

Inovasi Vaksin DNA *Heat Shock Protein 65* (hsp65) dengan *Ubiquitin* Terenkapsulasi Nanopartikel PLGA sebagai Terapi Preventif dan Kuratif Tuberkulosis

Caren Andika Surbakti, Shierly Novitawati, Matthew Billy

Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, Jakarta, Indonesia

ABSTRAK

Indonesia merupakan salah satu negara dengan masalah tuberkulosis yang masih tinggi (*high burden countries*). Terapi preventif saat ini, yaitu vaksin *Bacillus Calmette-Guerin*, menunjukkan efikasi yang bervariasi dan penurunan kemampuan proteksi, sedangkan terapi kuratif obat anti-tuberkulosis menghadapi tingginya resistensi. Oleh karena itu, dibutuhkan pilihan terapi baru. Penulisan karya tulis ini menggunakan metode kajian pustaka dari sumber terpercaya. Beberapa penelitian menemukan vaksin DNA *heat shock protein* (hsp) 65 memiliki potensi tinggi dapat memicu respons imun adaptif terhadap bakteri *Mtb* sebagai terapi preventif dan kuratif penyakit TB. Kelemahannya adalah hasilnya tidak tetap dan efektivitasnya masih rendah. Penelitian lain mengungkapkan bahwa vaksin DNA hsp65 yang dikombinasikan dengan *ubiquitin* dapat memicu respons imun yang lebih efektif. Selain itu, *polylactic polyglycolic acid* (PLGA) sering digunakan sebagai *carrier* obat untuk meningkatkan efektivitas dan efisiensinya. Berdasarkan temuan tersebut, penulis mengajukan inovasi vaksin baru menggunakan DNA hsp65 yang dikombinasikan dengan *ubiquitin* dan dienkapsulasi dalam PLGA. Vaksin kombinasi ini diharapkan dapat menjadi terapi preventif dan kuratif penyakit TB.

Kata Kunci: *Mycobacterium tuberculosis*, PLGA, tuberkulosis, *ubiquitin*, vaksin hsp65

ABSTRACT

Indonesia is one of the high burdens for TB countries. Today's preventive therapy, *Bacillus Calmette-Guerin*, shows variable efficacy and decreased protection, and curative therapy is complicated with high resistance. New therapy is needed. This paper is written based on literature review method from trustworthy references. Several researches found that heat shock protein (hsp) 65 DNA vaccine has the ability to induce adaptive immune response to *Mtb*, but clinical results are inconsistent and the efficacy is low. Another research shows that combination of hsp65 DNA vaccine and *Ubiquitin* can induce more effective immune response; and *polylactic polyglycolic acid* (PLGA) is often used as drug carrier to increase efficacy and efficiency. This paper proposes innovative vaccine using the combination of hsp65 DNA and *ubiquitin*, then encapsulated by PLGA. This vaccine combination can be a new preventive and curative therapy for TB. **Caren Andika Surbakti, Shierly Novitawati, Matthew Billy. Innovation of DNA Vaccine Heat Shock Protein 65 (hsp65) with Ubiquitin PLGA Nanoparticles Encapsulated as the Preventive and Curative Treatment Tuberculosis.**

Keywords: hsp65 vaccine, *mycobacterium tuberculosis*, PLGA, tuberkulosis, *ubiquitin*

PENDAHULUAN

Tuberkulosis (TB) merupakan penyakit yang disebabkan oleh infeksi bakteri *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*). Data *World Health Organization* 2012 menunjukkan bahwa prevalensi kasus TB di dunia adalah 169/100.000 populasi dan insidensi sebesar 122/100.000 populasi. Tingkat mortalitas

