

Metody biologii molekularnej wykorzystywane w diagnostyce zakażeń *Mycoplasma synoviae* u drobiu

OLIMPIA KURSA, GRZEGORZ TOMCZYK, ANNA SAWICKA, ZENON MINTA

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

Otrzymano 22.10.2015

Zaakceptowano 02.11.2015

Kursa O., Tomczyk G., Sawicka A., Minta Z.

Molecular methods used in the diagnosis of *Mycoplasma synoviae* infection in poultry

Summary

Diagnostics of *Mycoplasma synoviae* (MS) is generally based on serological, culturing and molecular methods. Rapid diagnosis and identification of infections is very important in the poultry industry. The use of PCR or real-time PCR makes it possible to shorten the time for obtaining results from research and the effective detection of genetic material of MS. There are many variations of the PCR method, one of them is the LAMP method, which is rapid, very sensitive and does not require specialist equipment. This article reviews the molecular methods used for the diagnosis of *Mycoplasma synoviae* infection in poultry.

Keywords: *Mycoplasma synoviae*, diagnostics, PCR, LAMP

Mycoplasma synoviae (MS) jest jednym z ważnych patogenów drobiu, odpowiedzialnym za znaczne straty ekonomiczne w produkcji drobiarskiej. Zarówno u kur, jak i u indyków spektrum patogennego oddziaływania MS skutkuje zapaleniem stawów, ewentualnie zapaleniem worków powietrznych, a także – w świetle badań z ostatnich lat – u kur dodatkowo może wpływać na funkcje układu rozrodczego, wywołując syndrom anomalii wierzchołka skorupy jaja (egg apical abnormality – EAA). Infekcje MS występują często w zakażeniach mieszanych z *Mycoplasma gallisepticum* (MG), *Ornithobacterium rhinotracheale* (ORT), *E. coli*, z wirusami zakaźnego zapalenia oskrzeli (IBV) kur i z wirusem rzekomego pomoru drobiu (NDV) (7, 20). Zakażenia MS bardzo często przebiegają w postaci subklinicznej, a zakażone ptaki mogą pozostawać bezobjawowymi siewcami aż do momentu wystąpienia oznak choroby (objawy kliniczne i zaburzenia w reprodukcji). Z tego też powodu bardzo istotna jest szybka i precyzyjna diagnoza. Wstępne rozpoznanie zakażeń *M. synoviae* jest wykonywane z użyciem testów serologicznych, takich jak aglutynacja płytowa (SPA) i ELISA (38). Pozwalają one na skuteczną i szybką diagnozę infekcji w oparciu o obecność swoistych przeciwciał anti-MS, które można wykryć po ok. 7-14 dniach po zakażeniu, a ich obecność świadczy o kontakcie ptaków z patogenem (6, 32). Często

problemem w interpretacji uzyskanych wyników badań serologicznych są reakcje krzyżowe z antygenami innych mykoplazm, np. z *M. gallisepticum*. W diagnostyce dostępna jest również klasyczna metoda hodowlana (badanie mikrobiologiczne) polegająca na wykrywaniu zakażeń mykoplazmami z zastosowaniem podłoży selektywnych, określonych jako PPLO (pleuropneumonia like organism), na których można wykazać obecność żywych mykoplazm. Jest to metoda bardzo wartościowa, uznawana za tzw. złoty standard, lecz izolacja patogenu na podłożach jest pracochłonna (2, 6, 9).

