

Monitoring serologiczny koni

Magdalena Zaleska, Joanna Nerc, Artur Żbikowski

z Katedry Patologii i Diagnostyki Weterynaryjnej Wydziału Medycyny Weterynaryjnej w Warszawie

Diagnostyka laboratoryjna chorób zakaźnych koni powinna uwzględniać wiek zwierząt, warunki bytowania, utrzymanie oraz sposób użytkowania. Niezbędne są też informacje dotyczące dotychczasowej profilaktyki swoistej. Odpowiedź immunologiczna konia na podanie szczepionki może być obniżona przez wiele czynników, wśród których ważną rolę odgrywają zaburzenia procesu prezentacji antygenów związane z głównym układem zgodności tkankowej (major histocompatibility complex – MHC). Innym ważnym czynnikiem jest immunosupresja, wynikająca z różnych stanów chorobowych i stosowania leków. Czynniki te obniżają przede wszystkim odpowiedź immunologiczną związaną z powstawaniem przeciwciał klas IgA i IgG. Jednym z ważniejszych czynników wpływających na skuteczność szczepień jest wiek zwierzęcia.

Niedobry immunologiczne sprzyjają chorobom układu oddechowego źrebiąt

w wieku od 1 do 6 miesiąca życia. Szczególnie groźne w tym okresie są zakażenia *Rhodococcus equi*, które przyjmują postać endemiczną (1).

U źrebiąt immunoglobuliny powstają od momentu urodzenia, ale ich poziom jest niski do 2 miesiąca życia. Ponadto w pierwszych tygodniach życia odpowiedź immunologiczna źrebiąt jest hamowana przez obecne jeszcze w ich organizmie przeciwciała matczyne (2).

Stosowanie w diagnostyce chorób zakaźnych koni monitoringu serologicznego wykorzystywane jest w badaniach nad nowymi szczepionkami i metodami szczepień, pozwalającymi na wytworzenie odporności, mimo obecności przeciwciał matczynych (3).

Monitoring serologiczny polega na okresowym badaniu surowic koni w celu wykrycia przeciwciał przeciwko określonym czynnikom zakaźnym. **Tabela 1** przedstawia testy używane w diagnostyce serologicznej chorób zakaźnych koni.

Tabela 1. Najważniejsze testy serologiczne stosowane w diagnostyce chorób zakaźnych koni (15)

Nazwa testu	Rodzaj wykrywanych przeciwciał	Nazwa choroby
Test zahamowania hemaglutynacji (HI)	IgG	grypa koni gorączka Zachodniego Nilu wschodnie zapalenie mózgu i rdzenia zachodnie zapalenie mózgu i rdzenia rodokokoza źrebiąt
Test dyfuzji w żelu agarowym (AGP)	IgM	zapalenie jamy nosowej i płuc koni oraz ronienie kłaczy niedokrwiistość zakaźna koni afrykański pomór koni rodokokoza źrebiąt
Test seroneutralizacji (SN)	IgG IgM	zapalenie jamy nosowej i płuc koni oraz ronienie kłaczy otręt koni wirusowe zapalenie tętnic u koni gorączka Zachodniego Nilu zachodnie zapalenie mózgu i rdzenia wenezuelskie zapalenie mózgu i rdzenia
Test szybkiej aglutynacji płytowej (SPA)	IgM	gruźlica koni leptospiroza bruceloza koni
Test ELISA – test immunoenzymatyczny (Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay – ELISA)	IgG, IgM, IgA	grypa koni zapalenie jamy nosowej i płuc koni oraz ronienie kłaczy wirusowe zapalenie tętnic u koni niedokrwiistość zakaźna koni gorączka Zachodniego Nilu choroba bornaska afrykański pomór koni leptospiroza bruceloza koni krętkowica kleszczowa koni rodokokoza źrebiąt
Test immunodyfuzji w żelu agarowym (test Cogginsa, AGID)	IgG	niedokrwiistość zakaźna koni

Serological monitoring in horses

Zaleska M., Nerc J., Żbikowski A., Department of Pathology and Veterinary Diagnostics, Faculty of Veterinary Medicine, Warsaw University of Life Sciences – SGGW