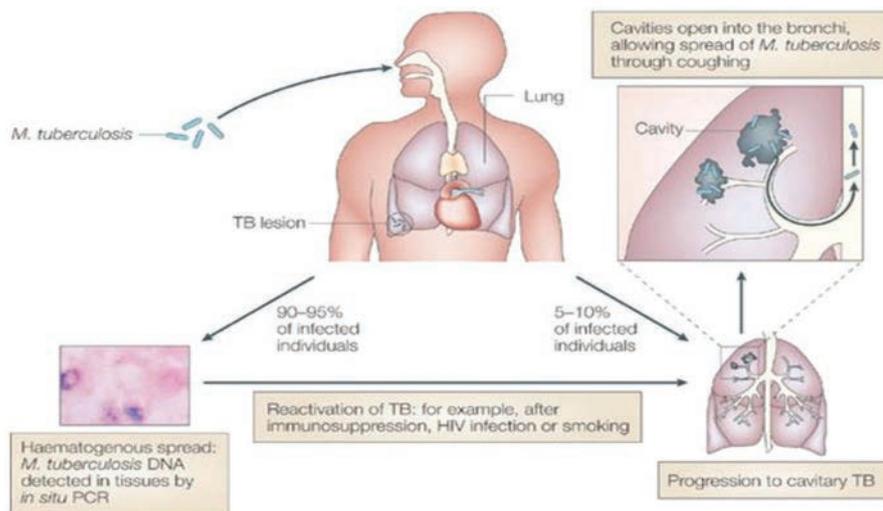
penyakit TB di dunia pada tahun 2012 adalah 13/100.000 populasi atau sekitar 940.000 kasus kematian. Indonesia merupakan salah satu negara dengan beban masalah TB yang tinggi (*high-burden countries*). Berdasarkan data WHO pada tahun 2012, angka prevalensi, insidensi, dan mortalitas penyakit TB di Indonesia secara berturut-turut

adalah 297/100.000 populasi (730.000 kasus), 185/100.000 populasi (460.000 kasus), dan 27/100.000 populasi (67.000 kasus).¹ Data di atas menunjukkan bahwa penyakit TB masih menjadi masalah kesehatan di dunia dan Indonesia.

Penanganan kuratif untuk penyakit TB

Makalah ini telah dipresentasikan di *Scientific Project and Olympiad of Sriwijaya, Universitas Sriwijaya, Palembang* pada 11-14 September 2014 dan berhasil memperoleh peringkat 3

Alamat Korespondensi email: carendikasurbakti@gmail.com



Gambar 1. Patogenesis TB¹⁴

dengan memberikan obat anti-tuberkulosis (OAT), namun ketidakpatuhan pasien dapat menyebabkan *Mtb* menjadi resisten terhadap OAT.² *Mtb* yang resisten terhadap isoniazid dan *rifampicin* disebut *Multidrug-Resistant Tuberculosis* (MDR-TB). Data WHO menunjukkan terdapat sekitar 3,6% atau 450.000 kasus TB yang menjadi MDR-TB pada tahun 2012. Keadaan MDR-TB yang tidak ditangani dengan tepat dapat berkembang menjadi *eXtensively Drug-Resistant Tuberculosis* (XDR-TB) yang menyebabkan penyakit TB makin sulit disembuhkan.³

Pencegahan penyakit TB yang tersebar luas di dunia adalah vaksin *Bacillus Calmette-Guerin* (BCG). Vaksin BCG terbukti protektif pada anak, tetapi efikasinya menurun signifikan setelah 10-15 tahun divaksinasi.^{3,4} Selain itu, efikasi vaksin BCG bervariasi antara 0 – 80% bergantung pada genetik dan daerah geografis. Ditambah lagi, efikasi vaksin BCG makin menurun di negara berkembang karena meningkatnya *strain* baru *Mtb*.⁵ Dengan demikian, vaksin BCG belum mampu mengontrol perkembangan penyakit TB.

Vaksin BCG yang kurang efektif serta makin berkembangnya *Mtb* resisten menunjukkan diperlukannya vaksin baru yang lebih efektif. Vaksin baru yang banyak mengalami perkembangan adalah vaksin DNA, salah satunya yang berpotensi tinggi adalah vaksin DNA *Heat Shock Protein 65* (*hsp65*).

