

Ana Kotnik¹Splenektomija in imunski odziv²*Splenectomy and the Immune Response²*

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: splenektomija, pnevmokokne infekcije-preprečevanje in nadzor

Izhodišča. Pri hudih poškodbah vranice z močno krvavitvijo lahko poškodovančevo življenje rešimo s splenektomijo. Po odstranitvi vranice je odpornost operirancev za okužbo zmanjšana. Najpogostejša je okužba s pnevmokoki. Zato moramo operirance primerno zaščititi. Najprimernejši način je preventivno cepljenje s 23-valentnim pnevmokoknim cepivom. Zanimalo nas je, ob katerem času ima cepljenje največji učinek. Proučevali smo naslednje možnosti: cepljenje tik pred splenektomijo, cepljenje en dan po splenektomiji in cepljenje sedem dni po splenektomiji, ko si je bolnik že opomogel po operaciji. Naša hipoteza je bila, da je najustreznejše cepljenje tik pred ali takoj po splenektomiji.

Metode. Prospektivno raziskavo smo izvedli na tridesetih miškah, razdeljenih v šest skupin. Operacijsko smo jim odstranili vranico in jih cepili ob različnih časih. Prvi skupini mišk vranice nismo odstranili, cepili pa smo jih s pnevmokoknim cepivom. Drugo skupino smo cepili tik pred splenektomijo, tretjo skupino 1 dan po splenektomiji in četrto skupino 7 dni po operaciji. Peti skupini smo odstranili vranico, ne da bi jih cepili. Šesta skupina so bile zdrave, necepljene miške. Med poskusom smo miškam štirikrat odvzeli vzorce krvi. Z encimsko-immunskim testom smo opazovali spreminjanje množine za *Streptococcus pneumoniae* specifičnih protiteles razredov IgM in IgG. Z metodo mikroprecipitacije v kapilari smo izmerili množino precipitacijskih za pnevmokoke specifičnih protiteles v njihovem krvnem serumu. Poskus smo zaključili z nadzorovano okužbo mišk s pnevmokoki.

Rezultati. Množina IgG, IgM in precipitacijskih protiteles je bila pri vseh odvzemih največja pri skupini mišk, ki so bile imunizirane, ne pa splenektomirane (skupina 1). V primerjavi te skupine mišk in vseh ostalih skupin smo našli statistično značilno razliko ($p < 0,05$). Od splenektomiranih mišk so največjo množino specifičnih protiteles sintetizirale miške, ki so bile imunizirane 1 dan po splenektomiji (skupina 3). Vendar med to skupino in skupino mišk imuniziranih tik pred splenektomijo (skupina 2), nismo našli statistično značilne razlike ($p > 0,05$). Najmanjšo množino specifičnih protiteles med imuniziranimi miškami so proizvedle miške, imunizirane 7 dni po splenektomiji (skupina 4). Med skupino 4 in ostalimi skupinami imuniziranih mišk smo našli statistično značilno razliko ($p < 0,05$). Podobne rezultate smo dobili tudi po nadzorovani okužbi mišk s pnevmokoki. Štiri od petih mišk so poginile v skupini zdravih mišk (skupina 6) in v skupini splenektomiranih mišk, imuniziranih 7 dni po operaciji. Nobena miška pa ni poginila v skupini imuniziranih nesplenektomiranih mišk in v skupini splenektomiranih mišk, imuniziranih tik pred splenektomijo. Navkljub veliki množini specifičnih protiteles sta v skupini splenektomiranih mišk, imuniziranih 1 dan po splenektomiji, umrli dve od petih mišk.

Zaključki. Na osnovi naših rezultatov lahko potrdimo, da imunizacija sproži sintezo specifičnih protiteles. Splenektomija zmanjša zmožnost sinteze specifičnih protiteles, zmanjšanje pa je odvisno od časa med splenektomijo in imunizacijo. Največja zmožnost sinteze se ohrani pri operiranih miškah, ki jih imuniziramo tik pred ali 1 dan po posegu. Rezultati potrjujejo našo hipotezo, da je cepljenje s pnevmokoknim cepivom najučinkovitejše, če živali cepimo tik pred ali takoj po splenektomiji.

¹ Ana Kotnik, štud. med., Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Korytkova 2, 1000 Ljubljana.² Delo je bilo nagrajeno s Prešernovim priznanjem študentom za leto 2000.

ABSTRACT

KEY WORDS: splenectomy, pneumococcal infections-prevention and control

Backgrounds. Severe trauma of the spleen can be followed by excessive internal bleeding. The life of the injured person can be saved only with splenectomy. Removal of the spleen reduces resistance of the patient to infections, most frequently those caused by pneumococci. The most effective way of protecting these patients is vaccination with a 23-valent pneumococcal vaccine. The aim of our research was to establish at what time after splenectomy vaccination is most effective. Different possibilities were studied: vaccination just before splenectomy, vaccination one day after and seven days after splenectomy. Our hypothesis was that vaccination just before splenectomy has the best protective effect from infection.

Methods. The prospective study was carried out on thirty mice divided into six groups. Their spleens were surgically removed and they were vaccinated at different times before or after the operation. The first group was vaccinated, without splenectomy. The second group was vaccinated just before splenectomy, the third group 1 day after and the fourth group 7 days after surgery. The fifth group had their spleens removed without vaccination. The sixth group consisted of healthy, unvaccinated mice. During the study, the mice had their blood drawn four times. With an enzyme-linked immunosorbent assay, the changing of the amount of specific IgM and IgG antibodies directed against pneumococcal antigens was measured. The amount of precipitating antibodies in the blood serum of mice was measured with a micro-precipitation capillary test. The study was concluded with a supervised infection of mice with live pneumococci.

Results. The amount of IgG, IgM and precipitating antibodies was at all times highest in the group of immunized unsplenectomized mice (group 1). A statistically significant difference was found between this and all other groups ($p < 0.05$). Between the splenectomized groups of mice, mice immunized 1 day after splenectomy (group 3) produced the highest amount of specific antibodies against *Streptococcus pneumoniae*. However there was no statistically significant difference found between group 3 and the group of mice immunized just before splenectomy (group 2) ($p > 0.05$). The lowest amount of specific antibodies was produced in the group of mice immunized 7 days after splenectomy (group 4). There was a statistically significant difference found between group 4 and other groups of immunized mice ($p < 0.05$). Similar results were obtained after a supervised infection of mice with live pneumococci. Four out of five mice died in the group of healthy mice (group 6) and in group 4. No mice died in the groups of only vaccinated mice and mice vaccinated just before splenectomy. In spite of the high quantity of specific antibodies in the group of mice vaccinated 1 day after splenectomy, two out of five mice died.

Conclusion. We conclude that vaccination with a pneumococcal vaccine triggers synthesis of specific antibodies. Splenectomy lowers the ability of this synthesis. The lowering depends on the time between splenectomy and vaccination. The highest ability of synthesis of specific antibodies was in operated mice vaccinated just before and 1 day after surgery. Our results confirm the hypothesis that vaccination with a pneumococcal vaccine is most effective if mice are vaccinated just before or very soon after splenectomy.

UVOD**Poškodbe vranice**

Vranica je najpogosteje poškodovani trebušni organ (1). Poškodbe so dveh vrst. Ostre poškodbe nastanejo po vbodu z ostrim predmetom

ali po strelni rani v predelu levega hipohondrija. Tope poškodbe so posledica udarca ali padca na levo stran prsnega koša (1). Večina topih poškodb je posledica prometnih nesreč. Zanje je značilno, da je pogosto poškodovanih hkrati več organov. Takrat govorimo o politravmi (1).

Vranica je lahko poškodovana na različne načine. Lahko je zatrgana vranična ovojnica ali pa so prisotne različno globoke raztrgane vranice. Lahko so zmečkani le njeni deli ali pa je vranica v celoti zdrobljena. Pri poškodbah vranice pride do močne krvavitve. To se zgodi predvsem takrat, ko je poškodovan hilus z vranično arterijo in veno. Včasih krvavitev iz manj poškodovane vranice preneha sama po sebi (1).

Danes je zdravljenje poškodb vranice diferencialno. Pri hemodinamsko stabilnem bolniku poskusijo s konzervativnim zdravljenjem ob stalnem nadzoru v enoti intenzivne nege. Ob znakih, da se krvavitev ne ustavlja je potrebna operacija. Operacijsko zdravljenje je lahko ohranitveno (zlasti pri otrocih) ali pa radikalno. Kadar je poškodba prehuda, je nujna odstranitev vranice z operacijskim posegom, imenovanim splenektomija.

Organi, pomembni za razvoj imunskega odziva

Ustrezen imunski odziv nastane, če se v limfatičnih organih učinkovito srečajo imunske celice in antigeni. Primarni limfatični organi so organi, v katerih limfociti zorijo, da bi postali zmožni reagirati s specifičnimi antigeni. Organi, v katerih se naselijo imunsko zmožni limfociti, da bi se ob antigenem draženju preoblikovali iz malih limfocitov v imunoblaste, so sekundarni limfatični organi (2).

Osrednja limfatična organa sta priželjc, v katerem zorijo limfociti T, in Fabrizijeva burza ptic, v kateri zorijo limfociti B. Pri človeku je Fabrizijevi burzi verjetno analogen organ kostni mozeg (2).

Periferni limfatični organi so tonzile, bezgavke, vranica in Peyerjevi poloji v tankem črevesju (2).

Vranica

Vranica (gr. *splen*) je soliden trebušni organ. Leži v levem subfreničnem prostoru v višini od IX. do XI. rebra, med želodcem in steno prsnega koša. Po obliki spominja na kavino zrno. Je temno rjave barve. Dolga je 12 cm, široka 8 cm in debela 3–4 cm. V povprečju tehtata 170 gramov. Čeprav je skrita za rebri, se pogosto poškoduje (1).

Vranica ima več pomembnih vlog. V drugi polovici embrionalnega obdobja nastajajo v njej krvne celice. Potencialna hemopoetska sposobnost ostane vranici tudi v človekovem odraslem življenju (2). Do neke mere skladišči kri in železo in je soudeležena pri nastajanju bilirubina. Vranica je organ, v katerem poteka uničenje starih eritrocitov, trombocitov in levkocitov (1).

V človekovi imunski obrambi ima vranica tri specifične vloge. To so: fagocitoza bakterij in tujih delcev, sinteza protiteles in aktivacija alternativne poti komplementnega sistema. Vse tri so izjemnega pomena pri preprečevanju nastanka bakterijske sepse, povzročene z inkapsuliranimi bakterijami, predvsem pnevmokoki (3, 4).

Vranica lahko opravlja našteje vloge zaradi svoje specifične zgradbe. Zgrajena je iz več ločenih, a anatomsko povezanih sestavnih delov. Bela pulpa vsebuje germinativne centre, v katerih so spravljene limfociti, plazmatke in makrofagi. Najdemo jih okrog centralne arterije. Rdeča pulpa predstavlja večino organa. V njej so Billrothovi endotelijski poveзки, ki segajo interdigitalno med vranične sinusoidne. V rdeči pulpi so mnoge majhne arterije. Kri odteka po žilnih sinusih. Zgradba in prekrvavitev vranice omogočata tesen in časovno dovolj dolgotrajen stik med tuji in makrofagi, ki jih učinkovito odstranjujejo. Tako se s fagocitozo uniči in odstrani večina tujih neimunih delcev in predvsem inkapsuliranih bakterij (2–4).

