

Research Article

Analisis *in silico* Peptida Berasaskan Epitop Daripada Protein-Protein Immunogen *Burkholderia pseudomallei*

Yi Wan Seow, Zhi Yun Tan and Sylvia Chieng*

Jabatan Sains Biologi dan Bioteknologi, Fakulti Sains dan Teknologi, Universiti Kebangsaan Malaysia, 43600 Bangi, Selangor, Malaysia

*Corresponding author: sylvia@ukm.edu.my

ABSTRACT

Melioidosis is an infectious disease caused by the gram-negative bacterium *Burkholderia pseudomallei*. This disease is associated with high human mortality rate, especially in tropical and subtropical regions. Rapid diagnosis is crucial in ensuring proper management and treatment of the disease with effective antibiotics. Currently, melioidosis diagnosis, bacterial culture is time consuming, difficult, and not sensitive, while IHA is hindered by high antibody background in healthy population and ELISA lacks standardization and is hindered by antigen inconsistency. To improve the current diagnosis method for melioidosis, this research aims to identify, screen, and develop epitope-spanning peptides to be used as standardized *B. pseudomallei* antigen in serodiagnosis of melioidosis. Peptides are favoured as they are more stable, and they offer effective and rapid antibody detection. Using *in silico* analysis, a pool of 154 *B. pseudomallei* proteins previously reported as immunogenic were screened and ranked based on their antigenicity, subcellular localization, stability, adhesive properties, and ability to interact with class I and class II major histocompatibility complex (MHC). The selected candidate from the analysis, BPSS0908 and BPSL2152 were then taken for further analysis to identify linear B-cell epitopes using several sequence-based B-cell epitope prediction tools. Consensus sequences that are confidently predicted by more than two prediction tools and are longer than 15 amino acids were then selected as linear B-cell epitopes. Through ELISA analysis, low sensitivity was demonstrated by the epitope-spanning peptides as compared to *B. pseudomallei* crude lysate. However, high specificity of 100% was observed for all tested peptides. The low sensitivity demonstrated by the peptides in ELISA could be due to lack of 3-dimensional structure which is needed for a stable antigen-antibody binding.

Key words: *Burkholderia pseudomallei*, ELISA, melioidosis, peptide, serodiagnosis

Article History

Accepted: xx November 2022

First version online: 25 December 2022

Cite This Article:

Seow, Y.W., Tan, Z.Y. & Chieng, S. 2022. Analisis *in-silico* peptida berasaskan epitop daripada protein-protein imunogen *Burkholderia pseudomallei*. Malaysian Applied Biology, 51(5): 237-247. <https://doi.org/10.55230/mabjournal.v51i5.2404>

Copyright

© 2022 Malaysian Society of Applied Biology

ABSTRAK

Melioidosis ialah penyakit berjangkit yang disebabkan oleh bakteria Gram-negatif, iaitu *Burkholderia pseudomallei*. Penyakit ini telah menyumbang kepada kadar kematian manusia yang tinggi, terutamanya di kawasan tropika dan subtropika. Diagnosis yang pantas adalah penting dalam memastikan pengurusan dan rawatan penyakit yang sesuai dengan antibiotik yang berkesan. Pada masa kini, diagnosis melioidosis mempunyai beberapa kekurangan. Kultur bakteria adalah sukar, kurang sensitif dan mengambil masa yang lama, manakala kaedah hemaglutinasi tak langsung (IHA) dihadkan dengan latar belakang antibodi yang tinggi dan asai imunojerapan berpaut enzim (ELISA) tidak mempunyai piawaian dan dihadkan oleh masalah ketidakkonsistenan antigen yang digunakan. Untuk memperbaiki kaedah diagnosis melioidosis yang sedia ada, kajian ini telah dijalankan untuk menyaring, mengenalpasti dan mencirikan peptida berasaskan epitop sebagai calon-calon antigen *B. pseudomallei* yang boleh digunakan sebagai antigen seragam dalam serodiagnosis melioidosis. Peptida digunakan sebagai calon diagnosis kerana peptida adalah stabil serta dapat mengesan kehadiran antibodi terhadap patogen dalam masa yang singkat dan cekap. Dengan menggunakan analisis *in silico*, sebanyak 154 protein *B. pseudomallei* yang dilaporkan sebagai imunogen telah disaring dan disenaraikan berdasarkan sifat antigen, penyetempatan subsel, kestabilan, sifat lekatan dan keupayaan untuk berinteraksi dengan molekul kompleks histokompatibiliti utama (MHC) kelas I dan kelas II. Calon-calon yang dipilih daripada analisis tersebut, iaitu

BPSS0908 dan BPSL2151 kemudiannya digunakan dalam analisis lanjutan untuk mengenalpasti epitop linear sel B menggunakan beberapa peramal epitop linear sel B berdasarkan jujukan. Jujukan konsensus yang diramal oleh lebih daripada dua peramal epitop linear sel B dan mengandungi lebih daripada 15 asid amino lalu dipilih sebagai epitop linear sel B. Melalui analisis ELISA, kesemua peptida yang diuji menunjukkan kesensitifan yang rendah berbanding lisat kasar *B. pseudomallei*. Walaubagaimanapun, kespesifikan yang tinggi iaitu sebanyak 100% ditunjukkan oleh kesemua peptida. Kesensitifan peptida yang mengandungi epitop linear sel B yang rendah dalam analisis ELISA mungkin disebabkan oleh epitop linear yang dikenalpasti dan dicirikan memerlukan struktur tiga dimensi untuk membentuk ikatan antigen-antibodi yang kukuh.

Kata kunci: *Burkholderia pseudomallei*, ELISA, melioidosis, peptida, serodiagnosis

PENGENALAN

Melioidosis merupakan penyakit yang disebabkan oleh bakteria *Burkholderia pseudomallei* yang boleh menjangkiti manusia dan haiwan. Melioidosis berlaku secara endemik di lebih kurang 46 buah negara merangkumi kawasan-kawasan tropika dan subtropika terutamanya di Asia Tenggara, Australia utara dan benua kecil India (Wiersinga et al., 2018). Kajian Limmathurotsakul et al. (2016) telah meramalkan bilangan kes melioidosis manusia sedunia adalah sebanyak 165 000 kes setahun dengan kes kematian sebanyak 89 000 kes. Di Malaysia, melioidosis bukanlah penyakit yang dikategorikan sebagai penyakit notifikasi di bawah Akta Pencegahan dan Pengawalan Penyakit Berjangkit 1988 (Akta 342). Oleh itu, beban sebenar penyakit melioidosis di Malaysia tidak diketahui, walaupun lebih daripada seribu kes telah dilaporkan di seluruh Malaysia (Nathan et al., 2018).

Burkholderia pseudomallei ialah saprofit Gram negatif yang boleh dijumpai di dalam tanah, air bawah tanah, aliran bertakung, sawah padi dan kolam. Jangkitan melioidosis boleh berlaku melalui pendedahan kepada tanah dan air yang terkontaminasi, penyedutan aerosol dan pengingesan (Lau et al., 2015). Potensi pendedahan kepada *B. pseudomallei* boleh meningkat dengan perubahan iklim kerana perubahan geografi. Hal ini kerana *B. pseudomallei* yang berada di dalam tanah dapat bergerak ke permukaan tanah dan menjadi aerosol semasa hujan lebat (Virk et al., 2020). Bakteria ini juga berupaya untuk mengelak daripada serangan sistem pertahanan perumah dan bereplikasi di dalam sel perumah. Kebolehan ini disumbang oleh pelbagai faktor kevirulenan termasuk polisakarida permukaan, sistem perembesan dan faktor-faktor lain seperti faktor maut-1, protein perembesan dan metabolit sekunder (Gassiep et al., 2020).

