



Živinarstvo

GOD. LI

Br. 7/8 2017.



XXVI
SAVETOVANJE ŽIVINARA
ZBORNİK RADOVA
Tara 2017.

STRUČNO-NAUČNI ČASOPIS

ISSN 0354-4036



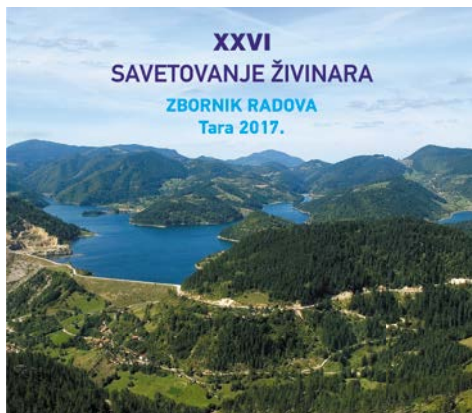
STRUČNO-NAUČNI ČASOPIS

GOD. L / BR. 7-8

BEOGRAD 2017.

Izdavač

Ciiip Živinarstvo



Centar za informisanje, izdavaštvo,
inovacije i propagandu – Beograd

Direktor

Dipl. vet. Dušanka Čobanović

Glavni i odgovorni urednik

Prof. dr Todor Palić

Kompjuterska i grafička priprema
Aleksandar Petrović

Štampa "M' Co" Beograd

Adresa redakcije:

11000 Beograd, p. fah 58,

Bul. oslobođenja 18

(Veterinarski fakultet)

Tel. 011/2657-953

Tel/faks: 011/2644-841

e-mail: ciiip-z@eunet.rs

dusanka.cobanovic@gmail.com

Kontakt vreme:

Sreda i četvrtak od 11 do 13 časova

SADRŽAJ

NEKROTIČNI

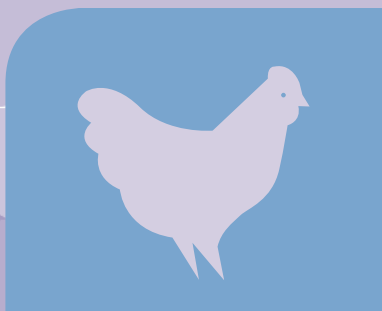
Pretplata na časopis za 2017. godinu:

za pravna lica **5.000* din.**, za pojedince **2.500* din.**, za inostranstvo **100* EUR.**

Tekući račun: **CIIIP "Živinarstvo" 160-419455-92**

Devizni žiro račun: **RS35-160-0053800014340-49**

Primljeni rukopisi se ne vraćaju



LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA PREGLEDOM KRVNIH SERUMA

DANKA MASLIĆ - STRIŽAK¹ 2, LJILJANA SPALEVIĆ¹, RADMILA RESANOVIĆ³

KRATKI SADRŽAJ

Utvrdjivanje postojanja antitela u serumima, koje ptice proizvode kao odgovor na vakcinacije ili na infekcije raznim antigenima rade se različitim laboratorijskim metodama. Metode za ispitivanje mogu biti kvantitativne i kvalitativne, a izbor metode zavisi i od cilja koji želimo postići utvrđujući postojanje antitela.

U radu su prikazane laboratorijske metode koje se najčešće koriste u našim laboratorijama sa ciljem da se utvrdi postojanje infekcije, provjeri rezultat provedenih vakcinacija kod različitih kategorija živine ili odredi vrijeme vakcinacije kako bi primjenjena vakcina dala najbolji rezultat.

Ključne riječi: serologija, aglutinacija, precipitacija, uzorkovanje krvi živine, rezultati testova.

