS powodującego największe straty w produkcji drobiarskiej.

Celem badań było określenie wpływu zakażenia szczepami *M. synoviae* wyizolowanymi z układu oddechowego i rozrodczego kur na zarodki kurze SPF. W opracowaniu przedstawiono po raz pierwszy porównanie patogenności szczepów MS zaszeregowanych do różnych grup genotypowych dla zarodków kurzych SPF.

Materiał i metody

Do zakażenia zarodków kurzych SPF wykorzystano dziesięć szczepów *M. synoviae* (pochodzących z własnej kolekcji) wyizolowanych z dróg oddechowych i z układu rozrodczego kur z objawami klinicznymi mykoplazmozy. Szczepy wykorzystane do zakażenia namnażano na podłożach płynnych i agarze PPLO. Hodowle bulionowe mykoplazm posiane na agarze PPLO były inkubowane w temperaturze 37°C (± 2°C), w wilgotnej atmosferze, z dodatkiem 5% CO₂, aż do momentu uzyskania wzrostu charakterystycznych kolonii w postaci „sadzonego jaja” (1, 6, 8, 9).

Ekstrakcję DNA z hodowli bulionowej tych szczepów prowadzono przy użyciu komercyjnego zestawu QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen), zgodnie z instrukcją producenta.

Obecność materiału genetycznego *M. synoviae* potwierdzano metodami PCR i LAMP (Loop-mediated isothermal amplification). W reakcji PCR wykorzystano startery MSLF (forward primer) i MSrR (reverse primer) mające sekwencje komplementarne do fragmentu genu *vlhA* i warunki reakcji opracowane przez Hammonda i wsp. (10) z modyfikacją własną. W badaniu PCR zastosowano mieszaninę reakcyjną Taq PCR Master Mix (EurX, Polska), zawierającą wszystkie niezbędne reagenty. Końcowa objętość mieszaniny reakcyjnej wynosiła 25 µl. W jej skład wchodziło: Master Mix – 12,5 µl, po 1,5 µl każdego ze starterów (10 µM) (Genomed, Polska), 7,5 µl wody wolnej od RNAz i DNAz oraz 2 µl DNA. Reakcję PCR przeprowadzono w termocyklerze Biometra (Niemcy) z profilem temperaturowym: etap wstępnej denaturacji przeprowadzono w 94°C przez 2 min, 35 cykli w 94°C przez 3 s denaturacja, 55°C przez 30 s przyłączanie starterów, 72°C przez 1 min wydłużanie, 72°C przez 7 min wydłużanie końcowe. Produkty powstałe w reakcji amplifikacji rozdzielano na 2% żelu agarozowym z dodatkiem bromku etydydny.

Ryc. 1. Analiza pokrewieństwa 10 badanych szczepów terynowych MS wykorzystanych do określenia patogenności na zarodkach kurzych SPF przedstawiona w postaci drzewa filogenetycznego. Dendrogram wykonano metodą najbliższego sąsiada (NJ, 1000 powtórzeń)

Objaśnienia: Kolorem zielonym i niebieskim oznaczono szczepy wykorzystane do zakażenia zarodków SPF. Szczep referencyjny MS oznaczono żółtym trójkątem.

Otrzymane produkty PCR poddano sekwencjonowaniu (Genomed Polska).

W badaniach nad wykrywaniem genu *vlhA* zastosowano także metodę LAMP wykorzystującą amplifikację kwasów nukleinowych w warunkach izotermicznych. Metoda została zastosowana zgodnie z opisanymi wcześniej warunkami reakcji (16).

Wybrane szczepy *M. synoviae* klasyfikowano pod względem przynależności do grup genotypowych przy użyciu programu MEGA 7 metodą neighbour-joining (NJ) przy wartości bootstrap – 1000. Do badań nad patogennością szczepów *M. synoviae* dla zarodków kurzych SPF wybrano ostatecznie po dwa szczepy z genotypu G i I, trzy z genotypu F oraz po jednym z genotypów C, E i H (ryc. 1).