This paper presents the principles and aims of the serological monitoring of equine infectious diseases, including evaluation of immunization efficacy. The immunological response to vaccination in horses can be impeded by many factors. Among them are disorders of the major histocompatibility complex (MHC), influencing the process of antigen presentation. Also immunosuppression which is associated with infectious diseases and with some drugs administration is often observed. Infectious diseases which could be evaluated serologically were briefly described. Methods, namely enzyme linked immunosorbent assay (ELISA), haemagglutination inhibition test (HI), agar gel precipitation test (AGP), seroneutralization test (SN), rapid serum plate agglutination test (SPA) and agar gel immunodiffusion test (AGID, Coggins test), were presented in association with their application to the monitoring purposes. It was also mentioned that other factors, as the age and performance of animals should be considered when results of these tests are interpreted.

Keywords: serological monitoring, infectious diseases, efficacy of vaccination, horse.

Laboratoria diagnostyczne stosują do rutynowej diagnostyki serologicznej głównie testy immunoenzymatyczne – ELISA. O ich szerokim stosowaniu w praktyce zadecydowała przede wszystkim możliwość pełnej automatyzacji wykonania oraz szybkość oznaczeń. Możliwe jest zbadanie 92 surowic z różnymi antygenami w czasie około 2 godzin. Najistotniejszymi zaletami testów ELISA są:

- ich czułość i swoistość,
- dokładność,
- powtarzalność wyników,
- możliwość pełnej automatyzacji,
- możliwość komputerowej analizy danych,
- możliwość przesyłania wyników drogą elektroniczną natychmiast po wykonaniu badania!
- ekonomika (ceny testów od wielu lat są na stabilnym poziomie).

Monitoring serologiczny konia podejrzanego o zakażenie określonym czynnikiem zakaźnym powinien obejmować próbki surowic z dwóch pobrań krwi, przeprowadzonych w odstępie 1–3 tygodni. Takie postępowanie umożliwia wykazanie wzrostu miana przeciwciał, co jest konsekwencją rozwinięcia się humoralnej odpowiedzi immunologicznej na wykrywalnym poziomie. Pojedynczy wynik badania jest wystarczającą podstawą rozpoznawania jedynie w odniesieniu do nielicznych chorób zakaźnych koni, jak na przykład niedokrwiłość zakaźna koni, w których zakażenie utrzymuje się przez całe życie. Należy podkreślić, że wynik ujemny badania serologicznego może świadczyć o braku zakażenia lub o początku zakażenia, kiedy nie doszło jeszcze do serokonwersji (4).

Przykład terminów pobierania próbek do monitoringu serologicznego może przedstawiać się następująco: 1 dzień życia (przed spożyciem siary), 3 miesiąc życia, 5 miesiąc życia, 7 miesięcy i 2 tygodnie, 10 miesięcy i 2 tygodnie, 2 miesiące przed porodem (w przypadku klaczy).

Zasady pobierania próbek do badań serologicznych

Do badania należy pobrać około 10 ml krwi z żyły szyjnej zewnętrznej do płaskodennej, okrągłej probówki z zakrętką o pojemności 20 ml. Probówkę po opisaniu układu się płasko, aby powierzchnia krzepnięcia krwi była jak największa. Przez pierwsze około 30 minut nie należy jej chłodzić. Krew powinna znajdować się w temperaturze pokojowej do czasu skrzepnięcia, po czym oddziela się skrzep od ścianek probówki. Probówkę z oddzielonym od jej ścianek skrzepem poddaje się chłodzeniu (nie zamraża). Po oddzieleniu się surowicy należy ją przelać do probówek wirówkowych (o pojemności 10 ml

ze szczelnym zamknięciem), które odpowiednio opisujemy.

Przy pobieraniu próbek należy przestrzegać zasad aseptyki. Bardzo ważne jest, aby próbki, które nie będą transportowane do laboratorium diagnostycznego przed upływem 24 godzin, były dokładnie opisane i schłodzone. Próbki należy zapakować do szczelnie zamkniętych torebek i dokładnie opisać, uwzględniając:

- nazwisko właściciela,
- szczegółowe dane identyfikujące konia,
- wiek konia,
- kierunek badania.