Berdasarkan berbagai penelitian, vaksin DNA

hsp65 telah terbukti dapat mencegah infeksi *Mtb* secara *in vivo* pada hewan percobaan.^{7,8} Selain efek preventif, vaksin DNA *hsp65* juga memiliki efek kuratif, sehingga dapat digunakan untuk menyembuhkan penyakit TB.⁹ Wang, *et al*,¹⁰ mengombinasikan vaksin *hsp65* dengan protein *ubiquitin* (*Ub*), dan hasilnya membuktikan bahwa kombinasi vaksin *hsp65* dan *Ub* memiliki efikasi lebih tinggi.¹⁰ Namun, untuk dapat memicu respons imun yang optimal, vaksin ini harus diberikan sebanyak tiga dosis dengan rentang antar dosis tiga minggu. Beberapa penelitian^{11,12} menunjukkan bahwa nanopartikel *polylactic polyglycolic acid* (PLGA) terbukti dapat mengantarkan antigen TB menuju ke makrofag alveolar secara utuh. Selain itu, injeksi suatu antigen dengan PLGA dengan

dosis tunggal saja sudah dapat memicu respons imun secara optimal.¹³

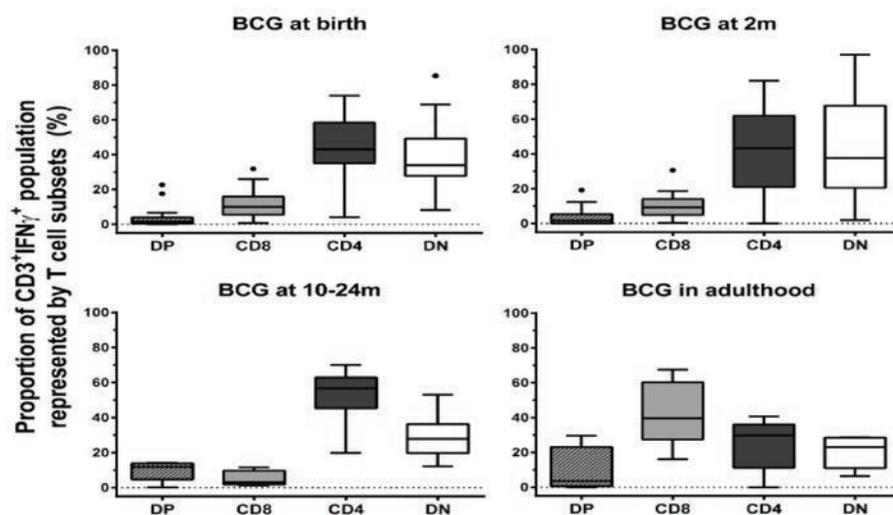
Berdasarkan penelitian-penelitian di atas, penulis mengajukan gagasan untuk mengombinasikan vaksin DNA *hsp65* dengan protein *Ub* untuk mencegah infeksi *Mtb* secara efektif. Kemudian, kombinasi ini dikapsulasikan ke dalam nanopartikel PLGA sehingga meningkatkan efisiensi vaksin *hsp65* dengan cara menurunkan dosisnya menjadi dosis tunggal. Vaksin kombinasi ini diharapkan dapat menjadi solusi baru yang mampu mencegah perkembangan penyakit TB.

PEMBAHASAN

Patogenesis dan Patofisiologi TB Paru

Penyakit TB disebabkan oleh infeksi bakteri *Mtb*. Bakteri *Mtb* masuk ke dalam tubuh individu melalui udara atau *droplet* dari penderita yang terinfeksi. Selanjutnya, *Mtb* menyebabkan reaksi inflamasi di jaringan parenkim paru. Makrofag paru memfagositosis bakteri dan mengeluarkan sitokin seperti interleukin, *TNF-α*, dan enzim proteolitik,²² menyebabkan makin banyak sel limfosit bermigrasi ke tempat radang. Secara morfologi, terbentuk lesi *granulomatosa* di daerah tersebut yang disebut *tuberkel*. TB primer ini biasanya dapat diatasi atau menjadi laten.¹⁴

Selanjutnya di masa hidupnya, seorang yang sudah terkena infeksi primer dapat



Gambar 2. Pergeseran produksi sel T CD4+ dan CD8+ seiring bertambahnya usia pada individu yang menerima BCG¹⁶



terkena infeksi sekunder. Infeksi sekunder ini menyebabkan bakteri menyebar melalui pembuluh darah, sehingga fokus Gohn terbentuk di seluruh jaringan paru yang disebut dengan TB milier. Jaringan paru beserta darah dapat keluar melalui batuk dan membentuk kavitas.