Do określenia patogennego wpływu zakażenia szczepami *M. synoviae* użyto zarodków kurzych SPF (VALO Bio-Media, Niemcy) w 9. dniu inkubacji. Zarodki były inkubowane w temperaturze 37°C (± 2°C) i wilgotności 55%. Użyte do zakażenia zarodków szczepy zestawiono w tabeli 1. Ocenę patogenności szczepów dla zarodków kurzych SPF dokonano na podstawie zamieralności, masy ciała i deformacji w budowie ciała oraz obecności zmian anatomopatologicznych w narządach wewnętrznych w stosunku do zarodków niezakażonych (grupy kontrolnej).

Tab. 1. Szczepy *M. synoviae* z kolekcji własnej użyte do zakażenia 9-dniowych zarodków kurzych SPF

Lp.	Symbol szczepu	Genotyp	Lp.	Symbol szczepu	Genotyp
1	98/15PL	H	6	K5/15PL	I
2	146/15PL	E	7	W9/14PL	I
3	146-2M/15PL	F	8	7LpT/15PL	G
4	146-3J/15PL	F	9	156/14PL	G
5	92/16PL	F	10	GK1/15PL	C

Tab. 2. Średnia masa ciała i zmiany anatomopatologiczne u zarodków kurzych SPF zakażonych eksperymentalnie szczepami *M. synoviae* z kolekcji własnej (n = 8)

Nazwa szczepu	Średnia m.c. zarodków w g (min-max)	Średnia m.c. kontroli w g	Zmiany anatomopatologiczne
F92/16PL	23,07 (23,06-28,30)	29,35	niedorozwój zarodka (4/8), surowicze nacieki tkanki podskórnej z tylnej strony głowy (2/8)
1/146/15 PL PL	26,63 (19,57-30,87)	31,36	niedorozwój zarodka (1/8), błądź w wątroby (4/8), przykurcz stóp (4/8)
146-3J/15PL	20,74 (7,72-27,44)	28,88	karłowatość (2/8), niedorozwój zarodka (2/8), zamieralność (1/8), błądź w wątroby (2/8), przykurcz stóp (2/8)
146-2M/15PL	26,46 (24,37-27,56)	28,88	karłowatość (1/8), niedorozwój zarodka (1/8), zamieralność (3/8), surowicze nacieki tkanki podskórnej z tylnej strony głowy (2/8), przykurcz stóp (2/8)
GK1/15PL	24,58 (22,14-26,43)	28,88	karłowatość (1/8), niedorozwój zarodka (2/8), zamieralność (1/8)
K5/15PL	23,34 (10,12-27,24)	28,05	karłowatość (1/8), niedorozwój zarodka (1/8), zamieralność (1/8), przykurcz stopy (1/8)
98/15PL	26,70 (26,01-27,50)	28,99	brak
7ŁpT/15PL	22,74 (20,83-26,61)	28,05	niedorozwój zarodka (3/8), przykurcz stóp (1/8), błądź w wątroby (1/8)
156/14PL	29,10 (25,40-29,90)	31,08	brak
W9/14PL	25,90 (23,64-27,30)	29,59	niedorozwój zarodka (1/8), zamieralność (1/8)

W tym celu 9-dniowym zarodkom kurzym SPF, w grupach po osiem zarodków, podano dożyłkowo 48-godziną hodowlę bulionową poszczególnych szczepów *M. synoviae* w objętości 0,2 ml w koncentracji 10^4 CFU/ml. Zarodki inkubowano do 19. dnia codziennie prześwietlając i oceniając ich zamieralność. Zarodki kontrolne inokulowano czystym bulionem PPLO w objętości 0,2 ml. Wszystkie zarodki zmarłe w ciągu pierwszych 24 godzin po zakażeniu traktowano jako zamarcie niespecyficzne. W 19. dniu inkubacji zarodki schładzano (2-8°C). Zarodki zmarłe i schłodzone poddano dokładnej ocenie, a treść żółtka i zmienione narządy pobrano do dalszych badań (reizolacji mykoplazm).