Pengesahan penyakit melioidosis di

kebanyakan makmal masih menjadi cabaran utama disebabkan oleh kelemahan-kelemahan diagnosis yang sedia ada. Diagnosis yang lambat menyebabkan rawatan tidak dapat diberikan dengan segera kepada pesakit. Hal ini meningkatkan kadar kematian melioidosis terutamanya di kawasan-kawasan endemik (Kingsley et al., 2016). Oleh itu, masa yang digunakan dalam diagnosis perlu dikurangkan agar kekerapan jangkitan dan kadar kematian disebabkan oleh melioidosis dapat dikawal. Kebanyakan makmal diagnostik di Malaysia menggunakan kaedah pengkulturan bakteria yang mengambil masa yang panjang untuk mengenal pasti kehadiran *B. pseudomallei* dalam sesuatu spesimen klinikal (Nathan et al., 2018). Kaedah ini adalah sukar untuk mengesan kehadiran *B. pseudomallei* disebabkan pertumbuhan yang perlahan dan kehadiran bakteria lain di dalam sampel (Virk et al., 2020). Kaedah serologi seperti hemagglutinasin tak langsung (*indirect hemagglutination*, IHA) adalah kurang spesifik terutamanya di kawasan endemik akibat kehadiran seroprevalens yang tinggi di kalangan populasi (Lau et al., 2015; Mustafa et al., 2015). Manakala bagi kaedah ELISA, beberapa antigen yang berpotensi telah dilaporkan, namun antigen-antigen ini belum dicirikan dengan terperinci dan tiada penyeragaman di peringkat antarabangsa.

Bagi mengatasi kekurangan yang dihadapi dalam kaedah-kaedah diagnosis yang sedia ada, terutamanya masalah ketakselarasan protein sebagai antigen dalam asai ELISA, penggunaan peptida sebagai antigen telah dicadangkan. Penggunaan protein lengkap sebagai antigen boleh menimbulkan masalah seperti ketidakstabilan, kesukaran dalam pengendalian dan pengesanan oleh lebih daripada satu antibodi, yang mana boleh menyebabkan peningkatan kesilapan di dalam diagnosis (Cretich et al., 2019). Berbanding dengan protein lengkap, peptida adalah lebih mudah disintesis sebagai rantai linear melalui kaedah fasa pepejal, dan mudah disimpan serta diurus. Peptida juga dibuktikan mampu menangkap antibodi yang beredar dalam plasma dan serum darah pesakit (Cretich et al., 2019). Peptida juga lebih stabil secara kimia (Heyduk et al., 2018). Penggunaan peptida juga memudahkan pengubahsuaian dan menunjukkan kespesifikan terhadap sasaran yang lebih tinggi (Ellert-Miklaszewska et al., 2017). Penggunaan peptida berasaskan epitop reaktif adalah lebih berkesan dalam merangsang dan mengamplifikasikan tindak balas keimunan berbanding dengan protein lengkap (Bergamaschi et al., 2019).

Oleh itu, penyelidikan ini bertujuan untuk mengenal pasti dan mencirikan peptida berasaskan epitop daripada protein imunogen *B. pseudomallei* untuk serodiagnosis melioidosis.

Protein-protein imunogen *B. pseudomallei* yang telah dikenal pasti melalui kajian lepas telah disaring dan disenaraikan berdasarkan sifat fizikal dan kimia menggunakan pendekatan in siliko. Protein-protein yang terpilih kemudiannya digunakan untuk analisis lanjutan bagi mengenal pasti epitop linear sel B menggunakan beberapa program peramal epitop linear sel B. Peptida yang diperolehi kemudiannya diuji melalui asai ELISA bagi menentukan kespesifikan dan kesensitifan peptida sebagai antigen dalam serodiagnosis melioidosis.

BAHAN DAN KAEDAH

Analisis bioinformatik untuk penyaringan calon antigen

Sebanyak 154 protein *B. pseudomallei* yang menunjukkan imunoreaktiviti dalam kajian yang telah dijalankan oleh Felgner *et al.* (2009) dan Su *et al.* (2008) telah dikenal pasti dan digunakan untuk analisis bioinformatik (Lampiran). Penyaringan protein imunogen *B. pseudomallei* dijalankan berdasarkan kaedah yang digunakan oleh Muruato *et al.* (2017) dengan pengubahsuaian.

Penyaringan berasaskan sifat fizikal

Protein yang berpotensi sebagai antigen telah dianalisis melalui program Vaxign (<http://www.violinet.org/vaxign/>) dengan memasukkan jujukan setiap protein untuk menyingkirkan protein yang menunjukkan homologi jujukan protein dengan protein hos (He *et al.*, 2010). Sebagai output, perkataan 'yes' pada ruangan protein serupa manusia menunjukkan protein tersebut menunjukkan homologi jujukan protein dengan protein hos, iaitu protein manusia. Manakala perkataan 'no' menunjukkan yang sebaliknya.

Seterusnya, PSORTb 3.0 (<https://www.psort.org/psortb/>) digunakan untuk mengesan protein membran luar dan protein ekstrasel (Yu *et al.*, 2010). Protein-protein dengan skor ramalan yang lebih daripada 9.5 telah dipilih. Sebagai output, bahagian 'final prediction' akan menunjukkan penyetempatan setiap protein daripada ekstrasel, membran luar, sitoplasma, periplasma atau tidak diketahui, manakala bahagian 'localization score' menunjukkan skor PSORTb mengenai penyetempatan ramalan protein tersebut.

Kajian ini diteruskan dengan penyaringan protein dari segi sifat antigen (*threshold* = 0.4) dan kestabilan (*threshold* ≤ 40) melalui VaxiJen (<http://www.ddg-pharmfac.net/vaxijen/VaxiJen/VaxiJen.html>) (Doytchinova & Flower 2007) dan ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>) (Gasteiger *et al.*, 2005). Sebagai output, ruangan dalam VaxiJen akan menunjukkan sama ada protein tersebut merupakan protein antigen ataupun protein bukan antigen di bawah bahagian 'overall prediction for

the protective antigen', manakala ProtParam akan menunjukkan protein tersebut stabil atau tidak stabil bawah bahagian 'instability index'.

Penyaringan berasaskan sifat kimia

Seterusnya, protein yang tidak tersingkir kemudiannya dianalisis dan disenaraikan berdasarkan ramalan sifat lekatan melalui Vaxign. Kemudian, perisian NetCTL1.2 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetCTL>) (Larsen *et al.*, 2007) dan NetMHCII 2.3 (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?NetMHCII-2.3>) (Jensen *et al.*, 2018) telah digunakan untuk meramal sifat imunogen bagi protein berasaskan pengikatan protein terhadap molekul MCH-I dan MHC-II. Sebagai input, jujukan protein dalam bentuk fasta digunakan bagi kesemua perisian bioinformatik yang telah digunakan. Sebagai output, ruangan Vaxign menunjukkan keberangkalian sifat lekatan, manakala ruangan NetCTL 1.2 menunjukkan bilangan ligan MHC-I yang dikesan. Bagi output NetMHCII 2.3 pula, bilangan peptida sebagai pelekat kuat, bilangan peptida sebagai pelekat lemah dan jumlah bilangan peptida telah ditunjukkan, namun hanya jumlah bilangan peptida difokuskan. Protein yang menunjukkan keupayaan yang baik dari segi sifat lekatan dan sifat imunogen berasaskan pengikatan protein terhadap molekul MHC kelas I dan kelas II telah dipilih sebagai calon untuk pengenalpastian dan pencirian peptida berasaskan epitop.