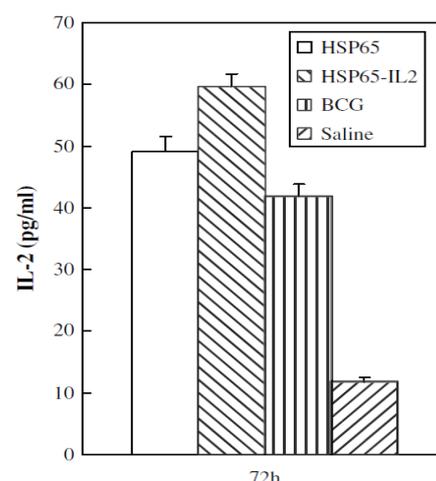
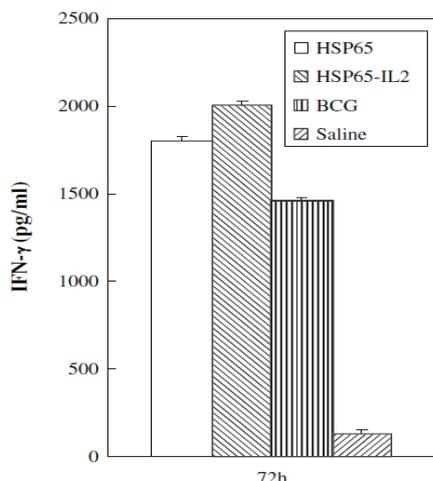
Vaksin BCG dan Efektivitasnya

Vaksin *Bacillus Calmette-Guerin* (BCG) merupakan vaksin yang telah dikenal luas untuk mencegah penyakit TB. BCG merupakan vaksin hidup strain bakteri *Mycobacterium bovis* yang dilemahkan. Efek proteksi vaksin BCG bervariasi dari 0-80%, bergantung pada genetik dan daerah geografis. Selain itu, kemampuan proteksi vaksin BCG akan makin menurun signifikan seiring bertambahnya usia setelah 10-15 tahun divaksinasi. Ditambah lagi, vaksinasi BCG ulang atau booster tidak bisa dilakukan karena vaksinasi ulang tidak akan meningkatkan proteksi terhadap TB, bahkan menambah risiko efek samping, berupa pembengkakan kelenjar limfe, demam, muntah, dan nyeri perut.^{3-5,15}

Berdasarkan studi Zufferey, *et al*,¹⁶ dengan makin bertambahnya umur, terjadi pergeseran peningkatan produksi limfosit T. Saat umur awal divaksinasi, limfosit yang banyak adalah sel T CD4+. Namun, seiring berjalannya waktu, konsentrasi sel T CD4+ menurun dan produksi sel T CD8+ meningkat. Hal ini justru menurunkan efek proteksi BCG karena respons imun sel T CD8+ terhadap antigen Mtb tidak begitu kuat dibanding sel T CD4+.²⁹ Ditambah lagi, saat terjangkit HIV, sel limfosit yang terserang adalah sel T CD4+ sehingga lebih mudah terjangkit penyakit TB.

Heat Shock Protein

Heat shock protein (hsp) merupakan protein yang memiliki peranan penting dalam kelangsungan makhluk hidup. Fungsinya adalah meregulasi konformasi protein fungsional lainnya dalam respons terhadap stres seperti hipoksia, toksin, inflamasi, dan panas. Salah satu contohnya adalah hsp16 pada bakteri Mtb yang dapat berfungsi menjaga keberlangsungan hidup bakteri Mtb di dalam lingkungan anaerobik. Selain itu, hsp dapat memicu *antigen presenting cell* (APC) untuk bekerja, sehingga muncul respons imun adaptif. Ada tiga jenis hsp pada bakteri



Gambar 3. Konsentrasi IFN-γ (atas) dan IL-2 (bawah) pada tikus setelah divaksinasi.⁹

Mtb yang diketahui dapat memicu proliferasi limfosit T, yaitu hsp70, hsp65, dan hsp16.¹⁷

Protein hsp65 merupakan salah satu antigen Mtb yang paling banyak diekspresikan. Peran hsp65 adalah sebagai protein yang mengaktifasi monosit saat terjadi infeksi Mtb. Hal ini meningkatkan produksi TNF, IL-6, dan IL-8 yang berfungsi dalam respons imun spesifik yang dimediasi oleh sel limfosit T. Pada pasien ataupun hewan yang terinfeksi Mtb dapat ditemukan respons imun tubuh terhadap hsp65 baik secara seluler maupun humoral. Ini menunjukkan potensi hsp65 sebagai vaksin terhadap Mtb sangat besar terutama karena sifatnya yang sangat antigenik.