Doświadczenia dotyczące eksperymentalnego zakażenia zarodków SPF przeprowadzono za zgodą II Lokalnej Komisji Etycznej ds. Doświadczeń na Zwierzętach z siedzibą w Lublinie (uchwała nr 86/2015 z dnia 15 września 2015 r.).

Wyniki i omówienie

Obecność zmian patologicznych u zarodków kurzych SPF porównano z zarodkami grupy kontrolnej (niezakażonej), a wyniki przedstawiono w tabeli 2. Zmiany w postaci redukcji masy ciała wykazano u zakażonych zarodków kurzych SPF w dziewięciu grupach (F92/16PL, 1/146/15PLPL, 146-2M/15PL, 146-3J/15PL, K5/15PL, 7ŁpT/15PL, GK1/15PL, W9/14PL, 156/14PL), niedorozwój i karłowatość zarodków w czterech grupach (146-2M/15PL, 146-3J/15PL, GK1/15 PL, K5/15PL) (ryc. 2), natomiast przykurcz stóp zarodków stwierdzono w przypadku pięciu badanych grup (1/146/15PLPL, 146-2M/15PL, 146-3J/15PL, K5/15PL, 7ŁpT/15PL) (ryc. 3). Dodatkowo zmiany anatomopatologiczne w postaci przekrwienia tkanki podskórnej i nacieki surowicze w okolicy głowy, błądź w wątroby i nerek wykazano w siedmiu grupach zakażonych zarodków SPF (F92/16PL, 1/146/15PLPL, 146-2M/15PL, 146-3J/15PL, K5/15PL, 7ŁpT/15PL, GK1/15PL). W dwóch grupach zarodków obserwowano powiększenie i przekrwienie wątroby (1/146/15 PLPL

i 7ŁpT/15PL). Zamieralność zarodków wywoływały szczepy: 146-2M/15PL, 146-3J/15PL GK1/15PL i W9/14PL. Z zarodków wszystkich zakażonych grup doświadczalnych reizolowano te same szczepy, których użyto do zakażenia. Nie stwierdzono ww. zmian u zarodków kontrolnych. Odmienne wyniki w zakresie patogenności mykoplazm u drobiu uzyskali Levisohn i wsp. w badaniach nad *M. gallisepticum* (21). Szczepy *M. gallisepticum*, które wykazywały patogenność dla zarodków kurzych, nie zawsze były chorobotwórcze dla kurcząt (20, 21). Nieśpójność między zdolnością do zakażenia embrionów i piskląt przez *M. gallisepticum* może odzwierciedlać różnice w patogenności

Ryc. 2. Zmiany anatomopatologiczne u zakażonych eksperymentalnie MS zarodków kurzych SPF w postaci ich niedorozwoju w stosunku do zarodka kontrolnego
Objaśnienia: K – zarodek grupy kontrolnej

Ryc. 3. Zmiany anatomopatologiczne u zakażonych eksperymentalnie MS zarodków kurzych SPF w postaci deformacji i przykurczów palców
Objaśnienia: K – zarodek grupy kontrolnej

szczepów tego zarazka dla zarodków kurzych i kurcząt. Podobnie jak w przypadku *M. gallisepticum*, inokulacja zarodków różnymi szczepami *M. synoviae* ujawniła pewne różnice w ich zjadliwości dla embrionów. Patogenność dla zarodków kurzych SPF, szczepów *M. synoviae* użytych w prezentowanych badaniach w większości była spójna z ich chorobotwórczością dla kur niosek. Najbardziej patogenne dla zarodków kurzych SPF okazały się szczepy scharakteryzowane jako genotyp F izolowane z układu rozrodczego kury oraz szczepy z genotypu C izolowane z układu oddechowego. Powodowały one głównie karłowatość i niedorozwój zarodka, przykurcz stóp oraz wcześniejszą ich zamieralność. Jeden szczep z genotypu H i jeden z genotypu G izolowane z układu oddechowego nie wykazywały patogennego wpływu na zarodki kurze SPF.

