

Pengujian Mutu Vaksin *Mycoplasma gallisepticum* strain F, ts11, 104, dan R-980 pada Ayam SPF Menggunakan Metode uji ELISA, SPA, Kandungan Bakteri, dan Analisis Koefisien Kappa

Ernes Andesfha, Irma Rahayuningtyas, Istiyaningsih, Neneng Atikah, Sarji

Unit Uji Bakteriologi

Balai Besar Pengujian Mutu dan Sertifikasi Obat Hewan, Gunungsindur – Bogor, 16340

ABSTRAK

Vaksin *Mycoplasma gallisepticum* (MG) yang beredar di Indonesia memiliki beberapa strain yaitu strain F, ts11, 104, dan R980. Penggunaan vaksin MG bertujuan untuk mencegah infeksi bakteri MG terutama pada ayam *layer* sehingga produksi telur tetap optimal. Tujuan kajian ini untuk mengetahui efikasi empat strain vaksin MG tersebut dengan menguji potensi vaksin menggunakan uji serologi ELISA dan SPA, menguji kandungan bakteri menggunakan metode *color change unit* (CCU), dan menguji reliabilitas hasil uji ELISA dan SPA dengan menghitung nilai koefisien Kappa. Hasil uji dari lima vaksin MG yang diuji terdapat satu vaksin MG strain ts11 yang tidak memenuhi persyaratan mutu uji potensi dan kandungan bakteri. Vaksin MG strain ts11 tidak mampu 100% menginduksi terbentuknya antibodi pada hewan uji kelompok vaksinasi dengan nilai serum positif 60% (6/10), hasil uji kandungan bakteri adalah 10^3 CCU/dosis dan nilai ini tidak memenuhi nilai minimal yang dipersyaratkan padahal kandungan bakteri sangat menentukan keberhasilan vaksin dalam membentuk antibodi dalam tubuh ayam. Empat vaksin MG lainnya 100% mampu menginduksi terbentuknya antibodi spesifik bakteri MG pada semua hewan uji kelompok vaksinasi dan kandungan bakteri memenuhi nilai yang dipersyaratkan. Nilai koefisien Kappa yang diperoleh adalah 0,44, nilai ini termasuk kategori cukup berbeda signifikan hasil uji antara ELISA dan SPA, perbedaan ini disebabkan karena kemampuan yang berbeda dari kedua uji serologi dalam mendeteksi adanya antibodi yang dihasilkan dari tahap terjadinya infeksi. Kegiatan monitoring keberadaan MG di peternakan selain menggunakan metode SPA dan ELISA memerlukan uji konfirmasi yang lebih spesifik dengan reaksi silang yang rendah seperti uji *haemagglutination inhibition* (HI) bahkan uji *polymerase chain reaction* (PCR).

Kata kunci: *Mycoplasma gallisepticum*, vaksin, ELISA, SPA, koefisien Kappa

ABSTRACT

Mycoplasma gallisepticum (MG) vaccine that is distributed in Indonesia has several strains namely F, ts11, 104, and R980 strains. The use of MG vaccine aims to prevent bacterial infection especially to layer chickens in order to optimally produce eggs. The objective of this study is to determine the efficacy of four MG vaccine strains by testing the potency using serology test of ELISA and SPA, testing bacterial content using color change unit (CCU) method, and testing reability of ELISA and SPA results using Kappa coefficient values. There was one strain ts11 out of five MG vaccines did not meet potency test and bacterial content. MG strain ts11 vaccine was unable 100% to induce antibody development on vaccinated animal experimental group with the positive serum value at 60% (6/10), bacterial content result was 10^3 CCU/dose and this value did not meet the minimum requirement, where bacterial content is an important factor to induce the antibody in chicken's body. Other four MG vaccines were able 100% to induce specific antibody to all vaccinated animal experimental groups and bacterial

content fulfilled the requirement. Kappa coefficient value obtained was 0.44, this value is significantly different between ELISA and SPA test results, the difference caused by ability differently from those two serological tests in detecting the presence of antibody produced when infection step occurred. Monitoring the presence of MG in livestock using SPA and ELISA methods, but also requiring specific confirmation test with low cross reaction such as haemagglutination inhibition (HI), more polymerase chain reaction (PCR) test.

Keywords: *Mycoplasma gallisepticum*, vaccine, ELISA, SPA, Kappa coefficient

PENDAHULUAN

Mycoplasma gallisepticum (MG) adalah bakteri patogen yang menginfeksi saluran pernafasan dan menyebabkan infeksi kronis pada ayam dan kalkun yang dikenal dengan penyakit *Chronic respiratory disease* (CRD) ⁽²¹⁾. Gejala infeksi bakteri MG pada ayam berupa gangguan pernafasan, batuk, *nasal discharge*, *airsacculitis* ⁽⁵⁾ dan kadang-kadang konjungtivitis ⁽³⁴⁾. Bakteri MG sangat patogenik dan menyebabkan kerugian yang signifikan dalam peternakan perunggasan. Kerugian infeksi bakteri MG pada peternakan ayam brolier adalah jumlah kematian yang meningkat dan banyak karkas yang berkualitas rendah, sedangkan pada ayam *layer* terjadi penurunan efisiensi pakan dan produksi telur berkurang, bahkan terjadi pengurangan ukuran telur ⁽⁵⁾.

Penularan infeksi bakteri MG dapat terjadi melalui telur atau inhalasi droplet terkontaminasi melalui udara sehingga penularan penyakit dapat terjadi di seluruh *flock* ⁽³⁴⁾. MG dapat ditularkan secara vertikal dari *breeder* yang terinfeksi MG dan penularan melalui penetasan telur. Penularan horizontal dapat terjadi melalui burung liar, dari kontaminasi melalui udara untuk jarak yang dekat dari ayam yang terinfeksi MG. *Breeder* bertugas menghasilkan *parent flock layer* yang bebas bakteri MG dan *Mycoplasma synoviae* (MS) ke seluruh dunia, pada sebagian besar negara farm *parent flock* harus dijaga bebas bakteri MG karena itu ayam komersial bebas MG dapat disediakan untuk komersial produksi telur yang akan ditetaskan. Namun banyak kasus pada farm komersial *layer* status bebas terhadap MG tidak dijaga. Adanya tipikal rotasi populasi dengan umur yang beragam pada farm *layer* sekala besar menyebabkan penularan secara horizontal dapat terjadi antar *flock* sehingga infeksi MG tidak pernah dapat dieliminasi, oleh karena itu untuk meminimalkan efek infeksi MG sangat baik dilakukan program vaksinasi MG ⁽¹⁰⁾.