UVOD

Tačan mehanizam prirode odbrambenog mehanizma - imunog odgovora, na infekciju ili vakcinaciju, kod ptica i dalje je predmet istraživanja. Poznato je da mehanizmi imunog odgovora ptica nisu identični tim procesima kod sisara te da su ti procesi vrlo složeni. Aplikacijom vakcine pokrećemo složene biološke

1 Naučni institut za veterinarstvo Srbije, Beograd

2 maslicd@gmail.com

3 Fakultet veterinarske medicine, Katedra za bolesti kopitara, mesojeda, živine i divljači, Beograd



mehanizme koji rezultiraju stvaranjem odbrambenih ćelija (antitela) (1). Kao odgovor na infekciju (vakcinaciju) stvaraju se:

- 1. Antitela koja cirkulišu u krvi (humoralna).**
- 2. Antitela koja se luče na sluzokože (uključujući sluznice oka , traheju, crijeva i sl.).**
- 3. Limfociti i makrofagi senzibilisani na antigen.**
- 4. Interferon.**

Merenje imunog odgovora je kontrola količine stvorenih cirkulirajućih antitela. Detekcija antitela je indirektan način dokazivanja infekcije (bolesti) ili rezultata vakcinacije u laboratorijskim uslovima (2). U tu svrhu koristi se brza krvna ili serumska aglutinacija (BSA), hemaglutinacija inhibicije (HAI), imunoenzimski test (ELISA), agar gel imunodifuzioni ili agar gel precipitacioni test (AGID ili AGP), virus neutralizacioni test (VNT), test vezivanja komplemenata (FT), indirektni fluorescentni test antitela (IFAT), test aglutinacije lateks (LAT), i mikroskopske aglutinacije (MAT).

| UZORKOVANJE KRVI ŽIVINE

Da bi se serološkim pretragama brzo i pouzdano postavila dijagnoza ili provjerilo stanje imuniteta potrebno je na odgovarajući način uzeti uzorak krvi i dostaviti ga u dijagnostičku laboratoriju (3).

VAĐENJE KRVI

Krv se uzima sterilnom iglom u sterilnu epruvetu (vakutanerom). Za većinu analiza dovoljno je da se uzme 1 - 2 ml krvi (rade se mikro metode). U zavisnosti od vrste analize i broja analiza po uzorku, potrebna količina seruma je od 0,1 μ l do 1ml. **Krv se kod živine uglavnom uzima iz vene ulnaris ili iz srca.** Ako je mala količina krvi u epruveti tokom transporta može doći do hemolize usled mućkanja.

Da bi se dobio kvalitetan uzorak seruma potrebno je da se krv što bolje zgruša (koagulira) i u tu svrhu se epruvete drže na sobnoj temperaturi zimi cijelu noć a u ljetnom periodu nekoliko sati. Izvađenu krv treba što prije dostaviti u laboratoriju ili izdvojiti serum i odvojen dostaviti u serološku laboratoriju. Ako do slanja u laboratoriju treba više dana serumi se mogu i zalediti i zaleđeni transportovati.

Broj uzoraka neophodnih za objektivnu dijagnozu je različit i zavisi od mnogih faktora, vrste analize, veličine jata, ponovljenih kontrola, odredaba u pravilniku i mnogih drugih faktora.

| SEROLOŠKE METODE

Standardne serološke metode koje se najčešće koriste u kontroli zdravlja živine su (4,5,6):

1. **Brza krvna ili serumska aglutinacija**
2. **AGP test (agar gel precipitacija)**
3. **Inhibicija hemaglutinacije**
4. **ELISA test**

1. BRZA KRVNA ILI SERUMSKA AGLUTINACIJA

Brzom krvnom ili serumskom aglutinacijom utvrđujemo aglutinine u krvi ili serumu živine. Za ispitivanje prisustva specifičnih aglutinina različitih antigena koriste se obojeni antigeni. Danas laboratorije upotrebljavaju gotove komercijalne obojene i standardizovane antigene.

Ako u ispitivanom uzorku postoje aglutinini-antitela (pozitivni uzorci) nakon mješanja krvi (seruma) i antigena krpičaste pahuljice se javljaju u kratkom vremenskom periodu od 1-2 minuta. Veličina pahuljica (flokula) može da varira što zavisi od koncentracije antitela u serumu. Ako u serumu (krvi) nema antitela, ne dolazi u određenom vremenu do promjena i karakterističnih pahuljica.