Patogenność szczepów *M. synoviae* dla zarodków kurzych oraz różnice w ich zjadliwości wykazano również w badaniach innych autorów. Badania przeprowadzone przez Lockaby i wsp. (22) obejmowały sześć szczepów *M. synoviae*, którymi zakażano do woreczka żółtkowego 7-dniowe zarodki kurze, a następnie obserwowano pojawienie się zmian charakterystycznych dla infekcji tym zarazkiem, takich jak przekrwienie i obrzęk tkanki podskórnej (w szczególności w obrębie głowy) oraz zahamowanie w rozwoju (3, 12, 21, 27). Dodatkowo w niektórych badaniach stwierdzono krwotok wewnętrzny (11, 20, 32), gliniaste przebarwienia wątroby i błądź śledziony (3, 11, 32) oraz deformacje palców stopy (11). U zarodków kurzych w następstwie mieszanego zakażenia *M. iners* i *M. synoviae* stwierdzono obrzęk stawów z obecnością serowaciejącego wysięku (32), błądź i przerost mięśnia sercowego oraz zwiększoną objętość płynu wysiękowego w worku osierdziowym (13). Na skutek zakażeń zarodków kurzych i indyjskich różnymi mykoplazmami stwierdzano drobne ogniska martwicze i stany zapalne mięszu wątroby (11, 24), mięśnia sercowego (24), worków powietrznych (29), nerek (24) i stawów (22, 32). W badaniach prowadzonych nad szczepem WVU 1853 *M. synoviae* izolowanym ze stawów kur, stwierdzono zmiany patologiczne w sercu oraz objawy ze strony układu oddechowego u kur (13). Podobne objawy stwierdzono u komercyjnych brojlerów naturalnie zakażonych *M. synoviae* (24). Prowadzono również badania na zarodkach zakażonych podczas lęgu (w 18. dniu inkubacji) szczepem *M. synoviae* izolowanym uprzednio z zatok indyków. Wyklute kurczęta wykazywały głównie objawy ze strony układu oddechowego, a w mniejszym stopniu ze strony układu lokomotorycznego (2, 28).

W piśmiennictwie niewiele jest informacji dotyczących oceny patogenności szczepów *M. synoviae*. W przedstawionej pracy po raz pierwszy porównano patogenność szczepów MS scharakteryzowanych jako sześć różnych genotypów. Prowadzenie dalszych

badan związanych z oceną patogennego wpływu zakażenia *M. synoviae* na układ rozrodczy kur i rozwój zarodków wydaje się bardzo istotne ze względu na negatywne oddziaływanie na efekty produkcyjne przemysłu drobiarskiego na całym świecie (5, 19, 25, 26).

Wyniki prowadzonych badań jednoznacznie dowodzą, że stada rodzicielskie kur muszą być wolne od zakażeń *M. synoviae*. Warunki wolnego handlu pomiędzy państwami UE mogą sprzyjać rozprzestrzenianiu się zakażeń i zmienności genetycznej szczepów *M. synoviae*. Z tego względu bardzo ważne jest wczesne wykrywanie zakażeń MS w stadach reprodukcyjnych dla przeciwdziałania rozprzestrzenianiu się choroby. Przestrzeganie kluczowych zasad bioasekuracji, jak również szczepień profilaktycznych w znacznym stopniu może ograniczyć występowanie zakażeń MS.