Jakość próbek

Należy mieć na uwadze, że jakość surowic dostarczonych do laboratorium ma zasadniczy wpływ na osiągnięte wyniki. Im lepszy jest ich stan, tym bardziej wiarygodne są uzyskane wyniki. W zasadzie niewielka lub występująca w średnim stopniu hemoliza nie ma wielkiego wpływu na wynik badania, ze względu na stosowanie w testach ELISA wysokiego rozcieńczenia próbek. Bakteryjne lub grzybicze zanieczyszczenie próbek może jednak znacząco wpływać na osiągnięte wyniki. Jeżeli surowica ma być transportowana w niesprzyjających warunkach przez dłuższy czas (np. wysyłka pocztą w czasie upałów), należy dodać do niej 0,05 ml (1 kropla) 1% roztworu mertiolatu. Jeżeli jakość nadesłanych próbek budzi duże zastrzeżenia, laboratorium może odstąpić od badania i prosić o nadesłanie nowych surowic lub próbek krwi (5).

Zasady i cel monitoringu

1. Określenie poziomu przeciwciał matczynych.
Znajomość poziomu przeciwciał u źrebiąt ma ważne znaczenie praktyczne. Pozwala między innymi ocenić program szczepień matki, a także precyzyjnie określić termin szczepień źrebiąt.
2. Określenie skuteczności szczepień w zależności od drogi podania szczepionki.
W wielu przypadkach błędy w technice szczepień mają negatywny wpływ na powstanie odporności. Monitorowanie serologiczne pozwala na szybką reakcję i zastosowanie właściwego szczepienia.
3. Ocena odporności poszczepiennej.
W przypadku, gdy poziom odporności poszczepiennej nie jest zadowalający możliwe jest skrócenie odstępu pomiędzy poszczególnymi szczepieniami. Przy wysokim poziomie odporności przerwy pomiędzy poszczególnymi immunizacjami mogą być dłuższe.
4. Sygnalizowanie możliwości pojawienia się problemów zdrowotnych.

5. Wczesne rozpoznawanie istniejących chorób.

Regularne badania serologiczne pozwalają również na bardzo szybkie i precyzyjne rozpoznanie wielu chorób. Dotyczy to zwłaszcza często spotykanych w praktyce jednostek chorobowych o przebiegu podklinicznym. Na podstawie wyników badań można sporządzić ocenę stanu zagrożenia chorobami zakaźnymi na danym terenie.

6. Obniżenie kosztów utrzymania poprzez poprawę stanu zdrowotnego.
7. Wyznaczanie właściwych terminów szczepień.

Jednostki chorobowe, które mogą być objęte monitoringiem serologicznym przy użyciu testów ELISA

Grypa koni (*influenza equorum*)

Etiologia

Chorobę wywołują dwa podtypy wirusa grypy: A/ equi 1 i A/ equi 2, należące do rodziny *Orthomyxoviridae* i rodzaju *Influenza A-Virus*. Są to jednociowe RNA wirusy, charakteryzujące się bardzo dużą zmiennością antygenową.

Objawy kliniczne

Choroba charakteryzuje się nagłym wzrostem temperatury ciała. Następnie pojawia się kaszel, wypływ surowiczy z nosa i worków spojówkowych, przyspieszony oddech, duszność, bóle mięśniowe. Obserwuje się zapalenie spojówek i niekiedy obrzęk powiek, kończyn i podbrzusza. Przebieg choroby może być ostry lub łagodny. Często dochodzi do powikłań bakteryjnych, co może prowadzić do zejścia śmiertelnego. Zdrowe dorosłe konie zwykle przechodzą w ciągu 4–5 dni bez żadnych dalszych powikłań.

Zmiany anatomopatologiczne

Stwierdza się nieżytowe zapalenie błon śluzowych oraz różnego stopnia zmiany zapalne innych narządów wewnętrznych. W przypadku powikłań często stwierdza się ropne odoskrzelowe zapalenie płuc. Mogą być również powiększone węzły chłonne żuchwowe i tchawiczo-oskrzelowe.

Diagnostyka

Rozpoznanie kliniczne potwierdza się badaniem serologicznym (test zahamowania hemaglutynacji (HI), test ELISA) oraz wirusologicznym (izolacja wirusa) lub badaniem potwierdzającym obecność wirusa testem Directigen Flu-A.