Vaksinasi adalah pilihan praktis dalam kasus endemik infeksi pada peternakan *layer* dengan umur yang beragam ^(6, 17). Variasi tipe vaksin yang digunakan untuk mencegah mycoplasmosis pada unggas adalah vaksin inaktif (bakterin) bentuk oil-emulsi, vaksin aktif atau

live attenuated vaksin (LAV) dan rekombinan *live* pox virus vaksin ⁽¹⁴⁾. Vaksin inaktif MG dan dapat mengurangi *shedding* bakteri MG ⁽⁴¹⁾ namun memiliki batas proteksi terhadap strain lapangan dan tidak mampu mengurangi transmisi horizontal MG diantara induk ayam petelur ⁽⁹⁾. Vaksin inaktif juga dianggap memiliki nilai minimal untuk mengontrol infeksi MG dalam jangka panjang pada *layer* komersial dengan umur beragam ⁽²¹⁾.

Vaksin MG aktif antara lain strain F, ts11 dan 6/85. Vaksin MG strain F secara alami berasal dari strain yang *mild* hingga *moderate* virulensinya terhadap ayam namun virulen terhadap kalkun. Transmisi strain F terjadi secara lambat antar kelompok unggas, sedangkan strain ts11 merupakan strain *avirulent* dan transmisi terhadap unggas yang tidak divaksin tidak dapat terjadi atau terjadi namun sangat sedikit kemungkinan terjadi jika terdapat kontak yang sangat dekat ⁽²²⁾. Vaksin MG strain ts11 dan 6/85 bersifat tidak patogen dan telah diperbolehkan untuk digunakan pada ayam *layer*. Strain vaksin ini tidak memperlihatkan transmisi antar unggas dan tidak dapat menggantikan *wild type* MG ⁽¹⁵⁾. Vaksin MG strain ts11 dan 6/85 lebih banyak dipilih untuk flock unggas rentan yang membutuhkan vaksinasi MG karena strain ts11 dan 6/85 bersifat avirulen dan karakternya yang sangat aman dibandingkan strain F ⁽¹⁹⁾.

Vaksin rekombinan seperti vectormune FP MG/rFP-MG merupakan suatu modifikasi genetik vaksin viral fowl pox yang mengekspresikan antigen MG. Suatu penelitian menunjukkan bahwa vaksinasi rFP-MG pada ayam tidak menyebabkan gejala klinis patologi dan juga menghasilkan proteksi terhadap fowl pox *challenge*, tidak menghasilkan respon positif saat diuji *serum plate agglutination* (SPA) ⁽⁴¹⁾. Namun vaksinasi dengan vaksin rFP-MG juga menghasilkan sedikit proteksi terhadap tantangan dengan strain MG yang virulen ⁽¹⁰⁾.

Pada peternakan *layer* dengan umur yang beragam akan mudah terjadi infeksi, sehingga akan sangat tepat jika dilakukan program vaksinasi MG pada periode pertumbuhan *pullet*. Idealnya *pullet* tumbuh dengan kondisi bebas bakteri MG sehingga sistem imunitas dapat berkembang optimal sebelum terinfeksi bakteri MG pada awal produksi telur ⁽¹⁰⁾. *Pullet* komersial biasanya divaksinasi pada umur 12 dan 16 minggu, tetapi vaksinasi pada umur yang lebih muda atau lebih tua dapat dilakukan. Hal ini biasanya dilakukan karena sebelumnya *flock* terinfeksi MG dari lingkungan. Vaksinasi dalam kasus terjadinya infeksi yang lebih awal dapat diberikan vaksin pada umur muda yaitu umur 2–4 minggu. Monitoring pasca vaksinasi pada suatu *flock* dapat diuji aglutinasi setelah 3–4 minggu pasca vaksinasi untuk meyakinkan semua ayam telah tervaksinasi dengan baik ⁽²⁸⁾.

Flock ayam *layer* biasanya dimonitoring terhadap infeksi MG dengan uji serologis menggunakan metode SPA kemudian dikonfirmasi dengan uji ELISA, HI atau isolasi bakteri MG⁽¹⁵⁾. Isolasi MG membutuhkan *conjugate* antibodi spesifik terhadap spesies *Mycoplasma* dengan tipe yang berbeda⁽³⁷⁾.

Tujuan kajian ini untuk mengetahui efikasi beberapa strain vaksin MG dengan menguji potensi vaksin dalam menimbulkan kekebalan terhadap MG, menguji kandungan bakteri pada vaksin MG aktif dan menguji reliabilitas dengan menghitung nilai koefisien Kappa dari hasil uji metode ELISA dan SPA sebagai metode uji serologi yang umum digunakan dalam monitoring infeksi MG di peternakan ayam.

MATERI DAN METODE

MATERI

Sampel

Sampel yang digunakan adalah vaksin MG aktif dan inaktif tahun 2014–2015 yaitu vaksin MG aktif strain ts11 (2015), vaksin MG aktif strain F (2015), vaksin MG inaktif strain 104 (2015), vaksin MG aktif strain F (2014) dan vaksin MG inaktif strain R-980 (2014).

Alat

Peralatan yang digunakan adalah sebagai berikut : *single channel* dan tips volume 0.5–10 ul, *multichannel* 8/12 dan tips volume 10–100 µL dan 50–250 µL, syringe 1 mL, syringe 3 mL, needle besi ujung tumpul, needle size 18G, *cool box*, tube volume 1.5 mL, aluminium foil, reservoir, gelas Erlenmeyer, pipet steril 1 mL, *pipet add*, vortex, plate 96 well, plate kaca aglutinasi, tabung reaksi, ELISA *Reader*, inkubator 37 °C.

Bahan

Bahan yang digunakan adalah sebagai berikut : lima sampel vaksin MG, antigen MG, serum ayam, ayam SPF 100 ekor umur 3–4 minggu, *destilated water* (DW) steril, kapas alkohol, tisu, PPLO broth, *Mycoplasma gallisepticum Antibody Test kit* (IDEXX 99-06729), serum ayam prevaksinasi, serum ayam 1–6 minggu pasca vaksinasi.

METODE

Uji Potensi

Sebelum dilakukan vaksinasi pada hewan coba, untuk vaksin MG aktif diencerkan menggunakan DW steril atau *diluent* vaksin. Pengenceran disesuaikan dengan besarnya dosis aplikasi dan volume akhir yang akan diaplikasikan harus mudah untuk dihitung pada skala yang terdapat pada syringe yang digunakan. Uji potensi menggunakan ayam SPF umur 3–4 minggu, setiap vaksin menggunakan 10 ekor ayam SPF untuk kelompok vaksinasi dan 10 ekor ayam SPF untuk kelompok kontrol. Sebelum pemberian vaksin dilakukan pengambilan darah ayam sebagai serum prevaksinasi untuk mengecek keberadaan titer antibodi MG. Selanjutnya ayam diinokulasi vaksin sebanyak 1 dosis, vaksin MG aktif diberikan melalui tetes mata dan vaksin MG inaktif melalui subkutan atau intramuskular.