Piśmiennictwo

1. Ben-Abdelmoumen B., Roy R. S.: Antigenic relatedness between seven avian mycoplasma species as revealed by western blot analysis. *Avian Dis.* 1995, 39, 250-262.
2. Bradbury J. M., Howell L. J.: The re-sponse of chickens to experimental infection 'in ovo' with *Mycoplasma synoviae*. *Avian Pathol.* 1975, 4, 277-286.
3. Bradbury J. M., McCarty J. D.: Patho-genicity of *Mycoplasma iowae* for chick embryos. *Avian Pathol.* 1983, 12, 483-496.
4. Catania S., Bilato D., Gobbo F., Granato A., Terregino C., Iob L., Nicholas R. A. J.: Treatment of eggshell abnormalities and reduced egg production caused by *Mycoplasma synoviae* infection. *Avian Dis.* 2010, 54, 961-964.
5. Evans J. D., Leigh S. A., Branton S. L., Collier S. D., Pharr G. T., Bearson S. M. D.: *Mycoplasma gallisepticum*: current and developing means to control the avian pathogen. *J. Appl. Poult. Res.* 2005, 14, 757-763.
6. Feberwee A., de Vries T. S., Landman W. J.: Seroprevalence of *Mycoplasma synoviae* in Dutch commercial poultry farms. *Avian Pathol.* 2008, 37, 629-633.
7. Feberwee A., de Wit J. J., Landman W. J.: Induction of eggshell apex abnormalities by *Mycoplasma synoviae*: field and experimental studies. *Avian Pathol.* 2009, 38, 77-85.
8. Ferguson-Noel N., Noormohammadi A. H.: *Mycoplasma synoviae* infection, [w:] Swayne D. E., Glisson J. R., McDougald L. R., Nolan L. K., Suarez D. L., Nair V. L. (eds.): *Diseases of Poultry*. Wiley, Ames 2013, s. 900-906.
9. Frey M. L., Hanson R. P., Anderson D. P.: A medium for the isolation of avian mycoplasmas. *Am. J. Vet. Res.* 1968, 29, 2063-2171.
10. Hammond P. P., Ramirez A. S., Morrow C. J., Bradbury J. M.: Development and evaluation of an improved diagnostic PCR for *Mycoplasma synoviae* using primers located in the haemagglutinin encoding gene *vlhA* and its value for strain typing. *Vet. Microbiol.* 2009, 136, 61-68.
11. Hayes M. M., Li B. J., Wear D. J., Lo S.: Pathogenicity of *Mycoplasma fermentans* and *Mycoplasma penetrans* in experimentally infected chicken embryos. *Infect. Immun.* 1996, 64, 3419-3424.
12. Kempf I., Blanchard A., Gesbert E., Guittet M., Bennejean G.: Comparison of antigenic and pathogenic properties of *Mycoplasma iowae* strains and development of a PCR-based detection assay. *Res. Vet. Sci.* 1994, 56, 179-185.
13. Kerr K. M., Bridges C. H.: Pathogenesis of cardiac lesions in specific-pathogen-free chicken embryos infected with *Mycoplasma synoviae*. *Am. J. Pathol.* 1970, 59, 399-408.
14. King D., Kleven D., Wengerd M., Anderson P.: Field studies with *Mycoplasma synoviae*. *Avian Dis.* 1973, 17, 722-726.
15. Kurska O.: Charakterystyka terenowych szczepów *Mycoplasma synoviae* w zakresie ich genotypu oraz patogenności w przebiegu klinicznych przypadków syndromu anomalii wierzchołka skorupy jaj u kur. Praca dokt., PIWet-PIB, Puławy 2017.
16. Kurska O., Woźniakowski G., Tomczyk G., Sawicka A., Minta Z.: Rapid detection of *Mycoplasma synoviae* by loop-mediated isothermal amplification. *Arch. Microbiol.* 2015, 197, 319-325.
17. Landman W. J. M., Feberwee A.: Aerosol-induced *Mycoplasma synoviae* arthritis: the synergistic effect of infectious bronchitis virus infection. *Avian Pathol.* 2004, 33, 591-598.
18. Landman W. J. M., Feberwee A.: Field studies on the association between amyloid arthropathy and *Mycoplasma synoviae* infection, and experimental reproduction of the condition in brown layers. *Avian Pathol.* 2001, 30, 629-639.

