

ABSTRAK, EKSEKUTIF SUMMARY & ARTIKEL ILMIAH  
PENELITIAN FUNDAMENTAL



IMUNISASI INTRANASAL PROTEIN ADHESI PILI *Streptococcus pneumoniae* UNTUK MENINGKATKAN RESPON IMUN MUKOSA DAN MENCEGAH PNEUMONIA MELALUI PENINGKATAN S-IgA

Oleh :

dr. Diana Chusna Mufida, M.Kes ( 0018037204)

dr. Dini Agustina, M.Biomed ( 0001088302)

dr. Yunita Armiyati, M.Kes (0004067405)

UNIVERSITAS JEMBER  
NOVEMBER  
2016

# IMUNISASI INTRANASAL PROTEIN PILI *Streptococcus pneumoniae* 54 kDa MENINGKATKAN EKSPRESI $\beta$ -DEFENSIN-2

Diana Chusna Mufida<sup>1</sup>, Dini Agustina<sup>1</sup>, Yunita Armiyanti<sup>2</sup>, Kusworini Handono<sup>3</sup>, Sumarno Reto Prawiro<sup>4</sup>, Sanarto Santoso<sup>4</sup>

<sup>1</sup> *Laboratory of Microbiology, Faculty of Medicine, University of Jember, Jember Indonesia*

<sup>2</sup> *Laboratory of Parasitology, Faculty of Medicine, University of Jember, Jember Indonesia*

<sup>3</sup> *Laboratory of Patology Clinic, Faculty of Medicine, University Brawijaya, Malang Indonesia*

<sup>4</sup> *Laboratory of Microbiology, Faculty of Medicine, University Brawijaya, Malang Indonesia*

## Abstrak

Infeksi *S. pneumoniae* dapat dicegah dengan pemberian vaksin. Imunisasi dapat menstimulus berbagai indikator respon imun. Pada imunisasi secara intranasal terjadi diferensiasi naive sel T menjadi Th1, Th2, Th17 dan T reg. Th17 menghasilkan berbagai macam sitokin yaitu IL-17, IL-17F, IL-22, IL-26 dan CCL-20. IL-17 dan IL-22 secara bersama-sama menstimulus ekspresi  $\beta$ -defensin-2. Tujuan penelitian ini untuk mengetahui kemampuan protein pili 54 kDa meningkatkan ekspresi  $\beta$ -defensin-2 melalui peningkatan produksi IL-22. Untuk mencapai tujuan tersebut protein pili 54 kDa yang telah dipurifikasi digunakan sebagai Ag imunisasi intranasal tikus Wistar. Respon imun mukosa diidentifikasi dari bilasan hidung tikus Wistar dengan indikator pemeriksaan IL-22, dan  $\beta$ -defensin-2. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa tikus yang diimunisasi dengan Ag +ajuvan mempunyai kadar IL-22, dan  $\beta$ -defensin-2 yang tinggi dibanding kelompok lain. Uji statistik menunjukkan terdapat perbedaan bermakna antara tikus yang diimunisasi Ag+ajuvan dibanding kelompok yang lain. Sehingga dapat disimpulkan bahwa imunisasi intranasal protein pili 54 kDa mampu meningkatkan ekspresi  $\beta$ -defensin-2

Keyword : imunisasi intranasal, protein pili *S. pneumoniae*,  $\beta$ -defensin-2

## Eksekutif Summary

Prevalensi pneumonia pada balita terjadi peningkatan antara tahun 2000 sampai 2010. Jika pada tahun 2000 prevalensi 604.9 juta pada tahun 2010 menjadi 633.5 juta, dan mayoritas peningkatan prevalensi terjadi di negara dengan penghasilan rendah dan menengah (*low and middle income countries/ LMIC*) yaitu 523.3 juta menjadi 547.3 juta dan hanya sedikit di negara maju yaitu 81.6 juta menjadi 86.2 juta. Pneumonia merupakan penyebab kematian balita terbanyak di dunia dan penyebab kematian kedua di Indonesia

Terapi utama pneumonia ditujukan untuk menghilangkan penyebabnya, dengan *Streptococcus pneumoniae* sebagai penyebab terbanyak pneumonia pada balita maupun orang dewasa. Namun saat ini beberapa serotipe *S.pneumoniae* sudah mulai resisten. Upaya untuk mengurangi insidensi maupun mortalitas *pneumococcus pneumonia* adalah dengan pemberian vaksinasi pada balita, orang tua maupun orang dengan faktor resiko. Namun vaksin yang ada saat ini yaitu *pneumococcal polysaccharida vaccine* (PPV) dan *pneumococcal conjugate vaccine*

(PCV. mempunyai kelemahan karena hanya bisa mencegah *pneumococcus pneumoniae* pada serotipe tertentu yang terkandung pada vaksin tersebut.