Pengamatan dilakukan pada kelompok vaksinasi dan kontrol setiap hari selama 35 hari, diamati adanya gejala klinis infeksi MG dan dilakukan pengambilan darah setiap minggu yaitu satu minggu sampai enam minggu pasca vaksinasi. Vaksin dinyatakan memenuhi syarat standar mutu jika ayam vaksinasi 100% positif terbentuk antibodi spesifik terhadap MG dengan menguji serum yang diambil pada minggu ke 3–5 pasca vaksinasi, sedangkan ayam kontrol harus 100% tidak terbentuk titer antibodi terhadap MG, deteksi keberadaan antibodi menggunakan metode uji ELISA dan SPA.

Uji Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Semua serum ayam kontrol dan ayam vaksinasi diuji ELISA dari serum prevaksinasi hingga serum 6 minggu pasca vaksinasi. Setiap serum individu ayam diuji secara duplo, prosedur ELISA sesuai dengan protokol yang terdapat dalam *Mycoplasma gallisepticum Antibody Test kit* (IDEXX 99-06729). Semua sampel serum diencerkan dengan perbandingan 1:500 menggunakan *sample diluent* pada plate 96 well bottom V dan dicampur hingga homogen. Kontrol positif dan kontrol negatif kit ELISA MG tidak diencerkan. Pada *plate* ELISA 96 well yang telah dicoating antigen ditambahkan kontrol positif dan kontrol negatif serta sampel yang telah diencerkan masing-masing 100 μ L dan inkubasi 30 menit pada suhu ruang. Tahap pencucian menggunakan DW2 sebanyak 350 μ L, pencucian dilakukan 3-5 kali. Tahap selanjutnya penambahan 100 μ L *conjugate* untuk setiap well dan inkubasi 30 menit pada suhu ruang. Tahap pencucian menggunakan DW2 sebanyak 350 μ L, pencucian dilakukan 3-5 kali. TMB *substrate* ditambahkan 100 μ L pada setiap well dan inkubasi 15 menit pada suhu ruang. Tahap akhir ditambahkan *stop solution* 100 μ L dan segera dilakukan pembacaan menggunakan ELISA *reader* pada panjang gelombang 650 nm. Hasil pembacaan ELISA *reader* berupa nilai *optical density* (OD) dan dilakukan perhitungan rasio S/P : (OD sampel – OD

kontrol negatif) / (OD kontrol positif – OD kontrol negatif). Nilai S/P ratio ≤ 0.50 artinya negatif antibodi, jika > 0.50 artinya positif terdapat antibodi.

Uji Serum Plate Aglutinasi (SPA)

Uji serum plate aglutinasi dilakukan menggunakan antigen *M. gallisepticum* komersial yang diwarnai kristal violet. Sebanyak 0.025 mL antigen dan 0.025 mL serum dicampur di atas plate kaca aglutinasi dengan menggunakan pipet dan dicampur hingga homogen. Hasil dibaca dalam waktu 2 menit. Pada hasil positif akan terbentuk butiran halus seperti pasir dan pada hasil negatif tidak terbentuk butiran seperti pasir.

Uji Color Change Unit (CCU)

Vaksin MG aktif diencerkan dengan 10 mL DW steril dan divortex hingga homogen, selanjutnya larutan vaksin diinokulasikan 1 mL ke dalam tabung reaksi berisi 9 mL PPLO broth, dan dibuat serial pengenceran 10x hingga pengenceran 10^{10} . Inkubasi pada suhu 37°C selama 7 hari. Vaksin dinyatakan memenuhi syarat jika hasil uji CCU melebihi minimum persyaratan yang direkomendasikan perusahaan pembuat vaksin.

HASIL

Sebelum pemberian vaksin, dilakukan pengambilan darah ayam prevaksinasi untuk mengecek keberadaan titer antibody menggunakan metode ELISA dan SPA, hasil kedua uji tidak ditemukan titer antibodi pada semua ayam yang akan digunakan dalam uji potensi, artinya ayam bebas terhadap paparan bakteri MG. Hasil uji terdapat dalam tabel 1 dalam hasil uji ELISA dan SPA. Setelah vaksinasi, dilakukan pengamatan selama 35 hari dilakukan pada kelompok ayam vaksinasi dan kontrol, yaitu 10 ekor ayam vaksinasi dan 10 ekor ayam kontrol untuk masing-masing vaksin, hasil pengamatan tidak ditemukan adanya gejala klinis infeksi MG pada semua ayam vaksinasi dan control setiap vaksin, selanjutnya serum yang diambil setiap minggu diuji dengan metode serologis yaitu ELISA dan SPA.

Hasil Uji ELISA dan SPA

Tabel 1. Persentase serum positif metode uji ELISA dan SPA

Tahun Pengujian	Strain Vaksin	Jenis Vaksin	Bentuk Vaksin, Suhu Penyimpanan	Jenis Uji	Hari Pasca Vaksinasi							Hari Pasca Vaksinasi							
					0	7	14	21	28	34	42	0	7	1	21	28	3	42	
					Persentase Serum Positif Ayam Vaksinasi							Persentase Serum Positif Ayam Kontrol							
2015	MG-ts-11	Aktif	Cair, -20°C	SPA	0	0	20	20	30	10	0	0	0	0	0	0	0	0	
				ELISA	0	0	0	0	10	40	60	0	0	0	0	0	0	0	0
	MG-F	Aktif	Lyophilized, 2-8°C	SPA	0	0	40	20	10	90	100	0	0	0	0	0	0	0	
				ELISA	0	0	0	30	40	90	100	0	0	0	0	0	0	0	0
				SPA	0	0	10	10	40	50	50	0	0	0	0	0	0	0	0
				ELISA	0	0	90	90	90	100	100	0	0	0	0	0	0	0	0
MG-104	Inaktif	Cair, -20°C	SPA	0	0	10	10	40	50	50	0	0	0	0	0	0	0	0	
			ELISA	0	0	90	90	90	100	100	0	0	0	0	0	0	0	0	
			SPA	0	0	10	10	40	50	50	0	0	0	0	0	0	0	0	
			ELISA	0	0	90	90	90	100	100	0	0	0	0	0	0	0	0	
2014	MG-F	Aktif	Lyophilized, 2-8°C	SPA	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	
				ELISA	0	0	0	40	90	100	100	0	0	0	0	0	0	0	0
	MG-R-980	Inaktif	Cair, -20°C	SPA	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	
				ELISA	0	0	0	30	90	90	100	0	0	0	0	0	0	0	0

Keterangan: untuk setiap vaksin menggunakan 20 ekor ayam, 10 ekor untuk kelompok vaksinasi, 10 ekor untuk kelompok kontrol. *sampel vaksin MG tahun 2014 tidak dilakukan uji RPA karena antigen MG sedang tidak tersedia

Hasil uji SPA vaksin MG strain ts11, F dan 104 positif terdeteksi antibodi pada hari ke-14 pasca vaksinasi (PV) sebesar 20% (2/10), 40%(4/10) dan 10%(1/10). Persentase serum positif tertinggi pada vaksin MG strain ts11 pada hari ke-28 PV yaitu 30% (3/10) namun nilai ini terus menurun hingga pada hari ke-42 PV tidak lagi terdeteksi serum positif. Pada vaksin MG strain F persentase serum positif terus meningkat yaitu 90% (9/10) dan 100% (10/10) pada hari ke-35 dan 45 PV. Pada vaksin MG strain 104 persentase serum positif terus meningkat tetapi tidak mencapai 100%, hingga hari ke-42 PV persentase serum positif yang dicapai 50%.

