

Pengaruh Vaksinasi Interleukin 17-A Terhadap Jumlah Kolonisasi Bakteri pada Organ Paru Mencit Model Lupus Eritematosus Sistemik Pasca Injeksi MRSA (*Methicillin Resistant Staphylococcus aureus*)

The Effects of Interleukin 17-A Vaccination Against Bacterial Colonisation of the Lungs of Mice Post Injection MRSA (*Methicillin Resistant Staphylococcus Aureus*)

Miranthi Ayu Irnanda*, Kusworini Handono**, Iriana Maharani***

ABSTRAK

Lupus eritematosus sistemik merupakan suatu penyakit autoimun yang membahayakan. Berbagai upaya terapi telah dikembangkan untuk membantu mencegah progresivitas penyakit ini. Salah satu terapi yang kini dikembangkan adalah terapi dengan menggunakan vaksin kinoid. Vaksin kinoid merupakan vaksin yang bertujuan untuk menginduksi antibodi yang dapat menetralkan sitokin terkait. Penelitian kali ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian vaksin kinoid IL-17A terhadap kerentanan infeksi bakteri pada organ paru mencit model lupus eritematosus sistemik pasca injeksi MRSA (*Methicillin resistant staphylococcus aureus*). Studi eksperimental menggunakan *post test only group design* dilakukan terhadap hewan coba mencit balb/c jantan. Sampel dipilih dengan cara *proporsional sampling* untuk dibagi dalam empat kelompok yaitu kelompok perlakuan 1 (vaksin (+) MRSA (+)); kelompok perlakuan 2 (vaksin (+) MRSA (-)); kelompok perlakuan 3 (vaksin (-) MRSA (+)) dan kelompok perlakuan 4 (vaksin (-) MRSA (-)). Variabel yang diukur adalah jumlah kolonisasi bakteri pada organ paru pasca injeksi MRSA. Hasil penelitian menunjukkan bahwa terdapat perbedaan jumlah kolonisasi bakteri pada organ paru mencit (Anova, $p=0.028$). Terjadi perubahan yang signifikan antara kelompok perlakuan 2 dengan kelompok perlakuan 4 (*Post hoc tukey*, $p<0.05$). Namun, tidak terbukti terdapat perbedaan yang signifikan antara kelompok perlakuan 2 dengan kelompok perlakuan 1 maupun kelompok perlakuan 3 (*Post hoc tukey*, $p>0.05$). Kesimpulan dari penelitian ini adalah vaksin kinoid IL-17A menurunkan jumlah kolonisasi bakteri komensal *Staphylococcus aureus* pada organ paru mencit balb/c model LES namun belum mampu menurunkan kerentanan infeksi organ paru mencit balb/c model LES terhadap infeksi bakteri MRSA.

Kata Kunci : Lupus eritematosus sistemik, vaksin kinoid IL-17A, MRSA (*Methicillin Resistant Staphylococcus Aureus*)

ABSTRACT

Systemic Lupus Erythematosus is an autoimmune disease which is dangerous. A lot of therapy have been developed to prevent the progresivity of this disease. One of those therapy is kinoid vaccination. Kinoid vaccination is a vaccine which induce the antibody that can neutralized related cytokine. The purpose of this research is to acknowledge the effects of IL-17A vaccination against the bacterial infection susceptibilty on the lungs of lupus mice post injection MRSA

(*Methicillin Resistant Staphylococcus aureus*). Experimental study used post test only group design is being held to the male mice. The samples were selected by random sampling and divided into four groups, namely group 1 (vaccine (+) MRSA (+)) ; group 2 (vaccine (+) MRSA (-)) ; group 3 (vaccine (-) MRSA (+)) ; group 4 (vaccine (-) MRSA (-)).The results showed that there were significant differences in the amount of bacterial colonization on the lungs of mice levels between groups with p value = 0.028 ($p < 0.05$) (One-Way ANOVA test). There was a significant difference between the group 2 and 4. Meanwhile, the group 2 and 1 or 3 showed that there were no significant difference among those groups (Post hoc tukey , $p > 0.05$). The conclusion of ths study is that vaccination of IL-17-A can reduce the number of bacterial colonization of the commensal bacterial *Staphylococcus aureus* on the lungs of balb/c mice. But, the vaccination can't decrease the MRSA infection susceptibility of lungs of SLE balb/c mice.