Saat ini telah dikembangkan vaksin berasal dari faktor virulensi bakteri yang berperan pada adhesi ke sel epitel pejamu. Faktor virulensi tersebut telah digunakan pada vaksin *Bordetella pertussis* yang dikenal dengan *pertactin*. Vaksin pertusis yang mengandung *pertactin* tersebut terbukti lebih efektif dibanding dengan vaksin yang hanya mengandung toksin pertusis dan *filamentous haemagglutinin* (FHA). Penelitian lain menunjukkan bahwa struktur epitop *pertactin* yang berperan dalam meningkatkan imunitas melalui pembentukan antibody adalah struktur yang berperan pada adhesi bakteri ke sel epitel pejamu (Olin *et al.*, 1997., Hijnen *et al.*, 2004). Untuk itu perlu dikembangkan vaksin berbasis protein hemaglutin pili (filament). *S. pneumoniae* mempunyai protein pili dengan berat molekul 54 kDa.

Untuk mengetahui kemampuan protein pili 54 kDa memacu respon imun mukosa, protein pili 54 kDa yang telah dipurifikasi diimunisasikan ke tikus wistar dengan dosis 20 ug + 2 ug CTB sebagai adjuvan. Imunisasi diberikan sebanyak 3 kali dengan interval pemberian 1 minggu. Seminggu setelah imunisasi terakhir hewan coba diterminasi dan dilakukan isolasi bilasan hidung. Respon imun mukosa diidentifikasi dari bilasan hidung tikus Wistar dengan indikator pemeriksaan IL-22,  $\beta$ -defensin-2 dan sIgA.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa tikus yang diimunsasi dengan Ag (protein pili 54 kDa) +adjuvan mempunyai kadar IL-22,  $\beta$ -defensin-2 dan sIgA paling tinggi dibanding kelompok lain. Uji statistik menunjukkan terdapat perbedaan bermakna antara tikus yang diimunsasi Ag+adjuvan dibanding kelompok yang lain (kontrol, adjuvan). Sehingga dapat disimpulkan bahwa protein pili 54 kDa bersifat imunogen dan dapat memacu respon imun mukosa.

## 1. Pendahuluan

*Streptococcus pneumoniae* (*S.pneumoniae*) atau disebut juga *Pneumococcus* merupakan penyebab infeksi saluran pernapasan, sinusitis, *community-acquired pneumonia* (CAP) dan penyakit invasif seperti meningitis (Kim, 2010; Moschioni *et al.*, 2010). *Pneumococcal pneumonia* merupakan infeksi paru dengan angka morbiditas dan mortalitas yang cukup tinggi di negara sedang berkembang (Pletz *et al.*, 2008).

*S. pneumoniae* mempunyai berbagai faktor virulensi yaitu polisakarida kapsul, pili, protein permukaan dan toksin. Faktor virulensi tersebut sangat penting sebagai antifagositik,

faktor adhesi, invasi, transport besi dan logam berat lainnya, proteksi terhadap stress oksidatif, menghasilkan pneumolisin dan pembentukan biofilm (Van der Poll *and* Opal, 2009).

*S. pneumoniae* memiliki 2 tipe pili yang berperan sebagai adhesin. Selain sebagai adhesin, pili tipe 1 berperan memperkuat kolonisasi dan memfasilitasi pembentukan mikrokoloni dan biofilm (Basset *et al*, 2011). Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa *S. pneumoniae* mempunyai pili yang berfungsi sebagai hemagglutinin dengan berat molekul 54 kDa.

Imunisasi secara intranasal, merupakan salah satu imunisasi mukosa, dapat memberikan proteksi di paru dan saluran pernapasan bagian atas terhadap infeksi berbagai patogen. Mukosa nasal merupakan tempat yang sesuai untuk pemberian vaksin terhadap infeksi saluran pernapasan bukan hanya disebabkan karena cavum nasi merupakan tempat masuknya patogen saluran pernapasan, namun juga karena adanya stimulus sistem imun mukosa saluran pernapasan oleh *nasopharyngeal-associated lymphoid tissue* (NALT) (Xu *et al*, 2014).