Hasil uji ELISA positif terdeteksi hari ke-28 PV untuk vaksin MG strain ts11 yaitu 10%, MG strain F dan R980 positif terdeteksi hari ke-21 PV dengan persentase 30% (MG-F 2015), 40% (MG-F 2014) dan 30% (MG-R980). Vaksin MG strain 104 merupakan strain yang paling cepat terdeteksi antibodi yaitu pada hari ke-14 PV dengan nilai 90%. Nilai serum positif tertinggi vaksin MG strain ts11 hingga hari terakhir pengujian yaitu hari ke-42 PV hanya mencapai nilai 60%, sedangkan MG strain F, 104 dan R980 nilai serum positif terus meningkat hingga mencapai 100% (10/10). Hasil uji SPA dan ELISA dari semua serum kelompok ayam kontrol menunjukkan hasil negatif yaitu tidak ditemukan antibodi.

Hasil Uji Kandungan Bakteri Vaksin MG Aktif

Tabel 2. Uji kandungan bakteri pada vaksin MG aktif

Pengenceran Uji CCU	Vaksin MG-ts-11							Vaksin MG-F (2015)							Vaksin MG-F (2014)						
	Hari Pengamatan Uji CCU																				
	1	2	3	4	5	6	7	1	2	3	4	5	6	7	1	2	3	4	5	6	7
10 ¹	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+
10 ²	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+
10 ³	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+
10 ⁴	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+
10 ⁵	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+
10 ⁶	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+
10 ⁷	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+
10 ⁸	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+
10 ⁹	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10 ¹⁰	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Persyaratan Mutu	Minimum 10 ⁶ CCU/dosis							Minimum 10 ⁶ CCU/dosis							Minimum 10 ⁶ CCU/dosis						
Hasil Uji	Kandungan Bakteri: 10 ³ CCU/dosis							Kandungan Bakteri: 10 ⁸ CCU/dosis							Kandungan Bakteri: 10 ⁸ CCU/dosis						
Kesimpulan Uji	Tidak Memenuhi Syarat							Memenuhi Syarat							Memenuhi Syarat						

Catatan: Persyaratan mutu kandungan bakteri ditentukan oleh dokumen perusahaan vaksin

Hasil uji kandungan bakteri dengan metode CCU untuk vaksin MG strain ts11 hingga hari ke-7 pasca inokulasi perubahan warna media PPLO broth dari warna merah menjadi kuning terjadi pada pengenceran tertinggi 10³, artinya nilai kandungan bakteri yang diperoleh hanya 10³ CCU/dosis dan nilai ini tidak memenuhi nilai yang dipersyaratkan dokumen vaksin MG strain ts11 yaitu minimum 10⁶ CCU/dosis.

Pada vaksin MG strain F tahun pengujian 2015 sampai hari ke-7 pasca inokulasi terjadi perubahan warna PPLO broth hingga pengenceran 10⁸, artinya kandungan bakteri yang diperoleh 10⁸ CCU/dosis, nilai ini memenuhi persyaratan dokumen vaksin yaitu minimum 10⁶ CCU/dosis. Pada vaksin MG strain F tahun pengujian 2014 terjadi perubahan media PPLO broth menjadi kuning pada pengenceran 10⁸, sehingga diperoleh kandungan bakteri 10⁸ CCU/dosis dan nilai ini memenuhi persyaratan dokumen vaksin yaitu minimum 10⁶ CCU/dosis.

Hasil Uji Nilai Koefisien Kappa

Tabel 3. Perhitungan nilai Kappa metode uji ELISA dan SPA

		Hasil uji SPA		Total
		Hasil Positif	Hasil negatif	
Hasil uji ELISA	Hasil positif	36	48	84
	Hasil negatif	14	322	336
Total		50	370	420

Catatan : hasil uji dari vaksin MG strain ts11, GF dan 104 yang diuji tahun 2015

$$\text{Nilai Kesepakatan yang terobservasi} = ((36+322)/420) = 0.85$$

Nilai Kesepakatan yang diharapkan

$$N = \frac{(36+48)(36+14) + (14+322)(48+322)}{420^2} = 0.73$$

$$420^2$$

$$\text{Koefisien Kappa} = \frac{0.85 - 0.73}{1 - 0.73}$$

$$\text{Koefisien Kappa} = 0.44$$

Nilai koefisien Kappa yang diperoleh adalah 0.44, sesuai dalam ketentuan tingkat reliabilitas koefisien Kappa nilai ini masuk kategori cukup (*moderate*). Kategori tingkat reliabilitas koefisien Kappa < 0.20 kategori rendah (*poor*), 0.21 – 0.40 kategori lumayan (*fair*), 0.41–0.60 kategori cukup (*moderate*), 0.61–0.80 kategori kuat (*good*) dan 0.81–1.00 kategori sangat kuat (*very good*), diharapkan nilai koefisien Kappa mendekati angka satu sebagai indikator bahwa kedua jenis uji memberikan hasil yang sama konsisten³.

PEMBAHASAN

Vaksin MG Strain ts11

Hasil uji serologis metode SPA vaksin MG strain ts11 menunjukkan nilai persentase positif tertinggi 30% pada hari ke-28 PV dan menurun menjadi 10% hingga antibodi tidak terdeteksi lagi pada hari ke-42 PV. Sedangkan nilai persentase serum positif menggunakan metode uji ELISA yaitu 40% dan 60% pada hari ke-35 dan 42 PV. Hasil uji ini hampir sama dengan hasil penelitian yang dilakukan Abd-El-Motelib dan Kleven yaitu ayam yang divaksin MG strain ts11 menunjukkan reaksi dalam 28 hari pasca vaksinasi dan menurun di akhir percobaan, sedangkan MG-6/85 menghasilkan serum positif pada hari ke-42 yang juga selanjutnya akan menurun⁽¹⁾. Ley *et al* mengkaji vaksin MG strain ts11 menggunakan metode ELISA dan diperoleh seropositif rata-rata 10% pada hari ke-42 pasca vaksinasi dan tertinggi sampai 70% pada hari ke-105 pasca vaksinasi sedangkan dengan metode SPA dideteksi 60% seropositif pada *pullet* umur 42 hari pasca vaksinasi²³.

Vaksin MG aktif avirulent strain ts11 dan 6/85 menunjukkan efek pasca vaksinasi yang lebih ringan daripada strain F, namun menginduksi kekebalan yang lebih rendah dan kurang melindungi dibandingkan vaksin strain F^(1, 14). Kajian Nascimento *et al* menunjukkan vaksin MG strain ts11 dan 6/85 hasilnya sama yaitu hanya menimbulkan 20% reaksi SPA pada hari ke-49 pasca vaksinasi⁽²⁶⁾.

Vaksin MG strain 6/85 dan ts11 lebih aman daripada strain F, walaupun level proteksi lebih rendah, namun vaksin strain ini dapat sangat berguna sebagai vaksin strain untuk permulaan di *flock* yang umurnya beragam atau sebagai vaksin generasi kedua yang digunakan sebelum penggunaan vaksin strain F. Vaksin MG strain 6/85 dan ts11 dapat digunakan pada

infeksi yang tidak disengaja dari *flock* unggas peternakan terdekat. Strain F dapat menggantikan MG *wild type* yang lebih efisien daripada strain ts11 atau 6/85, tetapi strain ts11 telah digunakan untuk eradikasi strain F dari *flock layer* dengan umur yang beragam ⁽³⁸⁾.

MG Strain F

Hasil pengujian serum ayam yang divaksinasi MG strain F untuk uji SPA diperoleh nilai positif pada hari ke-14 PV yaitu 40% (4/10) dan terus meningkat hingga 100% pada hari ke-42 PV. Hasil uji ELISA (tahun 2014 dan 2015) menunjukkan nilai yang tinggi hingga mencapai persentase 100% pada hari ke-35 dan 42 PV, artinya semua ayam yang divaksinasi tubuhnya mampu menghasilkan antibodi spesifik terhadap MG.

Hasil penelitian Abd-El-Motelib dan Kleven menyatakan bahwa MG strain F pertama menghasilkan reaksi positif SPA setelah 28 hari pasca vaksinasi sedangkan vaksinasi dengan MG strain F menghasilkan proteksi yang lebih besar terhadap infeksi MG yang virulent dibandingkan dengan vaksin strain ts11 dan 6/85 ⁽¹⁾. Namun bertambahnya proteksi dari virulensi yang meningkat dibuktikan oleh adanya *induction lesion air sac* pada broiler dan kalkun yang terkena dari pemberian vaksin melalui tetes mata dan aerosol ^(32, 24). Produksi telur juga telah dilaporkan lebih rendah pada *flock* yang divaksin MG strain F ⁽⁷⁾.

Vaksin MG strain F juga menimbulkan respon antibodi yang lebih kuat, menghasilkan proteksi yang lebih baik terhadap *airsacculitis* dan bertahan dalam level yang lebih tinggi di saluran pernafasan atas daripada strain kurang virulen (ts11 dan 6/85) ⁽³²⁾. Walaupun strain F menginduksi lebih tinggi level antibodi yang bersirkulasi daripada strain ts11 atau 6/85, namun proteksi tidak berhubungan dengan nilai titer antibodi ⁽³⁵⁾. Hal ini telah dinyatakan oleh Lam dan Lin bahwa secara lokal produksi IgA mungkin lebih penting dalam pertahanan terhadap MG ⁽¹⁸⁾.

Hasil penelitian menunjukkan bakteri menginduksi respon sangat kuat pada uji ELISA dan MG strain F respon induksinya lebih sedikit, sedangkan respon MGts11 dan 6/85 lemah tetapi dapat dideteksi ⁽²⁹⁾. Levisohn menunjukkan bahwa terdapat hubungan yang rumit antara infektivitas, patogenisitas, dan imunogenisitas strain MG ⁽²⁰⁾. Lin dan Kleven menyatakan bahwa level proteksi didapat dengan vaksin MG aktif berkorelasi dengan virulensi dari strain vaksin, strain vaksin yang virulensinya lebih rendah akan menimbulkan level imunitas lebih rendah terhadap *airsacculitis* setelah *challenge* secara aerosol ⁽²⁵⁾. Karakteristik penting vaksin MG aktif adalah kemampuannya meningkatkan resistensi terhadap strain infeksi *wild type* dan

menggantikan strain *wild type* dengan strain vaksin pada *layer* dengan umur yang beragam ^(19, 38).

Bakterin

Pengujian serum ayam yang divaksin bakterin strain 104 dan R980 untuk uji SPA strain 104 diperoleh nilai positif pada hari ke-14 PV yaitu 10% (1/10) dan nilai tertinggi yang diperoleh yaitu 50% pada hari ke-42 PV. Hasil uji ELISA vaksin bakterin strain 104 menunjukkan nilai yang tinggi dan cepat yaitu 90% pada hari ke-14 PV, nilai ini terus bertahan hingga hari ke-42 PV menjadi 100%. Sedangkan uji ELISA untuk vaksin bakterin R980 hasil positif pada hari ke-21 PV sebesar 30% dan meningkat menjadi 90% pada hari ke-28 PV dan mencapai persentase 100% pada hari ke-42 PV.

Vaksinasi dengan bakterin telah mampu mengurangi infeksi bakteri tetapi tidak menghilangkan bakteri dan kolonisasi oleh MG yang diikuti *challenge*. Namun menurut Ley, bakterin memiliki nilai minimal dalam jangka waktu panjang mengontrol infeksi pada *layer* produksi komersial dengan umur beragam ⁽²²⁾. Bakterin biasanya digunakan pada *pullet* komersial untuk proteksi terhadap turunnya produksi telur yang terjadi setelah terkena MG pada *layer* dengan umur yang beragam ⁽¹²⁾. Vaksin bakterin dibutuhkan untuk mengurangi transmisi melalui telur pada *pullet breeder*.

Pemberian vaksin bakterin secara intramuscular beresiko terjadi reaksi persisten pada tempat pemberian vaksin, sehingga dibutuhkan *trimming* pada karkas, sehingga rute pemberian yang dianjurkan secara subkutan di dorsal bagian leher ⁽²⁸⁾. Vaksin MG inaktif memiliki batas proteksi dan proteksi ini tidak cukup untuk mengontrol infeksi pada *flock* dengan umur yang beragam ^(36, 19, 9). Efek attenuasi vaksin MG menghasilkan kapasitas kolonisasi yang lebih rendah daripada strain virulent ⁽³⁹⁾.

