

# КОНСТРУИРОВАНИЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ ШТАММОВ *E. COLI* — ПРОДУЦЕНТОВ СПЕЦИФИЧЕСКИХ АНТИГЕНОВ *BURKHOLDERIA PSEUDOMALLEI*

Ю.А. Кузютина, И.Б. Захарова, Д.В. Викторов

ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, г. Волгоград, Россия

**Резюме.** Возможность завоза в Российскую Федерацию экзотических инфекций, в том числе и мелиоидоза, лабораторно подтвержденные случаи которого регулярно регистрируются в неэндемичных регионах мира, обуславливает необходимость разработки и совершенствования методов их ускоренной диагностики. Наличие перекрестной реактивности между филогенетически близкими видами рода *Burkholderia* затрудняет диагностику мелиоидоза методами экспресс-анализа, предусматривающими применение препаратов на основе моноклональных антител к эпитопам экзополисахарида возбудителя. Исследования, направленные на поиск антигенов-мишеней для создания группо- и видоспецифических иммунодиагностических препаратов нового поколения, позволяющих выявлять *Burkholderia pseudomallei*, не теряют актуальности. Цель работы заключалась в клонировании полных кодирующих последовательностей дифференцирующих поверхностных биополимеров *Burkholderia pseudomallei* с последующей оптимизацией схемы очистки рекомбинантных антигенов. В результате сравнительного *in silico* исследования в качестве целевых биомолекул были выбраны обладающие высокой иммуногенностью протеины внешней мембраны *B. pseudomallei* Omp38 и OmpA/MotB. В ПЦР были получены необходимые для клонирования специфические ампликоны генов *omp38* и *ompA/motB*, которые лигировали с линейным экспрессирующим вектором RIC-Ready pPAL7. Лигазной смесью трансформировали компетентные клетки *E. coli* C-Max5α для накопления рекомбинантных плазмидных молекул, после чего их выделяли и вводили в *E. coli* BL21(DE3) для высокоэффективной экспрессии рекомбинантных протеинов. По-видимому, из-за мультимерной организации белков стандартная процедура их очистки из нативного клеточного дезинтеграта оказалась неэффективной. Модификация методики очистки привела к повышению концентрации рекомбинантного белка в элюате. Однако ввиду привнесенных денатурирующих условий на промежуточных этапах очистки произошел гидролиз пептидных связей в молекулах целевых протеинов. Предполагаемым местом разрыва являлась ковалентная связь между аминокислотами пролин и аспарагин. В элюатах содержались N-концевые фрагменты, посредством которых рекомбинантные белки были связаны с неподвижной фазой хроматографической колонки. Аминокислотные последовательности N-концевых участков, соответствующих молекулярным массам элюированных пептидов, были оценены на предмет содержания линейных эпитопов. По результатам *in silico* анализа на исследуемых полипептидах было установлено присутствие ряда участков, обладающих выраженной антигенной активностью. Сконструированные штаммы *E. coli* BL21(DE3) VpsOmp39 и *E. coli* BL21(DE3) VpsOmpA являются продуцентами поверхностных протеинов Omp38 и OmpA/MotB возбудителя мелиоидоза, очищенные формы которых могут быть использованы в качестве основы разрабатываемых диагностических тест-систем.

**Ключевые слова:** мелиоидоз, *Burkholderia pseudomallei*, OmpA, Omp38, штамм-продуцент, рекомбинантный антиген, эпитоп.

## Адрес для переписки:

Кузютина Юлия Александровна  
400131, Россия, г. Волгоград, ул. Голубинская, 7,  
ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский  
противочумный институт.  
Тел.: 8 (8442) 37-37-74. Факс: 8 (8442) 39-33-36.  
E-mail: 6uoxumuk@mail.ru

## Contacts:

Yulia A. Kuziyutina  
400131, Russian Federation, Volgograd, Golubinskaya str., 7,  
Volgograd Plague Control Research Institute.  
Phone: +7 (8442) 37-37-74. Fax: +7 (8442) 39-33-36.  
E-mail: 6uoxumuk@mail.ru