Imunisasi intranasal meningkatkan ekspresi IL-17 telah diteliti oleh Zymunt, *et al*. (2009). Pada penelitian tersebut, menunjukkan bahwa imunisasi intranasal meningkatkan ekspresi CCR6 pada permukaan sel T CD4<sup>+</sup>. CCR6 merupakan penanda untuk Th17 (Jaffar *et al*, 2009). Th 17 menghasilkan beberapa sitokin, diantaranya IL-17 dan IL-22 (Korn *et al*, 2009). IL-17 dan IL-22 bekerja secara sinergi menginduksi sel epitel saluran pernapasan untuk menghasilkan antimikroba antara lain  $\beta$ -defensin-2 (Khader *et al*, 2009). Berdasar latar belakang tersebut, tujuan penelitian ini adalah mengetahui kemampuan imunisasi intranasal protein pili 54 kDa menstimulus produksi  $\beta$ -defensin-2.

## **2. Metode**

### **2.1. Isolasi Pili**

Bakteri yang telah dikultur pada media TCG, ditampung di tabung 100 ml, ditambah TCA sehingga konsentrasi 3% dan dikocok selama 30 menit dan dibiarkan dalam suhu kamar

selama 1 jam, kemudian disentrifus pada suhu 4°C 6000 rpm selama 30 menit. Endapan bakteri sebanyak 3 g disuspensi dengan 6 ml PBS pH 7.4 kemudian diletakkan dalam tabung pemotong pili. Pili bakteri dipotong menggunakan *bacterial pili cutter* dengan kecepatan 5000 rpm suhu 4°C selama 30 detik. Sampel kemudian disentrifus dengan kecepatan 12000 rpm selama 15 menit. Supernatan dipisahkan dan endapan disuspensi dengan PBS pH7.4 secukupnya, kemudian dilakukan pemotongan pili. Proses ini diulang sebanyak 4-7 kali dan diperoleh supernatan yang mengandung protein pili dan endapan yang merupakan bagian sel bakteri. Potongan pili tersebut selanjutnya dikonfirmasi menggunakan mikroskop elektron (Sumarno *et al*, 2011).

## **2.2 SDS-PAGE Protein Pili *S. pneumoniae***

Untuk mengetahui berat molekul protein pili dilakukan *SDS-PAGE* menggunakan *Separating Gel* 12% (akril/ bis akril 40%, 1,5 M Tris HCl pH 8,8 , 10% SDS, H<sub>2</sub>O steril, 10% APS dan TEMED) (b/v) dan *Stacking Gel* 4% (akril/ bis akril 40%, 0,5 M Tris HCl pH 6,8 , 10% SDS, H<sub>2</sub>O steril, 10% APS dan TEMED) (b/v). Sampel protein sebelum dimasukkan ke dalam sumuran gel, diberi buffer yang mengandung 62.5 mM Tris-HCl (pH 6.8), 10% glycerol, and 0.001% bromophenol blue with 5% (v/v) mercaptoethanol dipanaskan selama 5 menit. Sebanyak 20 µl sampel protein dimasukkan kedalam sumuran gel. Elektroforesis dilakukan selama 60 menit, 125 Volt, pada suhu ruang dalam buffer elektroda pH 8,3. Selanjutnya dilakukan pewarnaan gel menggunakan *coomassie brilliant blue* selama 30 menit dan dilanjutkan *destaining* (Sumarno *et al.*, 2011)

## **2.3. Pili protein purification**

Protein pili dilakukan purifikasi dengan elektroelusi. Pita gel hasil elektroforesis berat molekul 54 kDa protein pili dipotong. Potongan pita diletakkan pada membran selulosa dan di running dengan buffer elektroforesis. Elektroelusi menggunakan elektroforesis horizontal a dengan voltase selama 25 menit. Hasil elektroelusi selanjutnya dilakukan dialisis menggunakan PBS selama 2x 24 jam pada suhu 4°C. Protein hasil purifikasi disimpan dalam suhu -20°C.

