

**РЕТРОСПЕКТИВНАЯ ОЦЕНКА ГУМОРАЛЬНОГО ОТВЕТА ПРИ
МЕЛИОИДОЗЕ ЖИВОТНЫХ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ
МНОГОЛЕТНИХ ДАННЫХ**

Захарова И. Б. ¹,

Терешко Д. Л. ¹,

Чирсков П. Р. ¹,

Vui T. L. A. ²,

Thomson S. ³,

Новицкая И.В ¹

¹ ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, г. Волгоград, Россия.

² Российско-Вьетнамский Тропический научно-исследовательский и технологический центр, г. Ханой, Вьетнам.

³ Вьетнамский центр спасения медведей, национальный парк Там Дао, Вьетнам.

**A RETROSPECTIVE LONG-TERM ASSESSMENT OF ANTIBODY
RESPONSE IN MELIOIDOSIS ANIMALS**

Zakharova I. B. ^a,

Tereshko D. L. ^a,

Chirskov P. R. ^a,

Bui T. L. A. ^b,

Thomson S. ³,

Novitskaya I. V. ^a

^a Volgograd Plague Control Research Institute, Federal Service for Surveillance in the Sphere of Consumers Rights Protection and Human Welfare, Volgograd, Russia.

^b Russian-Vietnamese Tropical Research Center, Hanoi, Vietnam.

^c Vietnam Bear Rescue Centre, Tam Dao National Park, Vietnam.

Резюме

Мелиоидоз – инфекция с высокой летальностью, вызываемая грамотрицательной бактерией *Burkholderia pseudomallei*. Возбудитель мелиоидоза по своей природе является сапрофитом и обладает значительным адаптационным потенциалом, позволяющим занимать самые разнообразные экологические ниши – от почвы до человека. Бактерия является факультативным внутриклеточным патогеном и способна инфицировать практически все классы позвоночных животных, за исключением амфибий. В силу разнообразия клинических проявлений мелиоидоза этот диагноз устанавливается на основании лабораторных исследований, золотым стандартом считается выделение культуры возбудителя. Тем не менее, РНГА остается востребованным методом быстрой диагностики мелиоидоза и показатель нарастания титра антител в парных сыворотках является важным критерием для установления диагноза. В связи с этим целью настоящей работы был ретроспективный анализ длительной динамики антительного ответа у погибших от мелиоидоза и контактных животных из вьетнамского центра спасения медведей (VBRC) и молекулярно-генетический анализ выделенных штаммов *B. pseudomallei*. От погибших животных были выделены бактериальные культуры, один штамм (VP069) идентифицирован на Vitek 2 как *Burkholderia cepacia*, 3 штамма (VP044, VP161 и VP200) – как *B. pseudomallei*. Методом мультиплексной ПЦР показано, что все 4 штамма являются возбудителем мелиоидоза. Мультилокусное сиквенс типирование показало, что штаммы VP069 и VP044 имели одинаковый и до настоящего времени не описанный сиквенс тип, обозначенный STnew, штаммы VP161 и VP200 также имели общий ST541, распространенный среди штаммов, выделенных на севере Вьетнама. Идентичность внутри пар штаммов с одинаковыми ST подтверждена типированием 4221 локусов основного генома. Полученные данные позволили установить неклональный характер вспышки мелиоидоза с двумя разными источниками инфекции. Проведен

ретроспективный анализ 546 образцов сывороток от 226 медведей. Все погибшие от мелиоидоза животные были серопозитивными в отношении *B. pseudomallei*, среди исследованных здоровых медведей серопозитивных оказалось 24%. Обнаружено, что у людей и медведей прослеживается общая тенденция динамики антительного ответа. Так же, как у людей у медведей при бактериологически подтвержденном мелиоидозе наблюдалось как повышение и снижение титра сывороток, так и неизменный и достаточно высокий титр, что показывает диагностическую неэффективность показателя нарастания титра антител в парных сыворотках при мелиоидозе.