## Библиографическое описание:

Кузютина Ю.А., Захарова И.Б., Викторов Д.В. Конструирование рекомбинантных штаммов *E. coli* — продуцентов специфических антигенов *Burkholderia pseudomallei* // Инфекция и иммунитет. 2019. Т. 9, № 1. С. 203–208. doi: 10.15789/2220-7619-2019-1-203-208

## Citation:

Kuziyutina Yu.A., Zakharova I.B., Viktorov D.V. Engineering *E. coli* recombinant strains for high yield production of *Burkholderia pseudomallei* specific antigens // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2019, vol. 9, no. 1, pp. 203–208. doi: 10.15789/2220-7619-2019-1-203-208

## ENGINEERING *E. COLI* RECOMBINANT STRAINS FOR HIGH YIELD PRODUCTION OF BURKHOLDERIA PSEUDOMALLEI SPECIFIC ANTIGENS

Kuzyutina Yu.A., Zakharova I.B., Viktorov D.V.

Volgograd Plague Control Research Institute, Volgograd, Russian Federation

**Abstract.** A risk of introducing into the Russian Federation exotic infections including laboratory-confirmed melioidosis regularly recorded worldwide necessitates development and improvement of express diagnostics tools. Cross reactivity between phylogenetically related species of the genus *Burkholderia* complicates melioidosis diagnostics by express test methods based on using monoclonal antibodies against pathogen exopolysaccharide epitopes. Searching for target antigens to create the next generation group- and species-specific immunodiagnostic reagents for identifying *Burkholderia pseudomallei* is still of high priority. The study was aimed at cloning complete coding sequences for cell surface proteins differentiating *Burkholderia pseudomallei* and optimizing recombinant antigens purification protocol. *In silico* comparative study allowed to select highly immunogenic *B. pseudomallei* outer membrane proteins Omp38 and OmpA/MotB as target biomolecules. For cloning, *omp38* and *ompA/motB* gene-specific amplicons were obtained by PCR and ligated with the linear expression vector RIC-Ready pPAL7. Competent *E. coli* C-Max5 $\alpha$  cells were transformed by a ligation mixture for producing recombinant plasmids, which were further purified to transform *E. coli* BL21 (DE3) cells for robust recombinant protein expression. Due to a potential multimeric protein structure, a standard protein purification protocol from native cell lysate was inefficient, which was modified to increase recombinant protein yield. However, by adding denaturing conditions at intermediate purification steps caused hydrolysis of peptide bonds in the target proteins, presumably between proline and asparagine residues. As a result, N-terminal fragments connecting recombinant proteins to the stationary phase of chromatographic column were eluted and evaluated for linear epitope detection according to their molecular weights. *In silico* analysis data identified highly antigenic motifs within the polypeptides studied. Thus, strains of *E. coli* BL21(DE3) BpsOmp39 and *E. coli* BL21(DE3) BpsOmpA engineered by us produce cell surface proteins Omp38 and OmpA/MotB derived from melioidosis pathogen, which can be useful for developing diagnostic test systems.

**Key words:** melioidosis, *Burkholderia pseudomallei*, OmpA, Omp38, producing strain, recombinant antigen, epitope.

## Введение

*Burkholderia pseudomallei* является возбудителем особо опасного инфекционного заболевания мелиоидоза, который признан одной из основных причин острого летального сепсиса в ряде эндемичных регионов мира. Мелиоидоз распространен в странах Юго-Восточной Азии (Таиланд, Малайзия, Камбоджа, Вьетнам, Лаос, Бирма, Гонконг, Тайвань, Сингапур), на территориях южного Китая, Индостана, Северной Австралии, Папуа — Новой Гвинеи, Западной и Центральной Африки, а также о. Мадагаскар, в западном полушарии — Пуэрто-Рико, Сальвадора, островов Карибского бассейна, стран Латинской Америки (Венесуэла, Бразилия, Эквадор), где возбудитель входит в состав микробиоты почвы и воды стоячих водоемов. Вместе с тем регулярно регистрируются лабораторно подтвержденные завозные случаи мелиоидоза на неэндемичных по данному заболеванию регионах Северной Америки и Европы [7, 8]. Возрастающие масштабы туристической и трудовой миграции населения из Юго-Восточной Азии должны вызывать настороженность в отношении завоза мелиоидоза в Россию. Кроме того, *B. pseudomallei* рассматривается как потенциальное средство осуществления биотеррористических актов [3, 14], что подчеркивает необходимость разработки и совершенствования методов его ускоренной детекции и идентификации.