Jedną z możliwości diagnostyki mykoplazmozy są metody biologii molekularnej. Na podstawie tych metod wykazano, że MS charakteryzuje się małą zawartością zasad G+C. Podobnie jak inne mykoplazmy posiada niewielki genom będący rezultatem ewolucji, na skutek której utraciły różne mechanizmy w swoim metabolizmie. Diagnostyka molekularna MS oparta na reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR) pozwala na szybkie wykrywanie wielu kopii fragmentów materiału genetycznego (DNA) z niewielkiej objętości próbki pobranej do badań. Może być oparta na klasycznym PCR skierowanym na amplifikację genu 16S rRNA o wysokiej czułości 10 fg, opisanym przez Zhao i wsp. (44). W 1995 r. Garcia i wsp. (12) oraz Laureman i wsp. (25) opracowali metodę multispecies PCR-RFLP

(restriction fragment length polymorphism), dzięki której można wykryć równocześnie zakażenie trzema gatunkami mykoplazm: MS, MG i *Mycoplasma iowae* (MI). Z kolei w metodzie opisanej przez Lauermana i wsp. (24) użyte startery pozwoliły na amplifikację fragmentu międzygenowego regionu 16S/23S rRNA MS. Potwierdzili to również Ramirez i wsp. (33, 34). Także dzięki zastosowaniu metody RFLP możliwe jest zróżnicowanie dziewięciu gatunków mykoplazm. Podobną metodę wykorzystali Fan i wsp. (5) amplifikując 1026 par zasad z fragmentu genu 16S rybosomalnego RNA. Zastosowanie sześciu różnych enzymów restrykcyjnych (HpaI, HhaI, HaeIII, HphI, FokI, i NlaIV) pozwala na równoczesne różnicowanie aż czterech gatunków mykoplazm, w tym MS. Metoda ta jest wykorzystywana wyłącznie do identyfikacji czystych hodowli, np. uzyskanych badaniami mikrobiologicznymi, podobnie jak często używana metoda losowej amplifikacji polimorficznego DNA (random amplified polymorphic DNA – RAPD) oraz polimorfizm długości amplifikowanych fragmentów (amplified fragment length polymorphism – AFLP) opisane przez Feberwee i wsp. (8) w 2005 r. W metodach tych wykorzystuje się dwie pary enzymów, co pozwala na genotypowanie szczepów MS (5, 24). Opisane techniki są homologiczne i okazały się dobrym narzędziem do różnicowania molekularnego gatunków mykoplazm, ale są one dosyć kosztowne i czasochłonne.

Analiza uzyskanego produktu PCR w czasie rzeczywistym (real-time PCR; qPCR) charakteryzuje się wyższą czułością i wydajnością w stosunku do metod konwencjonalnych (PCR), ale wymaga wysoce specjalistycznego sprzętu, który pozwala na rejestrację sygnału fluorescencyjnego. Emitowany sygnał jest proporcjonalny do ilości uzyskanego w reakcji DNA (10, 35). Metody amplifikacji fragmentów regionu 16S rRNA czy fragmentu międzygenowego 16-23S rRNA mogą, niestety, dawać wyniki fałszywie dodatnie ze względu na fakt, że sekwencje te mogą występować u więcej niż jednego gatunku mykoplazm (35). Międzygatunkowe reakcje krzyżowe z innymi mykoplazmami występującymi u ptaków obserwowano np. pomiędzy MG a *M. imitans*, które opisała Kempf (19). W ostatnich latach Zhixun Xie i wsp. (45) opracowali nowoczesną metodę elektroforezy kapilarnej (GeXP) umożliwiającą szybki rozdział produktu PCR z dużą czułością. Dzięki tej metodzie można wykryć w jednej reakcji dziewięć różnych patogenów odpowiedzialnych za infekcje dróg oddechowych u ptaków. Nowa, czuła metoda pozwala wykryć *M. synoviae* już przy 10^2 kopii/ μ l oraz zidentyfikować inne patogeny, takie jak: wirusy grypy ptaków (AI), w tym podtypy H5, H7 i H9, wirusy zakaźnego zapalenia oskrzeli (IBV), choroby Newcastle (NDV), zakaźnego zapalenia krtani i tchawicy (ILT), *Mycoplasma gallisepticum* (MG) i *Avibacterium paragallinarum* (HPG). Z kolei opracowana przez McAuliffe i wsp. (27) elektroforeza w gradiencie stężeń czynnika denaturującego (denatu-