V vranici nastajajo imunoglobulini razreda IgG, imenovani opsonini. To so specifična protitelesa, usmerjena proti ovojnicam bakterij, kot so pnevmokoki. IgG se veže na ovojnice in jih s tem označijo kot organizmu tuje. Tako jih lažje spoznajo makrofagi, ki jih fagocitirajo. S tem jih odstranijo iz krvnega obtoka in hkrati sprožijo imunski odziv (2–4).

Poleg IgG nastajajo v vranici tudi specifična protitelesa IgM. Ker se pri imunskem odzivu pojavijo prva, jih imenujemo tudi zgodnja protitelesa. Po sekundarni imunizaciji ali ponovnem stiku organizma z enakim antigenom pride v vranici do preklopa sinteze protiteles IgM v sintezo velike množine protiteles IgG. Ta protitelesa IgG so tista, ki bodo človeka doživljenjsko ščitila pred okužbo z istim antigenom oziroma bakterijo (2–4).

Tretja specifična vloga vranice v človekovi imunski obrambi, poleg fagocitoze in sinteze specifičnih protiteles, je aktivacija alternativne poti komplementnega sistema. Komplementni sistem je skupek krvnih beljakovin, ki s tesnim kaskadnim delovanjem omogočajo nespecifično uničevanje tujkov. Aktivacija komplementnega sistema poteka po dveh poteh: klasični, pogojeni s protitelesi, in alternativni, pogojeni s stiki s tujimi površinami, kot je npr. bakterijska ovojnica. Obe poti se srečata pri aktivaciji osrednje komponente komplementnega sistema, imenovane C3. Cepitev C3 v C3a in C3b povzroči aktivacijo nadaljnjih komponent, ki skupaj izoblikujejo litični kompleks. Ta povzroči lizo celice oziroma bakterije. Liziran, organizmu tuj material, na koncu makrofagi odstranijo iz bolnikove krvi (3–6).

IMUNSKI SISTEM

Imunski sistem je zapleten sistem specializiranih limfatičnih organov, celic in celičnih mediatorjev, ki je človeku omogočil preživetje v spreminjajočih se in zanj ne vedno ugodnih življenjskih razmerah. Glavni dejavnosti imunskega sistema sta preprečevanje in omejitev okužb z različnimi patogenimi mikroorganizmi (7).

Imunski odziv sestoji iz dveh dejavnosti:

- celičnega imunskega odziva, ki je rezultat delovanja limfocitov T. Limfociti T so odgovorni za zaščito gostitelja pred okužbami z znotrajceličnimi paraziti, kot so *Mycobacterium tuberculosis*, virusi in glive. Sodelujejo pri nastanku alergije in zavrnitvenih reakcijah. Pomembno vlogo imajo v uravnavanju protitelesnega imunskega odziva, ki ga ali spodbujajo ali pa zavirajo z izločanjem celičnih mediatorjev, imenovanih citokini (8, 9);
- protitelesnega imunskega odziva. Glavne celice protitelesnega imunskega odziva so limfociti B. Aktivirani limfociti B so plazmatke, ki proizvajajo za določen patogen ustrezna protitelesa. Protitelesa sodelujejo v obrambi organizma z opsonizacijo bakterij in nevtralizacijo toksinov in virusov. Limfociti B sodelujejo tudi v reakcijah nastanka alergije in avtoimunosti (7, 10).

Za uspešnost obrambe, ki jo opravlja imunski sistem, je pomembna še pomoč, ki jo nudita naravna odpornost in sproženje komplementnega sistema (5, 6, 11).

Eden najdejavnejših načinov naravne odpornosti je fagocitoza. Fagocitne celice predstavljajo najpreprostejši način celične obrambe. Med fagocitne celice uvrščamo več celičnih vrst, za imunski odziv so najpomembnejši monociti in njihove tkivne različice – makrofagi. Glavna dejavnost makrofagov je požiranje (fagocitoza) organizmu tujih delcev in predelava njihovih sestavin v majhne beljakovine in/ali sladkorje. Te molekule imenujemo antigeni. Ker makrofagi izpostavijo antigene na svoji površini, jih tako predstavijo limfocitom T, zato jih imenujemo tudi antigen predstavljajoče celice. Kot druge celice imunskega sistema tudi fagocitne celice izločajo citokine. Pri predstavitvi antigena so poleg makrofagov pomembne še interdigitalne in dendritične celice, ki jih najdemo vsepovsod v medceličnici (8, 11).

Potek imunskega odziva

Imunski sistem je torej učinkovit, kadar je delovanje vseh njegovih delov ustrezno in, ko je sodelovanje med njimi brezhibno. Komunikacija med celicami imunskega sistema poteka na ravni celičnih mediatorjev, citokinov in na ravni specifičnih celičnih receptorjev (7, 8).

Mikroorganizmi in tujki vstopajo v naše telo po različnih poteh. Lahko jih vdihnemo ali pogoltnemo. Rane so vedno nevarno mesto za okužbo. Možen je vstop skozi očesno veznico ali pa skozi telesne odprtine. Da bi se mikroorganizmi ustavili še pred vstopom v notranjost telesa in v kri, je narava razvila primarno obrambno črto. To predstavljajo ustna, nosna in očesna sluznica ter koža.

Vsi povzročitelji bolezni pa se vendarle ne ustavijo tukaj, temveč potujejo naprej po telesu in končajo pot v krvi. V krvi jih čaka pripravljena sekundarna obramba, sestavljena iz celic imunskega odziva. Najprej se z mikroorganizmi srečajo makrofagi. To so celice, ki mikroorganizme in tujke fagocitirajo. Fagocitirani tujek se združi z lizosomom v notranjosti fagocita, v fagolizosom. V njem so prosti radikali, ki žive mikroorganizme ubijejo, in kislilne prebavne encimi, ki tujek raz-

gradijo v osnovne sestavine (11). Molekule, ki nastanejo, so beljakovine ali polisaharidi. Makrofagi imajo na svoji površini posebne receptorje. To so receptorji razreda MHC II (angl. *major histocompatibility complex*). Makrofagi majhne molekule, ki so nastale ob razgradnji tujka, predstavijo na teh receptorjih limfocitom T, celicam pomagalkam (T_H – angl. *helper*). Molekule, ki se predstavljajo na receptorjih MHC II, imenujemo antigene (12, 13). Tudi celice pomagalko imajo na svoji površini receptorje. Za limfocite T so značilni T-celični receptorji (TCR) in receptorji CD2, CD3 in CD4. Za razpoznavo makrofaga in antigena se pomembni receptorji TCR skupaj z receptorji CD4 (7). Ob medsebojni interakciji med makrofagom in celico pomagalko začne makrofag izločati interleukin-1 (IL-1). To aktivira celico pomagalko. Aktivirana celica pomagalka začne izločati interleukin-2 (IL-2). IL-2 je citokin, ki deluje na nezrele celice pomagalko (T_{H0}) in na citotoksične limfocite T (te na površini izražajo molekule CD8). Nezrele celice pomagalko se diferencirajo v dve smeri. T_{H1} so tiste celice, ki bodo spodbudile naslednje makrofage k še obilnejši fagocitozi in sprožile nastanek citotoksičnega vnetja. T_{H2} pa so celice, ki bodo spodbudile limfocite B k preobčutljivostnemu tipu imunskega odziva (9). Med limfocitom T celico pomagalko in limfocitom B pride, podobno kot z makrofagom, do interakcije na ravni receptorjev in posledičnega spoznavanja antigena (7). Po stiku med receptorjem CD4 celice T_{H2} in receptorjem MHC II limfocita B, začne celica T_{H2} izločati IL-4, IL-5, IL-6 in IL-10. To aktivira ustrezne limfocite B, da postanejo plazmatke, ki v svojem endoplazemskem retikulumu izdelajo za antigen ustrezna protitelesa (10). Plazmatke izdelujejo in sprostijo v kri na vsako sekundo tisoče protiteles. Nato v nekaj dneh propadejo. Nekaj aktivnih plazmatk se pretvori v spominske limfocite B. To so tiste celice, ki ostanejo v bezgavkah dolgo časa in se ob naslednjem srečanju z istim antigenom hitro aktivirajo ter začnejo z izdelavo novih, enakih protiteles (14).

Protitelesa

Protitelesa so globulinske beljakovinske molekule. V krvnem vzorcu ločimo z elektroforezo

tri tipe globulinov: alfa, beta in gama globuline. Protitelesa so gama globulini. Ker sodelujejo v imunskem odzivu, jih imenujemo imunoglobulini (10, 14).

Poznamo pet razredov imunoglobulinov (Ig): razred G (IgG), razred M (IgM), razred A (IgA), razred D (IgD) in razred E (IgE). Med seboj se ločijo po strukturi in po vlogi, ki jo imajo v imunskem odzivu (14).

- Imunoglobulini G (IgG) so sestavljeni iz dveh lahkih in dveh težkih verig. Glavno vlogo imajo pri sekundarnem (ponovnem – poznem) imunskem odzivu. Ker so majhni, lahko prehajajo skozi posteljico z matere na otroka. IgG so protitelesa, ki opsonizirajo (označijo) bakterije, da jih makrofagi lažje spoznajo kot telesu tuje in jih tako hitreje odstranijo (14).
- Imunoglobulini M (IgM) so protitelesa, ki se sintetizirajo najhitreje po okužbi. Sodelujejo torej v primarnem imunskem odzivu in jih zato imenujemo zgodnja protitelesa. V laboratorijski serumski diagnostiki so zgodnji kazalci sveže okužbe. IgM so pentameri. Ker imajo 10 vezavnih mest za antigene, se zdijo najbolj učinkovit razred protiteles. Zaradi velikosti ne prehajajo skozi posteljico. Če jih najdemo v krvi novorojenčka, lahko sklepamo, da gre za svežo okužbo novorojenčka in ne matere (14).
- Imunoglobuline A (IgA) najdemo v telesnih izločkih, kot so kolostrum, slina, solze in izločki dihalne in črevesne sluznice ter sluznice sečil in spolovil. Protitelesa IgA pospešujejo pritrditev mikroorganizmov na telesne sluznice in verjetno prispevajo k nastanku tolerance za antigene, ki so sestavine hrane. Sluznični IgA so dimerne molekule (14).
- Imunoglobulini D (IgD) nimajo znane protitelesne vloge. Verjetno so pomembni kot antigenski receptorji. IgD najdemo na površini limfocitov B skupaj z monomernimi IgM v tako imenovanem B-celičnem receptorju (BCR) in, v majhnih količinah, v serumu (14).
- Imunoglobulini E (IgE) imajo dve pomembni vlogi. So protitelesa, ki sodelujejo pri preobčutljivosti tipa I, npr. anafilaktični reakciji. Njihova druga vloga je obramba pred zajedalci. V majhnih količinah najdemo IgE v normalnem serumu (14).