Согласно МУ 4.2.2787-10 в общей схеме лабораторной диагностики мелиоидоза иммунологическим методам отводится важная роль, особенно при экспресс-анализе поступивших на исследование проб. Для иммунофлуоресцентного и иммуноферментного анализов, а также реакции непрямой агглютинации бактерий применяют современные диагностические препараты и тест-системы, сконструированные с использованием моноклональных антител (МКА) различной эпитопной направленности [11, 13, 15]. На сегодняшний день широко распространенные иммунодиагностические средства на основе МКА к эпитопам экзополисахарида возбудителя мелиоидоза в той или иной мере характеризуются перекрестной реактивностью в отношении близкородственных непатогенных или малопатогенных буркхольдерий. По этой причине исследования, направленные на получение рекомбинантных белков — диагностических мишеней, специфичных для *B. pseudomallei*, являются перспективными [5].

Современные методологии создания иммунодиагностических систем нового поколения с успехом развиваются применительно к ряду бактериальных патогенов [6, 9]. Они основаны на технологии направленного выбора потенциальных кандидатных биополимеров бактериальных клеток и включают в себя сравнительное *in silico* исследование геномов бактерий, клонирование кодирующих последовательностей (CDS) целевых биомолекул-мишеней и получе-

ние рекомбинантных продуктов, удобных для их быстрого и безопасного накопления. Ранее нами были проведены сравнительный анализ последовательностей геномов штаммов возбудителя мелиоидоза и выявление дифференцирующих групп CDS поверхностных биополимеров [2]. Цель настоящего исследования заключалась в клонировании выбранных генов *B. pseudomallei* с последующей оптимизацией схемы очистки рекомбинантных антигенов.

## Материалы и методы

В качестве источника хромосомной ДНК был использован штамм возбудителя мелиоидоза *B. pseudomallei* 56770 из коллекции ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора. Для выделения ДНК из 24-часовой культуры *B. pseudomallei*, выращенной на LB-агаре при 37°C, использовали метод протеиназного лизиса [4]: 200 мкл свежеприготовленной бактериальной взвеси в стерильной бидистиллированной воде плотностью  $2 \times 10^9$  м.к./мл смешивали с равным объемом лизирующего буфера (20 мМ Трис-НСl, 100 мМ КCl, 5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0,2 мг/мл желатина, 0,9% Nonidet P-40, 0,9% Твин 20, 150 мкг/мл протеиназы К), инкубировали при 60°C 120 мин, затем при 99°C 30 мин для инактивации фермента.

Для амплификации полных нуклеотидных последовательностей генов *omp38* и *ompA/motB* были использованы известные из литературы праймеры *bpsomp38* [10] и разработанные нами оригинальные праймеры *bps4255* [1] соответственно. Все праймеры были модифицированы путем достройки с 5'-конца фосфорилированного адаптера с целью облегчения клонирования продукта.

ПЦР осуществляли в монолокусном формате на амплификаторе C1000 (Bio-Rad, США) при параметрах: 95°C — 4 мин, 35 циклов (95°C — 40 с, 57°C для праймеров *bpsomp39* или 66,2°C для праймеров *bps4255* — 30 с, 72°C — 1 мин 20 с), финальная элонгация 72°C — 10 мин. Объем реакционной смеси на одну пробу составлял 15 мкл, концентрация праймеров — 50 пМ. Для детекции продуктов амплификации использовали электрофоретическое разделение в 1,5% агарозном геле и визуализацию посредством окрашивания бромистым этидием.

Клонирование полноразмерных кодирующих последовательностей генов поверхностных биополимеров *omp38* и *ompA/motB* возбудителя мелиоидоза производили по протоколу Profinity eXact™ (Bio-Rad, США) с использованием линейного экспрессирующего вектора RIC-Ready pPAL7 и компетентных клеток штаммов *E. coli* C-Max5α и *E. coli* BL21 (DE3) (Bio-Rad, США). Специфические ампликоны и вектор лигировали в соотношении 10:1. Трансформированные бак-

терии выращивали при 37°C на L-агаре с добавлением ампициллина (100 мкг/мл) в качестве селективного агента. Плазмидную ДНК выделяли с помощью набора GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Scientific, Литва) согласно инструкции.