Pengenalpastian dan pencirian peptida berasaskan epitop

Pengenalpastian dan pencirian peptida berasaskan epitop telah dilakukan secara *in silico* berdasarkan kaedah oleh Nithichanon *et al.* (2015). Ramalan epitop linear sel B berdasarkan jujukan dijalankan dengan menggunakan tiga program peramal epitop linear sel B, iaitu BepiPred 2.0 (<http://tools.ieedb.org/bcell/>) (Jespersen *et al.*, 2017), BCPred (<http://ailab.ist.psu.edu/bcpred/predict.html>) (El-Manzalawy *et al.*, 2008), dan AAP (<http://ailab.ist.psu.edu/bcpred/predict.html>) (Chen *et al.*, 2007). Sebagai input, jujukan lengkap protein imunogen *B. pseudomallei* yang terpilih telah dihantar ke setiap program peramal epitop linear sel B. Parameter BepiPred 2.0 ialah *threshold* = 0.35, BCPred ialah kespesifikan pengelasan = 75%, dan AAP ialah kespesifikan pengelasan = 75%. Sebarang jujukan yang diramal sebagai epitop oleh lebih daripada dua program peramal epitop linear sel B berdasarkan jujukan dan mengandungi lebih daripada 15 asid amino dipilih sebagai epitop linear sel B. Epitop linear sel B yang mempunyai intensiti tertinggi daripada BepiPred 2.0 dan skor tertinggi daripada BCPred serta AAP telah dipilih sebagai calon peptida. Jujukan-jujukan

peptida yang dipilih kemudiannya disintesis oleh *Elabscience*® (Amerika Syarikat).

Penentuan kesensitifan dan kespesifikan peptida sebagai antigen

Asai imunojerapan berpaut enzim (ELISA)

Asai ELISA telah dijalankan berdasarkan kaedah yang digunakan oleh Chieng *et al.* (2015) dengan pengubahsuaian. Piring mikrotiter bertelaga 96 disalut dengan lisat *B. pseudomallei* atau peptida berasaskan epitop (1.25 µg/mL) dalam penimbal salutan (0.1 M natrium karbonat-bikarbonat, pH 9.6) dengan isipadu akhir sebanyak 100 µL dan dieramkan pada 4 °C semalaman. Selepas itu, telaga-telaga dibilas lima kali dengan PBS-Tween 0.1% dan dijerap dengan 100 µL penimbal penghalang jerapan iaitu 5% susu skim dalam PBS selama satu jam pada 37 °C. Selepas sepuluh bilasan dengan 0.1% PBST, 100 µL sera yang telah dicairkan dalam penimbal penghalang jerapan (1:125) ditambahkan ke dalam setiap telaga. Setiap sampel sera dianalisis dalam tiga replikat. Piring tersebut dieramkan pada 37 °C selama satu jam dan dibilas seperti yang dijelaskan. Peroksidase horseradish terkonjugat anti-manusia IgG (Promega Co., USA) (100 µL dengan pencairan 1:2 500) ditambahkan ke dalam telaga dan dieramkan selama satu jam pada 37 °C. Kesemua telaga dibilas sepuluh kali dengan 0.1% PBST dan tindak balas enzim dikesan oleh penambahan 150 µL substrat 1-Step™ ABTS (Thermo Fisher Scientific Inc., USA) selama 30 minit di suhu bilik. Sebanyak 100 µL larutan SDS 1% ditambahkan ke dalam setiap telaga bagi menghentikan tindak balas penghasilan warna oleh substrat. iMark™ Microplate Reader (Bio-Rad Laboratories, USA) digunakan untuk menentukan bacaan penyerapan optik dengan jarak gelombang 405 nm. Purata nilai penyerapan dan sisihan piawai untuk setiap ukuran dan sampel kemudiannya ditentukan.

Penentuan kesensitifan dan kespesifikan ELISA

Kesensitifan dan kespesifikan ELISA telah disahkan melalui analisis 24 sampel sera pesakit melioidosis dan 8 sampel sera normal. Nilai purata kesemua sampel sera normal dengan dua kali sisihan piawai digunakan sebagai titik potongan (*cut-off point*). Sampel sera yang memberikan nilai melebihi titik potongan yang ditentukan bagi setiap antigen ditakrifkan sebagai positif.

HASIL DAN PERBINCANGAN

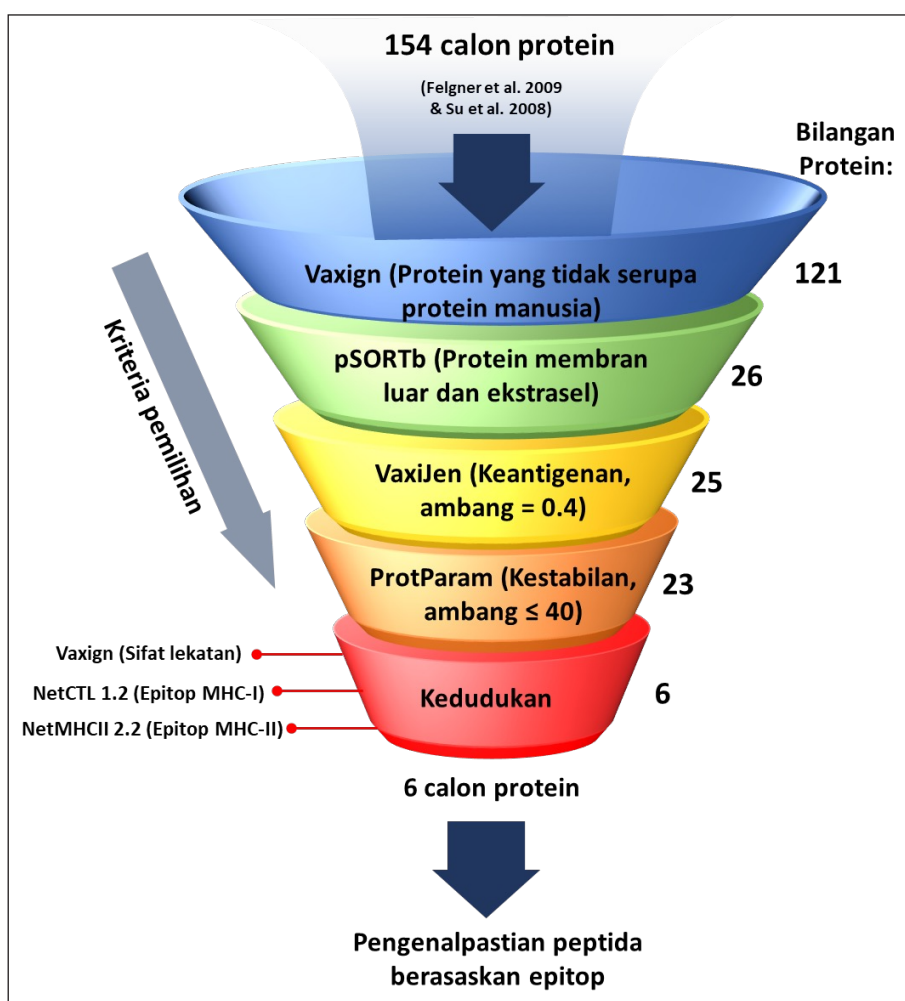
Serodiagnosis melioidosis melalui ELISA menunjukkan sensitiviti yang rendah dan mempunyai beberapa kekurangan iaitu antigen yang digunakan oleh setiap lokasi adalah

tidak diseragamkan secara antarabangsa. Ini menyebabkan pelbagai variasi keputusan diperhatikan apabila kepelbagaian antigen digunakan dalam serodiagnosis melalui ELISA. Selain itu, IHA pula menunjukkan kadar keputusan positif palsu yang tinggi akibat latar belakang antibodi terhadap *Burkholderia pseudomallei* yang tinggi (Chaichana *et al.*, 2018). Penduduk kawasan endemik melioidosis berkemungkinan mempunyai antibodi terhadap *B. pseudomallei* akibat sedikit sebanyak terdedah kepada *B. pseudomallei*. Oleh itu, individu yang sihat mungkin didiagnosis dengan keputusan positif dengan serodiagnosis yang sedia ada (Hoffmaster *et al.*, 2015).