## 2.4 Imunisasi

Tikus wistar usia 12-16 mgg, dibagi menjadi 4 kelompok masing masing kelompok terdiri dari 7 ekor. Tikus kontrol diimunisasi secara intranasal dengan PBS sebanyak 40 $\mu$ L, kelompok perlakuan 1 diimunisasi 40  $\mu$ L PBS yang mengandung ajuvan saja yaitu 2 $\mu$ g CTB (cholera toxin B), kelompok perlakuan 2 diimunisasi dengan antigen saja (protein pili 54 kDa) dan kelompok perlakuan 3 diimunisasi dengan 40 uL PBS yang mengandung Ag + ajuvan. Imunisasi diberikan secara intranasal sebanyak 20  $\mu$ L per lubang hidung. Semua tikus diimunisasi pada hari ke -0, 7 dan 14. Satu minggu setelah imunisasi terakhir dilakukan isolasi bilasan hidung (Malley *et al.*, 2006; Cai *et al.*, 2013).

## 2.5 Isolasi Sampel

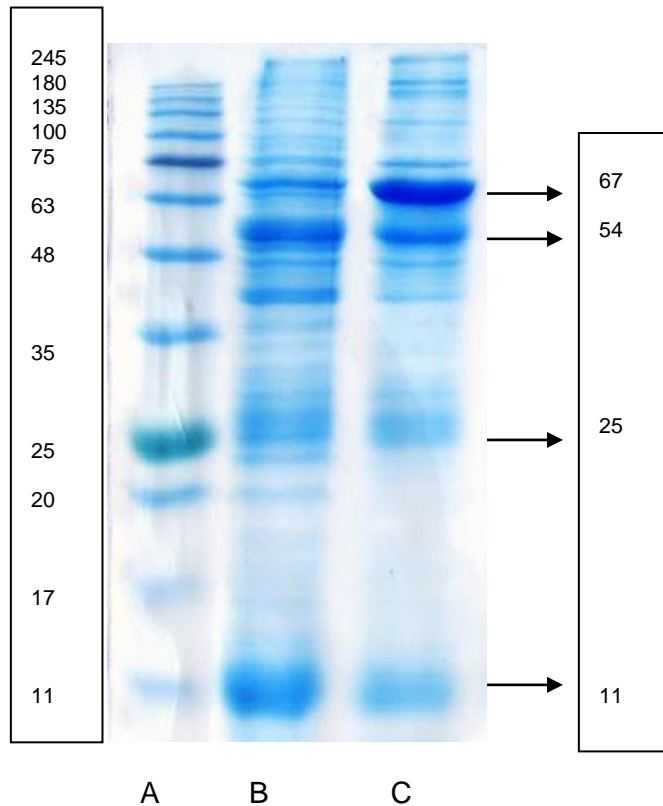
Satu minggu setelah imunisasi terakhir, hewan coba di anestesi dengan eter, setelah itu hewan coba dimatikan dengan *decapitation*. Isolasi bilasan hidung dilakukan secara *retrograde* dengan memasukkan 1-2 ml larutan saline steril melalui trachea dan tetesan larutan salin lewat lubang hidung ditampung ke eppendof steril (Oros-Pantoja *et al.*, 2011).

## 2.6 Pengukuran Kadar IL-22 dan Defensin Bilasan Hidung

Konsentrasi IL- 22 dan  $\beta$ -defensin-2 bilasan hidung, diukur dengan menggunakan kit ELISA komersial untuk IL- 22 dan  $\beta$ -defensin-2, sesuai dengan prosedur pabrik (BT-Laboratory cat No E1334 Ra dan cat No E. Sampel dimasukkan ke dalam well selanjutnya ditambah dengan 10  $\mu$ L antibody terhadap IL-22 atau  $\beta$ -defensin-2 sesuai dengan tujuan pengukuran. Setelah itu ditambah 50 10  $\mu$ L streptavidin HRP lalu dikocok dan diinkubasi selama 1 jam t 37°C. Setelah 1 jam *plate* dicuci dengan *washing solution* dan ditambah dengan 50  $\mu$ L larutan substrat A dan 50  $\mu$ L larutan substrat B, diinkubasi selama 10 menit lalu diberi dengan 50  $\mu$ L stop solution. Ekspresi warna yang terlihat diukur OD larutan pada  $\lambda=450$ nm menggunakan *ELISA reader*.