ring gradient gel electrophoresis – DGGE) okazała się wysoce specyficzną, a dodatkowo pozwala na jednoczesną identyfikację 32 gatunków mykoplazm, w tym dziesięciu występujących u ptaków, między innymi MS. Metoda ta oparta jest na wykrywaniu regionu V3 genu 16S rRNA i polega na spowalnianiu migracji fragmentów DNA poprzez użycie czynnika denaturującego w różnych stężeniach. Umożliwia to lepszy rozdział produktów PCR w żelu, a fragmenty DNA zatrzymując się na różnych wysokościach, tworzą w żelu tzw. ścieżki „fingerprint”. Dzięki tej metodzie możliwe jest różnicowanie szczepów w obrębie poszczególnych gatunków, jak również detekcja nowych gatunków mykoplazm. Jedynym mankamentem opisanej metody jest długi czas potrzebny do uzyskania końcowego wyniku badania.

W wielu metodach molekularnych wykorzystujących technikę PCR zastosowano różne startery do wykrywania poszczególnych fragmentów genów *M. synoviae*, jednak startery oparte na sekwencjach specyficznych regionów genu, jakim dla MS jest gen *vlhA* (variable lipoprotein and haemagglutinin), wydają się w tej chwili najbardziej powszechne. Nowoczesne techniki biologii molekularnej pozwalają uwidocznić szczególne cechy genetyczne MS. Gen *vlhA* jest jedynym w genomie zidentyfikowanym jako gen docelowy dla MS TS (temperature sensitivity) (3). Ulega on potranslacyjnemu rozczepieniu do dwóch białek powierzchniowych: MSPB – powierzchniową lipoproteinę kodowaną przez region 5' tego genu i MSPA – hemaglutyninę kodowaną przez region 3' tego genu (28-30). Oparte na stopniu zmienności sekwencji genu *vlhA* można podzielić na trzy główne regiony: konserwatywny, półzmienny i wysoce zmienny (29). Dla przykładu: w całej sekwencji genomu szczepu 53 (MS53) gen *vlhA* zawiera 64 geny, które stanowią więcej niż 8% genomu (GenBank AE017245) (39). Tylko jeden z całej rodziny genów MS *vlhA* zawiera promotor, a reszta genów określana jest jako pseudogeny. Gen ten jest zarówno wielkościowo, jak i fazowo zmienny. Wykrywanie zmiennego genu *vlhA* w oparciu o konserwatywny region 5', a następnie sekwencjonowanie DNA wykorzystuje się do klasyfikacji szczepów, a także w badaniach epidemiologicznych (1, 3, 14, 15, 17, 36, 40). Określenie sekwencji nukleotydowej produktów PCR dla określonego genu *vlhA* daje możliwość analizy filogenetycznej szczepów terenowych MS oraz umożliwia szczegółowe poznanie cech genetycznych (genotypowanie). Stosunkowo szybka i niedroga technika wykrywania mutacji, jaką jest polimorfizm konformacji jednoniciowych fragmentów (single-strand conformation polymorphism – SSCP) oraz analiza krzywej topnienia (high-resolution melting – HRM) są bardzo użytecznym narzędziem do bezpośredniej analizy zmienności genetycznej mykoplazm, a w szczególności w przypadku konieczności przeanalizowania większej liczby próbek (4, 21). Ponadto, analiza HRM może być stosowana do geno-

typowania i wykazania mutacji szczepów mykoplazm (17). Dodatkowo wprowadzenie nowych barwników fluorescencyjnych, takich jak LCGreen czy SYTO 9 usprawniło metodę HRM wykorzystywaną w badaniach klinicznych i epidemiologicznych (13, 21).