Streptococcus pneumoniae

Streptokoki so velik rod (*genus*) bakterij, ki jih družijo določene skupne lastnosti. Znotraj rodu zaradi posameznih posebnosti ločimo več vrst (*species*) streptokokov. Glavni skupni značilnosti streptokokov sta, da se po Gramu obarvajo pozitivno in da so sferične oblike. Ponavadi so v barvanih mikroskopskih preparatih urejeni v parih ali verižicah. Vsi streptokoki so katalaza negativni (15, 16).

Streptokoke delimo glede na tip hemolize, ki jo povzročajo na krvnem agarju. Ločimo alfa hemolitične, beta hemolitične in nehemolitične streptokoke (16).

Streptococcus pneumoniae oziroma pnevmokok je alfa hemolitični streptokok. Na krvnem agarju vidimo okrog kolonij pnevmokokov zelenkast pas, ki je posledica nepopolne lize eritrocitov. Kot drugi streptokoki se tudi pnevmokoki po Gramu obarvajo pozitivno. V mikroskopskem preparatu bomo pnevmokoke spoznali kot ovalne (lancetne) bakterije, ki so v parih ali kratkih verižicah. Od tod tudi ime diplokok. Vsak pnevmokok je obdan s tanko, polisaharidno ovojnico. Poznamo 85 različnih tipov pnevmokoknih ovojnic. Ovojnice so tisti del bakterije, ki je virulenten. Torej tisti del, ki omogoči nastanek bolezni in sproži imunske obrambne mehanizme (17).

Pnevmokoki povzročajo različne bolezni. So najpogostejši povzročitelji pljučnice. Poleg pljučnice pa povzročajo še bakteriemijo, meningitis in okužbe zgornjih dihal npr. vnetje obnosnih votlin in srednjega ušesa (18).

Pnevmokoki so pri delu prebivalstva (5–50%) del normalne flore v zgornjih dihalih. Navkljub prisotnosti bakterij na njihovi sluznici ti ljudje niso bolni. Lahko jih imenujemo tudi bacilonosci, saj lahko prenesejo bakterije na ljudi, ki pred okužbo niso zaščiteni. Pnevmokoki se prenašajo z drobnimi aerosolnimi kapljicami, ki nastanejo ob kihanju ali kašljanju, torej po zraku. Občutljivi ljudje se tako lahko okužijo in zbolijo (17, 18).

Pomen cepljenja s pnevmokoknim cepivom

Nosilci pnevmokokov so verjetno naravno zaščiteni pred okužbo, vendar v neugodnih

okolščinah lahko tudi zbolijo. Ljudje z normalnim imunskim odzivom okužbo s pnevmokoki navadno prebolijo brez zapletov, če med boleznijo jemljejo penicilin G (18). Žal pa obstajajo ljudje z zmanjšano odpornostjo za okužbo s pnevmokoki. Takšni so ljudje po odstranitvi vranice, tisti s kroničnimi boleznimi, kot so srpasta anemija, Hodgkinova bolezen, multipli mielom in nefrotski sindrom, in ljudje, pri katerih je zmanjšan refleks kašlja, kot na primer pri zastrupitvi z alkoholom ali zdravili. Bolj izpostavljeni so tudi ljudje s poškodbami dihalne poti z dražičimi snovmi in bolniki z moteno cirkulatorno dinamiko, ki nastopi pri pljučnem edemu ali odpovedovanju srca (15, 17).

Ljudje z zmanjšano odpornostjo niso bolj kot drugi ali pogosteje izpostavljeni okužbi s pnevmokokom. Razlika je v tem, da pri zdravem človeku manjše okužbe pravzaprav ne opazimo, saj jo uspešno prepreči ali odpravi zdrav imunski sistem. Pri ljudeh z zmanjšano odpornostjo pa lahko že majhna okužba pomeni težko ali celo usodno bolezen (19). Iz tega razloga je nujna preventivna zaščita imunskega sistema (zavrtih) ljudi. Danes tem ljudem pomagamo s cepljenjem s 23-valentnim pnevmokoknim cepivom, ki vsebuje očiščene polisaharidne antigene vseh glavnih pnevmokoknih serotipov, ki so povzročitelji 90% okužb pri odraslih in 100% okužb pri otrocih (20–26).

S preventivnim cepljenjem izvedemo aktivno imunizacijo. Z majhno količino antigenov, značilnih za določeno bakterijo, spodbudimo nastanek imunskega odziva. Zgradba in količina antigena je tako majhna, da povzroči nastanek ustreznih zaščitnih protiteles in določeno število spominskih limfocitov B, ne pa bolezni. Bolnik je torej pripravljen na morebiten stik s patogenim mikroorganizmom. Prva obrambna črta bodo sedaj njegova zaščitna protitelesa, hkrati pa se bodo hitro aktivirale še spominske celice in začele proizvajati velike količine ustreznih protiteles. Imunski odziv bo dovolj hiter in močan, da bo pri bolniku preprečil ali pa vsaj omejil okužbo, ki bi brez zaščite potekala mnogo težje ali pa celo smrtno (27–31).

Namen raziskave

Pri hudih poškodbah vranice z močno krvavitvijo lahko poškodovančevo življenje rešimo

s splenektomijo. Po odstranitvi vranice je odpornost poškodovancev za okužbo zmanjšana (3, 4). Najpogostejša je okužba s pnevmokoki. Brez aktivne zaščite lahko pride pri nekaterih do najtežje oblike pnevmokokne okužbe – sepse. Pnevmonokna sepsa ima pogosto težek potek in/ali smrten izid (17, 18). Zato moramo poškodovance primerno zaščititi. Najprimernejši način je s preventivnim cepljenjem. V doktrinah urgentnih oddelkov povsod po svetu upoštevajo to priporočilo (20–26). Žal pa je še vedno neznanka in tema mnogih raziskav in razprav vprašanje, kdaj moramo poškodovanca cepiti, da bo cepljenje najučinkovitejše.

Za nastanek učinkovitega imunskega odziva je potreben določen čas (7). Protitelesa, ki se sintetizirajo ob okužbi s določenim patogenom prva, so protitelesa imunoglobulinskega razreda IgM. Ta pa se v dovolj veliki množini za učinkovito obrambo navadno pojavijo v 10 dneh. Torej bi bilo smiselno cepljenje vsaj 10 dni pred morebitno okužbo (10, 14). Žal lahko cepimo poškodovanca najprej šele, ko se je že poškodoval.

V raziskavi smo proučevali naslednja vprašanja:

- Ali imunizacija sproži sintezo specifičnih protiteles.
- Ali splenektomija zmanjša zmožnost sinteze specifičnih protiteles.
- Ali je vpliv splenektomije na zmanjšanje zmožnosti sinteze specifičnih protiteles pogojen s časom imunizacije.

Da bi odgovorili na zastavljena vprašanja, smo raziskali naslednje možnosti: cepljenje tik pred splenektomijo, cepljenje en dan po splenektomiji in cepljenje sedem dni po splenektomiji, ko si je bolnik že opomogel po operaciji.

Naša hipoteza je bila, da je najustreznejše cepljenje tik pred ali takoj po splenektomiji.

Raziskavo smo izvedli na živalskem modelu, na tridesetih miškah, razdeljenih v šest skupin. Miškam smo operacijsko odstranili vranico in jih cepili s pnevmokoknim cepivom ob različnih časih. Prvi skupini mišk vranice nismo odstranili, smo jih pa cepili. Drugo skupino smo cepili tik pred splenektomijo, tretjo skupino 1 dan po splenektomiji in četrto skupino 7 dni po operaciji. Peti skupini smo odstranili vranico, ne da bi jih cepili. Šesta skupina so bile zdrave, necepljene miške. Merili smo spreminjanje množin IgM, IgG in precipitacijskih protiteles v njihovem krvnem serumu. Poskus smo zaključili z nadzorovano okužbo mišk s pnevmokoki. Miške iz vseh navedenih skupin smo okužili ob istem času, z enako količino pnevmokokov. V štiriurnih intervalih smo spremljali njihovo počutje in poginjanje.

METODE IN PREISKOVANCI

Živali

Našo raziskavo smo izvedli na živalskem modelu. V poskus smo vključili 30 mišk, razdeljenih v šest skupin po pet poskusnih živali ($n = 5$). Vse miške so bile sokrvnega seva BALB/c, ženskega spola, vzgojene v Hlevčku Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo v Ljubljani. Ob začetku poskusa so bile stare 2 meseca in so v povprečju tehtale 20 gramov.

Skrbeli smo, da so živele v za njih najustreznejših življenjskih razmerah. V vsaki kletki je bilo po pet mišk. Prebivale so v sobi s stalno temperaturo (22°C), ustrezno svetlobo (12 ur svetlobe in 12 ur teme) imele so

Tabela 1. Razlike med skupinami mišk glede na opravljene posege.

Skupina	Poseg			
	Imunizacija	Splenektomija	Odvzem krvi	Okužba s pnevmokoki
1. skupina	+	/	4-krat	+
2. skupina	tik pred splenektomijo	+	4-krat	+
3. skupina	1 dan po splenektomiji	+	4-krat	+
4. skupina	7 dni po splenektomiji	+	4-krat	+
5. skupina	/	+	4-krat	+
6. skupina	zdrave miške	/	4-krat	+

mir. Skrbeli smo za čisto steljo. Svežo vodo in hrano v obliki briketov so imele *ad libitum*.

Na miškah smo opravili naslednje posege: imunizacija/cepljenje s pnevmokoknim cepivom Pneumo 23[®], odstranitev vranice, odvzem krvnih vzorcev, kontrolirana okužba z bakterijo *Streptococcus pneumoniae* (pnevmokoki). Skupine so se med seboj razlikovale po opravljenih posegih (tabela 1).

V prvi skupini so bile miške, ki smo jih imunizirali ne da bi jim odstranili vranice. Druga skupina so bile miške, ki smo jim odstranili vranico in jih cepili tik pred operacijo, v tretji skupini smo miške cepili 1 dan po operaciji. Četrta skupini smo odstranili vranice in jih cepili 7 dni po splenektomiji. Miškam v peti skupini smo odstranili vranico, ne da bi jih cepili. V šesti skupini so bile zdrave miške, ki jih nismo cepili ali jim odstranili vranic.