### 3. Hasil Penelitian

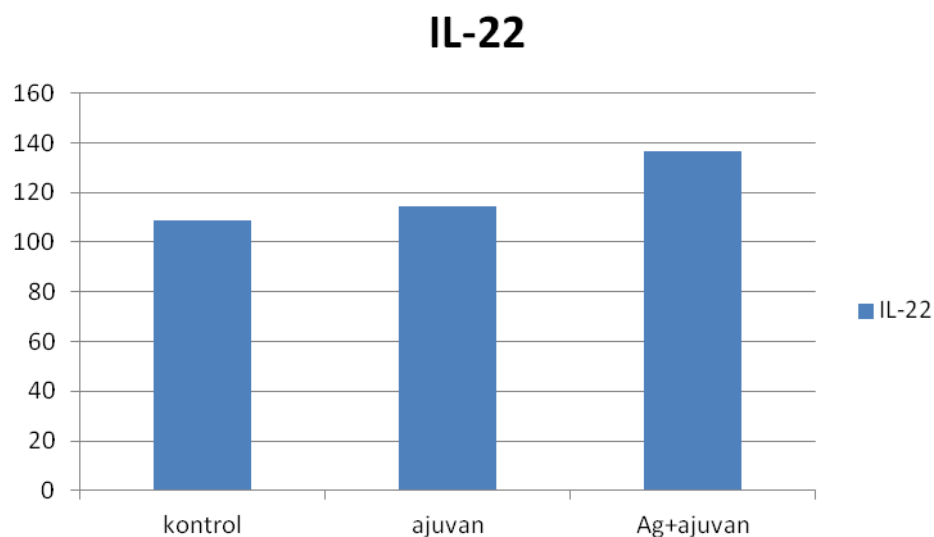
*S. pneumoniae* yang telah dikultur pada media bifasik BHI yang diperkaya dengan 5% darah domba- TCG dipanen setelah 2X24 jam dan dilakukan pemotongan pili sampai warna supernatant sama dengan PBS. Untuk mengetahui profil protein pili, hasil potongan pili tersebut dilakukan SDS-PAGE dengan konsentrasi sumuran 12% pewarnaan commasie blue. Hasil SDS-PAGE dapat dilihat bahwa protein pili yang dominan mempunyai berat molekul 67, 54, 25 dan 11 kDa. Protein pili dengan berat molekul 54 kDa dipotong dan dipurifikasi secara elektroelusi dan dilanjutkan dialisis. Hasil purifikasi tersebut selanjutnya digunakan sebagai antigen untuk mengimunisasi hewan coba (tikus).



Gambar 1. SDS-PAGE protein pili *S. pneumoniae* dengan pewarnaan commasie blue  
Keterangan : A). protein marker, B). whole bakteri, C). potongan pili

Hewan coba (tikus Wistar) yang telah diimunisasi secara intranasal dengan berbagai kandungan vaksin yang berbeda, dilakukan isolasi bilasan hidung satu minggu setelah booster

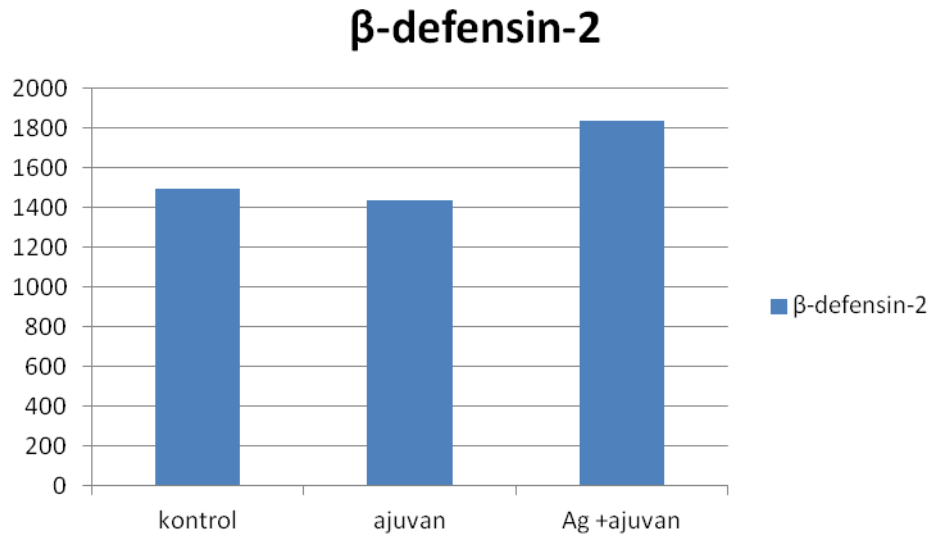
ke-2. Bilasan hidung tersebut, selanjutnya dilakukan penghingan kadar IL-22 dan  $\beta$  defensin-2 secara ELISA. Hasil ELISA dapat dilihat pada Grafik 1 dan 2. Kadar IL-22 yang tertinggi dijumpai pada kelompok hewan coba dengan imunisasi yang mengandung antigen (protein pili 45 kDa) dengan ajuvan dan hasil uji statistik annova menunjukkan perbedaan yang signifikansi antara kelompok yang diimunisasi yang mengandung antigen dan ajuvan dibanding kelompok lainnya, dengan nilai  $p$  0.024 ( $p < 0.05$ ).