W badaniach diagnostycznych dla *M. synoviae* przydatna może okazać się także metoda amplifikacji w warunkach stałej temperatury (loop-mediated isothermal amplification – LAMP). Metoda ta, opracowana przez Notomi i wsp. (31), jest obecnie modyfikowana i implementowana do wykrywania wielu różnych patogenów, takich jak *Shigella spp.*, *Salmonella spp.*, *E. coli* (11) oraz do wykrywania zakażeń wirusowych i grzybiczych u ludzi i zwierząt (16, 18, 26, 37, 41-43). Polega ona na syntezie nici DNA dzięki obecności polimerazy Bst lub Bsm DNA oraz dwóch lub trzech par starterów komplementarnych do sześciu lub ośmiu różnych regionów danego genu (11, 31). W metodzie tej wykorzystywana jest para starterów wewnętrznych (FIP – Forward Inner Primer i BIP – Backward Inner Primer), zewnętrznych (F3 – Forward i B3 – Backward) oraz tzw. starterów zapętlających (FL – Loop Forward i BL – Loop Backward), które umożliwiają szybsze wykrywanie specyficznego DNA (31, 41). Zaletą tej metody przy wykrywaniu genu *vlhA* jest jej wysoka czułość, nawet 1000 razy większa niż konwencjonalny PCR (10^{-1} CFU/ml). Dodatkowo jej atutami są warunki izotermiczne reakcji (63°C) oraz krótki czas potrzebny do uzyskania wyniku (ok. 1 godziny) (22). Ta skuteczna i łatwa metoda wykrywania patogenów występujących u drobiu jest bardzo istotna w diagnostyce stad drobiu, nie tylko z epidemiologicznego i ekonomicznego punktu widzenia, ale również ewentualnego zastosowania celowego leczenia (23).

Obecnie monitoring mykoplazmozy drobiu prowadzony jest w oparciu o klasyczne metody serologiczne, jak (SPA) czy testy ELISA, które opierają się na wykrywaniu specyficznych przeciwciał. Nie zawsze obecność przeciwciał oznacza wystąpienie zakażenia, a jedynie pozwalają stwierdzić, że ptak miał kontakt z patogenem. Ponadto metody serologiczne mogą być wykorzystywane do diagnostyki stad, w których nie była stosowana immunoprofilaktyka, ponieważ na ich podstawie nie można stwierdzić, czy obecność przeciwciał jest wynikiem zakażenia szczepem terenowym, czy są to przeciwciała wytworzone w wyniku odpowiedzi immunologicznej. Zastosowanie metod biologii molekularnej pozwala nie tylko na szybką i precyzyjną diagnostykę laboratoryjną u ptaków poprzez wykrycie infekcji mykoplazmami, ale również umożliwia dalszą charakterystykę uzyskanych izolatów, jak i potwierdzenie bądź wykluczenie wyników badań serologicznych i hodowlanych. Opisana metoda LAMP pozwala na znaczne skrócenie czasu uzyskiwania wyniku badań i skuteczne wykrywanie materiału genetycznego MS, co w znacznym stopniu może usprawnić diagnostykę zarówno u kur, jak i u indyków.

Biorąc pod uwagę, że zakażenia utajone *M. synoviae* mogą nie wywoływać u ptaków objawów klinicznych choroby lub wywoływać ją w warunkach immunosupresji spowodowanej innymi czynnikami, bardzo istotne jest prowadzenie diagnostyki z zastosowaniem różnych technik, które dadzą możliwość uzyskania wiarygodnych informacji o badanym patogenie.