Imunizacija

Z leti so se pnevmokokna cepiva precej spreminjala. Prvo splošno uporabljano cepivo so razvili leta 1977 in je vsebovalo 14 serološko različnih tipov bakterije *Streptococcus pneumoniae* (32). V naših poskusih smo uporabili sodobno izpopolnjeno 23-valentno cepivo Pneumo 23[®] – *Polyvalent pneumococcal vaccine* proizvajalca Pasteur Mérieux iz Lyona v Franciji, ki vsebuje 23 serološko različnih, za pnevmokokni tip specifičnih (značilnih) antigenov (20–26). Med njimi so vsi tipi, ki danes v svetu in pri nas najpogosteje povzročajo pnevmokokne pljučnice, meningitis, vnetje obnosnih votlin, vnetje srednjega ušesa in pnevmokokno sepsa (18). Predstavljajo namreč povzročitelje 90 % pnevmokoknih okužb pri odraslih in 100 % okužb pri otrocih (32). Polivalentno cepivo vsebuje očiščene polisaharidne antigene naslednjih pnevmokoknih serotipov: 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F, 33F.

Miške smo cepili z 0,1 ml cepiva intrapeoritonealno dvakrat v razmaku 17 dni (30, 32, 34). Pri nobeni od cepljenih živali se niso pojavili stranski učinki cepljenja (31), kot so rdečina na mestu vboda, slabo počutje, ki bi ga opazili kot nasršeno dlako, pomanjkanje želje po hrani ali žeje, spremembe v iztrebljanju ali nezainteresiranost za okolico.

Splenektomija

Priprava za splenektomijo

Za vsak operacijski poseg je potrebna priprava. Pripraviti je treba živali, ki jih bomo operirali, in orodje, s katerim bomo poseg opravili. Za aseptični način dela pa je nujna še priprava prostora, operacijske mize in operaterjev (35). Le tako so dosežene optimalne razmere za uspešno delo.

Najprej smo za operacijo pripravili miške. Naenkrat (v enem dnevu) smo operirali eno skupino, to je 5 mišk. Miške smo osamili v posebnem prostoru. Tam so bile ločene od drugih, pod stalnim nadzorom in v miru. Dve uri pred začetkom operacije smo jim previdno pobrili dlako na trebuhu. V teh dveh urah po britju sta se razdraženost kože in hiperemija na operacijskem mestu pomirili, kar je zmanjšalo krvavitev ob inciziji.

Orodje, ki smo ga uporabili za splenektomijo, so sterilizirali na Oddelku za sterilizacijo Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo v Ljubljani, dan pred operacijo. Operacijsko mizo smo razkužili z 1 % natrijevim hipokloritom in jo pokrili s sterilnim pregrinjalom (36).

Na poseg smo se pripravili tudi operaterji v skladu z antiseptično pripravo operaterja (35).

Anestezija

Kot pri posegih na ljudeh, je tudi pri živalih pred operacijo potrebna anestezija. Z anestezijo preprečimo bolečino in neugodje zaradi posega ali pa žival pomirimo pred tehnično zahtevnim posegom (37, 38).

Za splenektomijo je bila potrebna splošna anestezija. Stanje omamljenosti je moralo nastopiti dovolj hitro, s čim manj izraženo drugo fazo anestezije, za katero sta značilna nemir in nevarnost motenj dihanja in delovanja srca s posledično smrtjo. Trajati je moralo dovolj dolgo, da smo poseg lahko izpeljali do konca. Tudi zburjanje je moralo potekati brez zapletov in za miško čim manj neprijetno. Zelo pomembna je bila terapevtska širina anestetika, saj je natančno odmerjanje zaradi majhne telesne teže mišk zelo težavno (37).

Za naš poskus smo kot najbolj primerno, to je tisto, ki najbolj zadostuje zgoraj navedenim pogojem, izbrali mešanico dveh

anestetikov. Uporabljali smo mešanico keta-
mina in ksilazina v razmerju 10 : 1. Povprečna
teža operiranih mišk je bila 20 gramov. Opti-
malni odmerek za 30 minutno anestezijo je
bil 0,04 ml ketamin/ksilazina (38).

Miški smo vbrizgali ustrezní odmerek
anestetika in jo vrnili v kletko, kjer je bila sama
(slika 1). Da smo jo lahko opazovali ves čas
nastopa anestezije, smo uporabljali prozorno
kletko. Spremljali smo prehode skozi različ-
ne faze anestezije. Iz običajnega vedenja je
miška prešla v fazo ekscitacije, ko je hitro teka-
la in visoko skakala po kletki, dokler se ni
zatekla v kot in se popolnoma pomirila. Anes-
tezija je bila za operacijo ustrežna, ko se je
spremenilo miškino dihanje. Postalo je poča-
sno in plitvo in nazadnje ni več reagirala na
bolečinske dražljaje (ščipanje ušesk in zadnjih
tačk). Miška je bila v kirurški fazi anestezije
(38, 39).

Splenektomija

Splenektomija (gr. *splen* – vranica, gr. *ektome* –
izrez) je kirurška odstranitev vranice (40).
Splenektomija je lahko delna ali popolna.
V našem poskusu smo miškam odstranili
celotno vranico. Naredili smo torej popolno
splenektomijo (1).

Miško v kirurški fazi anestezije smo iz
kletke prenesli na operacijsko mizo. Zaradi
lažjega dostopa do vranice smo miško pole-
gli v desni bočni položaj. Da smo ji sprostil
dihalno pot in ji s tem olajšali dihanje med
operacijo, smo ji glavo zvrnili malce navzgor
in nazaj (41).

Operacijsko polje smo razkužili s 70%
alkoholom na sterilnem tamponu (35).

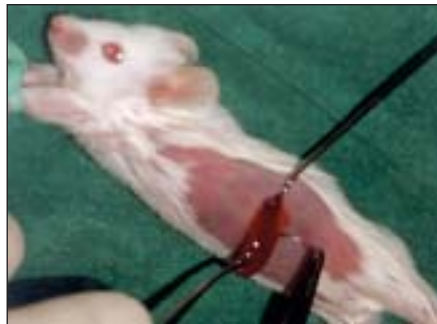
S skalpelom z rezilom številka 10 (proi-
zvajalec Aesculap AG, Tuttlingen, Nemčija)
smo naredili 1 cm dolgo prečno incizijo med
zadnjim spodnjim levim rebrom in levim
sprednjim zgornjim črevničnim trnom (*spi-
na iliaca anterior superior*) (slika 2). Vezivno
tkivo pod kožo smo odpreparirali s topimi
konci operacijskih škarij. Kožo smo na vsaki
strani fiksirali s kirurškimi kljukicami. Tako
je bila vranica dobro vidna pod tanko steno.
Steno (mišice in peritonej) smo previdno
prezrezali z ostrimi škarjami. Z anatomsko pin-
ceto smo nežno prijeli vranico in jo izvlekli
skozi nastalo odprtino (slika 3) (41). Najbliž-
je želodcu, v hilusu vranice, je pri miškah



Slika 1. Intrapertitonealno vbrizgavanje anestetika.



Slika 2. 1 cm dolga prečna incizija med med zadnjim spodnjim levim rebrom in levim sprednjim zgornjim črevničnim trnom.



Slika 3. Z anatomsko pinceto nežno primemo vranico in jo izvlečemo skozi nastalo odprtino.



Slika 4. Šivanje operacijske rane.

vrančna arterija. To smo ligirali z dvojno zanko z nitjo Coated Vicryl 5/0 (proizvajalec ETHICON – Johnson & Johnson Intl, Bruselj, Belgija). Na drugem koncu vranice smo na enak način ligirali še vranično veno. Odstranili smo vranico, mezenterij, s katerim je vranica pritrjena na želodec, in okolišnje vezivno tkivo (41).

Peritonej smo skupaj z mišicami zašili z enoslojnim tekočim šivom po Kirschnerju z nitjo Coated Vicryl 5/0 (35). Sprostili smo kirurške kljukice in s štirimi posameznimi šivi zašili še kožo z nitjo Coated Vicryl 4/0 (35) (slika 4). Pazili smo, da so bili ostanki niti ravno prav dolgi. Če bi bili prekratki, bi se vozli razvezali, če pa bi bili predolgi, bi si jih miške pregrizle (41).

Rano smo očistili s sterilnim tamponom in jo pustili nepokrito. Splenektomija je bila s tem zaključena. Miško smo namestili v kletko za okrevanje (41).

Pooperacijska oskrba

Mali glodalci imajo veliko razmerje med telesno površino in telesno težo, zato lahko pri njih hitro pride do podhladitve. Vsako miško smo po splenektomiji dali v posebno ogrevano kletko, v kateri smo vzdrževali stalno zunanjo temperaturo 35°C. Pazili smo, da so imele miške sproščeno dihalno pot. Dokler se niso same prebudile, so ležale v bočnem položaju z rahlo nazaj in navzgor zvrnjeno glavo (41).

Po 15 minutah so se miške počasi začele prebujati. Obračale so se na trebuh, začele vstajati na tačke in hoditi po kletki. Ko so si dovolj opomogle, da so hodile po kletki kot pred operacijo, smo jim pod kožo vbrizgali 1 ml fiziološke raztopine. Tako smo nadomestili telesno tekočino, ki so jo miške izgubile med operacijo zaradi manjše krvavitve in izhlapevanja iz odprte trebušne votline. Miške smo dve uri po operaciji vrnili v njihove običajne kletke, kjer so bile ponovno v skupinah po pet (41).

Za lajšanje pooperacijskih bolečin smo dajali miškam paracetamol (Lekadol® 500 mg/200 ml, proizvajalec Lek, Ljubljana, Slovenija) v vodi za pitje *ad libitum* (42). Miške so se ves čas po operaciji hranile z enako briketirano hrano kot pred operacijo.

Spremljanje imunskega odziva

Glede na čas, v katerem se protitelesni imunski odziv pojavi, in glede na protitelesa, ki pri njem sodelujejo, razlikujemo primarni in sekundarni imunski odziv (7, 10, 14):

- Primarni imunski odziv se pojavi 10 dni po okužbi organizma. Zanj je značilen velik porast množine protiteles razreda M (IgM) in le majhen porast protiteles razreda G (IgG). IgM včasih zaradi tega poimenujemo tudi zgodnja protitelesa (7, 10, 14).
- Sekundarni imunski odziv nastane ob ponovni okužbi z enakim povzročiteljem. Zanj je značilen porast IgG protiteles. Protitelesa IgG navadno imenujemo zaščitna protitelesa (7, 10, 14).

V naši raziskavi smo spremljali primarni in sekundarni imunski odziv. V krvnem serumu mišk smo spremljali spreminjanje množine IgG, IgM in precipitacijskih protiteles.

Odvzem krvi

Protitelesa so beljakovine, ki jih najdemo v krvnem serumu (14). Za njihovo določitev je torej nujen odvzem krvi. Pri človeku odvzem krvi tehnično ni zapleten poseg. Pri miškah, ki so majhne živali, pa je potrebno veliko spretnosti in izkušenj, da dobimo dovolj velik vzorec krvi, ne da bi jim pri tem ogrozili življenje.

Kri najlažje odvezamo iz venskega pleteža v retroorbitalnem prostoru. Pri tem je potrebna natančnost in mirnost. Ker gre za za miško neprijeten poseg in ker mora biti ta čim bolj pri miru, da ji ne poškodujemo očesa in retroorbitalnega prostora, jo pred posegom anesteziramo z etrom. Anestezija naj bo kratka in hitra. Zadostuje, da miško pustimo v kletki, v kateri je vata, prepojena z etrom, približno eno minuto, oziroma tako dolgo, da se spremeni njeno dihanje. Iz običajnega, pljučnega, se dihanje spremeni v hitro abdominalno (38).