Gambar 2. Hasil ELISA IL-22 (ng/L) bilasan hidung tikus kontrol dan perlakuan

Kadar  $\beta$  -defensin-2 yang tertinggi juga terjadi pada kelompok hewan coba yang diimunisasi menggunakan Ag disertai ajuvan (Gambar 3). Hasil uji statistik menunjukkan adanya perbedaan bermakna antara kelompok yang diimunisasi dengan Ag ditambah ajuvan dibanding kelompok yang lain, dengan  $p$  0.03 ( $p < 0.05$ ). Selanjutnya untuk mengetahui ada hubungan antara kenaikan kadar IL-22 dan  $\beta$  -defensin-2 bilasan hidung tikus dilakukan uji korelasi. Hasil uji korelasi menunjukkan tidak ada hubungan yang signifikan secara statistik antara kadar IL-22 dan  $\beta$  -defensin-2 ( $p > 0.05$ ).





Gambar 3. Konsentrasi β-defensin-2 (ng/L) bilasan hidung tikus setelah imunisasi secara intranasal

#### 4. Pembahasan

Keseimbangan antara toleransi dan respon imun baik innate maupun adaptif diatur secara ketat di membran mukosa. Sel epitel saluran napas merupakan pertahanan pertama terhadap patogen dari luar mempunyai kemampuan bertahan secara mekanik dan kimia. Kemampuan bertahan secara mekanik dengan adanya silia yang ada dipermukaan. Secara kimia, sel epitel menghasilkan antimikroba berupa peptida, seperti β-defensin, LL-37, CCL20 serta protein yang besar yaitu lisozim, laktoferin, *secretory leukocyte proteinase* (SLPI) dan musin (Parker and Price ,2011).

Imunisasi mukosal secara intranasal maupun peroral mampu menginduksi ekspresi β-defensin-2. Imunisasi secara intranasal protein hemagglutinin pili *S. pneumoniae* 54 kDa, memicu ekspresi β-defensin -2. Grafik 2, menggambarkan bahwa immunisasi intranasal tikus menggunakan antigen protein pili 54 kDa disertai ajuvan menunjukkan ekspresi β-defensin-2 tertinggi dibanding kelompok lain. Grafik tersebut juga menjelaskan bahwa ajuvan yang digunakan yaitu CTB tidak menginduksi ekspresi β-defensin-2. Hasil tersebut menjelaskan bahwa ajuvan tidak memicu ekspresi β-defensin-2, namun berfungsi sebagai imunostimulator, sehingga repon imun mukosa yang dihasilkan terjadi oleh adanya protein pili 54 kDa.

B-defensin merupakan antimikroba yang penting untuk pertahanan terhadap mikroba yang bersifat patogen di saluran pernapasan. B-defensin pada manusia ada 6 kelas, namun yang diekspresikan di saluran pernapasan hanya  $\beta$ -defensin 1-4.  $\beta$ -defensin-1 secara konstan diekspresikan di epitel, namun  $\beta$ -defensin 2,  $\beta$ -defensin-3,  $\beta$ -defensin-4 diekspresikan dengan induksi oleh berbagai macam patogen baik bakteri, virus maupun jamur. Ekspresi  $\beta$ -defensin-2 diinduksi oleh proinflammatory sitokin TNF dan IL-1 $\beta$ , serta signal TLR2 (Parker and Price ,2011).