Metoda je brza, lako se izvodi i može da se koristi za veliki broj uzoraka. Ovo je kvalitativna metoda kojom se utvrđuje da li u serumu ili krvi postoje ili ne postoje antitela. Rezultati se iskazuju kao broj pozitivnih u odnosu na broj ispitanih uzoraka npr :

Pozitivno / ispitano
0/20
5/64

Metod je pogodan za izvođenje na terenu, a u slučajevima kad se radi izdvajanje inficiranih treba kontrolisati cijelo jato.

2. AGAR GEL PRECIPITACIONI TEST

Agar gel precipitacioni test se koristi za utvrđivanje antitela na različite antigene, antigen sa antitelima iz seruma se povezuje formirajući kompleks od kojeg nastaje vidljiva linija u gelu. Test je lagan za izvođenje, kao antigen može poslužiti horizontalna membrana inficiranog embriona ili organ inficirane životinje. Za kontrolu se koriste sigurno pozitivni serumi a reakcije se izvode na pločama sa agarom. **Nedostatak testa je da je kvantitativan, slabo osjetljiv, nespecifičan i spor. Za očitavanje reakcija potrebno je i do 72 sata.**



3. TEST INHIBICIJE HEMAGLUTINACIJE (hemihinhibicija – HI)

Posredno virusne bolesti je moguće otkriti dokazom specifičnih antitela virusa u krvi živine. Testom hemihinhibicije dokazuju se hemihinhibitorna antitela nastala djelovanjem patogenog ili vakcinalnog soja virusa koji imaju u omotaču protein čiji hemaglutinin izaziva u zaraženom organizmu nastajanje antitela sposobnih da izvrše inhibiciju krvne aglutinacije (hemaglutinacije) i koja se u serumu nalaze u različitoj koncentraciji (7,8,9).

Sedam do deset dana nakon infekcije (vakcinacija) testom inhibicije hemaglutinacije moguće je utvrditi ne samo postojanje hemihinhibicionih antitela nego i njihovu zastupljenost u serumu.

Za test inhibicije hemaglutinacije koristi se antigen – radni virus obično sa 4 hemaglutinacione jedinice. Serološke laboratorije rade prema uputstvima propisanim od strane OIE (*Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2017.*) za određeni virus. Prisustvo antitela se utvrđuje u razređenom serumu. Niz razređenja se pravi tako da počinje sa jednakom količinom seruma i diluenta (PBS ili fiziološkog rastvora) 1:1, a potom se već tako razređen serum razređuje prenoseći propisanu količinu rastvora u istu količinu diluenta. Tako nastala višestruka razređenja se iskazuju kao 2^1 2^2 2^3 2^4 2^5 2^6 2^7 2^8 2^9 2^{10} ... 2^n (10)

Hemihinhibicioni titar se očitava određivanjem najvećeg razređenja seruma u kojem postoji kompletna inhibicija virusa sa 4 hemaglutinacione jedinice. Odnosno, hemihinhibicioni titar u serumu se izražava kao recipročna vrijednost razređenja seruma (11,12).

UZORAK	2^1	2^2	2^3	2^4	2^5	2^6	2^7	2^8	2^9	2^{10}	2^{11}	2^{12}
	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	4096
1.	2	3	8		7		5	1			4	
2.		2	7	9	3	2			5	1	1	

Uzorak 1 = $\log 2^{5.13}$ Aritmetička sredina: 313.066

Uzorak 2 = $\log 2^{5.13}$ Aritmetička sredina: 202.133

Hemihinhibicioni titar svakog uzorka je izražen kao recipročna vrednost razređenja seruma te se za očitavane vrijednosti koristi logaritam baze 2, što se svodi na brojanje rupica (epruvete) u kojima je nastala aglutinacija (13).

Praćenjem reakcije u višekratnom razređenju utvrđuje se koji broj uzoraka ima približno istu koncentraciju hemaglutinirajućih antitela i na osnovu dobijenih rezultata i broja uzoraka ocjenjuje se uspješnost vakcinacije ili infekcija.