Для экспрессии целевых белков в клетках штамма-продуцента ночную культуру засеивали в LB бульон, содержащий ампициллин (100 мкг/мл) и 0,5% глюкозу, выращивали 18 ч при 37°C и интенсивной аэрации до достижения оптической плотности взвеси OD<sub>600</sub> = 0,5–0,7. Затем для индукции синтеза рекомбинантных белков под контролем промотора T7lac в бульон с культурой вносили изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозид (ИПТГ) до конечной концентрации 2 мМ и продолжали культивировать при 37°C в течение 4 ч. Бактериальную взвесь осаждали центрифугированием и обрабатывали ультразвуком в буфере (0,3 М сахароза, 10 мМ Трис-НСl, 1,5 мМ ЭДТА) с помощью прибора VCX 130 (Sonic & Materials Inc., США).

Растворимость, уровень экспрессии и степень очистки целевых белков оценивали методом SDS-PAGE в 11% полиакриламидном геле (ПААГ) с последующим окрашиванием Coomassie Brilliant Blue R-250 Dye (Thermo Fisher Scientific, Литва). Очистку рекомбинантных протеинов осуществляли хроматографическим методом, применяя технологию аффинных меток (affinity tag) по протоколу Profinity eXact™ (Bio-Rad, США).

Молекулярные массы целевых полипептидов определяли с помощью пакета Biopython 1.71 (<https://biopython.org>). Поиск линейных эпитопов исследуемых белков выполняли методом BepiPred, используя ресурс IEDB Analysis (<http://www.cbs.dtu.dk/services/BepiPred>).

## Результаты и обсуждение

В результате сравнительного *in silico* исследования в качестве целевых биомолекул были выбраны основной порин внешней мембраны *B. pseudomallei* Omp38, играющий важную роль в процессах транспорта низкомолекулярных метаболитов, формировании множественной антибиотикорезистентности и обладающий высокой иммуногенностью, а также видоспецифичный в отношении *B. pseudomallei* мембранный белок MotB семейства протеинов OmpA, также характеризующихся значительной потенциальной иммуногенностью. В ПЦР с использованием высокоточной полимеразы High Fidelity PCR Enzyme Mix (Thermo Scientific, США) были получены необходимые для клонирования ампликоны CDS *omp38* и *ompA/motB* размером 1100 и 1310 п.н. соответственно (рис. 1).

Ампликоны обрабатывали T4 ДНК-полимеразой (Thermo Scientific, США) для образования «липких» концов и лигировали с высокоэкспрессирующим плазмидным вектором pPAL7,

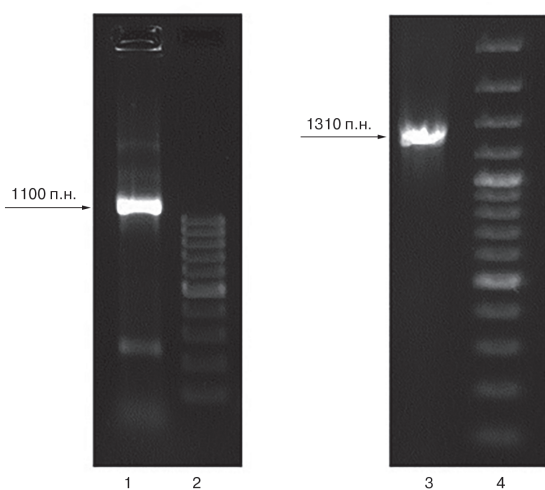
несущим детерминанту устойчивости к ампициллину, промотор T7lac и сайт инициации репликации ori pBR322. Также в составе вектора находилась нуклеотидная последовательность, кодирующая специфическую аффинную метку Profinity eXact tag, которая позволяет очистить рекомбинантный белок в системе Profinity™ (BioRad, США). Для накопления рекомбинантных плазмидных молекул лигазной смесью трансформировали компетентные клетки *E. coli* C-Max5α. Накопленными плазмидами трансформировали компетентные клетки *E. coli* BL21(DE3), предназначенные для высокоэффективной экспрессии рекомбинантных протеинов. Присутствие клонированных последовательностей у трансформантов подтверждали в ПЦР с исходными праймерами.