Pada manusia  $\beta$  defensin-2 mempunyai aktivitas tinggi sebagai bakterisid bakteri Gram negatif antara lain *Escheria coli*, *Pseudomonas aeruginosa* (LD<sub>90</sub>: 10 $\mu$ g/mL ) serta jamur *Candida albicans* (LD<sub>90</sub>: 25 $\mu$ g/mL). Pada bakteri Gram positif  $\beta$  defensin-2 bersifat bakteristatik terhadap *Staphylococcus aureus* dengan dosis >100 $\mu$ g/mL, sehingga dapat disimpulkan bahwa  $\beta$  defensin-2 lebih poten terhadap bakteri Gram negatif daripada Gram positif (Soto et al, 2007; Cobo and Chadee, 2013). Mekanisme kerja beta defensin-2 sebagai antimikroba melalui beberapa cara yaitu (a) pembentukan lubang di membran mikroorganisme sehingga terjadi kebocoran sel.(b) mengaktifkan enzim dan jalur untuk degradasi dinding bakteri (c) merusak dinding sel (d) mencegah penempelan bakteri ke sel epitel host (e) depolarisasi membran bakteri (Soto et al, 2007).

Selain sebagai antimikroba,  $\beta$  defensin-2 mempunyai fungsi kemotaktif selektif bagi sel yang mengekspresikan CCR6 yaitu iDCs dan sel memori CD4CD45RO. Disamping itu  $\beta$  defensin-2 menginduksi diferensiasi naïve DC menjadi matur DC serta menginduksi DC memproduksi sitokin yaitu IL-1, TNF, IL6 dan IL-12 dan kemokin yaitu IL-8, MDC, IP-10,MIPI- $\alpha$  dan meningkatkan regulasi reseptor CCR7 (Oppenheim et al, 2015).

Pada imunisasi secara intranasal terjadi diferensiasi sel T menjadi Th1, Th2 ,Th17 dan T reg ( Lawson et al, 2011). Th17 akan menghasilkan berbagai macam sitokin yaitu IL-17, IL-17F, IL-22, IL-26 dan CCL-20. IL-17 menginduksi ekspresi  $\beta$ -defensin-2, protein S1000 dan berbagai kemokine antara lain CXCL5, CXCL9, CCL3 dan CCL-20 di epitel saluran napas. IL-22 menginduksi berbagai macam antimikroba di saluran pernapasan, termasuk defensin. IL-17 dan

IL-22 secara sinergis menginduksi produksi  $\beta$ -defensin-2 dan protein S100 (Khader et al, 2009). Ekspresi IL-22 meningkat pada tikus yang diimunisasi dengan protein pili 54 kDa+CTB (Gb 2). Peningkatan ekspresi terjadi karena diferensiasi naïve sel T menjadi sel Th17. Namun walaupun terjadi peningkatan ekspresi IL-22 maupun ekspresi  $\beta$ -defensin-2, pada tikus yang diimunisasi protein pili 54 kDa+CTB secara statistik tidak ada korelasi yang bermakna. Hal tersebut kemungkinan disebabkan karena stimulus untuk meningkatkan ekspresi  $\beta$ -defensin-2, bukan hanya oleh IL-22 tetapi juga IL-17 yang pada penelitian ini tidak diukur. Oleh sebab itu perlunya diteliti lebih lanjut ekspresi IL-17 pada imunisasi intranasal protein pili 54 kDa. Disamping itu juga perlu dilakukan ujiantang dengan menginfeksi tikus yang telah diimunisasi dengan *S. pneumoniae*, yang pada penelitian belum dilakukan, untuk mengetahui efektifitas imunisasi tersebut mencegah infeksi *S. pneumoniae*.

Pada penelitian ini menunjukkan bahwa imunisasi intranasal protein pili *S. pneumoniae* 54 kDa mampu meningkatkan ekspresi IL-22 dan  $\beta$ -defensin-2. Selanjutnya dapat disimpulkan bahwa protein pili *S. pneumoniae* 54 kDa bersifat imunogenik dan mampu memacu respon imun mukosa saluran pernapasan tikus. Untuk selanjutnya perlu dilakukan penelitian respon imun mukosa humoral saluran pernapasan dengan indikator ekspresi sIgA saluran pernapasan.