Keywords: Systemic Lupus Erythemathosus, Interleukin 17-A Vaccination, MRSA (*Methicillin Resistant Staphylococcus aureus*)

*Program Studi Kedokteran, FKUB

**Laboratorium Patologi Klinik, RSSA-FKUB

***Laboratorium Ilmu Kedokteran THT, RSSA-FKUB



PENDAHULUAN

Lupus eritematosus sistemik (LES) merupakan penyakit autoimun kronis dan menyerang berbagai sistem yang ada dalam tubuh. Penyakit ini diakibatkan sistem imun dalam tubuh tidak dapat membedakan antigen dari sel dan jaringan tubuh sendiri sehingga sistem imun tidak hanya menyerang antigen yang bersifat patogen namun juga menyerang organ dan sel tubuh. Lupus eritematosus sistemik merupakan penyakit peradangan jaringan multisistem yang kerap muncul dengan gejala klinis yang tidak ringan dengan angka mortalitas dan morbiditas yang tinggi. Pasien LES di seluruh dunia diperkirakan sekitar 5 juta orang, sekitar 200.000 orang di antaranya berada di Indonesia.¹ Berdasarkan data YLI (Yayasan Lupus Indonesia) dikemukakan bahwa jumlah pasien LES di Indonesia meningkat dari tahun 2004 sampai 2007 sebanyak 6950 orang. Hingga akhir tahun 2007, jumlah penderita lupus tercatat 8018 orang. Angka ini terus meningkat hingga 12.700 jiwa pada 2012, menjadi 13.300 jiwa terhitung per April 2013. Penyakit lupus ini seringkali diderita oleh wanita dengan usia produktif sehingga dampaknya dapat langsung dirasakan bukan hanya oleh penderita namun juga keluarga.²

Hingga saat ini belum diketahui dengan jelas mengenai patogenesis LES, namun telah terbukti terjadi disregulasi sistem imun yang menyebabkan terjadi berbagai

kerusakan pada organ. Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan sebelumnya, diketahui bahwa beberapa sitokin memegang peranan penting dalam patogenesis lupus. Salah satunya adalah IL (interleukin) -17A yang berperan dalam menyebabkan inflamasi. Hal ini dibuktikan dengan meningkatnya kadar serum IL-17 pada pasien LES. Peningkatan kadar IL-17 ini berkaitan dengan derajat penyakit, keparahan maupun gejala klinis lain yang muncul pada pasien lupus.^{3,4}

Penggunaan imunosupresan dan steroid sebagai terapi LES yang merupakan pengobatan standar hingga saat ini ternyata masih belum menunjukkan hasil memuaskan. Bahkan pemberian steroid dan agen imunosupresan dalam jangka panjang semakin memperburuk kondisi pasien LES seperti menyebabkan penurunan berat badan, penipisan tulang dan kulit, infeksi bakteri, diabetes, wajah membengkak, katarak dan nekrosis persendian bila digunakan dalam dosis tinggi selama periode yang lama.⁵ Seiring perkembangan waktu, muncul terapi LES dengan menggunakan agen biologis yang menunjukkan hasil yang lebih baik. Namun penggunaan agen biologis sebagai pengobatan standar terkendala oleh harga yang mahal dan belum bisa dijangkau oleh sebagian pasien LES di Indonesia.⁶