Tambahan pula, kultur bakteria *B. pseudomallei* adalah susah, mengambil masa yang panjang (Sirisinha *et al.*, 2000) dan tidak sensitif (60%) (Limmathurotsakul *et al.*, 2010). Dengan menggunakan analisis *in silico*, sebanyak 154 protein *B. pseudomallei* yang dilaporkan sebagai imunogen telah disaring dan disenaraikan berdasarkan sifat antigen, penyetempatan subselel, kestabilan, sifat pelekat dan keupayaan untuk berinteraksi dengan molekul MHC kelas I dan kelas II. Calon yang dipilih daripada analisis tersebut kemudiannya digunakan dalam analisis lanjutan untuk mengenalpasti epitop linear sel B menggunakan beberapa peramal epitop linear sel B berdasarkan jujukan. Jujukan konsensus yang diramal oleh lebih daripada dua peramal epitop linear sel B dan mengandungi lebih daripada 15 asid amino lalu dipilih sebagai epitop linear sel B. Melalui analisis ELISA, kesensitifan dan kespesifikan peptida yang mengandungi epitop linear sel B yang dikenalpasti telah dianalisis.

Pemilihan calon antigen berasaskan sifat fizikal

Melalui program Vaxign, sebanyak 33 protein disingkirkan kerana telah dikenalpasti mempunyai homologi jujukan protein dengan protein hos dan 121 protein diterima (Rajah 1). Hal ini adalah untuk mengelakkan keputusan diagnosis negatif palsu akibat ketiadaan antibodi yang terhasil terhadap protein hos (manusia) atau protein yang serupa protein hos. Teori pemilihan klon (*clonal selection*) Burnet pada tahun 1959 telah meramalkan bahawa pendedahan pramatang limfosit kepada antigen hosnya akan menyebabkan kematian limfosit dan proliferasi limfosit tidak akan berlaku. Semasa kematangan sel B, kesemua sel B yang mempunyai reseptor pengikatan antigen yang boleh mengenalpasti protein hos akan dimatikan dan disingkirkan melalui penghapusan klon (*clonal deletion*) untuk mengehadkan tindak balas sistem imun terhadap tisu hos (Rose 2015). Oleh itu, protein hos atau protein serupa hos tidak dapat merangsang sistem keimunan terhadap protein tersebut. Antibodi terhadap protein tersebut juga



Rajah 1. Hasil analisis bioinformatik untuk pemilihan calon protein berasaskan sifat fizikal dan kimia

tidak akan dihasilkan. Protein yang serupa hos tidak boleh digunakan sebagai calon antigen dalam serodiagnosis kerana ketiadaan antibodi yang mengikat padanya, lantas mengakibatkan keputusan negatif palsu (He *et al.*, 2010).

Seterusnya, melalui program pSORTb, sebanyak 95 protein disingkirkan dan hanya 26 protein yang dikesan sebagai protein membran luar atau protein ekstrasel, dengan skor ramalan lebih daripada 9.5, diterima (Rajah 1). BPSS1525 dan BPSS2053 disingkirkan kerana skor ramalan tidak melebihi 9.5 walaupun penyetempatan mereka ialah ekstrasel dan membran luar masing-masing. Hanya protein ekstrasel dan protein membran luar diterima sebagai calon antigen untuk meningkatkan kemungkinan antigen diagnosis yang diguna boleh mengesan antibodi yang khusus terhadap antigen tersebut akibat lokasinya. Hal ini kerana protein ekstrasel dan protein membran luar lebih berkemungkinan untuk merangsang sistem keimunan hos demi penghasilan antibodi terhadap patogen (Muruato *et al.*, 2017). Menurut penjelasan pSORTb, skor ramalan bagi sesuatu penyetempatan menunjukkan nilai keyakinan yang dikaitkan dengan penyetempatan tersebut.

Semakin tinggi skor ramalan bagi sesuatu penyetempatan, semakin tinggi nilai keyakinan bahawa protein yang dianalisis mempunyai penyetempatan tersebut (Yu *et al.*, 2010). Oleh itu, hanya protein yang mempunyai skor ramalan lebih daripada 9.5 diterima sebagai calon diagnosis untuk meningkatkan keyakinan tentang penyetempatan protein.

Analisis diteruskan dengan program VaxiJen, iaitu satu protein disingkirkan kerana berkemungkinan bukan antigen dan 25 protein yang berkemungkinan antigen diterima (Rajah 1). Hanya protein yang bersifat antigen diterima sebagai calon antigen. Sifat antigen perlu dipertimbangkan dalam pemilihan calon diagnosis untuk menilai potensi sifat imunogen protein tersebut (Muruato *et al.*, 2017). Kriteria yang perlu ada adalah keupayaan protein merangsang sistem imun untuk menghasilkan antibodi spesifik terhadap protein antigen tersebut. Sifat antigen protein menunjukkan keupayaan untuk dikenali secara khusus oleh antibodi yang dihasilkan daripada tindak balas imun terhadap protein antigen tersebut (Ilinskaya & Dobrovolskaia 2016). Oleh itu, protein yang bersifat antigen dipilih untuk

meningkatkan kemungkinan calon antigen dapat mengenali antibodi melalui interaksi antigen-antibodi (Duthie *et al.*, 2014).

Seterusnya, melalui program ProtParam, dua protein yang tidak stabil disingkirkan dan 23 protein diterima lalu diteruskan dengan penyaringan calon antigen berasaskan sifat kimia (Rajah 1). Hanya protein yang stabil dipilih sebagai calon antigen melalui ProtParam kerana molekul yang lebih stabil adalah lebih senang disediakan dan boleh dihasilkan dalam kuantiti yang lebih banyak (Dong *et al.*, 2020).

Pemilihan calon antigen berasaskan sifat kimia

Hasil penyaringan berdasarkan sifat fizikal telah menghasilkan 23 calon protein yang berpotensi. Kesemua protein tersebut kemudiannya disaring berdasarkan sifat kimia iaitu sifat lekatan dan bilangan ligan terhadap molekul MHC-I dan MHC-II. Hasil penyaringan berasaskan sifat kimia pula telah menghasilkan 6 calon protein yang menunjukkan sifat lekatan dan bilangan ligan terhadap MHC-I dan MHC-II yang tertinggi (Jadual 1). Melalui program Vaxign, enam protein yang menunjukkan keberangkalian sifat lekatan yang tertinggi ialah BPSL1661, BPSL3319, BPSL0280, BPSS0908, BPSL2030 dan BPSL0093. Protein yang bersifat lekatan tinggi dipilih sebagai calon antigen supaya antigen tersebut dapat melekat pada sel hos, lalu meningkatkan kemungkinan antigen tersebut dapat menjangkiti sel hos dan menyebabkan penghasilan antibodi khusus terhadap antigen tersebut. Hal ini selari dengan kajian Huang *et al.* (2016) yang membuktikan sifat lekatan bakteria patogen *Helicobacter pylori* merupakan penentu tunggal dan utama bagi serangan patogen terhadap sel hos. Kajian Zhang *et al.* (2015) juga mendapati tiada perbezaan yang signifikan di antara pelbagai strain bakteria dari segi kadar jangkitan dan perlekatan pada sel hos. Hal ini membuktikan bahawa jumlah bakteria yang berkeupayaan untuk melekat kepada sel hos menjadi penentu kepada jumlah akhir bakteria yang invasif. Kedua-dua kajian tersebut membuktikan kepentingan sifat lekatan bakteria dalam keupayaan bakteria untuk menjangkiti sel hos lalu merangsang penghasilan antibodi yang dapat dikesan semasa serodiagnosis (Huang *et al.*, 2016, Zhang *et al.*, 2015).