Анализ растворимости целевых протеинов показал их наличие в обеих фракциях ультразвукового дезинтеграта клеточных суспензий штаммов-продуцентов: растворимой и нерастворимой. Нами была выбрана стратегия, применяемая для очистки рекомбинантных белков из нативного клеточного дезинтеграта. По-видимому, из-за мультимерной организации протеинов стандартная процедура, предлагаемая производителем, оказалась неэффективной: электрофореграммы анализируемых фракций свидетельствовали о потерях целевого продукта на промежуточных стадиях очистки. Во избежание снижения концентрации рекомбинантного белка в элюате методика была модифицирована добавлением мочевины до конечной концентрации 2 М в лизат бактерий и детергента Nonidet P-40 до 1% в промывочный буфер. Период инку-

бации хроматографической колонки с элюирующим буфером увеличили до 20 ч. Очищенные протеины имели меньшую молекулярную массу (~15 kDa) по сравнению с ожидаемой (40,6 и 36,9 kDa для мономеров Omp38 и OmpA/MotB, соответственно), предположительно, вследствие созданных денатурирующих условий (рис. 2).

Очевидно, что полученные нами очищенные формы рекомбинантных белков представляли собой неполноразмерные полипептидные цепи. Поскольку элюирующий раствор специфично активировал связанную с N-концом аффинной метки протеазу неподвижной хроматографической фазы, в элюатах несомненно содержались N-концевые аминокислотные последовательности целевых протеинов. По-видимому, на промежуточных этапах очистки в денатурирующих условиях произошел гидролиз пептидных связей в молекулах белков. Наиболее вероятным местом таких разрывов является жесткая пептидная связь, соединяющая иминокислоту пролин с соседними аминокислотами. Атом азота пролина входит в состав жесткого кольца, что исключает возможность вращения радикала относительно связи N — СН. Таким образом, в отличие от других аминокислот, имеющих по две степени свободы, пролин, обладающий лишь одной, вносит значительный вклад в конформационную «хрупкость» молекулы.

Анализ аминокислотных последовательностей целевых протеинов показал, что пролин находится в положениях 20, 155, 212, 220, 233, 239, 252, 305, 363 белка Omp38 и 52, 65, 151, 180, 191, 208, 221, 273, 276, 320, 321, 326, 329, 340 белка OmpA/MotB.

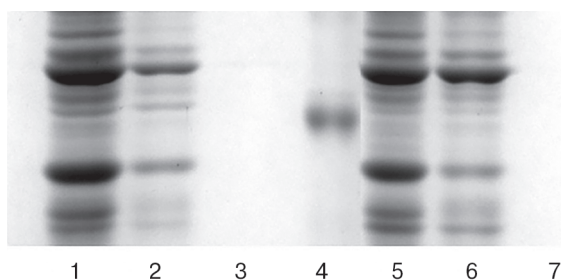


**Рисунок 1. Амплификация генов поверхностных протеинов *B. pseudomallei***

Figure 1. Amplification of genes encoding *B. pseudomallei* cell surface proteins

1 — CDS omp38; 2 — ДНК-маркер молекулярных масс (100–1000 п.н.); 3 — CDS ompA/motB; 4 — ДНК-маркер молекулярных масс (100–3000 п.н.).

1 — CDS omp38; 2 — DNA Ladder (100–1000 bp); 3 — CDS ompA/motB; 4 — DNA Ladder (100–3000 bp).



**Рисунок 2. Оценка эффективности хроматографической очистки рекомбинантных белков**

Figure 2. Efficiency of recombinant proteins chromatographic purification

1 — тотальный лизат клеток *E. coli* BL21(DE3) BpsOmp39; 2 — промывочная фракция очистки белка Omp38; 3 — элюат белка Omp38; 4 — маркер молекулярных масс (39,2 kDa); 5 — тотальный лизат клеток *E. coli* BL21(DE3) BpsOmpA; 6 — промывочная фракция очистки белка OmpA/MotB; 7 — элюат белка OmpA/MotB.