Piśmiennictwo

1. Bayatzadeh M. A., Pourbakhsh S. A., Ashtari A., Abtin A. R., Abdoshah M.: Molecular typing of Iranian field isolates *Mycoplasma synoviae* and their differentiation from the live commercial vaccine strain MS-H using *vlhA* gene. *Br. Poult. Sci.* 2014, 55, 148-156.
2. 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.
3. Bencina D., Drobnic-Valic M., Horvat S., Narat M., Kleven S. H., Dovc P.: Molecular basis of the length variation in the N-terminal part of *Mycoplasma synoviae* hemagglutinin. *FEMS Microbiol. Lett.* 2001, 203, 115-123.
4. Charvalos E., Peteinaki E., Spyridaki I., Manetas S., Tselentis Y.: Detection of ciprofloxacin resistance mutations in *Campylobacter jejuni gyrA* by non-radioisotopic single-strand conformation polymorphism and direct DNA sequencing. *J. Clin. Lab. Anal.* 1996, 10, 129-133.
5. Fan H. H., Kleven S. H., Jackwood M. W., Johansson K. E., Pettersson B., Levisohn S.: Species identification of avian mycoplasmas by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis. *Avian Dis.* 1995c, 39, 398-407.
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. Feberwee A., Dijkstra J. R., von Banniseht-Wysmuller T. E., Gielkens A. L., Wagenaar J. A.: Genotyping of *Mycoplasma gallisepticum* and *M. synoviae* by Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) analysis and digitalized Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) analysis. *Veterinary Microbiol.* 2005, 111, 125-131.
9. 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*, 13th edn. Wiley, Ames 2013, s. 900-906.
10. Fraga A. P., de Vargas T., Ikuta N., Fonseca A. S., Celmer A. J., Marques E. K., Lunge V. R.: A multiplex real-time PCR for detection of *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* in clinical samples from Brazilian commercial poultry flocks. *Braz. J. Microbiol.* 2013, 44, 505-510.
11. Fu S., Qu G., Guo S., Ma L., Zhang N., Zhang S., Gao S., Shen Z.: Applications of loop-mediated isothermal DNA amplification. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2011, 163, 845-850.
12. Garcia M., Jackwood M. W., Levisohn S., Kleven S. H.: Detection of *Mycoplasma gallisepticum*, *M. synoviae*, and *M. iowae* by multi-species polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism. *Avian Dis.* 1995, 39, 606-616.
13. Gundry C. N., Vandersteen J. G., Reed G. H., Pryor R. J., Chen J., Wittwer C. T.: Amplicon melting analysis with labeled primers: a closed-tube method for differentiating homozygotes and heterozygotes. *Clin. Chem.* 2003, 49, 396-406.
14. 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.
15. Hong Y., Garcia M., Leiting V., Benčina D., Dufour-Zavala L., Zavala G., Kleven S. H.: Specific detection and typing of *Mycoplasma synoviae* strains in poultry with PCR and DNA sequence analysis targeting the hemagglutinin encoding gene *vlhA*. *Avian Dis.* 2004, 48, 606-616.
16. Huang C. H., Lai G. H., Lee M. S., Lin W. H., Lien Y. Y., Hsueh S. C., Kao J. Y., Chang W. T., Lu T. C., Lin W. N., Chen H. J., Lee M. S.: Development and evaluation of a loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of chicken anemia virus. *J. Appl. Microbiol.* 2010, 108, 917-924.
17. Jeffery N., Gasser R. B., Steer P. A., Noormohammadi A. H.: Classification of *Mycoplasma synoviae* strains using single-strand conformation polymorphism and high-resolution melting-curve analysis of the *vlhA* gene single-copy region. *Microbiology* 2007, 153, 2679-2688.