Melalui program NetCTL 1.2 dan NetMHC-II 2.3, bilangan ligan terhadap MHC-I dan MHC-II pada calon protein telah diramalkan (Jadual 1). Pemilihan calon antigen berdasarkan bilangan epitop yang mengikat pada molekul MHC kelas I dan kelas II masing-masing digunakan untuk meramal sifat imunogen calon-calon antigen (Muruato *et al.*, 2017). MHC kelas I dan kelas II memainkan

peranan penting dalam sistem keimunan perolehan, iaitu kedua-dua kelas ini berkongsi tugas untuk mempamerkan peptida antigen pada permukaan sel untuk pengecaman oleh sel T dan sel B (Murphy & Weaver 2017). Kajian Murphy dan Weaver (2017) juga menyatakan kompleks peptida imunogen-MHC kelas I dipamerkan pada permukaan sel bernukleus dan dikesan oleh sel T CD8+ sitotoksik. Kompleks peptida imunogen-MHC kelas II pula dipamerkan pada sel pameran antigen (*antigen-presenting cell*) serta dikesan oleh sel T CD4 dan sel B, seterusnya akan merangsang penghasilan antibodi. Oleh itu, pemilihan calon antigen berdasarkan bilangan epitop yang mengikat pada molekul MHC kelas I dan kelas II boleh digunakan untuk meramal sifat imunogen protein untuk merangsang penghasilan antibodi. (Wieczorek *et al.*, 2017)

Berdasarkan penyaringan dan kedudukan protein-protein imunogen yang dianalisis, dua protein iaitu BPSS0908 dan BPSL2152 telah dipilih untuk analisis selanjutnya. BPSS0908 merupakan protein permukaan yang berpotensi untuk memodulasikan interaksi sel hos (Holden *et al.*, 2004), lalu meningkatkan kemungkinan protein ini dapat merangsang penghasilan antibodi terhadap *B. pseudomallei*. BPSS0908 telah dibuktikan menunjukkan seroaktiviti apabila disaring terhadap sera melioidosis manusia dan merupakan satu antara tujuh calon tertinggi sebagai antigen *Burkholderia* melalui analisis bio-dan imunoinformatik (Muruato *et al.*, 2017). Protein BPSL2151 dikenali sebagai protein membran luar faktor pemasangan BamA atau Omp85 (Silhavy *et al.*, 2010). Protein ini telah dilaporkan dapat mengaruh system keimunan hos untuk memberi perlindungan terhadap jangkitan *B. pseudomallei* dalam mencit. Protein rekombinan Omp85 didapati mengaruh gerak balas keimunan jenis Th2 dalam 70% mencit BALB/c kajian. Mencit-mencit ini didapati terimun kerana terlindung daripada jangkitan *B. pseudomallei* dan kandungan bakteria di dalam organ-organ luar paru didapati berkurangan (Su *et al.*, 2010).

Peptida sebagai antigen serodiagnosis

Merujuk kepada Nithichanon *et al.* (2015), pengenalanpastian dan pencirian peptida berasaskan epitop boleh dilakukan dengan menggunakan peramal linear epitop sel B berdasarkan jujukan seperti BepiPred 2.0, BCPred dan AAP. Hanya epitop yang mempunyai skor >0.9 dan skor >0.99 bagi BCPred dan AAP masing-masing diambil sebagai pilihan untuk meningkatkan keyakinan bahawa calon antigen yang dicirikan dapat mengesan antibodi spesifik terhadap antigen *B. pseudomallei*. Bagi protein BPSS0908 (nombor rujukan UniProt Q63LV4_BURPS), terdapat empat jujukan konsensus peptida telah dikesan sebagai

Jadual 1. Hasil analisis protein sebagai calon antigen berdasarkan sifat lekatan dan bilangan epitop yang mengikat kepada molekul MHC-I dan MHC-II

Bil	Tanda Lokus	Keberangkalian Sifat Lekatan	Bilangan ligan MHC-I	Bilangan ligan MHC-II
1	BPSS1532	0.247	10	57
2	BPSL3319	0.913	7	43
3	BPSL0280	0.884	31	124
4	BPSL1913	0.536	8	51
5	BPSL2522	0.551	4	24
6	BPSL2030	0.876	5	5
7	BPSS1588	0.69	13	38
8	BPSS0908	0.877	22	101
9	BPSS1850	0.337	26	86
10	BPSL0326	0.766	13	46
11	BPSS2160	0.761	18	43
12	BPSS2052	0.67	19	71
13	BPSS1727	0.353	8	70
14	BPSS0708	0.824	20	36
15	BPSS2136	0.801	16	40
16	BPSL0093	0.854	15	73
17	BPSL1661	0.969	87	163
18	BPSL2807	0.479	6	48
19	BPSL2780	0.225	7	44
20	BPSL0007	0.443	12	90
21	BPSL1775	0.668	27	85
22	BPSL0995	0.298	8	163
23	BPSL2151	0.779	23	102

peptida antigen melalui analisis program BepiPred 2.0, BCPred dan AAP, iaitu jujukan konsensus peptida pada kedudukan asid amino 323-339, 435-453, 175-193 dan 24-38. Jujukan konsensus peptida pada kedudukan 323-339 telah dipilih kerana diramalkan dengan intensiti BepiPred 2.0 (0.655 – 0.713), skor BCPred (0.998) dan skor AAP (1) yang tertinggi, lalu dinamakan semula sebagai antigen PSEP-1.

Bagi protein BPSL2151 (nombor rujukan UniProt Q63T20_BURPS) pula, terdapat 11 jujukan konsensus peptida telah dikesan sebagai peptida antigen melalui analisis program BepiPred 2.0, BCPred dan AAP, iaitu jujukan konsensus peptida pada kedudukan asid amino 85-105, 127-146, 155-171, 205-234, 295-311, 359-378, 410-429, 497-513, 547-564, 664-682 dan 707-724. Jujukan konsensus peptida pada kedudukan 547-564 telah dipilih kerana diramalkan dengan intensiti BepiPred 2.0 (0.648), skor BCPred (0.956) dan skor AAP (0.998) yang tertinggi, lalu dinamakan semula sebagai antigen BAMA-1.