Salah satu efek samping penggunaan agen imunosupresif adalah meningkatnya kerentanan terhadap infeksi. Infeksi menjadi

salah satu faktor penting dalam menentukan morbiditas dan mortalitas pasien LES. Menurut *Euro Lupus*, 36% odapus mengalami infeksi dan 30 % kematian selama 5 tahun pertama perkembangan penyakit.⁷ Pada pasien dengan LES, sebagian besar menunjukkan gejala paru. Hampir 90% pasien mengalami nyeri dada saat bernafas yang bisa disebabkan oleh radang pleura atau muskuloskeletal. Pasien LES manifestasi paru harus selalu diawasi terjadinya infeksi terutama bakteri dan virus.⁸

Suatu metode pengobatan untuk memperbaiki kondisi klinis pasien LES secara maksimal masih dibutuhkan. Vaksinasi merupakan suatu metode yang pada umumnya digunakan sebagai suatu upaya pencegahan penyakit. Secara umum, pencegahan penyakit secara primer dapat dilakukan melalui vaksinasi sebagai upaya untuk menghindari terjadinya sakit atau kejadian yang mengakibatkan seseorang menderita cedera dan cacat.⁹ Umumnya digunakan untuk pencegahan dan pengobatan suatu penyakit infeksi, namun penelitian terbaru menunjukkan bahwa vaksinasi tersebut juga dapat digunakan untuk penyakit non infeksi seperti autoimun.

Penelitian tentang pencegahan progresivitas penyakit autoimun dengan vaksinasi masih jarang dilakukan. Metode penggunaan vaksin sebagai pencegahan autoimun yang pernah dilakukan sejauh ini adalah vaksin kinoid.

Vaksin kinoid merupakan vaksin yang berasal dari sitokin derivat non toksik. Imunisasi menggunakan kinoid bertujuan untuk menginduksi antibodi yang dapat menetralkan sitokin terkait.¹⁰

Sejauh ini, vaksin kinoid yang telah dihasilkan adalah vaksin kinoid *Tumor Necrosis Factor (TNF)- α* . Vaksin kinoid *TNF- α* menginduksi antibodi anti *TNF- α* yang merupakan mediator inflamasi. Sebelumnya, vaksin ini telah diujicobakan pada tikus yang terinfeksi AR (Arthritis Rheumatoid) hingga pada manusia. Injeksi vaksin kinoid tersebut dilaporkan tidak mengakibatkan efek samping pada hewan coba.¹¹ Mengingat vaksin kinoid bersifat immunosupresan, diperlukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui efek penggunaan pada penyakit autoimun khususnya LES dalam mencegah progresivitas penyakit LES dan efek terhadap resistensi bakteri.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian vaksin kinoid IL-17A terhadap kerentanan infeksi bakteri *Staphylococcus* serta terhadap jumlah kolonisasi bakteri pada organ paru pasca injeksi MRSA.

METODE PENELITIAN

Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian ini adalah *true experimental study* dengan menggunakan *post test only group design*. Penelitian yang bertujuan

untuk mengetahui efek pemberian vaksin kinoid IL-17 terhadap resistensi bakteri MRSA (*Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus*) pada mencit pasca LES ini dilakukan secara *in vivo*. Subjek penelitian menggunakan hewan coba mencit Balb/c model LES diinduksi pristane yang diberi vaksin kinoid IL-17A dan sebagai kontrol adalah hewan coba model LES diinduksi pristane yang tidak diberi vaksin kinoid IL-17A.

Subjek penelitian terbagi menjadi 4 kelompok perlakuan, antara lain kelompok perlakuan 1 (P1), kelompok perlakuan 2 (P2), kelompok perlakuan 3 (P3) dan kelompok perlakuan 4 (P4).