### **Ucapan Terimakasih**

Terima kasih kami sampaikan kepada MENRISTEKDIKTI yang telah membiayai penelitian ini dengan SPK no: 186j/UN.25.3.1/LT/2016 tanggal 17 Februari 2016

### **Daftar Pustaka**

Basset A., Turner K.H., Boush E., Sayeed S., Dove S.L., and Malley R. 2011. Expression of the type 1 Pneumococcal pilus is bistable and negatively regulated by the structural component RrgA. *Infection and Immunity* **79**(8): 2974-2983

- Cai, Y., Kurita-Ochiai, T., Kobayashi, R., Hashizume, T., Yamamoto, M. 2013. Nasal immunization with the 40 kDa outer membrane protein of *Porphyromonas gingivalis* plus cholera toxin induces protective immunity in aged mice. *Journal of Oral Science* **55**(2): 107—114
- Cobo ER and Chadee K. 2013. Antimicrobial Human  $\beta$ -Defensins in the Colon and Their Role in Infectious and Non-Infectious Diseases. *Pathogens* **2**: 177-192
- Jaffar, Z., Ferrini, M.E., Herritt, L.A., Roberts, K. 2009. Cutting Edge: Lung mucosal Th17-mediated responses induce polymeric immunoglobulin receptor expression by the airway epithelium and elevate secretory IgA levels. *J.Immunol* **182**(8): 4507-4511
- Khadar SA., Gaffen SL and Kolls JK. 2009. Th17 cells at the crossroads of innate and adaptive immunity against infectious diseases at the mucosa. *Mucosal Immunology* **2**(5):403-411
- Kim, K.S. 2010. Acute bacterial meningitis in infants and children. *Lancet Infect. Dis* **10**: 32-42
- Korn, T., Bettelli, E., Oukka, M., Kuchroo, V.K. 2009. IL-17 and Th17 cells. *Annu. Rev. Immunol* **27**: 485-417
- Malley, R., Srivastava, A., Lipsitch, M., Thompson, C.M., Watkins, C., Tzianabos, A., Anderson, P.W. 2006. Antibody-independent, interleukin-17A-mediated, cross-serotype immunity to *Pneumococci* in mice immunized intranasally with cell wall polysaccharide. *Infection and Immunity* **74**(4): 2187-2195.
- Moschioni, M., Emolo, C., Biagini, M., Maccari, S., Pansegrau, W., Donati, C., Hilleringmann, M., Ferlenghi, I., Ruggiero, P., Sinisi, A., Pizza, M., Norais, N., Barocchi, M.A., Masignani, V.2010. The two variants of the *Streptococcus pneumoniae* pilus 1 RrgA adhesin retain the same function and elicit cross-protection in vivo. *Infection and Immunity* **78**(12): 5033-5042
- Oppenheim JJ, Biragyn A, Kwak LW dan Yang D. 2003. Roles of antimicrobial peptides such as defensin in innate and adaptive immunity. *Ann Rheum Dis* **62**: ii17-21
- Oros-Pantoja, R., Jarillo-Luna, A., Rivera-Aguilar, V., Sánchez-Torres, L.E., Godinez-Victoriaa, M., Campos-Rodríguez, R. 2011 Effects of restraint stress on NALT structure and nasal IgA levels. *Immunology Letters* **135**: 78–87
- Parker, D., and Price, A. 2011. Innate immunity in the respiratory epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol* **45** : 189-201
- Pletz, M.W., Maus, U., Krug, N., Welte, T., Lode, H. 2008. Pneumococcal vaccines: mechanism of action, impact on epidemiology and adaptation of the species. *International Journal of Antimicrobial Agents* **32**: 199-206.
- Soto E, Espinoza J, Nien JK, Kusanovic JP, Erez O, Richani K, Santolaya-Forgas J & Romero R.2007. Human  $\beta$  defensin-2: A natural antimicrobial peptide present in amniotic fluid participates in the host response to microbial invasion of the amniotic cavity, *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*, **20**:1, 15-22, DOI: 10.1080/14767050601036212

- Sumarno, Susanto, A., Ismanoe, G., Wienarsih. 2011. Combinations of protein sub-unit pili 37.8 kDa *V. cholerae* with cholera toxin sub-unit B *V. cholerae* can protect come out of the solution in the intestinal mice. *J. Pharm. Biomed. Sci.*, **1**(8) : 154-160
- Van der Poll T., and Opal S.M. 2009. Pathogenesis, treatment, and prevention of pneumococcal pneumonia. *Lancet* **374**:1543 -1556
- Xu, Y., Yuen, P., and Lam, J.K. 2014. Intranasal DNA vaccine for protection against respiratory infectious diseases: the delivery perspectives. *Pharmaceutics* **6**, 378-415
- Zygmunt, B.M., Rharbaoui, F., Groebe, L., Guzman C.A. 2009. Intranasal Immunization Promotes Th17 Immune Responses. *The Journal of Immunology* **183**: 6933– 6938.