Jednym z najważniejszych problemów profilaktyki grypy koni jest wybór odpowiedniego terminu szczepień. Przeciwciała matczyne mogą bowiem osłabiać

immunogenność antygenów szczepionkowych. Prowadzenie właściwej immunoprofilaktyki przeciwko tej chorobie wymaga monitorowania źrebiąt w pierwszych miesiącach życia. Dynamika zanikania przeciwciał matczynych może być inna u koni ras lekkich niż u koni ras ciężkich czy kuców. Badania przeprowadzone u innych gatunków zwierząt (drób, trzoda chlewna) wykazały, że zanikanie przeciwciał matczynych zależy od rasy i rodzaju użytkowania. U koni tego rodzaju badań jeszcze nie przeprowadzono, można jednak sądzić, że u tego gatunku okres utrzymywania się odporności biernej (naturalnej) może być uzależniony od tych samych czynników.

Zapalenie jamy nosowej i płuc koni oraz ronienie kłaczy (*rhinopneumonitis equorum*)

Etiologia

Zakażenie wywołują dwa typy herpeswirusa końskiego: equine herpesvirus-1 (EHV-1) i equine herpesvirus-4 (EHV-4), należące do rodziny *Herpesviridae* i podrodziny *Alphaherpesvirinae*. Podtyp EHV-1 odpowiedzialny jest za ronienia kłaczy, zaś EHV-4 za zapalenie układu oddechowego. Są to dwuniciowe DNA wirusy.

Objawy kliniczne

Choroba może przebiegać w trzech postaciach – zapalenia nosa i gardła (*rhinopneumonitis*), odoskrzelowego zapalenia płuc (*bronchopneumonia*) i ronienia (*abortus*). Ponadto mogą być obserwowane postaci nerwowe (głównie związane z zakażeniem EHV-1), objawiające się zaburzeniami w koordynacji ruchów, prowadzące do niedowładów.

W przypadku zakażeń źrebnych kłaczy ronienia występują między 7 a 11 miesiącem ciąży. Młode konie w wieku do 1 do 4 lat są bardziej zagrożone zakażeniem. U źrebiąt częściej zdarza się zakażenie EHV-1.

Zmiany anatomopatologiczne

W przypadku wystąpienia postaci oddechowej stwierdza się zmiany zapalne w płucach. Węzły chłonne mogą być powiększone. W poronionych płodach charakterystyczne są obrzęki tkanki podskórnej, zażółcenia błon śluzowych i tkanki podskórnej, wybroczyny w błonach śluzowych i tkance podskórnej, wybroczyny w błonach śluzowych układu oddechowego i w niektórych narządach. Obserwuje się również znaczną ilość płynu w jamach piersiowej i brzusznej.

Diagnostyka

Rozpoznanie kliniczne i anatomopatologiczne można potwierdzić badaniem

histopatologicznym, izolacją wirusa, testem dyfuzji w żelu agarowym (AGP), testem seroneutralizacji (SN), immunofluorescencji oraz serologicznym testem ELISA. W przypadkach zakażeń latentnych bardzo przydatna jest metoda PCR (6).

Niedokrwistość zakaźna koni (*anemia infectiosa equorum*)

Etiologia

Zakażenie wywołuje retrowirus (lentiwirus) z rodziny *Retroviridae*. Jest to jednociowy RNA wirus, który ulega zmienności pod wpływem każdego nawrotu gorączki. Jest on przenoszony przez muchy końskie oraz muchy żerujące na jeleniowatych, zwłaszcza podczas wiremii (faza gorączkowa choroby).

Objawy kliniczne

Objawy choroby są zróżnicowane i zależne od jej postaci. Wyróżnia się postaci: ostrą, podostrą, przewlekłą i utajoną. Zazwyczaj występuje wysoka gorączka i niedokrwistość. Jest to choroba nieuleczalna, a zakażenie utrzymuje się u koni do końca życia.

Zmiany anatomopatologiczne

Stwierdza się wybroczyny pod błonami surowiczymi, w błonach śluzowych i nerkach, a także powiększenie i przekrwienie śledziony oraz węzłów chłonnych.

Diagnostyka

W diagnostyce zasadniczą rolę odgrywają badania hematologiczne i serologiczne. Powszechnie stosowane są testy AGP, ELISA i Cogginsa (immunodyfuzji w żelu agarowym, AGID). Pozytywny wynik testu ELISA powinien być potwierdzony pozytywnym wynikiem testu AGP, ponieważ test ELISA ma mniejszą swoistość.