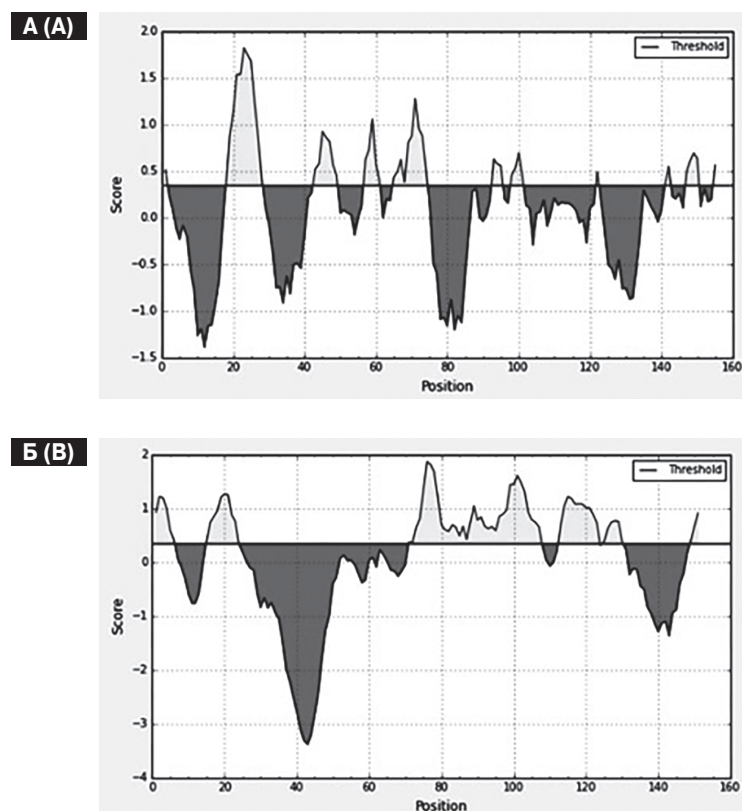
1 — whole cell lysate of *E. coli* BL21(DE3) BpsOmp39; 2 — wash fraction of purified Omp38; 3 — Omp38 elution; 4 — protein marker (39,2 kDa); 5 — whole cell lysate of *E. coli* BL21(DE3) BpsOmpA; 6 — wash fraction of purified OmpA/MotB; 7 — OmpA/MotB elution.

Молекулярным массам элюированных пептидов соответствовали N-концевые фрагменты белков, содержащие пролин на С-конце в положениях 155 (Omp38) и 151 (OmpA/MotB). Причем в предполагаемом месте «разлома» обоих протеинов была локализована пептидная связь между аминокислотами пролин и аспарагин. Известно, что полипептиды, содержащие последовательность Asn-Pro при воздействии аммиака подвергаются полному расщеплению по данной амидной связи [12]. В то же время пептидные связи между иными аминокислотами претерпевают либо частичное расщепление, либо остаются интактными. Поскольку применяемая нами схема очистки рекомбинантных белков включала этап обработки лизата бактерий-продуцентов мочевиной, приведенные выше данные подтверждают выдвинутое предположение относительно мест разрыва полипептидных связей в целевых продуктах.

Последовательности выбранных фрагментов размером 16,38 kDa (Omp38) и 16,47 kDa (OmpA/MotB) были оценены на предмет содержания линейных эпитопов. Результаты *in silico* анализа в графическом виде представляют собой кривые в осях координат: порог (ось ординат)/порядковый номер аминокислоты (ось абсцисс). Пики, расположенные выше линии порога, значение которого приравнивается к 0,35, и являются искомыми эпитопами, причем высота пика коррелирует со степенью антигенности аминокислот-

ной последовательности. На анализируемых полипептидах было установлено присутствие ряда участков, обладающих выраженной антигенной активностью (рис. 3).