Anestezirano miško položimo na poprej pripravljeno razkuženo podlago, pokrito s sterilnim pregrinjalom. Z levo roko jo držimo za sprednje tačke in rep, ne da bi pri tem pritisnili na telo. Z desno roko držimo stekleno kapilaro premera 1,8 mm (proizvajalec BRAND GmbH & Co., Wertheim, Nemčija). Previd-

no in počasi potisnemo kapilaro ob očesnem zrklju v retroorbitalni prostor. Zaradi kapilarne vleka steče kri po kapilari. Ko smo odvzeli dovolj krvi, kapilaro odmaknemo in pri tem pazimo, da nam kri, ki se še izliva iz rane, ne steče mimo kapilare. Odvzeto kri hitro spihamo v pripravljene posodice za shranjevanje vzorcev (proizvajalec Costar, Corning, ZDA), saj se kri v kapilari zelo hitro strdi.

Za našo raziskavo je zadostoval vzorec 150 μ l krvi. Vzorce smo jemali štirikrat. Prvi odvzem je bil deset dni po cepljenju s pnevmokoknim cepivom, drugi sedem dni po prvem odvzemu, tretji štiri dni pred in četrta dva tedna po nadzorovani okužbi s pnevmokoki. Da bi miška tudi v primeru nesrečne poškodbe očesa ali retroorbitalnega prostora lahko videla vsaj na eno oko, smo vse vzorce vzeli iz retroorbitalnega prostora na isti strani.

Prilprava in shranjevanje vzorcev

Odvzeto kri smo pustili v posodicah za shranjevanje vzorcev 30 minut pri sobni temperaturi, da se je sesirila. Vzorce smo nato centrifugirali 10 minut pri 3500 obratih na minuto. S centrifugiranjem smo ločili serum od krvnih celic, ki so ostale kot usedlina. Serume smo odpipetirali z 10 mikrolitrsko pipeto in shranili v hladilniku pri -20°C do uporabe.

Encimsko-imunski test

Encimsko-imunski test, krajše poimenovan ELISA (angl. *enzyme-linked immunosorbent assay*), je ena najbolj zanesljivih imunoloških metod za merjenje količine protiteles in antigenov v preiskovanem serumu (43). V naši raziskavi smo z njim merili množino nastalih protiteles po imunizaciji.

Metoda ELISA temelji na zaznavanju imunskih kompleksov, ki so nastali med antigeni in protitelesi. Pri testu za določevanje protiteles z ustreznim antigenom prekrijemo trdni nosilec, npr. mikrotitrno ploščo. Nato dodamo razredčen preiskovani vzorec seruma.

Če vzorec vsebuje protitelesa, ki so pravšnja za vezavo z navzočim antigenom, se ta povežejo z njimi. Nastane primarni imunski kompleks (43). Sedaj plošče speremo s pufrum za spiranje. S tem odstranimo vsa protitelesa, ki se niso vezala z antigeni na plošči. Po spiranju dodamo z encimom označena sekun-

darna protitelesa, ki spoznavajo primarna. Na sekundarna protitelesa vezan encim ne spremeni njihovih vezavnih lastnosti in tudi ne sestavin imunskega kompleksa. Najpogosteje uporabljamo za označevanje protiteles alkalno fosfatazo ali hrenovo peroksidazo.

Sekundarna protitelesa se vežejo s primarnimi. Nastane nov kompleks, ki ga sedaj imenujemo sekundarni imunski kompleks. Ponovno speremo ploščo, tako odstranimo nevezana sekundarna protitelesa. V končni fazi encimsko-imunskega testa dodamo substrat. Substrat je snov, ki jo bo encim, s katerim je označeno sekundarno protiteleso, spremenil tako, da bomo to spremembo zaznali kot spremembo barve. Iz količine razgrajenega substrata lahko sklepamo na množino vezanih sekundarnih protiteles in iz te na množino protiteles v primarnem imunskem kompleksu, torej na množino protiteles, ki jih je vseboval preiskovani vzorec (13, 43).

Mikroprecipitacija v kapilari

Ena od najpreprostejših, a učinkovitih imunoloških metod za določanje prisotnosti antigenov in protiteles je mikroprecipitacija v kapilari (13).

Z njo hitro in zanesljivo določimo prisotnost protiteles proti antigenom v pnevmokoknem cepivu. Uporabili smo majhne, s heparinom prevlečene kapilare premera 1 mm. S pomočjo kapilarne vleka smo v kapilaro najprej posrkali pnevmokokno cepivo, to je antigen, proti kateremu smo iskali protitelesa. Za antigenom smo v kapilaro posrkali enako količino vzorca. Postopek smo ponovili za vseh 120 vzorcev.

Pri sesanju v kapilaro smo morali biti zelo previdni, da se antigen in vzorec nista zmešala. Zanimal nas je namreč nastanek precipitacijskega obroča med obema tekočinama. Precipitacijski obroč nastane takrat, ko se antigeni in protitelesa med seboj povežejo v mrežo. Ta mreža je v kapilari dobro vidna že s prostim očesom kot bel obroček. Nastanek obroča je pomenil, da so v vzorcu prisotna specifična protitelesa proti antigenom iz pnevmokoknega cepiva. Množino protiteles smo ocenili z debelino nastalega precipitacijskega obroča.

Okužba s pnevmokoki

Našo raziskavo o pomenu splenektomije na imunski odziv operiranih mišk smo zaključili z nadzorovano okužbo mišk s pnevmokoki. Miške iz vseh skupin smo okužili ob istem času, z enako količino pnevmokokov. Njihovo počutje in poginjanje smo spremljali v štiriurnih časovnih intervalih.

Priprava pnevmokokne kulture in suspenzije za okužbo

Priprava bakterij pred intraperitonealnim injiciranjem je pomemben dejavnik, ki vpliva na virulenco pnevmokokov in s tem na odziv mišk na okužbo (44). Pomembno je, da bakterije rastejo v optimalnih razmerah toliko časa, da dosežejo končno število in maksimalno virulenco (44).

Pnevmokoke smo gojili v tekočem tioglikolatnem gojišču. Deset kolonij 24-urne kulture sluznega seva *Streptococcus pneumoniae* s krvnega agarja smo suspendirali v 5 ml tekočega tioglikolatnega gojišča. Pnevmonoki so se nato razmnoževali 24 ur v inkubatorju pri 37°C in 5% CO₂ in dosegli končno koncentracijo 5 × 10⁶/ml. Točno število bakterij (CFU – angl. *Colony Forming Units*) smo določili z metodo redčenja kolonij na krvnem agarju.

Suspenzijo za cepljenje mišk smo pripravili tako, da smo imeli v 50 µl kužila 250 CFU pnevmokokov. Miške smo cepili ob 12 uri s 50 µl takšne suspenzije.

REZULTATI

Nastanek in potek imunskega odziva pri preiskovanih miškah smo merili z določevanjem množine protiteles. Z encimsko-immunskim testom smo merili posebej množino specifičnih protiteles IgM in IgG. Z metodo mikroprecipitacije v kapilari pa smo merili množino sintetiziranih precipitacijskih protiteles.

Mikroprecipitacija v kapilari

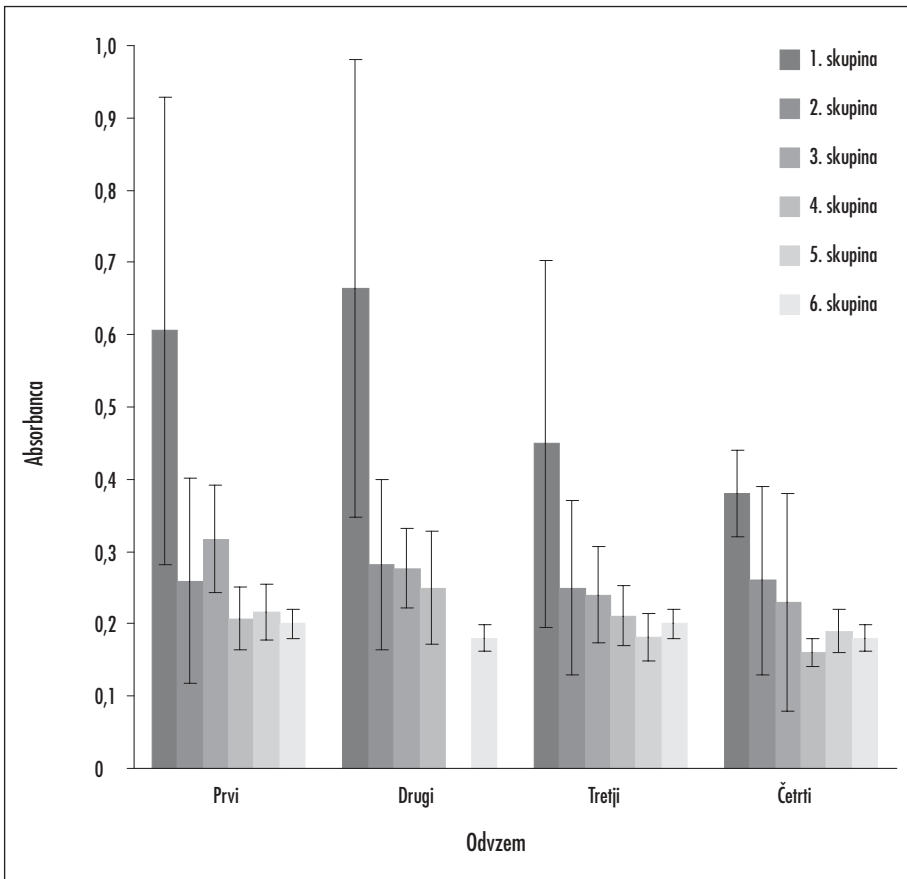
Največja množina, z metodo mikroprecipitacije v kapilari izmerjenih, specifičnih protiteles proti pnevmokoknim antigenom, ki jih vsebuje cepivo Pneumo 23[®], je za razliko od meritev za protitelesa IgM in IgG premaknjena k tretjemu odvzemu. Tako je količina

protiteles pred okužbo s sluznim sevom *Streptococcus pneumoniae* največja pri skupini, ki ni bila splenektomirana (1. skupina), sledi skupina, ki je dobila cepivo 1 dan po splenektomiji (3. skupina), najmanj pa jih je pri skupini mišk, ki so bile imunizirane 7 dni po splenektomiji (4. skupina). Statistično značilne razlike med posameznimi skupinami mišk najdemo ob tretjem odvzemu ($p < 0,05$ pri primerjavi skupine imuniziranih in nesplenektomiranih in vseh ostalih imuniziranih splenektomiranih skupin miši). Prav tako najdemo statistično značilno razliko med miškami, imuniziranimi tik pred splenektomijo, in skupino mišk, imuniziranih 7 dni po operaciji ($p < 0,05$), ter skupino neimuniziranih splenektomiranih mišk ($p < 0,05$). Med skupino imuniziranih nesplenektomiranih in tik pred splenektomijo imuniziranih miši pa ni statistično značilne razlike ($p > 0,05$).