Uji serologis yang umum digunakan memiliki spesifisitas dan sensitifitas, uji serologis sangat direkomendasikan untuk monitoring *flock* daripada untuk pengujian individual unggas. Uji serologis yang paling umum digunakan adalah SPA, ELISA dan HI. Pada peternakan unggas penggunaan teknologi ELISA untuk screening sejumlah besar serum untuk antibodi yang mungkin ditemukan. Tidak ada standar internasional untuk interpretasi hasil uji serologis, tetapi tingginya porsi serum positif dalam suatu *flock* (10% atau lebih) mengindikasikan adanya infeksi MG, terutama jika dikonfirmasi dengan metode uji HI atau ELISA yang dilakukan dalam satu bulan. Jika hasil tidak bisa disimpulkan maka dibutuhkan isolasi bakteri atau identifikasi

berbasis DNA. Hasil uji yang membingungkan untuk MG atau MS harus diinvestigasi dengan melakukan uji menggunakan antigen MS karena terdapat reaksi silang antara MG dan MS ⁽²⁸⁾.

Kandungan Bakteri

Terdapat tiga vaksin MG aktif yang diuji kandungan bakteri, berdasarkan hasil pada tabel 2 vaksin MG strain ts11 kandungan bakteri yang diperoleh yaitu 10^3 CCU/dosis, nilai ini tidak memenuhi persyaratan dokumen vaksin MG strain ts11 yaitu minimum 10^6 CCU/dosis. Kandungan bakteri MG strain F tahun 2014 dan 2015 hasilnya sama yaitu 10^8 CCU/dosis, keduanya memenuhi persyaratan dokumen masing-masing vaksin. Kandungan bakteri vaksin MG memiliki peranan penting karena terkait pada kemampuan bakteri membentuk perlindungan pertama pada saluran respirasi bagian atas yaitu membentuk kolonisasi yang menjadi pertahanan pertama terhadap masuknya bakteri MG. Ketentuan OIE untuk titer vaksin MG aktif strain ts11 $\geq 10^{7.7}$ CCU/dosis ⁽²⁸⁾.

Kandungan bakteri pada vaksin aktif sangat berhubungan dengan dosis aplikasi yang akan menimbulkan proteksi pada ayam. Pada penelitian yang dilakukan Raviv *et al* menunjukkan bahwa kolonisasi bakteri MG pada saluran respirasi bagian atas oleh vaksin MG strain K5831 tergantung pada dosis yang diberikan ⁽³¹⁾. Hasil penelitian Raviv *et al* diperoleh hanya dosis tertinggi pemberian vaksin yaitu 6.22×10^4 , 6.22×10^5 , dan 6.22×10^6 CCU yang mampu membentuk kolonisasi pada trachea ayam, selanjutnya setelah dichallenge dengan MG R_{low} strain menunjukkan jumlah perbanyakan strain challenge MG R_{low} pada trachea menurun secara tajam yang diukur menggunakan metode diferensiasi strain realtime PCR ⁽³¹⁾. Hal ini berhubungan dengan perlindungan terhadap lesion pada trachea dan air sac. Hasil secara statistik skor lesio pada trachea dan *air sac* secara signifikan tingkatnya lebih rendah, rata-rata grade uji SPA yang dihasilkan menjadi lebih tinggi, rata-rata titer HI juga meningkat pada ayam yang divaksinasi dengan dosis tinggi tersebut ⁽³¹⁾.

Kajian yang dilakukan oleh Whithear dan Hopkins menyatakan dosis memegang peranan penting untuk keberhasilan vaksinasi untuk vaksin MG aktif strain ts-11 dan 6/85 sehingga disimpulkan bahwa MG vaksin strain attenuated memiliki kemampuan kolonisasi lebih rendah daripada strain virulent dan menekankan pentingnya dosis aplikasi untuk kekebalan menggunakan vaksin MG aktif ⁽³⁹⁾.

Koefisien Kappa

Berdasarkan tabel 3 perhitungan nilai koefisien Kappa diperoleh nilai sebesar 0.44, nilai ini termasuk kategori cukup artinya uji ELISA dan SPA menunjukkan adanya perbedaan hasil uji dalam mendeteksi antibodi MG. Hal ini dapat disebabkan karena perbedaan kemampuan uji ELISA dan SPA dalam mendeteksi adanya antibodi yang dihasilkan dari tahap waktu infeksi yang berbeda. Uji SPA terutama digunakan untuk mengukur immunoglobulin M dan mampu mendeteksi antibodi dalam serum satu minggu post infeksi. Namun uji SPA cenderung menghasilkan positif palsu dan non spesifik reaksi yang terkadang tinggi untuk suatu alasan yang bervariasi, antara lain disebabkan adanya faktor antiglobulin like ⁽⁸⁾, serum ayam yang terinfeksi IBD ditemukan adanya reaksi silang dalam uji SPA MG ⁽³³⁾. Alasan lain reaksi positif palsu pada uji SPA sebagaimana di uji ELISA adalah hubungan *site antigenic* pada antigen diantara MG dan MS yang sama epitop ⁽⁴⁾. Reaksi silang, kuat dan sering positif pada SPA dan ELISA reaksi terjadi pada komponen medium yang berkontribusi timbulnya positif palsu pada uji SPA dan ELISA di unggas yang divaksinasi ⁽⁴⁾.

Osman *et al* melakukan uji serologi ELISA dan SPA terhadap bakteri MG yang dilakukan pada *breeder broiler*, *flock breeder* dan *layer*. Hasilnya diperoleh positif palsu pada level tertentu yang dapat terlihat di uji serologi, meskipun level positif palsu bervariasi antara dua uji serologi, hasilnya memperlihatkan bahwa sebaiknya tidak hanya mengandalkan satu pengujian serologi ⁽²⁹⁾.

Serum yang memberikan reaksi nonspesifik pada uji SPA biasanya tidak memberikan reaksi positif pada uji HI menggunakan HA antigen *live*. Hasil positif pada uji SPA dapat dikonfirmasi dengan uji HI dengan mengambil serum 2–3 minggu setelah infeksi pertama, namun uji HI cenderung lebih spesifik dan kurang sensitif ⁽¹⁶⁾ sehingga uji ELISA dapat digunakan sebagai alternatif ⁽²⁸⁾. Sampel serum sebaiknya tidak dibekukan sebelum diuji SPA, serum sebaiknya bebas dari haemolisis dan kontaminan untuk menghindari nonspesifik reaksi. Sampel harus diuji segera dalam waktu 72 jam karena antibodi *Mycoplasma* dapat rusak dalam penyimpanan, serum dapat diinaktivasi dalam *water bath* suhu 56 °C selama 30 menit ⁽²⁸⁾. Uji serologi sangat berguna untuk monitoring infeksi MG pada *flock* dan untuk mencegah terjadinya infeksi awal MG pada peternakan yang bebas MG. Namun uji serologi memperlihatkan terdapat reaksi silang yang besar ⁽²⁾. Banyak penelitian menekankan bahwa kemampuan awal mendeteksi infeksi MG akan membantu menurunkan angka kesakitan dan kematian pada ayam karena CRD, karena itu sangat penting metode diagnosa yang mampu mendeteksi penularan dan kolonisasi awal infeksi MG ⁽²⁹⁾.