Rezultati se iskazuju kao $\log 2^n$. Prema preporuci OIE smatra se da je uzorak ispitivan na New Castlae pozitivan ukoliko pokazuje titar 2^4 i veći. (1:16) (14).

Dobro je da se kontrolišu paralelni uzorci prije i nakon vakcinacije (infekcije). Isti metod je moguće koristiti u kontroli za virus New Castlae, Infektivni

bronchitis, Eggs drop syndrome i druge antigene koji svojim prisustvom u organizmu stvaraju heminhibitorna antitela.

4. ELISA

Enzimaska imunoanaliza (EIA) i enzimski vezana imunosorbentna analiza (ELISA) se koriste kao dijagnostičke metode u medicini i u kontroli kvaliteta u različitim industrijama. U biomedicinskim istraživanjima ovi testovi se koriste za detekciju i kvantifikaciju specifičnih antigena i antitela u analiziranom uzorku. Osnova testova je zasnovana na načelima radioimunskih testova (RIA)(15).

EIA / ELISA koristi osnovni imunološki koncept vezivanja antigena na specifično antitelo, što omogućava detekciju vrlo malih količina antigena kao što su proteini, peptidi, hormoni ili antitela u uzorku. EIA i ELISA koriste antigene i antitela označene enzimom za detekciju bioloških molekula, a najčešće korišćeni enzimi su alkalna fosfataza i glukoza oksidaza. U mikropločama sa 96 bunara se nalazi imobilizirani antigen koji ima sposobnost vezivanja samo sa specifičnim antitelom koji je oslobođen sekundarnim antitelima vezanim uz enzim. Supstrat sa enzimom ima sposobnost da mjenja boju ili florescira. Hromogeni supstrat za enzim daje vidljivu promjenu boje, što ukazuje na prisustvo antigena. Fluorogeni supstrati imaju veću osjetljivost i mogu precizno mjeriti koncentracije antigena u uzorku. Osjetljivost testa zavisi od apsorptivnog kapaciteta ploča. Ploče niskog do srednjeg kapaciteta (osjetljivosti) vezuju do 100 - 200 ng IgG / cm² a visoko vezivne ploče 400 - 500 ng IgG / cm² i apsorbiraju peptide dužine uglavnom 15-20 amino kiselina. Mjerenja se vrše kolorimetrijski pri čemu se određuje optička gustina reakcionog proizvoda koja je direktno proporcionalna količini mjenjenog analita. Zavisno od korišćenog supstrata očitavanja se rade na talasnim dužinama 405-450 nm (reagense žute boje) ili 490 nm (plavo-zelene) i 650 nm (reagense plave boje). Optička gustina reakcionog proizvoda je direktno proporcionalna količini mjenjenog analita, i kvantitativne ili kvalitativne mjere se procjenjuju na osnovu kolorimetrijskog očitavanja.(16,17)

Količina svjetlosti koju apsorbiruje uzorak naziva se apsorpcija-apsorbanca (A), a količina koja prodire kroz ispitivani uzorak prenos (T) - transmitanca. Odnos tih vrednosti je optička gustina (OD vrednost), pri tome je apsorpcija logaritamska vrijednost propuštene količine svjetlosti i izračunava se po formuli $A = -\log_{10}(I_1/I_0)$. Apсорpcija je zavisna od talasnih dužina svjetlosti. Ispitivani supstrat se priprema u razređenjima i očitava na pločama propuštajući svjetlost određene talasne dužine. Vrijednost titra za svako razblaženje se izračunava po formuli:

$$\log_{10} \text{ titar} = (\log_{10} \text{ apsorbanca} - Y_{\text{intercept}}) / \text{slope (presetnuti/nagib)}$$

i izražava se kao logaritam od 10.



Podaci ELISA se obrađuju optičkom gustinom i logaritamskom koncentracijom i na osnovu tih rezultata izrađuje se standardna kriva i zatim se ti podaci koriste za ispitivanje koncentracije nepoznatih uzoraka. Za dobijanje podataka o nepoznatom uzorku koriste se čitači sa softverskim programima. Princip predviđanja titra ELISA antitela u jednom razblaženju seruma korišćenjem standardne krivulje je općenito prihvaćen.