19. Landman W. J. M.: Is *Mycoplasma synoviae* outrunning *Mycoplasma gallisepticum*? A viewpoint from the Netherlands. *Avian Pathol.* 2014, 43, 2-8.
20. Levisohn S.: Early stages in the interaction between *Mycoplasma gallisepticum* and the chick trachea as related to pathogenicity and immunogenicity. *Isr. J. Med. Sci.* 1984, 20, 807-834.
21. Levisohn S., Dykstra M. J., Lin M. Y., Kleven S. H.: Comparison of in vivo and in vitro methods for pathogenicity evaluation for *Mycoplasma gallisepticum* in respiratory infection. *Avian Pathol.* 1986, 15, 233-246.
22. Lockaby S. B., Hoerr F. J., Lauerman L. H., Smith B. F., Samoylov A. M., Toivio-Kinnucan M. A., Kleven S. H.: Factors associated with virulence of *Mycoplasma synoviae*. *Avian Dis.* 1999, 43, 251-261.
23. Lysnyansky I., Gerchman I., Flaminio B., Catania S.: Decreased susceptibility to macrolide-lincosamide in *Mycoplasma synoviae* is associated with mutations in 23S ribosomal RNA. *Microb. Drug Resist.* 2015, 21, 581-589.
24. MacOwan K. J., Atkinson M. J., Bell M. A., Brand T. E., Randall C. J.: Egg transmission of a respiratory isolate of *Mycoplasma synoviae* and infection of the chicken embryo. *Avian Pathol.* 1984, 13, 51-58.
25. Mohammed H. O., Carpenter T. E., Yamamoto R.: Economic impact of *Mycoplasma gallisepticum* and *M. synoviae* in commercial layer flocks. *Avian Dis.* 1987, 31, 474-482.
26. Peebles E. D., Basenko S. L., Branton S. K., Whitmarsh P. D.: Effects of s6-strain *Mycoplasma gallisepticum* inoculation at ten, twenty-two, or forty-five weeks of age on the blood characteristics of commercial egg laying hens. *Poul. Sci.* 2006, 85, 2012-2018.
27. Power J., Jordan E. T. W.: A comparison of the virulence of three strains of *Mycoplasma gallisepticum* and one strain of *Mycoplasma gallinarum* in chicks, turkey poults, tracheal organ cultures and embryonated fowl eggs. *Res. Vet. Sci.* 1976, 21, 41-46.
28. Reis R., Yamamoto R.: Pathogenesis of single and mixed infections caused by *Mycoplasma meleagridis* and *Mycoplasma gallisepticum* in turkey embryos. *Am. J. Vet. Res.* 1971, 32, 63-74.
29. Rhoades K. R.: Pathogenicity of strains of the IJKNQR group of avian mycoplasmas for turkey embryos and poults. *Avian Dis.* 1981, 25, 104-111.
30. Tomczyk G.: Aktualny status epidemiologiczny mykop plazmozy w stadach drobiu w Polsce oraz ocena metod diagnostycznych. Praca hab. PIWet-PIB, Puławy 2013.
31. Tomczyk G., Wieliczko A.: Mykop plazmoza drobiu, [w:] Mazurkiewicz M. (red.): Choroby drobiu. UWP Wrocław 2011, s. 229-261.
32. Wakenell P. S., DaMassa A. J., Ya-mamoto R.: In ovo pathogenicity of *Mycoplasma iners* strain Oz. *Avian Dis.* 1995, 39, 390-397.

Adres autora: dr Olimpia Kursa, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy;
e-mail: olimpia.kursa@piwet.pulawy.pl