Protitelesa IgM

Količina protiteles razreda IgM v preiskovanih vzorcih se je večala od prvega dne po cepljenju s pnevmokoknim cepivom in dosegla vrh ob drugem odvzemu krvi 17. dan, nato pa se je ustalila. Najmanjša je bila ob četrtem odvzemu, to je potem, ko so odporne miške že preživele okužbo (slika 5).

Največ specifičnih protiteles IgM proti *Streptococcus pneumoniae* smo izmerili ob drugem odvzemu. Tik pred okužbo s sluznim sevom pnevmokokov smo največ protiteles našli pri skupini imuniziranih in nesplenektomiranih mišk (1. skupina), nato pa pri miškah, ki so dobile cepivo tik pred splenektomijo (2. skupina). Raven protiteles pri tej skupini pa je skoraj enaka ravni, ki smo jo izmerili pri miškah, ki so dobile cepivo 1 dan po operaciji (3. skupina) (slika 5). Med obeh skupinama (2 in 3) nismo našli statistično značilne razlike ($p > 0,05$). Razliko pa smo našli ob primerjavi skupine imuniziranih nesplenektomiranih mišk in vseh ostalih skupin ($p < 0,05$). Razlike v množini protiteles IgM med skupinami splenektomiranih mišk niso velike, viden pa je padec v množini protiteles pri vseh skupinah od drugega proti četrtemu odvzemu, kar potrjuje teoretično predpostavko, da gre za primarni tip imunskega odziva (10).



Slika 5. Dinamika spreminjanja množine specifičnih protiteles IgM proti antigenom pnevmokokov. Prvi odvzem – 10 dni po imunizaciji; Drugi odvzem – 17 dni po imunizaciji; Tretji odvzem – 4 dni pred okužbo s pnevmokoki; Četrti odvzem – 14 dni po okužbi. 1. skupina – imunizirane nesplenektomirane miške; 2. skupina – miške, imunizirane tik pred splenektomijo; 3. skupina – miške, imunizirane 1 dan po splenektomiji; 4. skupina – miške, imunizirane 7 dni po splenektomiji; 5. skupina – splenektomirane neimunizirane miške; 6. skupina – zdrave miške.

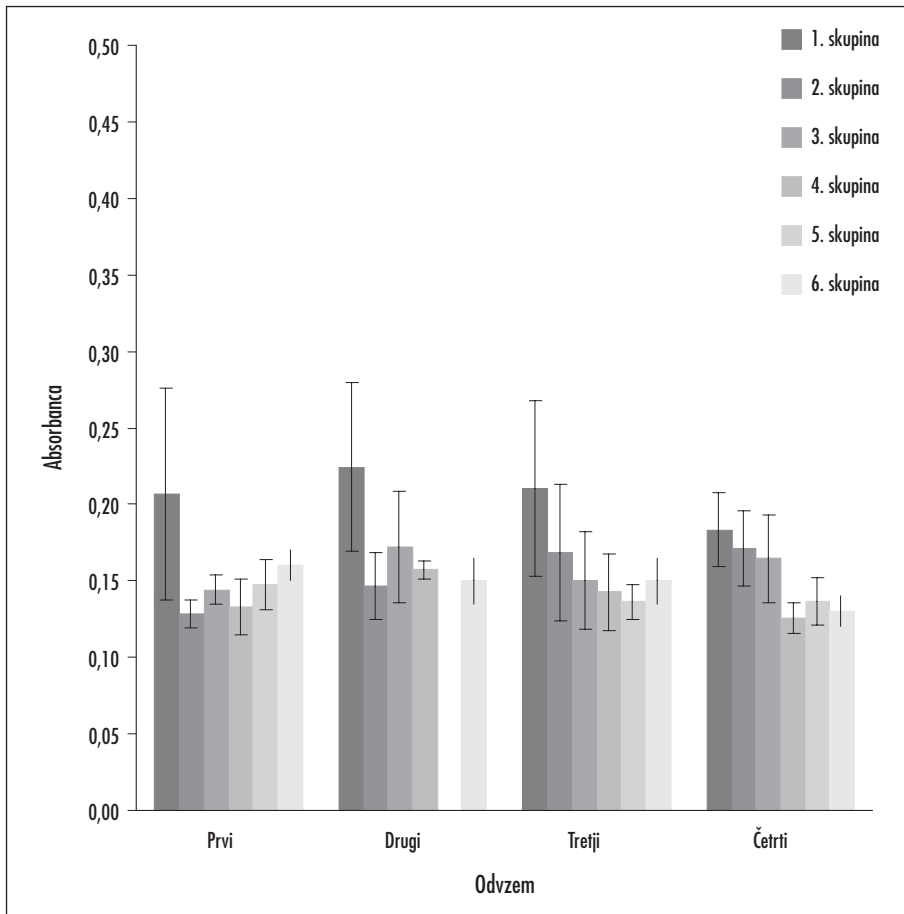
Protitelesa IgG

Specifičnih protiteles imunoglobulinskega razreda G proti bakteriji *Streptococcus pneumoniae* je bilo največ ob drugem odvzemu, to je 17. dan po imunizaciji (slika 6). Tik pred okužbo s sluznim sevom pnevmokokov (tretji odvzem) je raven protiteles še vedno visoka in najbolj značilna za spremembe, povzročene s splenektomijo. Tako ima odstranitev vranice teden dni pred imunizacijo (4. skupina) za posledico zelo šibko sintezo specifičnih protiteles. Največ protiteles najdemo pri miškah, ki niso bile splenektomirane, cepivo pa so dobile 10 dni pred prvim odvzemom krvi

(1. skupina). Iz prikazanih meritev se dozdeva, da je imunizacija tik pred in 1 dan po splenektomiji bolj učinkovita od imunizacije 7 dni po njej.

Pri prvih treh odvzemih, med prvo in vsemi ostalimi skupinami splenektomiranih miši, ne najdemo statistično značilne razlike ($p > 0,05$). Razlika se pokaže pri četrtem odvzemu pri primerjavi prve in druge skupine z ostalimi skupinami splenektomiranih miši ($p < 0,05$).

Če primerjamo rezultate iz slik dinamike IgG in IgM (sliki 5 in 6), lahko zaključimo, da izmerjene vrednosti potrjujejo našo hipotezo, da je najustreznejši čas imunizacije ob



Slika 6. Dinamika spreminjanja množine specifičnih protiteles IgG proti antigenom pnevmokokov. Prvi odvzem – 10 dni po imunizaciji; Drugi odvzem – 17 dni po imunizaciji; tretji odvzem – 4 dni pred okužbo s pnevmokoki; Četrti odvzem – 14 dni po okužbi. 1. skupina – imunizirane nesplenektomirane miške; 2. skupina – miške, imunizirane tik pred splenektomijo; 3. skupina – miške, imunizirane 1 dan po splenektomiji; 4. skupina – miške, imunizirane 7 dni po splenektomiji; 5. skupina – splenektomirane neimunizirane miške; 6. skupina – zdrave miške.

splenektomiji tik pred ali 1 dan po posegu (2. in 3. skupina).

Nadzorovana okužba mišk s pnevmokoki

Vse miške smo v ob istem času okužili z enako količino pnevmokokov. Miškam smo vbrizgali intraperitonealno 50 μ l kužila z 250 CFU pnevmokokov.

V štiriurnih intervalih smo nato spremljali spremembo njihovega počutja in njihovo poginjanje. Opazovali smo jih 7 dni (168 ur). Večina mišk je poginila v 60 urah, tiste, ki so

preživele, pa 2 meseca po koncu opisanih poskusov še živijo.

V skupini imuniziranih nesplenektomiranih mišk in mišk, imuniziranih tik pred splenektomijo ni poginila nobena miška. Največ mišk (štiri) je poginilo v skupini splenektomiranih mišk, imuniziranih 7 dni po operaciji in v skupini zdravih, neimuniziranih in nesplenektomiranih mišk. V povprečju so miške iz teh dveh skupin poginile 53 ur po okužbi. Po dve miški sta poginili v skupini splenektomiranih mišk, imuniziranih 1 dan po operaciji (v povprečju sta poginili 66 ur po okužbi) in v skupini splenektomiranih neimu-

Tabela 2. Nadzorovana okužba mišk s pnevmokoki. 1. skupina – imunizirane nesplenektomirane miške; 2. skupina – miške, imunizirane tik pred splenektomijo; 3. skupina – miške, imunizirane 1 dan po splenektomiji; 4. skupina – miške, imunizirane 7 dni po splenektomiji; 5. skupina – splenektomirane neimunizirane miške; 6. skupina – zdrave miške; \bar{x} – povprečna vrednost.

Skupina	Čas imunizacije	Število poginulih mišk	Število ur od okužbe do pogina
1. skupina	brez splenektomije	0	/
2. skupina	tik pred splenektomijo	0	/
3. skupina	1 dan po splenektomiji	2	56/76 (\bar{x} = 66)
4. skupina	7 dni po splenektomiji	4	33/36/68/76 (\bar{x} = 53,25)
5. skupina	brez imunizacije	2	60/60 (\bar{x} = 60)
6. skupina	zdrave miške	4	52/52/52/55 (\bar{x} = 53,5)

niziranih mišk (v povprečju sta poginili 60 ur po okužbi) (tabela 2).

RAZPRAVLJANJE

Namen naše raziskave je bil ugotoviti, ali imunizacija sproži sintezo specifičnih protiteles in ali splenektomija zmanjša zmožnost te sinteze, ter kakšen je vpliv časa med splenektomijo in imunizacijo na zmanjšanje zmožnosti sinteze specifičnih protiteles. Merili smo množino sintetiziranih specifičnih protiteles proti antigenom pnevmokoknega cepiva Pneumo 23® in zaščitno moč, ki jo ta protitelesa dajejo organizmu, ko je izpostavljen okužbi s *Streptococcus pneumoniae*.

● živalih in metodah dela

Živali

Na zastavljena vprašanja smo poskušali odgovoriti s prospektivno raziskavo, ki smo jo izvedli na živalskem modelu. V raziskavo je bilo vključenih šest skupin po 5 mišk.

Miške, ki so bile iz istega gnezda seva BALB/c, so bile nastanjene v kletkah po 5. V kletki so se igrale in včasih tudi spopadle. Medsebojno nerazumevanje so kazale predvsem po okužbi, ko se slabo počutile. Miške iz tretje skupine so se v kletki med seboj tudi pogrizle, kar bi lahko razložilo, zakaj so v tej skupini, ki je imela sicer veliko množino protiteles, tri od petih mišk po pnevmokokni okužbi poginilo. Možno namreč je, da je poleg okužbe s pnevmokoki prišlo še do dodatne okužbe, proti kateri niso bile zaščitene in je zato ta bila zanje usodna (18, 30, 32).