Vaksin DNA hsp65 dan Cara Kerjanya

Vaksin DNA hsp65 akan mengekspresikan protein hsp65 yang bersifat antigenik. Apabila diinjeksikan ke dalam tubuh, akan memicu produksi sel T CD4+ dan CD8+ sebagai respons imun adaptif. Changhong, *et al*,⁹ menggunakan tikus yang diinjeksikan dengan berbagai vaksin, yaitu vaksin hsp65, vaksin hsp65 dengan adjuvan IL2, dan BCG untuk melihat respons imun yang ditimbulkan. Hasilnya vaksin DNA hsp65 dapat memicu produksi sitokin, seperti IFN-γ dan IL-2, yang berperan penting dalam aktivasi dan proliferasi sel T CD4+ sebagai respons imun terhadap Mtb. Peningkatan produksi IFN-γ dan IL-2 pada vaksin hsp65 lebih tinggi dibandingkan dengan BCG.

Selain itu, aktivitas sel T CD4+ dan CD8+ juga

meningkat setelah diberi vaksin DNA hsp65 (**Tabel 1**).

Tabel 1. Kadar sel T CD4+ dan CD8+ pada tikus setelah divaksinasi.⁹

Group	CD4 (%)	CD8(%)
BCG	26.52 ± 1.30	13.51 ± 0.65
HSP65-IL2-DNA	25.36 ± 0.88 ^a	19.64 ± 1.01 ^{ab}
HSP65-DNA	22.08 ± 1.03	12.22 ± 0.69

Signifikansi statistik: ^a dibandingkan dengan hsp65-DNA, P <0,05; ^b dibandingkan dengan BCG, P <0,05

Selain berfungsi untuk mencegah penyakit TB, penelitian Changhong, *et al*,⁹ juga membuktikan bahwa vaksin hsp65 juga dapat berfungsi sebagai terapi kuratif terhadap penyakit TB. Pada penelitian tersebut, tikus yang telah terinfeksi Mtb diinjeksikan dengan vaksin hsp65 dan kemudian kadar bakteri dalam tubuh tikus tersebut diukur. Hasilnya menunjukkan bahwa terjadi penurunan signifikan kadar bakteri Mtb pada tikus yang diinjeksi dengan vaksin hsp65 (**Tabel 2**).

Tabel 2. Kadar bakteri Mtb pada tikus yang terinfeksi Mtb setelah divaksinasi dengan vaksin hsp65⁹

Group	M.Tuberculosis load CFUs (log10 ± S.D.)	
	Spleen	Lung
Normal saline	5.44 ± 0.13	6.17 ± 0.22
HSP65-IL2-DNA	4.10 ± 0.17 ^{ab}	4.61 ± 0.19 ^{ab}
HSP65-DNA	4.47 ± 0.15	4.89 ± 0.26 ^a

Signifikansi statistik: ^a dibandingkan dengan Normal Saline, P < 0,05; ^b dibandingkan dengan hsp65-IL 2-DNA, P < 0,05

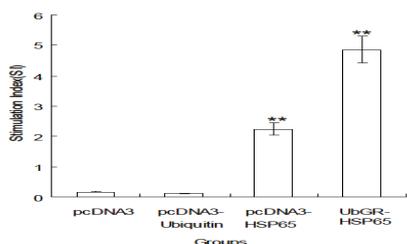


Ubiquitin-Proteasom Meningkatkan Efek Proteksi Vaksin DNA hsp65

Vaksin hsp65 yang diintroduksi ke hewan percobaan menghasilkan proteksi parsial serta efikasinya sangat bergantung dari metode introduksinya. Oleh karena itu, diperlukan adjuvan tambahan untuk memaksimalkan efikasinya.