18. *Kakuya F., Kinebuchi T., Fujiyasu H., Tanaka R., Kano H.*: Genetic point-of-care diagnosis of Mycoplasma pneumonia infection using LAMP assay. *Pediatr. Int.* 2014, 56, 547-552.
19. *Kempf I.*: DNA amplification methods for diagnosis and epidemiological investigations of avian mycoplasmosis. *Acta Vet. Hung.* 1997, 45, 373-386.
20. *Kleven S. H.*: Mycoplasma synoviae, [w:] Saif Y. M. (ed.): Diseases of poultry. 11th edn., Iowa State University Press, Ames 2003, s. 756-765.
21. *Krypyy M., Newnham G. M., Thomas D. M., Conron M., Dobrovic A.*: High resolution melting analysis for the rapid and sensitive detection of mutations in clinical samples: KRAS codon 12 and 13 mutations in non-small cell lung cancer. *BMC Cancer* 2006, 6, 295.
22. *Kursa 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.
23. *Landman W. J.*: Is Mycoplasma synoviae outrunning Mycoplasma gallisepticum? A viewpoint from the Netherlands. *Avian Pathol.* 2014, 43, 2-8.
24. *Lauerman L. H., Chilina A. R., Closser J. A., Johansen D.*: Avian mycoplasma identification using polymerase chain reaction amplicon and restriction fragment length polymorphism analysis. *Avian Dis.* 1995, 39, 804-811.
25. *Lauerman L. H., Hoerr F. J., Sharpton A. R., Shah S. M., van Santen V. L.*: Development and application of a polymerase chain reaction assay for Mycoplasma synoviae. *Avian Dis.* 1993, 37, 829-834.
26. *Mair G., Vilei E. M., Wade A., Frey J., Unger H.*: Isothermal loop mediated amplification (LAMP) for diagnosis of contagious bovine pleuro-pneumonia. *BMC Vet. Res.* 2013, 9, 108.
27. *McAuliffe L., Ellis R., Ayling R., Nicholas R.*: Differentiation of Mycoplasma Species by 16S Ribosomal DNA PCR and Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Fingerprinting. *J. Clin. Microbiol.* 2003, 41, 4844-4847.
28. *Noormohammadi A. H., Markham P. F., Duffy M. F., Whithear K. G., Browning G. F.*: Multigene families encoding the major hemagglutinins in phylogenetically distinct mycoplasmas. *Infect. Immun.* 1998, 66, 3479-3475.
29. *Noormohammadi A. H., Markham P. F., Kanci A., Whithear K. G., Browning G. F.*: A novel mechanism for control of antigenic variation in the haemagglutinin gene family of Mycoplasma synoviae. *Mol. Microbiol.* 2000, 35, 911-923.
30. *Noormohammadi A. H., Markham P. F., Whithear K. G., Walker I. D., Gurevich V. A., Ley D. H., Browning G. F.*: Mycoplasma synoviae has two distinct phase-variable major membrane antigens, one of which is a putative hemagglutinin. *Infect. Immun.* 1997, 65, 2542-2547.
31. *Notomi T., Okayama H., Masubuchi H., Yonekawa T., Watanabe K., Amino N.*: Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.* 2000, 28, E63.
32. *Olson N. O., Shelton D. C., Bletner J. K., Munro D. A., Anderson G. C.*: Studies of infectious synovitis in chickens. *Am. J. Vet. Res.* 1956, 17, 747-754.
33. *Ramirez A. S., Naylor C. J., Hammond P. P., Bradbury J. M.*: Development and evaluation of a diagnostic PCR for Mycoplasma synoviae using primers located in the intergenic spacer region and the 23S rRNA gene. *Vet. Microbiol.* 2006, 118, 76-82.
34. *Ramirez A. S., Naylor C. J., Yavari C. A., Dare C. M., Bradbury J. M.*: Analysis of the 16S to 23S rRNA intergenic spacer region of Mycoplasma synoviae field strains. *Avian Pathol.* 2011, 40, 79-86.