Rinciannya adalah sebagai berikut :

- P1 : Hewan coba induksi lupus, pemberian vaksin kinoid IL-17A 50µg, dan dengan pemberian bakteri MRSA.
- P2 : Hewan coba induksi lupus, pemberian vaksin kinoid IL-17A 50µg, dan tanpa pemberian bakteri MRSA.
- P3 : Hewan coba induksi lupus, tanpa pemberian vaksin kinoid IL-17A, dan dengan pemberian bakteri MRSA.
- P4 : Hewan coba induksi lupus, tanpa pemberian vaksin kinoid IL17A, dan tanpa pemberian bakteri MRSA.

Alat dan bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah spuit 1cc, *beaker glass*, incubator, tabung sentrifus, *petri dish*, *colony counter*, kantong selovan cat off 10 kDa, *falcon*, papan bedah, gunting lurus

untuk pembedahan, pin, medium *chrome agar plate*.

Bahan yang digunakan adalah Aquades, organ paru mencit, bakteri MRSA 10⁸ cfu/ml, Eter, *Recombinant mouse IL 17-A*, *Purified anti mouse IL 17-A antibody*, *Biotin goat anti mouse IgG antibody*, *ELISA coating buffer 96 uncoatingwell plate*, *FITC anti-mouse CD4*, *Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH)*, *ELISA Kit anti-dsDNA mouse NF-kB p65 antibody mouse*, *Starr Trek Universal HRP Detection*, *ELISA Kit mouse IL-17A*, NaBH₄ 20 mg, APW

Prosedur Penelitian

Mencit yang telah terdeteksi lupus, dibagi menjadi 4 kelompok perlakuan. Pada kelompok perlakuan mencit yang diberi vaksin, vaksin dilakukan sebanyak 3 kali yakni vaksin pertama diikuti booster sebanyak 2 kali. Jarak antar pemberian vaksin yakni 3 minggu. Setelah pemberian booster vaksin kedua, mencit dengan kelompok perlakuan MRSA (+) diinjeksikan bakteri MRSA secara intraperitoneal. Mencit-mencit baik kelompok perlakuan 1,2,3 maupun 4 diinkubasi selama 7 hari. Setelah inkubasi, mencit kemudian dibedah untuk dilakukan kultur. Setelah dilakukan kultur, dilakukan penghitungan jumlah kolonisasi bakteri pada organ paru mencit balb/c model LES.

Analisa data

Data yang telah diperoleh kemudian diolah menggunakan program SPSS yakni menggunakan

analisis perbandingan antar kelompok dengan uji *One-Way ANOVA* yang sebelumnya telah dilakukan uji *Kolmogorov-smirnov* untuk mengetahui bahwa sebaran data terdistribusi normal dan dilakukan *Levene Test* untuk mengetahui bahwa data terdistribusi normal. Setelah dilakukan uji *One-Way ANOVA*, dilakukan uji *Post-Hoc Tukey* untuk mengetahui perbedaan dengan tingkat kemaknaan 95% ($p < 0,05$) antar kelompok perlakuan.

HASIL PENELITIAN

Penelitian yang telah dilakukan selama 8 bulan ini, bertujuan untuk mengetahui efek vaksinasi terhadap kerentanan infeksi melalui penghitungan jumlah kolonisasi. Hasil penghitungan jumlah kolonisasi bakteri *Staphylococcus aureus* tersaji dalam tabel berikut.

Tabel 1. Hasil penghitungan jumlah kolonisasi bakteri organ paru mencit

Kelompok	Rata - rata Kolonisasi Bakteri (Mean ± SD)
P1	331.40 ± 22,1 cfu/gr
P2	227.78 ± 24.03 cfu/gr
P3	290.65 ± 51.14 cfu/gr
P4	394.38 ± 29.25 cfu/gr

Keterangan :

P1 : vaksin (+) MRSA (+)