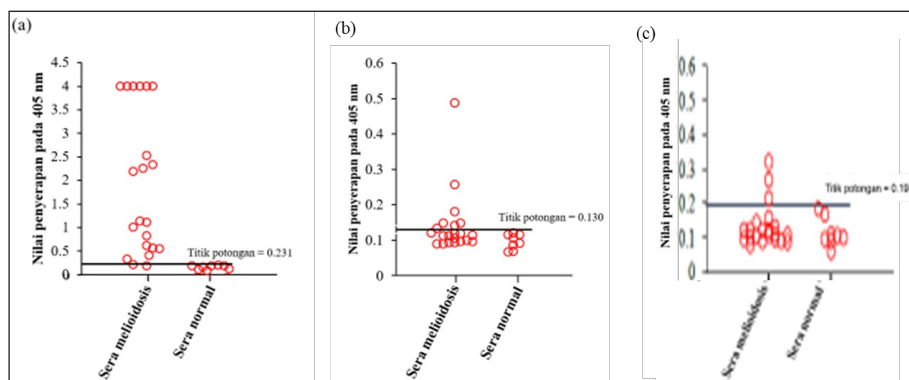
Penentuan kesensitifan dan kespesifikan calon antigen melalui ELISA

Untuk penentuan kesensitifan dan kespesifikan calon diagnosis terhadap sera pesakit melioidosis, analisis ELISA dilakukan menggunakan PSEP-1 dan BAMA-1. Sebanyak 24 sera pesakit melioidosis dan 8 sera normal dianalisis. Analisis ELISA juga dilakukan dengan lisat *B. pseudomallei* sebagai perbandingan setiap antigen dalam pengesanan

antibodi terhadap *B. pseudomallei*. Setiap sampel antigen dianalisis dengan menggunakan antibodi anti-IgG manusia berkonjugat HRP sebagai antibodi sekunder (Chieng *et al.*, 2015).

Hasil analisis ELISA menunjukkan sebanyak 21 daripada 24 sera pesakit melioidosis adalah reaktif terhadap sekurang-kurangnya satu daripada tiga antigen tersebut. Kesemua sera yang reaktif ini digunakan dalam penentuan peratus kesensitifan dan kespesifikan bagi setiap antigen. Nilai penyerapan pada 405 nm bagi 3 sera yang selainnya adalah di bawah nilai titik potong untuk ketiga-tiga antigen dan telah dikecualikan daripada analisis yang selanjutnya. Kereaktifan sampel-sampel sera terhadap setiap antigen melalui analisis ELISA ditunjukkan pada Rajah 2 bersama titik potong bagi setiap antigen.

Hasil analisis ELISA menunjukkan sebanyak 19 daripada 21 sampel sera melioidosis adalah positif benar bagi lisat *B. pseudomallei*, memberikan tahap kesensitifan 90.5%. Walau bagaimanapun, didapati tahap kesensitifan bagi peptida-peptida adalah rendah iaitu 33.3% untuk PSEP-1 dan 14.3% untuk BAMA-1. Tahap kespesifikan bagi kesemua antigen pula adalah 100% (Jadual 2). Penyaringan antigen-antigen melalui analisis ELISA telah membuktikan peptida berasaskan epitop, iaitu kesensitifan peptida-peptida PSEP-1 dan BAMA-1 adalah rendah secara relatif sebagai antigen diagnosis berbanding dengan lisat *B. pseudomallei*. Hal ini menunjukkan ketidakupayaan peptida berasaskan epitop untuk



Rajah 2. Plot kereaktifan sampel-sampel sera terhadap antigen-antigen *B. pseudomallei* melalui asai ELISA. (a) Lisat *B. pseudomallei* (b) PSEP-1 (c) BAMA-1

Jadual 2. Analisis kesensitifan dan kespesifikan kesemua calon antigen

Calon antigen	Jumlah positif benar (n/21)	Kesensitifan (%)	Jumlah negatif benar (n/8)	Kespesifikan (%)
Lisat <i>B. pseudomallei</i>	19	90.5	8	100
PSEP-1	7	33.3	8	100
BAMA-1	3	14.3	8	100

mengesan antibodi terhadap *B. pseudomallei* secara efektif, manakala lisat *B. pseudomallei* yang mengandungi hampir kesemua protein bakteria tersebut adalah lebih berkesan dalam mengenali antibodi di dalam serum pesakit melioidosis.

Selain itu, ketidakupayaan antigen-antigen tersebut untuk mengesan antibodi terhadap *B. pseudomallei* mungkin menunjukkan sifat peptida adalah kurang imunogen. Walaupun peptida-peptida tersebut telah dikenalpasti dan dicirikan daripada protein-protein yang imunogen, namun peptida-peptida ini tidak mampu untuk merangsang tindak balas keimunan hos dan mengaruh penghasilan antibodi spesifik oleh sel-sel B. Hal ini mungkin disebabkan protein BPSS0908 dan BPSL2151 mengandungi peptida tak selanjur (*discontinuous peptide*) dan bukan peptida linear sebagai antigen yang mengikat pada antibodi. Berbanding dengan peptida linear, epitop pada peptida tak selanjur memerlukan struktur spesifik untuk dikesan oleh antibodi. Struktur spesifik peptida tak selanjur adalah terdiri daripada asid amino daripada bahagian polipeptida yang berlainan dan disatukan oleh lipatan protein (struktur tiga dimensi) untuk membentuk epitop yang boleh mengikat pada antibodi (Demolombe et al., 2019). Kajian ini telah menggunakan peramal epitop linear yang boleh menyebabkan epitop yang dicirikan kehilangan struktur yang boleh mengikat pada antibodi. Hal ini akan mengakibatkan sensitiviti yang rendah didapati pada peptida linear tetapi sensitiviti yang tinggi didapati pada protein lengkap yang terkandung dalam lisat *B. pseudomallei*.

Tambahan pula, kesensitifan peptida sebagai antigen diagnosis yang rendah mungkin disebabkan ikatan antigen-antibodi tidak dapat terbentuk akibat kehilangan struktur tiga dimensi antigen. Kompleks antigen-antibodi memerlukan ikatan spesifik untuk terbentuk. Setiap ikatan memerlukan asid amino yang berlainan kerana fungsi domain yang berlainan. Pada tapak pengikatan antigen-antibodi, antibodi yang memiliki lebih asid amino aromatik akan mengambil bahagian dalam daya ikatan van der Waals, interaksi hidrofobik dan ikatan hidrogen. Ikatan-ikatan tersebut diperlukan untuk menarik permukaan antigen dan antibodi yang berbentuk pelengkap (Janeway et al., 2001). Oleh itu, peptida linear yang dicirikan berkemungkinan tidak dapat membentuk ikatan-ikatan tersebut kerana tidak lagi berbentuk pelengkap dengan tapak ikatan antibodi menyebabkan antibodi *B. pseudomallei* tidak dapat dikesan.

KESIMPULAN

Dalam kajian ini, penyaringan 154 protein imunogen *B. pseudomallei* menggunakan analisis bioinformatik telah berjaya mengenal pasti dua protein yang berpotensi sebagai antigen iaitu protein BPSS0908 dan BPSL2151. Dengan menggunakan peramal epitop sel B berasaskan jujukan, peptida linear sel B bagi protein-protein yang terpilih telah dikenalpasti. Hasil asai ELISA menunjukkan potensi peptida-peptida tersebut sebagai antigen bagi serodiagnosis kerana kespesifikan yang tinggi. Walau bagaimanapun, kesensitifan peptida-peptida tersebut adalah

rendah secara relatif berbanding lisat *B. pseudomallei*, yang mungkin disebabkan oleh ketiadaan struktur tiga dimensi pada epitop linear yang diperlukan untuk ikatan kompleks antigen-antibodi yang stabil dan kukuh. Pengoptimuman yang selanjutnya boleh dijalankan dengan mengenalpasti dan mencirikan peptida selanjat atau dengan menggunakan protein pembawa bagi meningkatkan kesensitifan peptida sebagai antigen diagnosis.