Choroba podlega obowiązkowi rejestracji (znajduje się w załączniku nr 3 do ustawy o ochronie zdrowia zwierząt oraz zwalczaniu chorób zakaźnych zwierząt; 7).

Wirusowe zapalenie tętnic u koni (*arteritis virosa equorum*)

Etiologia

Czynnikiem wywołującym wirusowe zapalenie tętnic u koni jest wirus z rodziny *Arteriviridae*. Należy on do jednociowych RNA wirusów. Analiza filogenetyczna wykazała, że linie amerykańskie i europejskie wirusa wykazują znaczne różnice pomiędzy szczepami. Na zakażenie arteriowirusami wrażliwe są jedynie koniowate.

Objawy kliniczne

Dochodzi do wzrostu temperatury ciała, zapalenia spojówek, łzawienia, obrzęku wokół oczu, kończyn i podbrzusza. Stwierdza

się również wysypkę na skórze szyi i tułowia. U kłaczy źrebnych występują ronienia. Większość koni zdrowieje w okresie 1–2 tygodni.

Zmiany anatomopatologiczne

Stwierdza się zwiększoną ilość płynu w jamach ciała, zapalenie krwotoczne lub dyfteroidalne okrężnicy i jelita ślepego.

Diagnostyka

W diagnostyce stosuje się badanie histopatologiczne, izolację wirusa oraz testy SN, ELISA i RT-PCR.

Choroba podlega obowiązkowi rejestracji (znajduje się w załączniku nr 3 do ustawy o ochronie zdrowia zwierząt oraz zwalczaniu chorób zakaźnych zwierząt).

Gorączka Zachodniego Nilu (West Nile fever)

Etiologia

Zakażenie wywołują flawiwirusy, które należą do rodzaju *Flavivirus* w rodzinie *Flaviviridae*. Są to jednociowe RNA wirusy. U koni powodują one, poza Gorączką Zachodniego Nilu, także japońskie zapalenie mózgu typu B oraz wczesnoletnie zapalenie opon i mózgu. Gorączka Zachodniego Nilu jest chorobą wirusową przenoszoną przez krwiopijne owady kłujące (głównie gatunki komarów z rodzaju *Culex*).

Analiza filogenetyczna szczepów wirusa Zachodniego Nilu wykazała różnice pomiędzy szczepami z różnych rejonów świata. Wyróżnia się linię 1 – odpowiedzialną, za zachorowania z objawami nerwowymi u koni i ludzi w Europie i Ameryce i linię 2 – odpowiedzialną za przypadki występujące w Afryce Południowej, z reguły bez objawów klinicznych.

Objawy kliniczne

Główne objawy są następstwem zmian w ośrodkowym układzie nerwowym i nasuwają podejrzenie również innych jednostek chorobowych przebiegających z zakażeniem ośrodkowego układu nerwowego. Stwierdza się zmienione zachowanie, drżenie mięśni (m.in. drżenia głowy i szyi), płochliwość, wzmożone odruchy, brak reakcji na bodźce zewnętrzne, a także niezdolności, potykanie się, napady padaczkowe i porażenia.

Diagnostyka

Przyżyciowo zakażenie można wykryć za pomocą testów SN, HI lub ELISA. Pośmiertne potwierdzenie zakażenia uzyskuje się za pomocą immunohistochemii lub RT-PCR. Należy podkreślić, że istnieje ryzyko zakażenia się osoby, która bada próbki pochodzące z ośrodkowego układu nerwowego (8, 9).

Rodokokoza źrebiąt (*rhodococcus equorum*)

Etiologia

Rodokokozę źrebiąt wywołuje bakteria *Rhodococcus equi* (dawniej zwana *Corynebacterium equi*), należąca do rodziny No-cardiaceae. Pałeczka *Rhodococcus equi* jest zaliczana do flory przewodu pokarmowego i górnych dróg oddechowych. Chorują przede wszystkim konie.

Objawy kliniczne

U źrebiąt najczęściej dochodzi do ropno-ziarniniakowego zapalenie oskrzeli i płuc z tworzeniem się ropni i ropnymi zmianami w regionalnych węzłach chłonnych. Najczęściej obserwowanymi objawami klinicznymi jest duszność i przyspieszenie tętna. Źrebięta tracą apetyt i dochodzi do wypływu z nosa, początkowo surowiczego-słuzowego, później ropnego. Może także dojść do zapalenia stawów i biegunki. Źrebięta chorują zwykle w wieku od 2 do 5 miesięcy, a śmiertelność dochodzi nawet do 64%.

Zmiany anatomopatologiczne

Najczęściej obserwowane zmiany anatomopatologiczne to ropne zapalenie płuc i oskrzeli oraz obecność ropni w płucach i regionalnych węzłach chłonnych. Jeśli występowała biegunka, obserwowane mogą być również zmiany zapalne w przewodzie pokarmowym.

Diagnostyka

Potwierdzeniem rozpoznania klinicznego jest stwierdzenie obecności *Rhodococcus equi* w wydzielinie tchawiczo-oskrzelowej. Rozpoznanie opiera się głównie na badaniu bakteriologicznym i mikroskopowym (*Rhodococcus equi* jest bakterią Gram-dodatnią, pod mikroskopem wygląda jak kokopałeczka lub pałeczka).

W diagnostyce rodokokozy wykorzystywane są również testy ELISA, AGP, HI oraz PCR (10, 11, 12, 13, 14).

Piśmiennictwo

1. Kita J., Anusz K., Zaleska M.: Szczepienia koni. *Życie wet.* 2005, **80**, 625-630.
2. Morein B., Abusugra I., Blomqvist G.: Immunity of neonates. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2002, **87**, 207-213.
3. Minke J.M., Audonnet J.Ch., Fischer L.: Equine viral vaccines: the past, present and future. *Vet. Res.* 2004, **35**, 425-443.
4. Zimmerman K.L., Crisman M.V.: Diagnostic equine serology. *Vet. Clin. Equine* 2008, **24**, 311-334.
5. Szelezczuk P.: Monitoring serologiczny w stadach brojlerów kurzych. *Polskie Drobniarstwo* 2005, nr 2, 39-46.
6. Zbylut J., Malinowski E.: Sytuacja epizootyczna zakaźnego zapalenia macicy klaczy w wybranych ośrodkach hodowli koni w Polsce. *Med. Weter.* 2010, **66**, 559-561.
7. McGuire T.C., Leib S.R., Mealey R.H., Fraser D.G., Ridgely S.L., Prieur D.J.: Immune control of equine infectious anemia virus. In: *Havemeyer Foundation Monography Series No.4 Proceeding of a Workshop on equine immunology in 2001*. Ed: Lunn D.P., Wade J.F., 2001, s. 3-6.
8. Samorek-Salamonowicz E., Niczyporuk J.S.: Wirus Zachodniego Nilu oraz inne nowo pojawiające się zagrożenia zdrowia publicznego. *Post. Mikrobiol.* 2010, **49**, 187-190.
9. Samorek-Salamonowicz E., Niczyporuk J.S., Wijaszka T.: Wirus Zachodniego Nilu – zagrożenie dla zdrowia publicznego. *Med. Weter.* 2008, **64**, 1368-1370.
10. Giguere S., Cohen N.D., Keith Chaffin M., Hines S.A., Hondalus M.K., Prescott J.F., Slovis N.M.: Rhodococcus equi: clinical manifestations, virulence, and immunity. *J. Vet. Intern. Med.* 2011, **25**, 1221-1230.
11. Giguere S., Cohen N.D., Keith Chaffin M., Slovis N.M., Hondalus M.K., Hines S.A., Prescott J.F.: Diagnosis, treatment, control, and prevention of infections caused by Rhodococcus equi in foals. *J. Vet. Intern. Med.* 2011, **25**, 1209-1220.
12. Muscatello G.: Rhodococcus equi pneumonia in the foal – Part 1: Pathogenesis and epidemiology. *Vet. J.* 2012, **192**, 20-26.
13. Muscatello G.: Rhodococcus equi pneumonia in the foal – Part 2: Diagnostics, treatment and disease management. *Vet. J.* 2012, **192**, 27-33.
14. Witkowski L., Kaba J., Rzewuska M., Kita J.: Możliwości zapobiegania rodokokozy źrebiąt. *Życie wet.* 2008, **83**, 365-370.
15. Zaleska M., Anusz K., Kita J.: Testy HI, ELISA, SRH i odporności komórkowej w ocenie szczepień przeciw grypie koni. *Med. Weter.* 1996, **52**, 769-772.