Таким образом, получены штаммы-продуценты *E. coli* BL21(DE3) BpsOmp39 и *E. coli* BL21(DE3) BpsOmpA, несущие в составе вектора pPAL7 последовательности клонированных генов *omp38* и *ompA/motB* *B. pseudomallei*. Штаммы депонированы в Государственной коллекции патогенных бактерий ФКУЗ Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» под номерами КМ 252 и КМ 253, а также запатентованы в Федеральной службе по интеллектуальной собственности (положительное решение от 18.05.2018 г. по заявкам № 2016142890/10(068664) и 2016142892/10(068668)). Показана возможность накопления в рекомбинантных штаммах *E. coli* препаративных количеств поверхностных протеинов Omp38 и OmpA/MotB возбудителя мелиоидоза, полноразмерные формы которых можно безопасно выделить и очистить, применяя электрофоретическое разделение в ПААГ. Тем не менее очищенные полипептидные фрагменты, полученные нами посредством аффинной хроматографии и обладающие потенциальной антигенной активностью, также могут быть использованы при создании в дальнейшем библиотеки гибридом-продуцентов МКА для идентификации *B. pseudomallei*.



**Рисунок 3. Эпитопы N-концевого фрагмента белка Omp38 (А) и N-концевого фрагмента белка OmpA/MotB (Б) *B. pseudomallei***

Figure 3. *B. pseudomallei* protein Omp38 (A) and OmpA/MotB (B) N-terminal fragment epitopes

## Список литературы/References

1. Викторов Д.В., Захарова И.Б., Кузютина Ю.А., Лопастейская Я.А. Набор 5'-фосфорилированных олигонуклеотидных праймеров для амплификации методом полимеразной цепной реакции полной кодирующей последовательности гена ompA/motB Burkholderia pseudomallei. Патент РФ, 2608505, C12N1/00, C12Q1/68. 2017. [Viktorov D.V., Zakharova I.B., Kuzyutina J.A., Lopatetska J.A. Set 5'-phosphorylated oligonucleotide primers for amplification by polymerase chain reaction of the complete coding sequence of the gene ompA/motB Burkholderia pseudomallei. The patent of the Russian Federation, 2608505, C12N1/00, C12Q1/68. 2017. (In Russ.)]
2. Кузютина Ю.А., Захарова И.Б., Савченко С.С., Лопастейская Я.А., Молчанова Е.В., Викторов Д.В. Поиск потенциальных мишеней для детекции и дифференциации штаммов возбудителей мелиоидоза и сапа // Вестник ВолГМУ. 2016. № 4 (60). С. 114–117. [Kuzyutina Y.A., Zakharova I.B., Savchenko S.S., Lopatetska J.A., Molchanova E.V., Viktorov D.V. Search for potential targets for detection and differentiation the causative agents of melioidosis and glanders strains. *Vestnik VolgGMU = Journal of Volgograd State Medical University*, 2016, no. 4 (60), pp. 114–117. (In Russ.)]
3. Онищенко Г.Г., Сандакчиев Л.С., Нетесов С.В., Мартынюк Р.А. Биотерроризм: национальная и глобальная угроза // Вестник РАН. 2003. Т. 73, № 3. С. 195–204. [Onishchenko G.G., Sandakhchiev L.S., Netesov S.V., Martynuk R.A. Bioterrorism: national and global threat. *Vestnik RAN = RAS Bulletin*, 2003, vol. 73, no. 3, pp. 195–204. (In Russ.)]
4. Тетерятникова Н.Н., Захарова И.Б., Подшивалова М.В., Романова А.В., Лопастейская Я.А., Викторов Д.В., Алексеев В.В. Молекулярная детекция интегронов класса 1 у Burkholderia pseudomallei // Проблемы особо опасных инфекций. 2011. № 2 (108). С. 46–49. [Teteryatnikova N.N., Zakharova I.B., Podshivalova M.V., Romanova A.V., Lopasteiskaya Ya.A., Viktorov D.V., Alekseev V.V. Molecular detection of class 1 integrons in Burkholderia pseudomallei. *Problemy osobo opasnykh infektsiy = Problems of Particularly Dangerous Infections*, 2011, no. 2 (108), pp. 46–49. (In Russ.)]
5. Храпова Н.П., Алексеев В.В. Современное состояние серодиагностики мелиоидоза // Проблемы особо опасных инфекций. 2011. № 4 (110). С. 18–22. [Khrapova N.P., Alekseev V.V. Current state of human melioidosis serodiagnostics. *Problemy osobo opasnykh infektsiy = Problems of Particularly Dangerous Infections*, 2011, no. 4 (110), pp. 18–22. (In Russ.)]