35. *Raviv Z., Kleven S. H.*: The development of diagnostic real-time TaqMan PCRs for the four pathogenic avian mycoplasmas. *Avian Dis.* 2009, 53, 103-107.
36. *Reck C., Menin A., Canever M. F., Miletta L. C.*: Rapid detection of Mycoplasma synoviae and avian reovirus in clinical samples of poultry using multiplex PCR. *Avian Dis.* 2013, 57, 220-224.
37. *Saito R., Misawa Y., Moriya K., Koike K., Ubukata K., Okamura N.*: Development and evaluation of a loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of Mycoplasma pneumoniae. *J. Med. Microbiol.* 2005, 54, 1037-1041.
38. *Tomczyk G.*: Aktualny status epidemiologiczny mykoplazmozy w stadach drobiu w Polsce oraz ocena metod diagnostycznych. Praca hab. ZCHD, PIWet-PIB, Puławy 2013.
39. *Vasconcelos A. T., Ferreira H. B., Bizarro C. V., Bonatto S. L., Carvalho M. O., Pinto P. M., Almeida D. F., Almeida L. G., Almeida R., Alves-Filho L., Assunção E. N., Azevedo V. A., Bogo M. R., Brigido M. M., Brocchi M., Burity H. A., Camargo A. A., Camargo S. S., Carepo M. S., Carraro D. M., deMattos Cascardo J. C., Castro L. A., Cavalcanti G., Chemale G., Collevatti R. G., Cunha C. W., Dellagiovanna B., Dambro's B. P., Dellagostin O. A., Falcão C., Fantinati-Garborggini F., Felipe M. S., Fiorentin L., Franco G. R., Freitas N. S., Frias D., Grangeiro T. B., Grisard E. C., Guimarães C. T., Hungria M., Jardim S. N., Krieger M. A., Laurino J. P., Lima L. F., Lopes M. I., Loreto E. L., Madeira H. M., Manfio G. P., Maranhão A. Q., Martinkovics C. T., Medeiros S. R., Moreira M. A., Neiva M., Ramalho-Neto C. E., Nicolás M. F., Oliveira S. C., Paixão F., Pedrosa F. O., Pena S. D., Pereira M., Pereira-Ferrari L., Piffer I., Pinto L. S. D. P., Potrich R., Salim A. C., Santos F. R., Schmitt R., Schneider M. P., Schrank A., Schrank I. S., Schuck A. F., Seanez H. N., Silva D. W., Silva R., Silva S. C., Soares C. M., Souza K. R., Souza R. C., Staats C. C., Steffens M. B., Teixeira S. M., Urmenyi T. P., Vainstein M. H., Zuccherato L. W., Simpson A. J., Zaha A.*: Swine and poultry pathogens: the complete genome sequence of two strains of Mycoplasma hyopneumoniae and a strain of Mycoplasma synoviae. *J. Bacteriol.* 2005, 187, 5568-5577.
40. *Wetzel A. N., Lefevre K. M., Raviv Z.*: Revised Mycoplasma synoviae v1hA PCRs. *Avian Dis.* 2010, 54, 1292-1297.
41. *Woźniakowski G., Kozdruń W., Samorek-Salamonowicz E.*: Loop-mediated isothermal amplification for the detection of goose circovirus. *Viol. J.* 2012, 9, 110.
42. *Woźniakowski G., Samorek-Salamonowicz E., Kozdruń W.*: Rapid detection of Marek's disease virus in feather follicles by loop-mediated amplification. *Avian Dis.* 2011, 55, 462-467.
43. *Yang J. L., Rui Y., Cheng A. C., Wang M. S., Fu L. Z., Yang S. Q., Zhang S. H., Yang L., Xu Z. Y.*: A simple and rapid method for detection of goose parvovirus in the field by loop mediated isothermal amplification. *Viol. J.* 2010, 7, 14.
44. *Zhao S., Yamamoto R.*: Detection of Mycoplasma synoviae by polymerase chain reaction. *Avian Pathol.* 1993, 22, 533-542.
45. *Zhixun X., Sisi L., Liji X., Jiabo L., Yaoshan P., Xianwen D., Zhiqin X., Qing F., Mazhar I. Khan.*: Simultaneous Typing of nine avian respiratory pathogens using a novel GeXP analyzer-based multiplex PCR Assay. *J. Virol. Met.* 2014, 207, 188-195.

Adres autora: mgr Olimpia Kursa, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy