

ANDRZEJ KONCICKI, IRENA JANOWSKA

Wstępne wyniki badań nad odpornością nabytą biernie u indycząt przeciw pomorowi rzekomemu drobiu

Zakład Chorób Drobiu Katedry Epizootiologii Wydziału Weterynaryjnego AR-T,
10-957 Olsztyn-Kortowo, bl. 105

Bardzo ważnym czynnikiem, który należy uwzględnić przy szczepieniu ptaków młodych przeciw rzekomemu pomorowi drobiu, jest obecność w ich organizmie przeciwciał swoistych, przekazywanych przez nioski za pośrednictwem żółtka jaj. Wielu autorów donosi o hamującym wpływie tych przeciwciał na wytwarzanie odporności czynnej zarówno u kurcząt (1, 3, 6, 8, 23, 26, 27, 31, 32), jak i u indycząt (5, 7, 10, 11). Zjawisko to ma duże praktyczne znaczenie, ponieważ zazwyczaj istnieje potrzeba zabezpieczenia piskląt przez stosowanie szczepionek już w pierwszych dniach ich życia.

Poglądy na temat stopnia i czasu trwania odporności biernej u piskląt, a także jej wpływu na wprowadzoną w tym czasie szczepionkę są podzielone. Allan (2) podaje, że po aerozolowym zakażeniu kontrolnym działanie ochronne przeciwciał matczynych jest wysokie przez 8 dni po wykluciu, a po tym okresie śmiertelność jest wyższa niż u ptaków szczepionych. Po około 3 tygodniach ochronne działanie tych przeciwciał wygasa całkowicie. Inni autorzy (21) twierdzą, że odporność bierna zanika całkowicie około 25 dnia, natomiast odporność na zakażenie kontrolne około 15 dnia życia. Z badań Finatova i Artemičeva (16) wynika, że dopiero około 18—20 dnia życia przeciwciała matczyne nie mają wpływu na wytwarzanie odporności czynnej. Natomiast Landgraf i Vielitz (23) podają, że przeciwciała matczyne mają wpływ na powstawanie odporności u kurcząt szczepionych szczepem LaSota — pomimo, że w dużym stopniu ochraniały je przed zakażeniem kontrolnym przez kontakt z ptakami chorymi.

Celem pracy było zbadanie wpływu szczepień stada reprodukcyjnego indyczek na poziom i czas trwania odporności nabytej biernie u potomstwa oraz porównanie poziomu przeciwciał HI w żółtku jaj z poziomem tych przeciwciał w surowicy krwi niosek i piskląt.

Materiał i metody

Zwierzęta doświadczalne. Indyki stada podstawowego rasy białej szerokopierśnej importowane z Kanady z firmy Hybrid (H), ze Stanów Zjednoczonych z firmy Orlopp (O) oraz z Wielkiej Brytanii z firmy B.U.T. (B). Indyki uodporniano szczepionką „L”, a następnie okresowo oznaczano poziom przeciwciał HI i SN w ich surowicy (19).

248 piskląt indyckich uzyskanych z wylęgu jaj pochodzących od indyków stada podstawowego wyżej wymienionych trzech grup doświadczalnych. Do badań użyto po 30 piskląt w grupie z pierwszego i trzeciego miesiąca nieśności stada podstawowego. Nato-

miast z piątego miesiąca nieśności użyto 30 indycząt z grupy H, 20 z grupy B i 18 piskląt z grupy O.

Wirus. Mezogeniczny szczep Roakin, którego miano ELD₅₀ dla zarodków kurzych wynosiło 10^{-10,2}/ml, miano zaś hemaglutynacyjne — 1:640. Szczep ten używany był do wykonywania odczynów serologicznych.

Zarodki kurze. Do odczynu seroneutralizacji (SN) używano 10—11-dniowych zarodków kurzych pochodzących ze stada kur szczepionego przeciw pomorowi rzekomemu drobiu, u których nie stwierdzono chorób zakaźnych. Na każde rozcieńczenie surowicy używano po 3 zarodki, które zakażano do jamy owodniowo-omoczniowej.

Jaja indyckie. 30 jaj indyckich (po 10 z każdej grupy ptaków stada podstawowego), które służyły do określenia poziomu przeciwciał HI w żółtku. Żółtka jaj umieszczano w kolbach miarowych i zalewano zbuforowanym roztworem soli fizjologicznej (P.B.S.) w stosunku objętościowym 1:5. Następnie zawartość dokładnie mieszano przez wytrząsanie w ciągu 5 minut stosując do tego celu wytrząsarkę uniwersalną. Z kolbek odlewano do probówek jednakowe ilości zawiesiny żółtek i odwirowywano przez 15 minut przy 3 tys. obr./min. Do oznaczania poziomu przeciwciał HI pobierano lekko mętny supernatant.

Surowice i odczyny serologiczne. Do badań poziomu przeciwciał nabytych biernie krew pobierano z żyły jarzmowej (do zupełnego skrwawienia) w 2, 14 i 21 dniu życia indycząt, każdorazowo od 3—7 ptaków z grupy. Uzyskaną surowicę przed użyciem do badań inaktywowano przez 30 min. w temp. 56°C.

Odczyny serologiczne wykonywano wg metod używanych powszechnie w laboratoriach wirusologicznych; hemaglutynację (Ha) i hamowanie hemaglutynacji (HI) z 2 jaj. Ha metodą beta wg Beacha (4); odczyn seroneutralizacji (SN) sposobem beta na zarodkach kurzych stosując wzrastające rozcieńczenia surowicy i stałą dawkę wirusa — 100 ELD₅₀ (25).

Opracowanie wyników. Uzyskane wyniki obliczano metodą Reeda i Muencha (30) i przedstawiono w postaci średnich geometrycznych wartości.

Wyniki i omówienie

Wyniki badań nad określeniem poziomu i czasu trwania odporności biernej u potomstwa indyków uodpornianych szczepionką „L” przedstawiono w tab. 1.

Najwyższą średnią geometryczną mian przeciwciał HI i SN stwierdzono w surowicy piskląt wyklutych z jaj pierwszego miesiąca nieśności, a najniższą z piątego. Średnia geometryczna mian przeciwciał HI u piskląt w 2 dniu życia, wyklutych z jaj pochodzących z pierwszego miesiąca nieśności wahała się od 26,4 (grupa H) do 91,9 (grupa O) i była zbliżona do poziomu mian tych przeciwciał w surowicy niosek. Natomiast w surowicy piskląt wyklutych z jaj trzeciego i piątego miesiąca nieśności poziom przeciwciał nabytych biernie był niższy od stwierdzonego w surowicy niosek, pomimo wykonywania kolejnych szczepień stada pod-

Tab. 1. Poziom przeciwciał nabytych biernie u potomstwa indyków uodpornianych

Grupa	Wiek w dniach	Średnie geometryczne mian przeciwciał					
		a *		b *		c *	
		HI	SN	HI	SN	HI	SN
Hybrid	2	26,4 ** (20,0-80,0)	21,1 (8,0-32,0)	22,0 (5,0-40,0)	32,0 (4,0-128,0)	16,7 (0,0-160,0)	14,7 (8,0-16,0)
	14	5,5 (0,0-20,0)	3,0 (0,0-16,0)	2,5 (0,0-10,0)	2,0 (0,0-8,0)	2,2 (0,0-5,0)	1,7 (0,0-4,0)
	21	0	0	0	0	0	0
Orlopp	2	91,9 (40,0-160,0)	24,3 (8,0-64,0)	36,9 (20,0-80,0)	15,2 (8,0-16,0)	13,9 (10,0-40,0)	12,5 (8,0-16,0)
	14	2,6 (0,0-5,0)	3,5 (0,0-8,0)	1,9 (0,0-5,0)	2,6 (0,0-8,0)	2,6 (0,0-5,0)	2,3 (0,0-4,0)
	21	0	0	0	0	0	0
B.U.T.	2	60,6 (20,0-160,0)	42,2 (8,0-128,0)	27,5 (10,0-60,0)	17,4 (8,0-128,0)	15,2 (10,0-20,0)	19,0 (16,0-32,0)
	14	11,5 (5,0-20,0)	6,9 (4,0-32,0)	5,5 (0,0-20,0)	3,4 (0,0-8,0)	2,2 (0,0-5,0)	2,8 (0,0-8,0)
	21	0	0	0	0	0	0

Objaśnienia: * — potomstwa wylęgane z jaj indyckich; a — stada podstawowego, ** — średni wynik uzyskany od 3-7 krańcowych, 0 — brak przeciwciał.

pierwszego, b — trzeciego i c — piątego miesiąca nieśności indyczek; liczby w nawiasach oznaczają rozrzut wyników

stawowego. Poziom tych przeciwciał u piskląt wyklutych z jaj piątego miesiąca nieśności wahał się od 13,9 (grupa O) do 16,7 (grupa H). Stwierdzono również, że badane przeciwciała nabyte biernie osiągały w surowicy indyczek najwyższy poziom w pierwszych dniach życia, a następnie następował gwałtowny ich spadek — tak, że w 21 dniu życia ptaków nie wykazano już tych przeciwciał w ich surowicy.

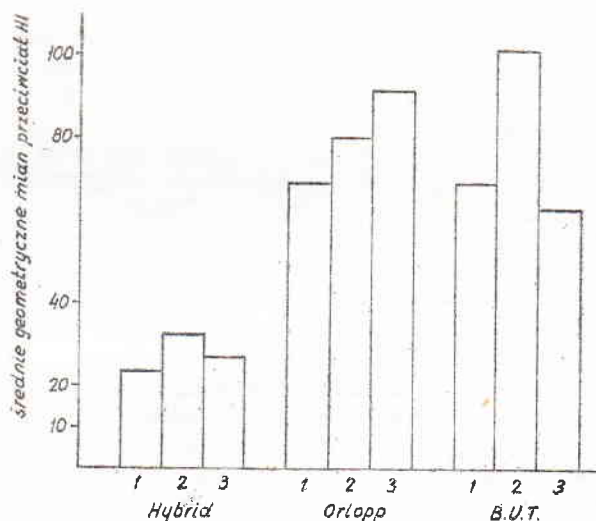
W dostępnym piśmiennictwie nie znaleziono danych dotyczących dynamiki zanikania tych przeciwciał w surowicy indyczek. Jedynie Janowska i wsp. (17) wykazali, że 7-dniowe indyczęta posiadały w surowicy biernie przekazywane przeciwciała HI i SN w stosunkowo niskich mianach. Pomimo to ptaki te były odporne na zakażenie wirusem zjadliwym. Przeciwciała te wywierały działanie hamujące na namnażanie się wirusa szczepionkowego, co powodowało słabszą odporność szczepionych ptaków. Natomiast Box i wsp. (8) badając próbki krwi jednodniowych piskląt indyckich wykazali, że w ich surowicy nie wykrywano lub stwierdzano tylko bardzo niski (1:5) poziom przeciwciał HI. Mogło to być związane z tym, że odporność bierna u ptaków przekazywana jest z żółtka na zarodek w czasie inkubacji jaj lęgowych oraz później — do 5 dnia po wykluciu piskląt (cyt. 24).

Biorąc pod uwagę podobne badania wykonane na kurczętach (15, 24) można stwierdzić, że i u indyczek poziom przeciwciał oraz czas ich utrzymywania się zależy od stopnia odporności niosek.

Kaletka (18) stwierdzał najwyższe miano przeciwciał matczynek HI i SN w surowicy kurcząt w 3 do 3,5 dni po wykluciu. Po tym okresie następował gwałtowny spadek mian, a po 3

tygodniu życia poziom tych przeciwciał był nieznaczny. Podobne wyniki uzyskali Durišić i wsp. (15). Mając na uwadze czas utrzymywania się przeciwciał nabytych biernie można przyjąć, że szczepienia indyczek w naszych warunkach powinny być rozpoczynane nie wcześniej niż ok. 14 dnia życia, gdyż będą wówczas bardziej skuteczne.

Ocenę skuteczności szczepień — oprócz określania poziomu przeciwciał HI i SN w surowicy szczepionych indyków (19) — oparto również na oznaczaniu poziomu przeciwciał HI w żółtku



Ryc. 1. Średnie geometryczne mian przeciwciał HI w surowicy indyczek, w żółtku jaj oraz w surowicy indyczek wyklutych z jaj pierwszego miesiąca nieśności

Objaśnienia: 1 — średnie geometryczne mian przeciwciał HI w surowicy indyczek, 2 — średnie geometryczne mian przeciwciał HI w żółtku jaj, 3 — średnie geometryczne mian przeciwciał HI w surowicy 2-dniowych indyczek.

jaj. Wyniki ilustruje ryc. 1, uwzględniając dla porównania średnią geometryczną mian przeciwciał HI w surowicy indyczek i poziom przeciwciał matczynych w surowicy 2-dniowych indyczek, wyklutych z jaj pierwszego miesiąca nieszności.

Średnia geometryczna mian przeciwciał HI w żółtku jaj we wszystkich badanych grupach była nieco wyższa od średniej geometrycznej mian tych przeciwciał w surowicy niosek. Natomiast średnia geometryczna mian przeciwciał HI w surowicy piskląt grup H i B była niższa od stwierdzonej w żółtku jaj, a wielkości te były zbliżone do średniej geometrycznej mian przeciwciał HI w surowicy niosek. W grupie O natomiast stwierdzony poziom przeciwciał matczynych był wyższy od średniej geometrycznej mian przeciwciał HI w żółtku jaj i surowicy indyczek.

Brandley i wsp. (cyt. 22) podają, że określając poziom przeciwciał w żółtku jaj można tak samo ocenić stan odporności stada przeciw chorobie Newcastle, jak przez oznaczanie poziomu przeciwciał w surowicy. Przeciwciała wytwarzane w organizmie nioski dostają się bowiem z surowicy do żółtka jaj, a następnie w okresie inkubacji jaj lęgowych — do rozwijającego się zarodka (20, 34). Patterson i wsp. (29) wstrzykując nioskom kurzym znakowaną immunoglobulinę wykazali, że przeciwciała te osiągają maksymalny poziom w żółtkach jaj badanych kilka dni po osiągnięciu szczytowego poziomu w surowicy niosek. Również Szemberowa (33) wykazała, że wyraźny wzrost poziomu przeciwciał w żółtku jaj następuje po 10 dniach od szczepienia kur, a najwyższy ich poziom autorka stwierdzała po 3 miesiącach.

W dostępnym piśmiennictwie światowym brak jest danych na temat określania i znaczenia poziomu przeciwciał w żółtku jaj niosek indycznych dla oceny stanu odporności przeciw rzekomemu pomorowi drobiu. Pakota i Klein (28), wykonując test HI z żółtkiem jaj kur niosek, wykazali zadowalające miana, które skutecznie zabezpieczały ptaki przed zakażeniem kontrolnym. Z badań Dorna i Wesslinga (13) wynika, że w większości badanych jaj — pochodzących ze stada kur uodpornionego szczepami lentogenicznymi, podawanymi z wodą do picia — poziom przeciwciał HI wahał się w granicach od 1:80 do 1:160.

Podobnie jak w badaniach własnych u indyków, również Danchev i Arnaudov (12) oraz Dorn i wsp. (14) stwierdzili wyższy poziom przeciwciał HI w żółtku jaj, niż w surowicy kur. Natomiast Chruściel (cyt. 33) wykazał, że miana przeciwciał HI w jajach pokrywały się z poziomem mian tych przeciwciał w surowicy kur niosek w 32%, 68% jaj miało miana nieco niższe, a tylko w 2 przypadkach na 28 zbadanych, miana w jajach były wyższe niż w surowicy kur szczepionych przeciw chorobie Newcastle.

Wnioski

1. Odporność bierna nabywana przez potomstwo pochodzące od indyków szczepionych — mierzona poziomem przeciwciał HI i SN — trwa do ok. 14 dnia życia indyczek.

2. Stan odporności stada przeciw pomorowi rzekomemu drobiu można ocenić przez określenie poziomu przeciwciał HI w żółtku jaj.

Piśmiennictwo

1. Allan W. H.: Agriculture 79, 413, 1972.
2. Allan W. H.: Vet. Rec. 93, 643, 1973.
3. Balla L., Papocsi L., Szurup I., Torn B.: Acta Vet. Acad. Scient. Hung. 26, 235, 1976.
4. Beach J. R.: J. Am. Vet. Med. Ass. 112, 35, 1948.
5. Bengelsdorff H. J.: Dt. tierärztl. Wschr. 81, 101, 1974.
6. Benson H. N., Wenger D. R., Beard P. D.: Avian Dis. 19, 558, 1975.
7. Boney W. A., Stone H. D., Gillette K. G., Coria M. F.: Avian Dis. 19, 19, 1975.
8. Borzemska W., Gołnik W.: Medycyna Wet. 25, 418, 1969.
9. Box P. G., Hellawell B. L., Hellawell P. H.: Vet. Rec. 89, 524, 1970.
10. Box P. G., Furninger I. G. S., Robertson W. W., Warden D.: Avian Path. 5, 307, 1976.
11. Box P. G., Robertson W. W., Warden D.: Vet. Rec. 102, 10, 1978.
12. Danchev P., Arnaudov H.: VetMed. Nauki, Sof. 11, 48, 1974.
13. Dorn P., Wessling E.: Dt. tierärztl. Wschr. 80, 571, 1973.
14. Dorn P., Seidl H., Wessling E.: Berl. Münch. tierärztl. Wschr. 86, 348, 1973.
15. Duršić S., Kosovac A., Velhner M., Višacki M.: Vet. Glasu. 27, 881, 1973.
16. Finatov V. E., Artemičev M. A.: Veterinarija, Moskva 8, 94, 1973.
17. Janowska I., Rotkiewicz Z., Krasnodębska-Depta A.: Nowosci Wet. 9, 47, 1979.
18. Kaleta E. F.: Dt. tierärztl. Wschr. 79, 184, 1972.
19. Konicki A., Janowska I.: Medycyna Wet. 39, 394, 1983.
20. Kramer T. T.: Avian Dis. 17, 208, 1973.
21. Kudrjavcev F. S., Cistova Z. Ja., Sjurin V. N.: Veterinarija, Moskva 42, 39, 1968.
22. Lancaster J. E.: Newcastle disease a review of some of the literature published between 1926 and 1964. — Monograph no 3, Health of Animals Branch, Canada Dep. Agric., Ottawa 1964.
23. Landgraf H., Vieltz E.: Dt. tierärztl. Wschr. 79, 493, 1972.
24. Larski Z.: Wirusologia weterynaryjna — PWRiL, Warszawa 1975.
25. Larski Z.: Diagnostyka wirusologiczna chorób zwierząt — PWRiL, Warszawa 1977.
26. Marek K., Raszevska H., Borzemska W.: Medycyna Wet. 17, 577, 1961.
27. Minta Z.: Uodpornianie kurcząt rzeźnych przeciwko rzekomemu pomorowi drobiu (ND) przez rozpylanie szczepionki „L”. Praca dokt., Puławy 1980.
28. Pakota R., Klein F. W.: Berl. Münch. tierärztl. Wschr. 88, 24, 1975.
29. Patterson R., Younger J. S., Weigle W. O., Dixon F. J.: J. Immunol. 89, 272, 1969.
30. Reed L. J., Muench H.: Am. J. Hyg. 27, 493, 1938.
31. Schulze-Rehm G., Monreal G., Kraft V.: Zentbl. VetMed. B, 21, 489, 1974.
32. Stone H. D., Boney W. A., Coria M. F.: Avian Dis. 19, 651, 1975.
33. Szember M.: Medycyna Wet. 29, 83, 1973.
34. Williams J.: Biochem. J. 83, 346, 1962.

Adres autora: dr Andrzej Konicki, ul. Barcza 17 m. 23, 10-685 Olsztyn

Кондицкий А., Яновская И. — Вступительные результаты исследований иммунитета, приобретенного пассивно индошатами, против ложной чумы домашней птицы

Исследования провели на индошагах, полученных из выпулывания яиц от индеек основного стада, импортированных из Канады, США и Великобритании. В работе определили влияние вакцинаций основного стада вакциной „L”, вводимой с питьевой водой на уровень и продолжительность иммунитета, пассивно приобретенного потомством, а также сравнили уровень противотел HI в желтке яиц с уровнем противотел в сыворотке крови несущек и птенцов.

В исследованиях показали, что пассивный иммунитет, приобретаемый потомством вакцинированных индеек, измеряемый уровнем противотел HI и SN, продолжается до ок. 14 дня жизни индошат.

Отметили также, что иммунитет стада индеек против ложной чумы птиц можно оценить через определение уровня противотел HI в желтке яиц.

Koncicki A., Janowska I. — **Preliminary results of examinations on the passive immunity in young turkeys against Newcastle disease**

The examinations were carried out on young turkeys obtained from eggs of the flock formed as a result of import from Canada, USA and Great Britain.

The influence of vaccination of the flock with the vaccine „L” given with drinking water on the level and the period of passive immunity was determined in the offspring. Besides, the level of HI antibodies in the yolk was compared with its concentration in the sera of laying hens and chickens. It was found that the passive immunity in offsprings derived from turkeys vaccinated, measured by means of HI and SN, lasted approx. 14 days in young turkeys. In addition, it was noted that the state of immunity against ND might be determined on the basis of the level of HI in the yolk.

JERZY MOLENDĄ, ANDRZEJ ZALESIŃSKI

Użyteczność odczynu MRHA w ocenie chorobotwórczości pałeczek okrężnicy wyosobnionych od prosiąt z kolibakteriozą

Zakład Higieny Weterynaryjnej, ul. Rodakowskiego 6, 50-966 Wrocław

O możliwościach patogennego oddziaływania enterotoksycznych szczepów *Escherichia coli* na błonę śluzową przewodu pokarmowego decydują przede wszystkim dwie ich właściwości: zdolność kolonizacji błony śluzowej jelit oraz wytwarzanie enterotoksyn (12). Czynniki umożliwiającymi adhezję komórek bakteryjnych do enterocytów są występujące u enterotoksycznych pałeczek okrężnicy tzw. „fimbrie swoiste”, na których zlokalizowane są takie antygeny adhezyjne jak: K99, 987P, CFA I, CFA II, F41 oraz najbardziej powszechny K88. Antygeny te posiadają ugrupowania receptorowe wchodzące w połączenia z komplementarnymi receptorami mikrorzęsek rąbka szczoteczki komórek nabłonka jelitowego (9, 10). Takie „umocowanie” bakterii do enterocytów umożliwia im kolonizację błony śluzowej oraz zapewnia odpowiednio bliski kontakt, niezbędny dla resorpcji cząsteczek enterotoksyn przez komórki nabłonkowe (7, 9). Są więc adhezyjne markery choroby i stwierdzenie ich obecności u badanych szczepów jest istotnym momentem diagnostycznym (12). W tym celu, między innymi, wykorzystywana jest wspólna fimbriom swoistą właściwość aglutynowania erytrocytów człowieka i różnych gatunków zwierząt, która nie ulega zahamowaniu w środowisku d-mannozy (4, 6).