Reaksi silang diantara spesies *Mycoplasma* dan adanya non spesifik reaksi menyebabkan masalah serius dalam kesalahan mendiagnosa dalam survey secara serologis ⁽²⁰⁾.

Munculnya strain MG *low virulent* dan penggunaan obat antimikrobal yang terakumulasi dalam saluran pernafasan telah menyebabkan hasil negatif palsu, karena itu kemampuan uji serologi menjadi terbatas untuk monitoring penyakit unggas. Vaksin MG dilaporkan memberikan pengaruh dalam diagnosa *Mycoplasma* sehingga dibutuhkan konfirmasi dengan uji PCR dan atau isolasi ⁽²⁷⁾. Metode PCR dapat dilakukan pada sampel yang memperlihatkan gejala klinis tanpa perlu dilakukan isolasi, uji PCR memiliki sensitifitas yang tinggi dan waktu pengujian yang cepat sehingga sekarang sangat sering digunakan untuk monitoring infeksi ⁽¹¹⁾.

Upaya mendapatkan proteksi maksimum dalam jangka waktu panjang dilakukan dengan cara vaksinasi setelah puncak masa produksi telur. Rendahnya level proteksi yang diberikan oleh strain MG yang virulensinya rendah dibandingkan dengan vaksin MG strain F membuat strategi vaksinasi dengan memberikan vaksin MG strain F pada siklus setelah masa puncak produksi. Karenanya alternatif pengaturan jadwal vaksinasi termasuk individual atau kombinasi vaksin inaktif dan vaksin aktif dengan virulensi rendah dapat dilakukan ⁽¹³⁾. Namun suatu penelitian melaporkan bahwa pemberian vaksin MG pada periode setelah puncak produksi memiliki potensi yang lebih merugikan secara psikologis pada unggas dibandingkan dengan efek vaksinasi yang diberikan sebelum masa produksi telur ⁽³⁰⁾. Pada penelitian Branton melaporkan bahwa infeksi MG yang terjadi pada umur 45 minggu maka efeknya lebih signifikan pada performa ayam petelur dibandingkan jika infeksi terjadi pada umur awal ⁽⁶⁾.

Upaya untuk menghindari efek yang merugikan dari vaksinasi MG strain F dikaji oleh Abd-el-Motelib dan Kleven dengan cara menggunakan vaksin MG strain ts11saat sebelum produksi selanjutnya vaksinasi kombinasi dengan MG strain F yang diberikan setelah periode puncak produksi telur yang berguna untuk mengontrol infeksi MG ⁽¹⁾. Hasil ini memberikan informasi berguna untuk pengembangan baru dan menciptakan protokol vaksinasi untuk menghilangkan dampak negatif vaksinasi vaksin MG strain F pada layer komersial dan untuk proteksi yang berkelanjutan terhadap infeksi MG strain lapangan ⁽¹³⁾.

KESIMPULAN

Lima vaksin MG telah diuji mutu potensi vaksin menggunakan ayam SPF, terdapat satu vaksin MG aktif strain ts11 yang tidak memenuhi persyaratan mutu untuk uji potensi dan uji kandungan bakteri. Kandungan bakteri pada vaksin aktif sangat menentukan keberhasilan bakteri menginduksi terbentuk antibodi untuk proteksi terhadap bakteri MG pada ayam dalam jangka waktu panjang. Realiabilitas hasil uji metode ELISA dan SPA menghasilkan nilai koefisien Kappa dalam kategori cukup artinya hasil uji kedua metode cukup berbeda signifikan.

Perbedaan ini karena setiap metode memiliki kemampuan berbeda dalam mendeteksi antibodi yang dihasilkan dari tahap terjadinya infeksi dan terdapat reaksi silang yang tinggi sehingga diperlukan uji serologis yang lebih spesifik seperti uji HI atau melakukan deteksi keberadaan bakteri MG menggunakan metode PCR yang memiliki sensitifitas dan spesifisitas yang tinggi serta hasil yang cepat.

DAFTAR PUSTAKA

1. **Abd-el-Motelib TY dan Kleven SH.** 1993. A comparative study of *Mycoplasma gallisepticum* vaccines in young chickens. *Avian Dis.* 37:981–987
2. **Abdelmoumen B. dan Roy RS.** 1995. Antigenic relatedness between seven avian *Mycoplasma* species as revealed by western blot analysis. *Avian Dis.* 39(2):250-262.
3. **Anonimus.** <http://research-indonesia.blogspot.co.id/2012/06/uji-konsistensi-cohens-kappa.html>.24.12.2016.
4. **Avakian AP dan Kleven SH.** 1993. Method of detecting *Mycoplasma* infection in poultry and compositions therefor. Document type and number: United States Patent 5196514. University of Georgia Research Foundation, Athens, Georgia.
5. **Branton SL, Lott BD, May JD, Maslin WR, Pharr GT, Brown JE, Boykin DL.** 1999. The effects of F-strain *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma synoviae*, and the dual infection in commercial layer hens over a 44-week laying cycle when challenged before beginning of lay. II. Egg size distribution. *Avian Dis.* 43:326–330.
6. **Branton SL, Lott BD, Deaton JW, Hardin JM, Maslin WR.** 1988. F strain *Mycoplasma gallisepticum* vaccination of post-production-peak commercial Leghorns and its effect on egg and egg shell quality. *Avian Dis.* 32:304–307 .
7. **Carpenter TE, Mallinson ET, Miller KF, Gentry RF, Schwartz LD.** 1981. Vaccination with F-strain *Mycoplasma gallisepticum* to reduce production losses in layer chickens. *Avian Dis.* 25:404–409.
8. **Czifra G, Tuboly T, Sundquist BG, Stipkovits L.** 1993. Monoclonal antibodies to *Mycoplasma gallisepticum* membrane proteins. *Avian Dis.* 37 (3):689-696.
9. **Feberwee A, von Banniseht-Wysmuller T, Vernooij JC, Gielkens AL, Stegeman JA.** 2006. The effect of vaccination with a bacterin on the horizontal transmission of *Mycoplasma gallisepticum*. *Avian Pathol.* 35:35–37.
10. **Ferguson N, Cookson NK, Laibinis VA, Kleven SH.** 2012. The efficacy of three commercial *Mycoplasma gallisepticum* vaccines in laying hens. *Avian Dis.* 56:272–275.