Pitanje na koje držaoci živine očekuju odgovor prilikom slanja uzorka na analizu imunog statusa jata je koja srednja vrijednost titra antitela štiti njihovo jato od pojave bolesti tj. može li se iz dobijenih nalaza procijeniti uspješnost vakcinacije, potreba za revakcinacijom ili dijagnostifikovati infekcija terenskim virusom?

Za pravilno tumačenje dobijenih rezultata ELISA testa, potrebno je poznavati očekivani titar antitela za određenu bolest prije i nakon vakcinacije, pravilno tumačiti vrednost koeficijenta varijacije (CV), znati starost, kategoriju živine i primijenjeni način vakcinacije. U tumačenju rezultata veliku ulogu igra i broj ispitanih uzoraka po jednom jatu. Za procijenu optimalnog vremena vakcinacije koristi se Deventer formula. Osim ujednačenosti nivoa antitela, na procijenu vremena vakcinacije u formuli je sadržan i podatak o uzrastu, kategoriji, vremenu poluraspada maternalnih antitela i dr. i na osnovu tih podataka izračunava se kad se očekuje da veliki procenat jedinki (najmanje 75%) u jatu ima titar ispod granice "proboja" (*de Wit 1998.*) kada će aplicirana vakcina biti najuspješnija.

Veličina ispitivanog uzorka, broj uzoraka krvi uzetih iz jata je od velikog značaja za dobijanje pouzdanog rezultata "istinskog srednjeg titra jata". Veličina uzorka varira od ujednačenosti/ neujednačenosti titara utvrđenih u jatu. Općenito, što je veća neujednačenost titara (nejednakost) u jatu, potrebno je ispitati veći broj uzoraka krvnih seruma da bi se dobio „pravi srednji titar“.

U praksi, broj uzoraka uzetih od jata je kompromis između statistički ispravnog broja i troškova uzimanja uzoraka i analize te pravilnika o procijeni broja uzoraka. Često taj broj uzoraka negativno utiče na sigurnost izračunatih podataka (18,19,20.).

Koliko je značajna veličina uzorka govori slijedeći primjer gdje su pokazani rezultati pregleda 20 uzoraka krvi živine uzrasta 2 dana, a dobijene vrijednosti prikazane kao rezultat pregleda različitih kategorija:

Visina titra A jato	Visina titra B jato
1275	1955
988	1257
5270	1785
628	1968
2106	1968
2100	2106
3690	2100
3546	1750
2036	1750
1900	1860
463	1900
2306	2304
2299	2306
4369	2299
2643	2192
3214	1857
4632	1934
6311	1987
321	1793
268	1680
Srednja vrednost 2518	Srednja vrednost 1938
CV = 68%	CV = 13%

Plan vakcinacije za jato A u odnosu na očekivani „proboj“ vakcine :

- „proboj“ zavisi od vrste vakcine

A)

1. Proboj na 500:

	75% jata	25% jata	Razlika u danima
Brojleri	12 dan	7 dan	6 dana
Roditelji teški	17 dan	8 dan	8 dana
Nosilje	20 dan	9 dan	10 dana

2. Proboj na 100:

	75% jata	25% jata	Razlika u danima za vakcinaciju
Brojleri	19	14	6
Roditelji teški	27	19	8
Nosilje	32	22	10



Plan vakcinacije jata B u odnosu na očekivani „proboj“vaccine:

B)

1. Proboj na 500:

	75% jata	25% jata	Razlika u danima
Brojleri	10	10	1
Roditelji teški	13	12	1
Nosilje	15	14	1

2. Proboj na 100:

	75% jata	25% jata	Razlika u danima
Brojleri	17	16	1
Roditelji teški	24	23	1
Nosilje	28	27	1

Ako se vrednosti dobijene za jato B dobiju u slučaju kontrole jata kome je krv uzeta 9 dan života onda plan vakcinacije izgleda ovako:

B)

1. Proboj na 500:

	75% jata	25% jata	Razlika u danima
Brojleri	15	15	1
Roditelji teški	18	17	1
Nosilje	20	19	1