Zaradi moralnih načel smo v raziskavo vključili minimalno število mišk. Zaradi majh-

nega števila preiskovancev je bilo težko izbrati primerne statistične metode. Smiselno bi bilo v prihodnje raziskavo razširiti na večje skupine. Zanimivo bi bilo tudi proučiti razlike med različnimi sevi mišk ali pa raziskavo izvesti še na drugih živalih (45, 46).

Splenektomija

Pred začetkom raziskave nas je najbolj skrbelo, kako bodo miške preživele operacijo. Nikjer v literaturi ni bilo opisane zanesljive tehnike anestezije in splenektomije mišk. Prav tako smo bili omejeni na prostor in razmere, v katerih so operacije potekale.

Ob pazljivem delu in izpopolnjeno minimalno invazivno tehniko splenektomije, so miške operacijo zelo dobro prenesle. Že nekaj minut po operaciji, so se zbudile iz anestezije (37, 38), in se samostojno sprehajale po kletki. Zaradi operacije nam ni poginila niti ena od živali. Pooperacijske bolečine smo jim lajšali s paracetamolom (42). Tretji dan po operaciji so bile miške že popolnoma zdrave in so se vedle povsem običajno.

Določanje množine protiteles

Za določevanje množine sintetiziranih specifičnih protiteles v krvnem serumu mišk smo uporabili dve metodi: metodo ELISA za določevanje specifičnih protiteles IgM in IgG ter metodo mikroprecipitacije v kapilari za določevanje množine precipitacijskih protiteles (13, 43).

ELISA je zelo zanesljiva in natančna metoda, ki zazna že zelo majhno množino prisotnih protiteles. Vendar pa je hkrati tudi zelo občutljiva in se lahko zgodi, da na rezultate vpivajo še drugi dejavniki. Da bi te čimbolj

odstranili, smo uporabili posebne mikrotitr-ske plošče, prevlečene s podlago, na katero se specifično vežejo polisaharidni antigeni. Tako smo v vzorcih resnično določili le protitelesa proti antigenom v pnevmokoknem cepivu.

Metoda mikroprecipitacije v kapilari je hitra, vendar manj natančna metoda kot ELISA (43). Z njo lahko množino protiteles v vzorcih določimo z opazovanjem s prostim očesom, kar ima prednosti in pomanjkljivosti. Glavna slabost je, da je ocenjevanje rezultatov subjektivno.

● rezultatih

Protitelesa IgM

Protitelesa IgM so zgodnja protitelesa, ki se po okužbi pojavijo prva in tudi prva izginejo (6, 7, 10, 14). Ta pojav smo opazili tudi v naši raziskavi. Dobro je bil namreč viden padec v množini specifičnih protiteles IgM pri vseh skupinah mišk od drugega do četrtega odvzema (29, 45).

V nasprotju s podatki iz literature (29) smo našli razliko v množini sintetiziranih protiteles IgM med kontrolno skupino (skupina 1 – nesplenektomirane imunizirane miške) in splenektomiranimi skupinami miši. Skupina nesplenektomiranih mišk je sintetizirala mnogo večjo množino protiteles od splenektomiranih mišk. Med skupino 1 in vsemi ostalimi skupinami smo s t-testom dokazali tudi statistično značilno razliko ($p < 0,05$), ki je drugi avtorji v svojih poskusih niso mogli dokazati.

Protitelesa IgG

Podobno, kot za protitelesa IgM, tudi za IgG v literaturi poročajo o majhni razliki v sintezi specifičnih protiteles med nesplenektomiranimi in splenektomiranimi miškami (29, 45). Tudi v naši raziskavi smo prišli do podobnih rezultatov. Imunizirane nesplenektomirane miške so sintetizirale večjo množino specifičnih protiteles IgG proti pnevmokoknim antigenom v primerjavi z ostalimi miškami, ki smo jim odstranili vranico, vendar pa so bile razlike tako majhne, da jih pri prvih treh odvzemih statistično nismo mogli dokazati ($p > 0,05$).

Do zanimivega rezultata smo prišli ob analiziranju vzorcev, pridobljenih ob četrtem

odvzemu. Tu namreč nismo našli signifikantne razlike med prvo in drugo skupino miši, torej med imuniziranimi nesplenektomiranimi miškami in miškami, splenektomiranimi in imuniziranimi tik pred operacijo ($p > 0,05$). Razliko v množini protiteles pa smo našli ob primerjavi prve skupine z vsemi ostalimi (razen z drugo) in druge skupine z vsemi ostalimi (razen s prvo) ($p < 0,05$). Povzamemo lahko torej, da imunizacija tik pred splenektomijo operiranca zaščiti tako, da lahko njegov imunski odziv primerjamo z odzivom pri preiskovanecu z vranico.

Prvi odvzem krvi

Miškam smo kri prvič odvzeli 10 dni po imunizaciji s pnevmokoknim cepivom Pneumo 23[®]. Z encimsko-immunskim testom smo merili množino protiteles imunoglobulinskega razreda IgM in IgG, z metodo mikroprecipitacije v kapilari pa množino precipitacijskih protiteles. Pričakovali smo, da se je v teh desetih dneh med cepljenjem in odvzemom pri miškah razvil primarni imunski odziv (7, 10).

Rezultati so pokazali, da je prišlo pri vseh skupinah mišk do sinteze specifičnih protiteles IgG in IgM, pri tem pa je bila množina sintetiziranih IgM večja od IgG (29, 45). Pri miškah je res prišlo do razvoja primarnega imunskega odziva, ki ga zaznamuje sinteza velike množine zgodnjih protiteles IgM (10).

Drugi odvzem krvi

Drugič smo miškam vzeli kri 7 dni po prvem odvzemu, torej 17 dni po imunizaciji s pnevmokoknim cepivom. Pričakovali smo, da bo pri miškah v 17 dneh množina protiteles dosegla vrhunec, ki je značilen za primarni imunski odziv (10).

Množina specifičnih protiteles IgM je zrasla na svojo maksimalno vrednost (29, 45). Hkrati z njimi pa se je večala tudi množina specifičnih protiteles IgG. Razlika v sintezi med skupino nesplenektomiranih imuniziranih miši in ostalimi skupinami splenektomiranih mišk je bila iz rezultatov dobro vidna. Med njimi smo lahko dokazali statistično značilno razliko ($p < 0,05$).

Tretji odvzem krvi

Štiri dni pred nadzorovano okužbo s pnevmokoki smo miškam tretjič odvzeli kri. Pri

vseh skupinah mišk je od drugega cepljenja preteklo več kot mesec dni. Zato smo predpostavljali, da je porast množine protiteles, nastalih zaradi cepljenja, v krvnem serumu dokončen, torej se s časom ne bo več spremenjal (10). Izmerjena množina protiteles naj bi bila merilo za zaščitno vlogo protiteles pri okužbi z živimi pnevmokoki (7).

Z metodo mikroprecipitacije v kapilari smo pri tretjem odvzemu v krvnem serumu mišk pri vseh skupinah dokazali največjo množino protiteles. Na to povečanje je imelo največji vpliv povečanje množine protiteles IgG, saj se je množina protiteles IgM, kot je značilno za primarni imunski odziv, zmanjšala (slika 5) (10). Od imunizacije do tretjega odvzema je namreč minilo že več kot mesec dni. To pa je čas, v katerem je preklon sinteze protiteles IgM v IgG skoraj končan. Posledično se zmanjša množina protiteles IgM in zveča množina IgG (10, 14, 29, 30, 45).

Četrty odzvem krvi

Štirinajst dni po okužbi mišk z živimi pnevmokoki smo preživelim miškam vzeli vzorce krvi četrtič. Protitelesa so miške uspešno zaščitila pred okužbo (7, 18), nas pa je zanimalo, ali se je kaj spremenila njihova množina.

V serumu smo našli zmanjšano množino specifičnih IgG, IgM in precipitacijskih protiteles v primerjavi z množino, izmerjeno štiri dni pred okužbo. Zmanjšanje lahko razložimo z dejstvom, da so preživele miške za svojo obrambo pred okužbo porabile zaščitna protitelesa, ki so jih sintetizirale zaradi imunizacije. Ker od okužbe do odvzema krvi še ni minilo dovolj časa, da bi se sintetizirala nova, je zmanjšanje množine razumljivo (43).

Nadzorovana okužba mišk

Rezultate, pridobljene z metodama ELISA in mikroprecipitacijo v kapilari, smo potrdili z nadzorovano okužbo mišk s sluznim sevom bakterije *Streptococcus pneumoniae*.

Količina sintetiziranih specifičnih protiteles proti antigenom pnevmokokov po imunizaciji s cepivom Pneumo 23® je pokazatelj zmožnosti obrambe posamezne miške pred okužbo (7, 10). Okužbo so preživele vse imunizirane nesplenektomirane miške in miške, splenektomirane in imunizirane tik pred

operacijo. Ti dve skupini mišk sta imeli tudi največji množini protiteles. Navkljub veliki množini zaščitnih protiteles pri splenektomiranih miškah, imuniziranih 1 dan po operaciji, pa sta dve miški iz te skupine poginili. Žal sta se ti dve miški že pred samo okužbo v kletki medseboj pogrizli, kar je verjetno privedlo do dodatne okužbe, ki je bila zanju usodna. V skupini splenektomiranih mišk, imuniziranih 7 dni po operaciji, je umrlo enako število živali kot v skupini neimuniziranih nesplenektomiranih mišk. Ti dve skupini sta imeli tudi najmanjši množini specifičnih protiteles, torej najmanjšo možnost uspešne obrambe.

Ugotovitve

Po obdelavi vseh dobljenih podatkov in njihovi razlagi lahko zaključimo, da je najbolj ustrezna imunizacija tik pred odstranitvijo vranice ali 1 dan po njej.

To je v nasprotju s trditvami nekaterih avtorjev, ki v svojih študijah predstavljajo rezultate, ki kažejo, da je najustreznejše cepljenje 7 ali celo 14 dni po splenektomiji (29, 30, 45).

Naši rezultati so pokazali, da je imunizacija 7 dni po splenektomiji za operirane miške pravzaprav brez pomena, saj se pri njih ne razvije dovoljšen imunski odziv, tisti, ki pa se razvije pa je primerljiv s tistim, ki ga razvijejo miške, ki jih sploh ne cepimo.

ZAKLJUČKI

Imunizacija s cepivom proti pnevmokokom sproži sintezo specifičnih protiteles proti streptokoknim antigenom, splenektomija pa zmanjša zmožnost te sinteze. Vpliv splenektomije na zmanjšanje zmožnosti sinteze specifičnih protiteles je pogojen s časom, ki je minil med splenektomijo in imunizacijo.

Rezultati predstavljene študije potrjujejo hipotezo, da je za operirane miške najugodnejši čas imunizacije s pnevmokoknim cepivom tik pred ali 1 dan po splenektomiji. Imunizacija v tem času omogoči nastanek ustreznega imunskega odziva in sintezo specifičnih obrambnih protiteles IgG in IgM proti antigenom pnevmokoknega cepiva. Imunizirane splenektomirane miške imajo dovolj močno obrambo da lahko omejijo okužbo s sluzno obliko bakterije *Streptococcus pneumoniae* in jo brez posledic prebolijo.