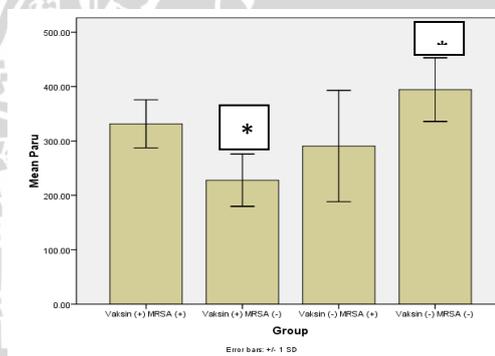
P2 : vaksin (+) MRSA (-)

P3 : vaksin (-) MRSA (+)

P4 : vaksin (-) MRSA (-)

Uji statistik yang pertama kali dilakukan adalah menentukan normalitas data menggunakan uji *Kolmogorov-smirnov*, ditemukan bahwa data memiliki sebaran normal dengan $p = 0,574$ (uji *Kolmogorov-smirnov* $p > 0,05$). Kemudian, dilakukan *Levene test* untuk menentukan homogenitas data. Hasil dari *Levene test* dinyatakan homogen apabila nilai $p > 0,05$. Menurut hasil statistik dengan $p = 0,071$.

Hasil uji *One-Way ANOVA* yang dilakukan menunjukkan perbedaan yang signifikan antar kelompok kontrol dan perlakuan dalam menurunkan jumlah kolonisasi bakteri organ paru dengan hasil $p = 0.028$ ($p < 0.05$)



Gambar 1. Hasil penghitungan rata-rata kolonisasi bakteri *Staphylococcus aureus* organ paru

*P2 memiliki perbedaan yang bermakna dengan P4 ($P < 0.05$)

Berdasarkan hasil analisa data menurut uji *Post-Hoc* dapat diketahui bahwa kelompok P2 dengan P4 memiliki beda rata-rata yang signifikan dengan $p < 0.05$, akan tetapi kelompok P2 dengan P1 maupun P3 memiliki beda rata-rata yang tidak signifikan dengan $p > 0,05$.

PEMBAHASAN

Berdasarkan data yang telah diperoleh, diketahui bahwa tanpa pemberian injeksi MRSA, kelompok perlakuan mencit (P4) memiliki kadar kolonisasi bakteri *Staphylococcus* yang tinggi. Hal ini menunjukkan bahwa tanpa tambahan injeksi MRSA, bakteri ini telah banyak ditemukan pada organ paru mencit. Kondisi tersebut dapat disebabkan karena *S. aureus* merupakan salah satu flora normal terbanyak yang dapat ditemukan pada traktus respiratorius.¹² Flora normal terdiri atas flora transient dan flora tetap. Flora tetap pada umumnya tidak bersifat patogen, kecuali *Staphylococcus aureus*. Bakteri ini dapat menyebabkan penyakit bila telah mencapai jumlah yang cukup untuk memproduksi toksin.^{13,14}

Analisa data juga menunjukkan bahwa kelompok mencit perlakuan 3 yang diinjeksi MRSA memiliki jumlah kolonisasi yang lebih rendah dibanding dengan mencit kelompok perlakuan 4 yang tidak diinjeksi MRSA. Hal ini dikarenakan adanya sifat kompetisi antar mikroba. Dengan mengkolonisasi diri, mikroba dapat bertahan dalam mekanisme klirens lokal suatu host (dengan mucus, silia), menempel pada epitel, bergantung pada nutrisi yang tersedia secara lokal, serta melewati sistem imun suatu host. Kolonisasi juga dapat dipengaruhi oleh adanya suatu kompetisi bila ditemukan mikroba lain yang ditemukan dalam organ host utamanya pada traktus respiratorius.