2. Proboj na 100:

	75% jata	25% jata	Razlika u danima
Brojleri	22	21	1
Roditelji teški	29	28	1
Nosilje	33	32	1

Uticaj veličine uzorka se vidi kad, na primer, iz podataka za jato A u formulu ne uvrstimo samo dva uzorka (titra 4369 i 4632) dobijemo srednju vrednost 2298 i CV 72% te u odnosu na te vrijednosti plan vakcinacije je:

C)

1. Proboj na 500:

	75% jata	25% jata	Razlika u danima
Brojleri	11	5	6
Roditelji teški	15	5	9
Nosilje	17	6	11

Ili ako nismo pregledali dva uzorka sa titrom 268 i 321 iz istog jata dobijemo srednju vrednost 2765 i CV58%, u tom slučaju plan vakcinacije je:

D) 1. Proboj na 500:

	75% jata	25% jata	Razlika u danima
Brojleri	12	8	4
Roditelji teški	17	10	7
Nosilje	20	11	8

ZAKLJUČAK

Zdravlje živine je osnova dobre i uspješne proizvodnje. Za očuvanje zdravlja neophodno je ispuniti niz uslova u držanju, smještaju i zaštiti živine. Jedan od uslova i obaveznih zahvata je i vakcinacija živine protiv bolesti izazvanih raznim uzročnicima. Uprkos dobrom kvalitetu vakcina i njihovoj stručnoj administraciji nismo u stanju da znamo je li postignut dovoljan nivo zaštite ako ne vršimo redovnu kontrolu. Kontrola uspješnosti sprovedenih vakcinacija, kao i određivanje vremena prve vakcine i/ili čak postavljanje sumnje na infekciju moguće je raditi pretragama krvnog seruma različitim laboratorijskim metodama. Neovisno od metoda koji se koristi, samo serološka kontrola, posebno ako je sprovedena jednokratno u jatu (proizvodnom turnusu) teško da može poslužiti za pravilno praćenje proizvodnje, zdravlja ili donošenja programa vakcinacija.

ABSTRACT

Determining the existence of antibodies in serums, which birds produce in response to vaccinations or infections with various antigens, are done by different laboratory methods. Test methods can be quantitative and qualitative, and the choice of the method depends on the goal that we want to achieve by determining the existence of an antibody.

The paper presents laboratory methods that are most often used in our laboratories in order to determine the existence of an infection, check the results of the conducted vaccinations in different categories of livestock or determine the time of vaccination in order for the applied vaccine to give the best result.

Key words: serology, agglutination, precipitation, animal blood sampling, test results