11. **Garcia M, Ikuta N, Levisohn S, Kleven SH.** 2005. Evaluation and comparison of various PCR methods for detection of *Mycoplasma gallisepticum* infection in chickens. *Avian Dis.* 49:125-132.
12. **Hildebrand DG, Page DE, Berg JR.** 1983. *Mycoplasma gallisepticum* (MG)– laboratory and field studies evaluating the safety and efficacy of an inactivated MG bacterin. *Avian Dis.* 27:792–802.
13. **Jacob R, Branton SL, Evans JD, Leigh SA, Peebles ED.** 2014. Effects of live and killed vaccines against *Mycoplasma gallisepticum* on the performance characteristics of commercial layer chickens. Poultry Science Association Inc.
14. **Kleven SH.** 2008. Invited review: Control of avian *Mycoplasma* infections in commercial poultry. *Avian Dis.* 52:367–374.
15. **Kleven SH.** 1998. *Mycoplasma* in the etiology of multifactorial respiratory disease. *Poult Sci.* 77:1146–1149.
16. **Kleven SH, Morrow CJ, Whithear KG.** 1988. Comparison of *Mycoplasma gallisepticum* strains by hemagglutination-inhibition and restriction endonuclease analysis. *Avian Dis.*, 32:731–741.
17. **Kleven SH, Glisson JR, Lin MY, Talkington FD.** 1984. Bacterins and vaccines for the control of *Mycoplasma gallisepticum*. *Isr. J. Med. Sci.* 20:989–991
18. **Lam KM, Lin W.** 1984. Resistance of chickens immunized against *Mycoplasma gallisepticum* is mediated by bursal dependent lymphoid cells. *Vet. Microbiol.* 9:509-514.
19. **Levisohn S, Kleven SH.** 2000. Avian mycoplasmosis (*Mycoplasma gallisepticum*). *Rev. Sci. Tech.* 19:425–442.
20. **Levisohn S.** 1984. Early stages in the interaction between *Mycoplasma gallisepticum* and the chick trachea as related to pathogenicity and immunogenicity. *Israel J Medical Sci.* 20:982–984.
21. **Ley DH.** 2008. *Mycoplasma gallisepticum* infection. *Diseases of Poultry:* 807–834.
22. **Ley DH.** 2003. *Mycoplasma gallisepticum* infection. *Disease of Poultry:* 722-744.
23. **Ley DH, McLaren JM, Miles AM, Barnes HJ, Miller SH, Franz G.** 1997. Transmissibility of live *Mycoplasma gallisepticum* vaccine strains ts-11 and 6/85 from vaccinated layer pullets to sentinel poultry. *Avian Dis.* 41:187–194.
24. **Lin MY, Kleven SH.** 1982. Pathogenicity of two strains of *Mycoplasma gallisepticum* in turkeys. *Avian Dis.* 26:360–364.
25. **Lin MY, Kleven SH.** 1980. Evaluation of attenuated strains of *Mycoplasma gallisepticum* as vaccines in young chickens. *Avian Dis.* 24:879-889.

26. **Nascimento ER, Polo P de A, Pereira VL de A, Barreto ML, Nascimento M, Zuanaze MAF, Correa ARA, Silva R.** 2006. Serologic response of SPF Chickens to live vaccines and other strains of *Mycoplasma gallisepticum*. *Brazilian J Poultry Sci.* 8(1):45–50.
27. **Nascimento ER, Yamamoto R, Herrick KR, Tait RC.** 1991. Polymerase chain reaction for detection of *Mycoplasma gallisepticum*. *Avian Dis.* 35:62–69.
28. **OIE.** 2008. *Terrestrial Manual Avian Mycoplasmosis (Mycoplasma gallisepticum, M. synoviae)*. Chapter 2.3.5.
29. **Osman KM, Aly MM, Amin ZMS, Hasan BS.** 2013. *Mycoplasma gallisepticum*: an Emerging Challenge to the Poultry Industry in Egypt. *Rev. Sci Tech.Cff.Int Epiz.* 28(3): 1015–1023
30. **Peebles ED, Branton SL.** 2012. *Mycoplasma gallisepticum* in the commercial egg-laying hen: A historical perspective considering the effects of pathogen strain, age of the bird at inoculation, and diet on performance and physiology. *J. Appl. Poult. Res.* 21:897–914.
31. **Raviv Z, Callison SA, Ferguson-Noel N, Kleven SH.** 2007. Strain differentiating real-time PCR for *Mycoplasma gallisepticum* live vaccine evaluation studies. *Science Direct. Vet Microb.* 129:179–187.
32. **Rodriguez R, Kleven SH.** 1980. Pathogenicity of two strains of *Mycoplasma gallisepticum* in broilers. *Avian Dis.* 24:800–807.
33. **Ross T., Slavik M., Bayyari G, Skeeles J.** 1990. Elimination of *Mycoplasma* plate agglutination crossreactions in sera from chickens inoculated with infectious bursal disease viruses. *Avian Dis.* 34 (3):663–667.
34. **Saif YM, Barnes HJ, Glisson JR, Fadly AM, McDougald LR, Swayne DE.** 2003. *Disease of poultry*. Iowa State Press, Ames. 11:722-743.
35. **Soeripto, Whithear KG, CottewGS, Harrigan KE.** 1989. Immunogenicity of *Mycoplasma gallisepticum*. *Aust. Vet.J.* 66:73-77.
36. **Talkington FD Kleven SH.** 1985. Evaluation of protection against colonization of the chicken trachea following administration of *Mycoplasma gallisepticum* bacterin. *Avian Dis.* 29:998–1003.
37. **Talkington FD Kleven SH.** 1983. A classification of laboratory strains of avian *Mycoplasma* serotypes by direct immunofluorescence. *Avian. Dis.* 27:422–429.
38. **Turner KS, Kleven SH.** 1998. Eradication of live F strain *Mycoplasma gallisepticum* vaccine using live ts-11 on a multiage commercial layer farm. *Avian Dis.* 42:404–407.
39. **Whithear KG.** 1996. Control of avian mycoplasmoses by vaccination. *Rev. Sci. Technol. Off. Int. Epiz.* 15:1527–1553.

40. **Yoder HW, Hopkins SR.** 1985. Efficacy of experimental inactivated *Mycoplasma gallisepticum* oil-emulsion bacterin in egg layer chickens. *Avian Dis.* 29:322–334.
41. **Zhang G.Z, Zhang R, Zhao HL, Wang XT, Zhang SP, Li XJ, Qin CZ, Lv CM, Zhao JX, Zhou JF.** 2010. A safety assessment of a fowlpox-vectored *Mycoplasma gallisepticum* vaccine in chickens. *Poult Sci.* 89:1301–1306.