Interaksi antar mikroba dapat berkembang menjadi interaksi positif maupun negatif. Dikatakan positif apabila satu mikroorganisme menghasilkan kondisi yang menguntungkan bagi lain. Sedangkan sebuah interaksi dikatakan negatif ketika organisme langsung bersaing untuk suatu posisi pada host yang sama, atau ketika respon imun tidak mempengaruhi satu dari mikroorganisme bersaing.¹⁵ Kondisi dimana mikroba saling berkompetisi dan membuat suatu interaksi negatif tidak hanya terjadi pada host yang memiliki respon imun yang tidak baik, namun juga pada host dengan kondisi respon imun baik utamanya anak-anak.¹⁶

Analisa data menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan antara kelompok mencit perlakuan 2 dengan kelompok mencit perlakuan 4. Seperti yang telah dibahas sebelumnya, IL-17A mengalami peningkatan pada penderita LES.¹⁷ IL-17A memegang peranan penting dalam sistem imun manusia. Namun pada penderita LES, IL-17A mengalami disregulasi yang menyebabkan fungsi dalam sistem imun terganggu. Vaksin yang bekerja dengan menghasilkan anti IL-17A pada percobaan kali ini, menunjukkan bahwa terdapat penurunan kolonisasi bakteri pada kelompok mencit yang telah divaksin dibandingkan dengan kelompok mencit yang tidak divaksin.

Namun, analisa data juga menunjukkan terdapat perbedaan yang tidak signifikan antara

kelompok mencit perlakuan 1 dengan kelompok mencit perlakuan 2 yang mana kedua kelompok perlakuan ini diinjeksikan vaksin. Selain itu perbedaan yang tidak signifikan juga didapatkan pada kelompok perlakuan 1 dan 3, yang mana kedua kelompok perlakuan ini mendapatkan injeksi MRSA namun hanya kelompok perlakuan 1 yang mendapatkan injeksi vaksin. Terdapat banyak faktor yang mempengaruhi efektifitas vaksin. Beberapa di antaranya adalah faktor vaksin, faktor host serta faktor lingkungan.¹⁸

Vaksin anti IL-17A merupakan vaksin yang berasal dari sitokin rekombinan yang pembuatannya memerlukan adjuvant dan bukan merupakan vaksin yang berasal dari mikroorganisme. Kekurangan utama dari vaksin yang bahannya tidak berasal dari mikroorganisme tertentu adalah membutuhkan dosis yang besar serta kurang memunculkan efek imunogenik. Selain itu, dilaporkan bahwa adjuvant yang terkandung dapat memberikan efek samping kepada host. Selain faktor vaksin, terdapat pula faktor host yang berpotensi menjadi penyebab tidak signifikannya perlakuan antar kelompok. Faktor host tersebut seperti sistem imun serta penyakit yang dimiliki oleh hewan coba. Kondisi sistem imun yang baik akan lebih efektif dalam merespon efek dari vaksin. Saat hewan coba telah sakit, maka akan menurunkan kemampuan untuk merespon vaksin.¹⁹

KESIMPULAN

1. Vaksin kinoid IL-17A menurunkan jumlah kolonisasi bakteri komensal *Staphylococcus aureus* pada organ paru mencit balb/c model LES.
2. Penggunaan vaksin kinoid belum mampu menurunkan kerentanan infeksi organ paru mencit balb/c model LES terhadap infeksi bakteri MRSA.

SARAN

1. Untuk penelitian selanjutnya, sebaiknya dilakukan pengamatan mengenai jumlah kolonisasi bakteri khususnya *Staphylococcus aureus* sebelum dilakukan injeksi bakteri MRSA.
2. Disarankan menggunakan cara per inhalan untuk mengevaluasi kerentanan organ paru terhadap infeksi pada penelitian selanjutnya.
3. Untuk mengevaluasi efek dari vaksin kinoid IL-17A terhadap kerentanan infeksi organ paru disarankan untuk menaikkan dosis vaksin IL-17A pada penelitian selanjutnya.

DAFTAR PUSTAKA

1. Maruli, A. 2011. Lupus dan Harapan yang Tak Pernah Pupus. Antara. Diunduh dari <http://www.antaranews.com>.
2. Arntsen, K.A. 2011. Lupus Facts and Knowledge. Lupus Research Institute. Diunduh dari <http://www.lupusresearchinstitute.org>.