LITERATURA

1. **Resanović Radmila**, 2016, Imunosupresija živine u svetlu imunoprofilakse, Zbornik predavanja „XXXVII seminara za inovacije znanja veterinara”, Beograd, 45-54
2. **Resanović Radmila**, 2015, Klinički aspekti imunosupresije živine, Veterinarski glasnik, 69, 1-2, 91-100
3. **P.F.McMullin (1984)**: THE MEANING OF VACCINATION TITRES; Proceedings of the 2nd Symposium of the Brazilian Chick Producers Association (APINCO) pp 11-16 Campinas, SP, 1984
4. **Dennis A. Senne**: Agar Gel Immunodiffusion (AGID) Test Principles and Techniques dennis.a.senne@aphis.usda.gov USDA, APHIS, VS, National Veterinary Services Laboratories, Ames, IA 50010
5. **Milic N, Lazic S, Vidanovic D, Sekler M, Nisavic J, Resanovic R, Petrovic T**, 2012, Molecular characterization of some strains of Newcastle disease virus isolated in province of Vojvodina, Republic of Serbia, Acta veterinaria, 62, 4, 365-374
6. A basic laboratory manual for the small-scale production and testing of I-2 ... <http://www.fao.org/docrep/005/ac802e/ac802e0a.htm>
7. Lab.2/ Virology B. Serological techniques: http://www.uobabylon.edu.iq/uobColeges/ad_downloads/4_28574_987.pdf
8. **Gregory A. Storch:(2000)**: Diagnostic Virology Clin Infect Dis 31 (3): 739-751.
9. **Manual of standards for diagnostic tests and vaccines**. Office International des Epizooties, World Organisation for Animal Health, Paris. 2017.. www.oie.int
10. **Aleksejuniene Iona, Aleksejunas Almontas, Šolkunaite Julija (2006)**: Antibody Response in chicks vaccinated against infectious bronchitis virus, Lietuvos veterinarijos akademijos veterinarijos institutas, Kaišiadorys, Lietuva
11. **Ricardo Luiz Moro de Sousa, Helio José Montassier, Aramis Augusto Pinto(2000)**: Detection and Quantification of Antibodies to Newcastle Disease Virus in Ostrich and Rhea Sera Using a Liquid Phase Blocking Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Journal List Clin Diagn Lab Immunol v.7(6); 2000 Nov
12. **K. M. Mozaffor Hossaint, Md. Yamin Ali, Ichiro Yamato (2010)**: Antibody Levels against Newcastle Disease Virus in Chickens in Rajshahi and Surrounding Districts of Bangladesh, International Journal of Biology Vol. 2, No. 2; July 2010
13. **M. Paton, D. Martin, M. Khan** : Linearization of a Dilution Curve for Antibody Titer Computation: A Useful Tool in the Immunogenicity Bioanalytical Labs <http://abstracts.aaps.org/Verify/AAPS2015/PosterSubmissions/W5211.pdf>
14. **How to calculate the geometric mean titer (GMT) of titers from a haemagglutination assay (influenza)?** <https://biology.stackexchange.com/questions/53884/how-to-calculate-the-geometric-mean-titer-gmt-of-titers-from-a-haemagglutinati>
15. **Perkins., T. (1958)**: A Ready Reckoner for the Calculation of Geometric Mean Antibody Titres, J. gw. Microbiol. 19, 540-541
16. **Roberto Reverberi:(2008)**: The statistical analysis of immunohaematological data Journal List Blood Transfus. 6(1); 2008 Jan

- 17. Scott S. Emerson (2014):** Use of Ratios and Logarithms in Statistical Regression Models, M.D., Ph.D. Department of Biostatistics, University of Washington, Seattle, WA 98195, USA January 22,
- 18. Aung Thiha, Fatimah Ibrahim (2015):** A Colorimetric Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) Detection Platform for a Point-of-Care Dengue Detection System on a Lab-on-Compact-Disc Sensors 2015, 15, 11431-11441; doi:10.3390/s150511431
- 19. Stephanie D.Gan , Kruti R.Patel (2013):** Enzyme Immunoassay and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Journal of Investigative Dermatology Volume 133, Issue 9, September 2013, Pages 1-3
- 20. Stephenson, Iain et al.(2009):** "Reproducibility of Serologic Assays for Influenza Virus A (H5N1)." *Emerging Infectious Diseases* 15.8: 1250–1259. *PMC*. Web. 11 July 2017.
- 21. Besseboua, O., Ayad, A., Benbarek, H.(2015):** 'Determination of the optimal time of vaccination against infectious bursal disease virus (Gumboro) in Algeria', *Onderstepoort Journal of Veterinary Research* 82(1), Art. #887, 6 pages. <http://dx.doi.org/10.4102/ojvr.v82i1.887>
- 22. Tajana Amšel Zelenika, Vladimir Savić, Mirta Balenović(2015):** Praćenje razine protutijela u jatima peradi kao osnova procjene procijepljenosti i terenske infekcije virusima zaraznog bronhitisa i zarazne bolesti burze XI. simpozij Peradarski dani 2015. s međunarodnim sudjelovanjem, Zbornik str: 19-24
- 23. Fa ntay H, Balcha E, Tesfay A, Afera B (2015):** Determining Optimum Time for Administration of Live Intermediate Vaccine of Infectious Bursal Disease to Chickens at Mekelle Farm. *J Veterinar Sci Technol* 6:223. doi:10.4172/2157-7579.1000223