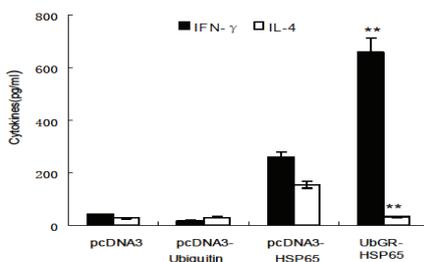
Ubiquitin memberikan solusi bagi keterbatasan tersebut. Dengan meningkatkan presentasi antigen melalui MHC kelas I, kombinasi hsp65 dan Ub dapat menghasilkan respons imun yang optimal. Penelitian Wang, *et al*, membandingkan respons imun pada tikus yang diinduksi oleh kombinasi Ub dan hsp65 (UbGR-hsp65) dengan hsp65 saja (pcDNA3-hsp65).¹⁰ Dengan adanya Ub, terjadi peningkatan stimulasi proliferasi sel Th secara signifikan (**Gambar 4**). Stimulasi sel Th akan menstimulasi perkembangan sel T CD8+ yang berperan dalam proteksi dari infeksi Mtb.

Parameter lain seperti produksi sitokin, yaitu IFN- γ dan IL-4. IFN- γ merupakan sitokin yang dikeluarkan oleh Th1 yang berperan dalam respons imun selular. Sedangkan IL-4 merupakan sitokin yang dikeluarkan oleh Th2 yang berperan dalam respons imun humoral. Dengan demikian, kedua sitokin tersebut dapat menunjukkan polarisasi respons imun. UbGR-hsp65 secara signifikan mensekresi sitokin IFN- γ dengan konsentrasi lebih tinggi dibanding dengan kelompok pcDNA3-hsp65. Sementara itu, untuk sitokin IL-4, UbGR-hsp65 memproduksi lebih sedikit dibandingkan dengan pcDNA3-hsp65, berarti UbGR-hsp65 menginduksi respons imun dengan polarisasi menuju sel Th1, atau respons imun selular. Hal tersebut sangat menguntungkan karena proteksi terhadap infeksi, seperti infeksi TB, membutuhkan respons imun selular.¹⁰



Gambar 4. Pengaruh berbagai kombinasi induksi antigen dengan derajat stimulasi sel Th. Derajat stimulasi ditandai dengan *Stimulation Index* (SI) pada sumbu vertikal.¹⁰

Wang¹⁰ melakukan eksperimen lebih lanjut untuk melihat konsentrasi sel T yang terbentuk dalam respons imun seluler. Hasilnya menunjukkan bahwa kelompok UbGR-hsp65 secara signifikan memicu produksi sel T CD4+ dan CD8+ lebih banyak dibanding kelompok pcDNA3-hsp65 (**Gambar 5**).



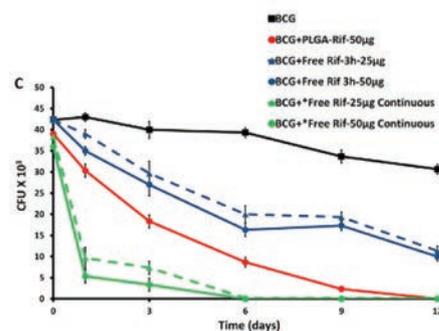
Gambar 5. Konsentrasi sitokin IFN- γ dan IL-4 pada berbagai kelompok. ** $p < 0,01$ kelompok UbGR-hsp65 dibandingkan dengan kelompok pcDNA3-hsp65.¹⁰

Dari berbagai eksperimen tersebut, dapat disimpulkan bahwa Ub dapat meningkatkan respons imun hsp65 menjadi lebih efektif.

PLGA sebagai Carrier Vaksin hsp65 dan Ub

Poly(lactic polyglycolic acid) (PLGA) merupakan salah satu nanopartikel yang paling sering digunakan sebagai *carrier* untuk membawa obat termasuk untuk penyakit TB.²¹ PLGA memiliki banyak kelebihan, salah satunya adalah dapat melindungi obat dari degradasi dan dapat dimodifikasi untuk menargetkan organ spesifik tertentu. Akhir – akhir ini, banyak penelitian menggunakan PLGA untuk membawa obat anti-tuberkulosis (OAT) agar bisa masuk ke dalam sel terinfeksi, sehingga obat dapat bekerja lebih efektif. Penelitian Kalluru, *et al*,²¹ memperjelas bahwa satu dosis obat yang terenkapsulasi di dalam PLGA dapat bertahan selama 12 hari dan dapat menyembuhkan infeksi bakteri Mtb. Hal ini menunjukkan bahwa PLGA merupakan nanopartikel yang memiliki potensi besar sebagai *carrier* obat anti-tuberkulosis.