3. Wong, C.K., Lit, L.C., Tam, L.S., Li, E.K., Wong, P.T., Lam, C.W. 2008. Hyperproduction of IL-23 and IL-17 in patients with systemic lupus erythematosus: implications for Th17-mediated inflammation in auto-immunity. *Clinical Immunology*, 127: 385-393.
4. Yang, J., Chu, Y., Yang, X., et al. 2009. Th17 and natural Treg cell population dynamics in systemic lupus erythematosus. *Arthritis and Rheumatism*. 60: 1472- 1483.
5. Guiducci, C. et al. *Nature*; published online June 17, 2010;doi:10.1038/nature09102.
6. Sherer Y, Shoenfeld Y. Intravenous immunoglobulin for immunomodulation of systemic lupus erythematosus. *Autoimmun Rev* 2006;5:153–155.
7. Cervera R, Khamashta MA, Font J, et al. Morbidity and mortality in systemic lupus erythematosus during a 10-year period: A comparison of early and late manifestations in a cohort of 1,000 patients. *Medicine (Baltimore)* 2003; 82: 299–308.
8. Helmi, Luthfi. 2008. Manifestasi Systematic Lupus Erythematosus pada Paru. *Majalah Kedokteran Nusantara* Volume 41 No. 1.
9. Ranuh, I.G.N. 2008. *Pedoman Imunisasi di Indonesia*. Edisi ketiga. Jakarta:Badan Penerbit Ikatan Dokter Anak Indonesia.
10. L.Delavelle, E. Duvallet, L. Semerano, et al. Anti cytokine vaccination in autoimmune diseases. *Swiss Med Wkly*. 2010;140:w13108.
11. L. Semerano, E. Assier, L. Dellevalle, et al., Kinoid of human tumor necrosis factor alpha for rheumatoid arthritis. *Expert Opin Biol Ther*. 2011;11:545-550.
12. Itzhak, Brook. 2011. Microbiology of Sinusitis. Washington DC. *Proc Am Thorac Soc* Vol 8. pp 90–100, 2011 DOI: 10.1513/pats.201006-038RN
13. Francis JS, Doherty MC, Lopatin U, Johnston CP, Sinha G, Ross T, Cai M, Hansel NN, Perl T, Ticehurst JR, et al. Severe community-onset pneumonia in healthy adults caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying the Panton-Valentine leukocidin genes. *Clin Infect Dis*. 2005;40:100–107.
14. Berube BJ, Bubeck Wardenburg. *Staphylococcus aureus* alpha-toxin: nearly a century of intrigue. *Toxins (Basel)*. 2013;5:1140–1166.
15. Bogaert D, Groot Rd, Hermans PWM. Streptococcus pneumoniae colonisation: the key of pneumococcal disease. *The lancet infectious disease*. 2004;4:144-155

16. Kwambana BA, Barer MR, Bottomley C, Adegbola RA, Antonio M. Early acquisition and high nasopharyngeal colonisation by *Streptococcus pneumoniae* and three respiratory pathogens amongst Gambian new-borns and infants. *BMC Infect Dis*. 2011 Jun 20;11:175. doi: 10.1186/1471-2334-11-175. PMID:21689403
17. Vincent FB, Morand EF, Mackay F: BAFF and innate immunity: new therapeutic targets for systemic lupus erythematosus. *Immunol Cell Biol*. 2012, 90: 293-303. 10.1038/icb.2011.111.
18. A. Rashid, K Rasheed, M. Akhta. Factors Influencing Vaccine Efficacy. *The Journal of Animal & Plant Sciences* 19(1): 2009, Pages: 22-25 ISSN: 1018-7081
19. Ramsey, I. dan T. Bryn. 2001. Manual of canine and feline infectious diseases. BSAVA, 46-48.