PENGHARGAAN

Kajian ini dibiayai oleh Universiti Kebangsaan Malaysia melalui Geran Galakan Penyelidik Muda GGPM-2018-059 dan geran Tabung Agihan Penyelidikan TAP-K022257 yang dianugerahkan kepada Sylvia Chieng.

KONFLIK KEPENTINGAN

Penulis mengisytiharkan tiada konflik kepentingan.

REFERENCES

- Bergamaschi, G., Fassi, E.M.A., Romanato, A., D'Annessa, I., Odiolli, M.T., Brambilla, D., Damin, F., Chiari, M., Gori, A., Colombo, G. & Cretich, M. 2019. Computational analysis of dengue virus envelope protein (E) reveals an epitope with flavivirus immunodiagnostic potential in peptide microarrays. *International Journal of Molecular Sciences* 20(8): 1-13. <https://doi.org/10.3390/ijms20081921>
- Chaichana, P., Jenjaroen, K., Amornchai, P., Chumseng, S., Langla, S., Rongkard, P., Sumonwiriya, M., Jeeyapant, A., Chantratita, N., Teparrukkul, P., Limmathurotsakul, D., Day, N.P.J., Wuthiekanun, V. & Dunachie, S.J. 2018. Antibodies in melioidosis: The role of the indirect hemagglutination assay in evaluating patients and exposed populations. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 99(6): 1378-1385. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.17-0998>
- Chen, J., Liu, H., Yang, J. & Chou, K.C. 2007. Prediction of linear B-cell epitopes using amino acid pair antigenicity scale. *Amino Acids*, 33(3): 423-428. <https://doi.org/10.1007/s00726-006-0485-9>
- Chieng, S., Mohamed, R. & Nathan, S. 2015. Transcriptome analysis of *Burkholderia pseudomallei* T6SS identifies Hcp1 as a potential serodiagnostic marker. *Microbial Pathogenesis*, 79: 47-56. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2015.01.006>
- Cretich, M., Gori, A., D'Annessa, I., Chiari, M. & Colombo, G. 2019. Peptides for infectious diseases: From probe design to diagnostic microarrays. *Antibodies*, 8(1): 23. <https://doi.org/10.3390/antib8010023>
- Demolombe, V., de Brevern, A.G., Felicori, L., Nguyen, C., de Avila, R.A.M., Valera, L., Jardin-Watelet, B., Lavigne, G., Lebreton, A., Molina, F. & Moreau, V. 2019. PEPOP 2.0: New approaches to mimic non-continuous epitopes. *BMC Bioinformatics*, 20: 387. <https://doi.org/10.1186/s12859-019-2867-5>
- Dong, Y., Dai, T., Wei, Y., Zhang, L., Zheng, M. & Zhou, F. 2020. A systematic review of SARS-CoV-2 vaccine candidates. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 5: 237 <https://doi.org/10.1038/s41392-020-00352-y>
- Doytchinova, I.A. & Flower, D.R. 2007. VaxiJen: A server for prediction of protective antigens, tumour antigens and subunit vaccines. *BMC Bioinformatics*, 8: 4. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-8-4>
- Duthie, M.S., Raychaudhuri, R., Tutterrow, Y.L., Misquith, A., Bowman, J., Casey, A., Balagon, M.F., Maghanoy, A., Beltran-Alzate, J.C., Romero-Alzate, M., Cardona-Castro, N. & Reed, S.G. 2014. A rapid ELISA for the diagnosis of MB leprosy based on complementary detection of antibodies against a novel protein-glycolipid conjugate. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 79(2): 233-239. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2014.02.006>
- Ellert-Miklaszewska, A., Poleszak, K. & Kaminska, B. 2017. Short peptides interfering with signaling pathways as new therapeutic tools for cancer treatment. *Future Medicinal Chemistry*, 9(2): 199-221. <https://doi.org/10.4155/fmc-2016-0189>
- El-Manzalawy, Y., Dobbs, D. & Honavar, V. 2008. Predicting linear B-cell epitopes using string kernels. *Journal of Molecular Recognition* 21(4): 243-255. <https://doi.org/10.1002/jmr.893>
- Felgner, P.L., Kayala, M.A., Vigil, A., Burk, C., Nakajima-Sasaki, R., Pablo, J., Molina, D.M., Hirst, S., Chew, J.S.W., Wang, D., Tan, G., Duffield, M., Yang, R., Neel, J., Chantratita, N., Bancroft, G., Lertmemongkolchai, G., Davies, D.H., Baldi, P., Peacock, S. & Titball, R.W. 2009. A *Burkholderia pseudomallei* protein microarray reveals serodiagnostic and cross-reactive antigens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(32): 13499-13504. <https://doi.org/10.1073/pnas.0812080106>
- Gassiep, I., Armstrong, M. & Norton, R. 2020. Human melioidosis. *Clinical Microbiology Reviews*, 33(2): e00006-19. <https://doi.org/10.1128/CMR.00006-19>

- Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M.R., Appel, R.D. & Bairoch, A. 2005. Protein identification and analysis tools on the ExPasy server. In: The Proteomics Protocols Handbook. J.M. Walker (Ed.) Humana Press, Totowa, N.J. pp. 571-607. <https://doi.org/10.1385/1-59259-890-0:571>
- He, Y., Xiang, Z. & Mobley, H.L.T. 2010. Vaxign: The first web-based vaccine design program for reverse vaccinology and applications for vaccine development. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2010: 297505. <https://doi.org/10.1155/2010/297505>
- Heyduk, E., Hickey, R., Pozzi, N. & Heyduk, T. 2018. Peptide ligand-based ELISA reagents for antibody detection. *Analytical Biochemistry*, 559: 55-61. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2018.08.012>
- Hoffmaster, A.R., Aucoin, D., Baccam, P., Baggett, H.C., Baird, R., Bhengsri, S., Blaney, D.D., Brett, P.J., Brooks, T.J.G., Brown, K.A., Chantratita, N., Cheng, A.C., Dance, D.A.B., Decuyper, S., Defenbaugh, D., Gee, J.E., Houghton, R., Jorakate, P., Lertmemongkolchai, G., Limmathurotsaku, D., Merlin, T.L., Mukhopadhyay, C., Norton, R., Peacock, S.J., Rolim, D.B., Simpson, A.J., Steinmetz, I., Stoddard, R.A., Stokes, M.M., Sue, D., Tuanyok, A., Whistler, T., Wuthiekanun, V. & Walke, H.T. 2015. Melioidosis diagnostic workshop, 20131. *Emerging Infectious Diseases*, 21(2): 1-9. <https://doi.org/10.3201/eid2102.141045>
- Holden, M.T.G., Titball, R.W., Peacock, S.J., Cerdeño-Tárraga, A.M., Atkins, T., Crossman, L.C., Pitt, T., Churcher, C., Mungall, K., Bentley, S.D., Sebahia, M., Thomson, N.R., Bason, M., Beacham, I.R., Brooks, K., Brown, K.A., Brown, N.F., Challis, G.L., Cherevach, I., Chillingworth, T., Cronin, A., Crossett, B., Davis, P., DeShazer, D., Feltwell, T., Fraser, A., Hance, Z., Hauser, H., Holroyd, S., Jagels, K., Keith, K.E., Maddison, M., Moule, S., Price, C., Quail, M.A., Rabinowitsch, E., Rutherford, K., Sanders, M., Simmonds, M., Songvilai, S., Stevens, K., Tumapa, S., Vesaratchavest, M., Whitehead, S., Yeats, C., Barrell, B.G., Oyston, P.C.F. & Parkhill, J. 2004. Genomic plasticity of the causative agent of melioidosis, *Burkholderia pseudomallei*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(39): 14240-14245. <https://doi.org/10.1073/pnas.0403302101>
- Huang, Y., Wang, Q.L., Cheng, D.D., Xu, W.T. & Lu, N.H. 2016. Adhesion and invasion of gastric mucosa epithelial cells by *Helicobacter pylori*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 6: 159. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2016.00159>
- Ilinkaya, A.N. & Dobrovolskaia, M.A. 2016. Understanding the immunogenicity and antigenicity of nanomaterials: Past, present and future. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 299: 70-77. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2016.01.005>
- Janeway, C.A., Travers, P., Walport, M. & Shlomchik, M. 2001. *Immunobiology*. 5th Ed. Garland Science, Taylor & Francis Group, New York. 884 pp.
- Jensen, K.K., Andreatta, M., Marcatili, P., Buus, S., Greenbaum, J.A., Yan, Z., Sette, A., Peters, B. & Nielsen, M. 2018. Improved methods for predicting peptide binding affinity to MHC class II molecules. *Immunology*, 154(3): 394-406. <https://doi.org/10.1111/imm.12889>
- Jespersen, M.C., Peters, B., Nielsen, M. & Marcatili, P. 2017. BepiPred-2.0: Improving sequence-based B-cell epitope prediction using conformational epitopes. *Nucleic Acids Research*, 45: W24-W29 <https://doi.org/10.1093/nar/gkx346>
- Kingsley, P.V., Arunkumar, G., Tiple, M., Leader, M. & Sathiakumar, N. 2016. Pitfalls and optimal approaches to diagnose melioidosis. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 9(6): 515-524 <https://doi.org/10.1016/j.apjtm.2016.04.003>
- Larsen, M.N., Lundegaard, C., Lamberth, K., Buus, S., Lund, O. & Nielsen, M. 2007. Large-scale validation of methods for cytotoxic T-lymphocyte epitope prediction. *BMC Bioinformatics*, 8: 424 <https://doi.org/10.1186/1471-2105-8-424>
- Lau, S.K.P., Sridhar, S., Ho, C.C., Chow, W.N., Lee, K.C., Lam, C.W., Yuen, K.Y. & Woo, P.C.Y. 2015. Laboratory diagnosis of melioidosis: Past, present and future. *Experimental Biology and Medicine*, 240(6): 742-751. <https://doi.org/10.1177/1535370215583801>
- Limmathurotsakul, D., Golding, N., Dance, D.A.B., Messina, J.P., Pigott, D.M., Moyes, C.L., Rolim, D.B., Bertherat, E., Day, N.P.J., Peacock, S.J. & Hay, S.I. 2016. Predicted global distribution of *Burkholderia pseudomallei* and burden of melioidosis. *Nature Microbiology*, 1(1): 6-10. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2015.8>
- Murphy, K. & Weaver, C. 2017. *Janeway's Immunobiology*. 9th Ed. Garland Science, Taylor & Francis Group, New York. 924 pp.
- Muruato, L.A., Tapia, D., Hatcher, C.L., Kalita, M., Brett, P.J., Gregory, A.E., Samuel, J.E., Titball, R.W. & Torres, A.G. 2017. Use of reverse vaccinology in the design and construction of nanoglycoconjugate vaccines against *Burkholderia pseudomallei*. *Clinical and Vaccine Immunology*, 24(11): 1-13. <https://doi.org/10.1128/CVI.00206-17>

- Mustafa, M.J., Balingi, Menon, J., Robinson, F. & Rahman, M. 2015. Clinical manifestations, diagnosis, and treatment of Melioidosis. *IOSR Journal Of Pharmacy*, 5(2): 13-19.
- Nathan, S., Chieng, S., Kingsley, P., Mohan, A., Podin, Y., Ooi, M.H., Mariappan, V., Vellasamy, K., Vadivelu, J., Daim, S. & How, S.H. 2018. Melioidosis in Malaysia: Incidence, clinical challenges, and advances in understanding pathogenesis. *Tropical Medicine and Infectious Disease*, 3(1): 25. <https://doi.org/10.3390/tropicalmed3010025>
- Nithichanon, A., Rinchai, D., Gori, A., Lassaux, P., Peri, C., Conchillio-Solé, O., Ferrer-Navarro, M., Gourlay, L.J., Nardini, M., Vila, J., Daura, X., Colombo, G., Bolognesi, M. & Lertmemonkolchai, G. 2015. Sequence- and structure-based immunoreactive epitope discovery for *Burkholderia pseudomallei* flagellin. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 9(7): 1-20. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003917>
- Rose, N.R. 2015. Molecular mimicry and clonal deletion: A fresh look. *Journal of Theoretical Biology*, 375: 71-76. <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2014.08.034>
- Silhavy, T.J., Kahne, D. & Walker, S. 2010. The Bacterial Cell Envelope. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2(5): a000414. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a000414>
- Sirisinha, S., Anuntagool, N., Dharakul, T., Ekpo, P., Wongratanacheewin, S., Naigowit, P., Petchclai, B., Thamlikitkul, V. & Suputtamongkol, Y. 2000. Recent developments in laboratory diagnosis of melioidosis. *Acta Tropica*, 74(2-3): 235-245. [https://doi.org/10.1016/S0001-706X\(99\)00076-5](https://doi.org/10.1016/S0001-706X(99)00076-5)
- Su, Y.C., Wan, K.L., Mohamed, R. & Nathan, S. 2008. A genome level survey of *Burkholderia pseudomallei* immunome expressed during human infection. *Microbes and Infection*, 10(12-13): 1335-1345. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2008.07.034>
- Su, Y.C., Wan, K.L., Mohamed, R. & Nathan, S. 2010. Immunization with the recombinant *Burkholderia pseudomallei* outer membrane protein Omp85 induces protective immunity in mice. *Vaccine*, 28(31): 5005-5011. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2010.05.022>
- Virk, H.S., Mukhopadhyay, C. & Wiersinga, W.J. 2020. Melioidosis: A neglected cause of community-acquired pneumonia. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine*, 41(4): 496-508. <https://doi.org/10.1055/s-0040-1710570>
- Wieczorek, M., Abualrous, E.T., Sticht, J., Álvaro-Benito, M., Stolzenberg, S., Noé, F. & Freund, C. 2017. Major histocompatibility complex (MHC) class I and MHC class II proteins: Conformational plasticity in antigen presentation. *Frontiers in Immunology*, 8: 292. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00292>
- Wiersinga, W.J., Virk, H.S., Torres, A.G., Currie, B.J., Peacock, S.J., Dance, D.A.B. & Limmathurotsakul, D. 2018. Melioidosis. *Nature Reviews Disease Primers*, 4: 17107. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.107>
- Yu, N.Y., Wagner, J.R., Laird, M.R., Melli, G., Rey, S., Lo, R., Dao, P., Cenk, S., Ester, M., Foster, L.J. & Brinkman, F.S.L. 2010. PSORTb 3.0: Improved protein subcellular localization prediction with refined localization subcategories and predictive capabilities for all prokaryotes. *Bioinformatics*, 26(13): 1608-1615. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq249>
- Zhang, X., Zhang, J., Lin, Y., Xu, K., Li, N., Chen, H. & She, F. 2015. Analysis of the relationship between invasive capability of *Helicobacter pylori* and gastroduodenal diseases. *Journal of Medical Microbiology*, 64: 498-506. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000049>