Lima, *et al*,¹² menggunakan vaksin hsp65 yang terenkapsulasi di dalam PLGA sebagai obat terhadap penyakit TB. Penelitian tersebut membuktikan bahwa vaksin DNA hsp65 terenkapsulasi dalam PLGA yang diinjeksikan dengan dosis tunggal dapat menginduksi respons imun yang setara dengan vaksin tanpa PLGA dosis tiga kali.¹² Hal ini membuktikan



Gambar 6. Perbedaan penggunaan PLGA sebagai *carrier* antibiotik rifampicin. Garis biru menunjukkan administrasi rifampicin tanpa PLGA dengan satu dosis; garis merah menunjukkan administrasi BCG bersama rifampicin dengan PLGA dengan satu dosis.¹³

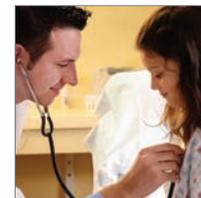
bahwa PLGA mampu meningkatkan efisiensi vaksin DNA hsp65. Dengan adanya PLGA, dosis vaksin DNA hsp65 dan Ub yang pada awalnya sebanyak tiga dosis dengan rentang antar dosis tiga minggu dapat diberikan hanya dengan dosis tunggal.

Potensi Kombinasi Vaksin DNA hsp65 dengan Ub Terenkapsulasi PGLA sebagai Terapi Preventif dan Kuratif TB

Vaksin DNA dipilih karena tingkat keamanannya cukup tinggi, tetapi vaksin DNA hsp65 menunjukkan hasil yang masih tidak konsisten terhadap penyakit TB. Dengan alasan itu Wang, *et al*,¹⁰ mengusulkan penggunaan Ub untuk memperbesar sifat imunogenik vaksin. Penelitian tersebut membuktikan bahwa kombinasi vaksin DNA hsp65 dan Ub dapat mencegah terjadinya penyakit TB. Namun, masalah selanjutnya adalah sifat vaksin DNA yang membutuhkan administrasi berulang karena tidak dapat bekerja dalam jangka lama. Berdasarkan masalah tersebut, penulis mengusulkan untuk menggabungkan vaksin DNA hsp65 dengan *carrier* PLGA yang telah terbukti dapat meningkatkan efisiensi dan waktu kerja beberapa jenis obat seperti rifampicin secara *in vivo*.¹³

Administrasi Vaksin Kombinasi

Vaksin DNA hsp65 merupakan salah satu vaksin DNA yang masih baru dikembangkan. Uji klinis vaksin tersebut pada tubuh manusia belum pernah dilakukan. Penelitian *in vivo* selama ini menunjukkan bahwa cara administrasi vaksin DNA hsp65 yang terbaik adalah melalui intramuskular.⁷ Pada manusia,



dosis vaksin ini belum dapat ditentukan karena belum melalui uji klinis pada manusia. Pada tikus, dosis yang biasa diberikan adalah 300 µg plasmid DNA hsp65. Jika dikombinasikan dengan PLGA, maka dosis yang dibutuhkan hanya 30 µg plasmid DNA dan 2,5 mg PLGA.¹² Penggunaan PLGA pada vaksin DNA hsp65 mengurangi dosis vaksin yang dibutuhkan dan menjadi dosis tunggal.

PENUTUP

Simpulan

Kombinasi vaksin DNA hsp65 dan *ubiquitin* dapat memicu respons imun spesifik terhadap bakteri Mtb dan dengan enkapsulasi PLGA dapat meningkatkan efisiensinya. Vaksin kombinasi memiliki potensi tinggi sebagai terapi preventif dan kuratif untuk penyakit TB.

Saran

Untuk selanjutnya dapat dilakukan penelitian mengenai efikasi, dosis, dan efek samping vaksin kombinasi ini pada manusia. Selain itu, dapat dilakukan penelitian lebih lanjut penggunaan *ubiquitin* untuk vaksin penyakit lain.