Celem przedstawionych badań było określenie przydatności odczynu hemaglutynacji erytrocytów różnych gatunków zwierząt zachodzącej w obecności d-mannozy (mannose resistant haemagglutination — MRHA) do wykrywania antygenów adhezyjnych u pałeczek okrężnicy wyosobnionych od prosiąt z kolibakteriozą. Obecność tych antygenów charakteryzuje szczepy uważane za czynnik etiologiczny jelitowej postaci kolibakteriozy i odróżnia je od pałeczek okrężnicy powodujących chorobę obrzękową oraz od szczepów niepatogennych.

Materiał i metody

Szczepy *E. coli*. Ogółem zbadano 263 szczepy. Pierwszą grupę tworzyło 177 beta-hemolitycznych szczepów wyosobnionych od prosiąt w wieku od 3 dni do 8 tygodni, które padły na żołądkowo-jelitową postać kolibakteriozy. U większości z nich (165) stwierdzono antygen K88, natomiast u pozostałych (12) antygen 987P. W 10 przypadkach poza antygenami adhezyjnymi, niemożliwe było przy pomocy posiadanych surowic diagnostycznych określenie wzorów antygenowych badanych szczepów. Druga grupa obejmowała 45 szczepów beta-hemolitycznych *E. coli*, wyosobnionych z przypadków choroby obrzękowej, należących do serotypów powszechnie uznawanych za czynniki etiologiczne tej choroby. Trzecia grupa natomiast to 39 izolacji niehemolitycznych pałeczek okrężnicy wyosobnionych z kału prosiąt zdrowych, których wzory antygenowe, podobnie jak niektórych szczepów z grup poprzednich, zostały oznaczone w Międzynarodowym Ośrodku *Escherichia* i *Klebsiella* w Kopenhadze. Ponadto zbadano 2 szczepy laboratoryjne, otrzymane ze wspomnianego ośrodka. Były to rekombinanty, którym wszczepiono plazmidy determinujące wytwarzanie antygenów K88 i K99.

Wykonanie odczynu MRHA. Odczyn wykonywano z erytrocytami konia, krowy, owcy, świni i świnki morskiej. Pobraną aseptycznie, odwłóknioną krew przemycano dwukrotnie buforowanym płynem fizjologicznym (PBS, pH 7,4), a następnie zawieszano w płynie Alsevera i przechowywano w temp. 4°C. Do badań używano 3% zawiesiny erytrocytów, przygotowywanej bezpośrednio przed użyciem. W tym celu przemyte erytrocyty doprowadzano do 10% gęstości, standaryzując zawiesinę kolorymetrycznie (0,5 ml przygotowanej zawiesiny + 14,5 ml 0,1% Na₂CO₃ w warstwie 10 mm przy 541 nm Specol, ekstynkcyjność = 0,7). Otrzymaną 10% zawiesinę rozcieńczano PBS do 3% koncentracji.

Szczepy *E. coli* hodowano przez 24 godziny w temp. 37°C na podłożu agarowym z 5% dodatkiem krwi owczej, zmywano 5 ml PBS, wirowano (2000 × g, przez 20 min) i zawieszano osad w PBS zawierającym 1% d-mannozy (Merck), przygotowując zawiesinę o gęstości 3 × 10⁸ bakterii w 1 ml.

Odczyn wykonywano na płytkach metapleksowych (Microtiter OX 603, Labor Mini, Budapeszt). Z zawiesin szczepów bakteryjnych sporządzano seryjne rozcieńczenia w PBS z 1% dodatkiem d-mannozy w objętościach 0,025 ml. Do kolejnych serii rozcieńczeń