ZAHVALA

Za pomoč in koristne nasvete pri izdelavi raziskovalne naloge se zahvaljujem mentorjema prof. dr. Vladimirju Kotniku, dr. med., in prof. dr. Andreju Baragi, dr. med., Tadeju

Malovrhu, dr. vet. med., za požrtvovalno pomoč pri delu z miškami, asist. dr. Katji Seme, dr. med., za sluzni sev *Streptococcus pneumoniae*, dr. Srdjanu Novakoviću, univ. dipl. biol., za nasvete pri anesteziji in Vesni Tlaker Žunter za jezikovni pregled naloge.

LITERATURA

- Gadžijev E. Vranica. In: Smrkolj V, ed. *Kirurgija*. Ljubljana: Sledi; 1995. pp. 408–10.
- Kališnik M. Limfatični sistem. In: Kališnik M. *Oris histologije z embriologijo*. 2nd ed. Ljubljana: Uredništvo »Acta stereologica«: Državna založba Slovenije; 1990. pp. 182–93.
- Cohn DA, Schiffman G. Immunoregulatory role of the spleen in antibody responses to pneumococcal polysaccharide antigens. *Infect Immun* 1987; 55: 1375–80.
- Wara DW. Host defence against *Streptococcus pneumoniae*: The role of the spleen. *Rev Infect Dis* 1981; 3: 299–309.
- Levinson W, Jawetz E. Complement. In: Levinson W, Jawetz E, eds. *Medical Microbiology & Immunology*. 5th ed. Stamford: Appleton & Lange; 1998. pp. 354–7.
- Kotnik V. Komplementni sistem. In: Kotnik V, ed. *Imunologija priročnik za vaje*. Ljubljana: Medicinska fakulteta; 1996. pp. 51–63.
- Levinson W, Jawetz E. Immunity. In: Levinson W, Jawetz E, eds. *Medical Microbiology & Immunology*. 5th ed. Stamford: Appleton & Lange; 1998. pp. 314–21.
- Levinson W, Jawetz E. Cellular Basis of the Immune Response. In: Levinson W, Jawetz E, eds. *Medical Microbiology & Immunology*. 5th ed. Stamford: Appleton & Lange; 1998. pp. 321–37.
- Levinson W, Jawetz E. Cell-Mediated Immunity. In: Levinson W, Jawetz E, eds. *Medical Microbiology & Immunology*. 5th ed. Stamford: Appleton & Lange; 1998. pp. 348–9.
- Levinson W, Jawetz E. Humoral Immunity. In: Levinson W, Jawetz E, eds. *Medical Microbiology & Immunology*. 5th ed. Stamford: Appleton & Lange; 1998. pp. 346–7.
- Ihan A. Imunski sistem in celice imunskega odziva. In: Kotnik V, ed. *Imunologija priročnik za vaje*. Ljubljana: Medicinska fakulteta; 1996. pp. 1–14.
- Levinson W, Jawetz E. Major Histocompatibility Complex & Transplantation. In: Levinson W, Jawetz E, eds. *Medical Microbiology & Immunology*. 5th ed. Stamford: Appleton & Lange; 1998. pp. 350–4.
- Dragaš AZ. Reakcije med antigeni in protitelesi. In: Dragaš AZ, ed. *Praktikum iz mikrobiologije in imunologije*. Ljubljana: Medicinska fakulteta; 1995. pp. 29–33.
- Levinson W, Jawetz E. Antibodies. In: Levinson W, Jawetz E, eds. *Medical Microbiology & Immunology*. 5th ed. Stamford: Appleton & Lange; 1998. pp. 337–46.
- Gram-Positive cocci. In: Levinson W, Jawetz E, eds. *Medical Microbiology & Immunology*. 5th ed. Stamford: Appleton & Lange; 1998. pp. 81–6.
- Whitnack E, Barg NL. Streptococci. In: Schaechter M, Engleberg NC, Eisenstein BI, Medoff G, eds. *Mechanisms of Microbial Disease*. 3rd ed. Baltimore: Williams & Wilkins; 1998. pp. 143–52.
- Storch GA. Pneumococcus and Bacterial Pneumonia. In: Schaechter M, Engleberg NC, Eisenstein BI, Medoff G, eds. *Mechanisms of Microbial Disease*. 3rd ed. Baltimore: Williams & Wilkins; 1998. pp. 153–60.
- Marolt-Gomišček M. Streptokokne okužbe. In: Marolt-Gomišček M, Radšel-Medvešček A, eds. *Infekcijske bolezni*. Ljubljana: Tangram; 1992. pp. 1–19.
- Reinert RR, Buessing A, Kierdorf H, Kuehnemund O, Kaufhold A. Recurrent Systemic Pneumococcal Infection in an Immunocompromised Patient. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1994; 13: 304–7.
- Shapiro ED, Berg AT, Austrian R, Schroeder D, Parcells V, Margolis A, et al. The protective efficacy of polyvalent pneumococcal polysaccharide vaccine. *N Engl J Med* 1991; 325: 1453–60.
- Butler JC, Breiman RF, Campbell JF, Lipman HB, Broome CV, Facklam RR. Pneumococcal polysaccharide vaccine efficacy: an evaluation of current recommendations. *JAMA* 1993; 270: 1826–31.
- Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices. Prevention of pneumococcal disease. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 1997; 46: 1–24.
- Siddins M, Downie J, Wise K, Oreilly M. Prophylaxis against postsplenectomy pneumococcal infection. *Aust N Z J Surg* 1990; 60: 183–7.
- Kinnersley P, Wilkinson CE, Srinivasan J. Pneumococcal vaccination after splenectomy: survey of hospital and primary care records. *BMJ* 1993; 307: 1398–9.
- Fedson DS. Adult immunization: Summary of the National Vaccine Advisory Committee Report. *JAMA* 1994; 272: 1133.
- Bryn GAW, van Furth R. Pneumococcal polysaccharide vaccines: indications, efficacy and recommendations. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1991; 10: 897–910.

27. Reinert RR, Kaufhold A, Kuehnemund O, Luetticken R. Serum Antibody Responses to Vaccination with 23-valent Pneumococcal Vaccine in Splenectomized Patients. *Zbl Bakt* 1994; 282: 481-90.
28. Shetty N, Aurora P, Ridgway GL. Failure of Anti-pneumococcal Vaccine and Prophylactic Penicillin in a Splenectomized Patient. *Journal of Infection* 1998; 37: 87-8.
29. Aaberge IS, Heier HE. Long term effect of pneumococcal polysaccharide vaccination on serum IgM and IgG antibody levels in individuals splenectomized for trauma. *Acta Path Microbiol Immunol Scand Sect C* 1984; 92: 363-9.
30. Aaberge IS, Lovik M. The antibody response to secondary immunization with pneumococcal polysaccharides in mice. *Scand J Immunol* 1995; 42: 617-25.
31. Caplan ES, Boltansky H, Snyder MJ, et al. Response of traumatized splenectomized patients to immediate vaccination with polyvalent pneumococcal vaccine. *J Trauma* 1983; 23: 801-5.
32. Aaberge IS, Lovik M. The antibody response after immunization with pneumococcal polysaccharide vaccine in splenectomized mice: the effect of re-immunization with pneumococcal antigens. *APMIS* 1996; 104: 307-17.
33. Konradsen HB, Henrichsen J. Pneumococcal infections in splenectomized children are preventable. *Acta Paediatr Scand* 1991; 80: 423-7.
34. Rutherford EJ, Livengood J, Higginbotham M, Miles WS, Koestner J, Edwards KM, et al. Efficacy and Safety of Pneumococcal Revaccination after Splenectomy for Trauma. *Journal of Trauma: Injury, Infection and Critical Care* 1995; 39: 448-52.
35. Smrkolj V. *Praktikum ambulantne kirurgije*. Ljubljana: Državna založba Slovenije; 1991.
36. Dragaš AZ. Mikroorganizmi v okolju. In: Dragaš AZ, ed. *Praktikum iz mikrobiologije in imunologije*. Ljubljana: Medicinska fakulteta; 1995. pp. 7-13.
37. Rang HP, Dale MM, Ritter JM. General anaesthetic agents. In: Rang HP, Dale MM, Ritter JM, eds. *Pharmacology*. New York and Tokyo: W. B. Saunders; 1995. pp. 532-47.
38. Donovan J, Brown P. Anesthesia. In: Coligan JE, Kruisbeek AM, Marguiles DH, Shevach EM, Strober W, eds. *Current Protocols in Immunology. Volume 1*. New York: John Wiley & Sons, Inc.; 1998. pp. 1.4.1-5.
39. Sok M. *Temeljni eksperimentalne kirurgije in poskusov na živalih*. Ljubljana: Založba Podvinski; 1996.
40. Dorland WAN. Splenectomy. In: Dorland WAN, ed. *Dorland's Illustrated Medical Dictionary*. 28th ed. Philadelphia: W. B. Saunders; 1994. pp. 1560-1.
41. Reeves JP, Reeves PA, Chin LT. Survival Surgery: Removal of the Spleen and Thymus. In: Coligan JE, Kruisbeek AM, Marguiles DH, Shevach EM, Strober W, eds. *Current Protocols in Immunology. Volume 1*. New York: John Wiley & Sons, Inc.; 1995. pp. 1.10.1-11.
42. Rang HP, Dale MM, Ritter JM. Analgesic drugs. In: Rang HP, Dale MM, Ritter JM, eds. *Pharmacology*. New York and Tokyo: W. B. Saunders; 1995. pp. 609-33.
43. Simčič S. Uporaba imunoloških metod pri spoznavi bolezni. In: Kotnik V, ed. *Imunologija priročnik za vaje*. Ljubljana: Medicinska fakulteta; 1996. pp. 33-49.
44. Aaberge IS, Eng J, Lemark G, Lovik M. Virulence of *Streptococcus pneumoniae* in mice: a standardized method for preparation and frozen storage of the experimental bacterial inoculum. *Microb Pathog* 1995; 18: 141-52.
45. Shatz DV, Schinsky MF, Pais LB, Romero-Steiner S, Kirton OC, Carlone GM. Immune Responses of Splenectomized Trauma Patients to the 23-Valent Pneumococcal Polysaccharide Vaccine at 1 versus 7 versus 14 days after Splenectomy. *Journal of Trauma: Injury, Infection and Critical Care* 1998; 44: 760-5.
46. Melissas J, Wasas A, Wade AA, Korkozoglou E, Flessas P. Pneumokokkeninduzierte Septikämie bei normalen und bei splenektomierten Kaninchen. *Langenbecks Arch Chir* 1992; 377: 341-4.
47. Kind EA, Craft C, Fowles JB, McCoy CE. Pneumococcal vaccine administration associated with splenectomy: Missed opportunities. *AJIC* 1998; 26: 418-22.

Prispelo 20. 3. 2001