DAFTAR PUSTAKA

1. Global Tuberculosis Report 2013. France: WHO; 2013.
2. Prasad R, Srivastava DK. Multi drug and extensively drug-resistant TB (M/XDR-TB) management: Current issues. Clin Epidemiol Glob Health. 2013;1(3):124–8.
3. Choices NHS. BCG tuberculosis (TB) vaccine - Vaccinations - NHS Choices [Internet]. 2014 [cited 2014 Jul 23]. Available from: <http://www.nhs.uk/Conditions/vaccinations/Pages/bcg-tuberculosis-TB-vaccine.aspx>
4. Ottenhoff THM, Kaufmann SHE. Vaccines against tuberculosis: Where are we and where do we need to go? PLoS Pathog. 2012;8(5):e1002607.
5. Parkash O. How to avoid the impact of environmental mycobacteria towards the efficacy of BCG vaccination against tuberculosis? Int J Mycobacteriology. 2014;3(1):1–4.
6. Li L, Saade F, Petrovsky N. The future of human DNA vaccines. J Biotechnol. 2012;162(2–3):171–82. doi: 10.1016/j.jbiotec.2012.08.012
7. Lima KM, dos Santos SA, Santos Jr. RR, Brandão IT, Rodrigues Jr. JM, Silva CL. Efficacy of DNA–hsp65 vaccination for tuberculosis varies with method of DNA introduction in vivo. Vaccine. 2003;22(1):49–56.
8. Zucchi FCR, Tsanaclis AMC, Moura-Dias Jr. Q, Silva CL, Pelegri-da-Silva A, Neder L, et al. Modulation of angiogenic factor VEGF by DNA-hsp65 vaccination in a murine CNS tuberculosis model. Tuberculosis. 2013;93(3):373–80.
9. Changhong S, Hai Z, Limei W, Jiase A, Li X, Tingfen Z, et al. Therapeutic efficacy of a tuberculosis DNA vaccine encoding heat shock protein 65 of Mycobacterium tuberculosis and the human interleukin 2 fusion gene. Tuberculosis. 2009;89(1):54–61.
10. Wang Q, Lei C, Liu Q. Ub combination enhanced cellular immune response elicited by HSP65 DNA vaccine against Mycobacterium tuberculosis. World J Vaccines. 2013;03(03):89–97.
11. Hirota K, Hasegawa T, Nakajima T, Inagawa H, Kohchi C, Soma G-I, et al. Delivery of rifampicin–PLGA microspheres into alveolar macrophages is promising for treatment of tuberculosis. J Controlled Release. 2010;142(3):339–46.
12. Lima KM, Santos SA, Lima VMF, Coelho-Castelo A a. M, Rodrigues JM, Silva CL. Single dose of a vaccine based on DNA encoding mycobacterial hsp65 protein plus TDM-loaded PLGA microspheres protects mice against a virulent strain of Mycobacterium tuberculosis. Gene Ther. 2003;10(8):678–85.
13. Kalluru R, Fenaroli F, Westmoreland D, Ulanova L, Maleki A, Roos N, et al. Poly(lactide-co-glycolide)-rifampicin nanoparticles efficiently clear Mycobacterium bovis BCG infection in macrophages and remain membrane-bound in phago-lysosomes. J Cell Sci. 2013;126(14):3043–54.
14. Rook GAW, Dheda K, Zumla A. Immune responses to tuberculosis in developing countries: Implications for new vaccines. Nat Rev Immunol. 2005; 5(8): 661–7.
15. Fishman A, Elias J, Fishman J, Grippi M, Senior R, Pack A. Fishman's pulmonary disease and disorders. 4th ed. New York: McGraw-Hill; 2008. p. 2069–70.
16. Zufferey C, Germano S, Dutta B, Ritz N, Curtis N. The contribution of non-conventional T cells and NK cells in the mycobacterial-specific IFN γ response in bacille calmette-guerin (BCG)-immunized infants. PLOSOne. 2013; 8(10). doi: 10.1371/journal.pone.0077334
17. Dubaniewicz A. Mycobacterium tuberculosis heat shock proteins and autoimmunity in sarcoidosis. Autoimmun Rev. 2010;9(6):419–24.