6. Bielecka M.K., Devos N., Gilbert M., Hung M.C., Weynants V., Heckels J. E., Christodoulides M. Recombinant protein truncation strategy for inducing bactericidal antibodies to the macrophage infectivity potentiator protein of Neisseria meningitidis and circumventing potential cross-reactivity with human FK506-binding proteins. *Infect. Immun.*, 2015, vol. 83, no. 2, pp. 730–742. doi: 10.1128/IAI.01815-14
7. Currie B.J., Dance D.A.B., Cheng A.C. The global distribution of Burkholderia pseudomallei and melioidosis: an update. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 2008, vol. 102, pp. S1–S4. doi: 10.1016/S0035-9203(08)70002-6
8. Gauthier J., Gerome P., Defez M., Neulat-Ripoll F., Foucher B., Vitry T., Crevon L., Valade E., Thibault F.M., Biot F.V. Melioidosis in travelers returning from Vietnam to France. *Emerg. Infect. Dis.*, 2016, vol. 22, no. 9, pp. 1671–1673. doi: 10.3201/eid2209.160169
9. Reyes A.W.B., Simborio H.L.T., Hop H.T., Arayan L.T., Kim S. Molecular cloning, purification and immunogenicity of recombinant Brucella abortus 544 malate dehydrogenase protein. *J. Vet. Sci.*, 2016, vol. 17, no. 1, pp. 119–122. doi: 10.4142/jvs.2016.17.1.119
10. Siritapetawee J., Prinz H., Krittanai C., Suginta W. Expression and refolding of Omp38 from Burkholderia pseudomallei and Burkholderia thailandensis, and its function as a diffusion porin. *J. Biochem.*, 2004, vol. 384, no. 3, pp. 609–617. doi: 10.1042/BJ20041102
11. Tabll A., Abbas A.T., El-Kafrawy S., Wahid A. Monoclonal antibodies: principles and applications of immunodiagnosis and immunotherapy for hepatitis C virus. *World J. Hepatol.*, 2015, vol. 7, no. 22, pp. 2369–2383. doi: 10.4254/wjh.v7.i22.2369
12. Tarelli E., Corran P.H. Ammonia cleaves polypeptides at asparagine proline bonds. *J. Pept. Res.* 2003, vol. 62, no. 6, pp. 245–251.
13. Trivedi P., Tuteja U., Khushiramani R., Reena J., Batra H.V. Development of a diagnostic system for Burkholderia pseudomallei infections. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 2012, vol. 28, no. 7, pp. 2465–2471. doi: 10.1007/s11274-012-1053-y
14. Workgroup, Planning. Biological and chemical terrorism: strategic plan for preparedness and response. *MMWR*, 2000, vol. 49, no. RR-4, pp. 1–26.
15. Zhao S., Shi J., Zhang C., Zhao Y., Mao F., Yang W., Bai B., Zhang H., Shi C., Xu Z. Monoclonal antibodies against a Mycobacterium tuberculosis Ag85B-Hsp16. 3 fusion protein. *Hybridoma*, 2011, vol. 30, no. 5, pp. 427–432. doi: 10.1089/hyb.2011.0047

**Авторы:**

**Кузютина Ю.А.**, научный сотрудник лаборатории патогенных буркхольдерий ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, г. Волгоград, Россия;  
**Захарова И.Б.**, к.б.н., доцент, зав. отделом микробиологии ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, г. Волгоград, Россия;  
**Викторов Д.В.**, д.б.н., доцент, зам. директора по научно-экспериментальной работе ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, г. Волгоград, Россия.

**Authors:**

**Kuzyutina Yu.A.**, Researcher, Laboratory of Pathogenic Burkholderia, Volgograd Plague Control Research Institute, Volgograd, Russian Federation;  
**Zakharova I.B.**, PhD (Biology), Associate Professor, Head of the Department of Microbiology, Volgograd Plague Control Research Institute, Volgograd, Russian Federation;  
**Viktorov D.V.**, PhD, MD (Biology), Associate Professor, Deputy Director for Scientific and Experimental Work, Volgograd Plague Control Research Institute, Volgograd, Russian Federation.

Поступила в редакцию 12.07.2018  
 Принята к печати 11.03.2019

Received 12.07.2018  
 Accepted 11.03.2019