Ключевые слова: мелиоидоз, *Burkholderia pseudomallei*, антитела, РНГА, типирование на основе WGS, геномный надзор.

Abstract

Melioidosis is an extremely fatal infection disease caused by the Gram-negative bacterium *Burkholderia pseudomallei*. The causative agent of melioidosis is an environmental saprophyte and has significant adaptive potential allowing it to undergo rapid adaptation to a wide variety of ecological niches. The bacterium is a facultative intracellular pathogen that can infect many animal species as well as humans. *B. pseudomallei* has no pronounced tropism for certain tissues of the infected organism, which explains the diversity and non-specificity of clinical manifestations, the most common of which are pneumonia with or without bacteremia and sepsis. This diagnosis is established on the basis of laboratory test data; cultured pathogen isolation is considered the gold standard. The indirect hemagglutination test remains a popular method for rapid melioidosis diagnostics, and increased paired serum antibody titer is an important criterion for making a diagnosis. The purpose of this work was to conduct a retrospective analysis of the long-term dynamic antibody response in Asiatic black bears that died from melioidosis and contact animals from the Vietnam Bear Rescue Center as well as molecular genetic analysis of isolated *B. pseudomallei* strains. Bacterial cultures were isolated from dead animals and identified by PCR as *B. pseudomallei* as *B. pseudomallei*. Multilocus sequence typing showed that strains VP069 and VP044 had the same and hitherto undescribed sequence type (ST_{new}), and strains VP161 and VP200 shared ST541. The pairwise strain identity with the same ST was confirmed by a core genome multilocus sequence typing. A retrospective analysis of 546 serum samples from 226 bears was carried out. All animals that died from melioidosis were seropositive for *B. pseudomallei*. Among the healthy bears studied, 24% were seropositive. It was found that in humans and bears there is a general trend in the dynamics of the antibody response. Similar to humans, bears with bacteriologically confirmed melioidosis were observed to have both higher and lower serum antibody titer, as well as a constant and fairly high titer, which shows the diagnostic ineffectiveness elevated paired serum antibody titer in melioidosis.

Keywords: melioidosis, *Burkholderia pseudomallei*, antibodies, IHA, WGS-based typing, molecular surveillance.

1 **1 Введение**

2 Мелиоидоз – инфекция с высокой летальностью, вызываемая
3 грамотрицательной бактерией *B. pseudomallei*. Возбудитель мелиоидоза по
4 своей природе является сапрофитом и обладает значительным адаптационным
5 потенциалом, позволяющим занимать самые разнообразные экологические
6 ниши – от почвы до человека. Бактерия является факультативным
7 внутриклеточным патогеном и способна инфицировать практически все
8 классы позвоночных животных. Возбудитель мелиоидоза не обладает
9 выраженным тропизмом к определенным тканям макроорганизма, чем
10 обусловлена разнообразность и неспецифичность клинических проявлений,
11 наиболее частыми из которых являются пневмония с бактериемией (или без
12 нее) и сепсис.

13 В естественных условиях *B. pseudomallei* распространена в тропических
14 и субтропических поясах всех континентов и ее ареал постоянно расширяется
15 по мере уделения внимания ее распространенности в тех или иных странах.
16 Так, за последние 5 лет список эндемичных по мелиоидозу стран пополнился
17 12 новыми странами Африки, Азии, Океании и Северной Америки [1].
18 Подавляющее большинство эндемичных по мелиоидозу стран являются
19 популярными для туризма, что, наряду с экспортом товаров и животных,
20 является причиной регулярных заносов инфекции на неэндемичные
21 территории. В России зарегистрирован единственный завозной случай
22 мелиоидоза из Таиланда, что, учитывая статистику российского туризма и
23 данные о заносах мелиоидоза в другие страны, не соответствует реальности,
24 поскольку мелиоидоз в нашей стране малоизвестен и не рассматривается при
25 диагностике лихорадок неясной этиологии.

26 В силу разнообразия клинических проявлений мелиоидоза этот диагноз
27 во всем мире устанавливается на основании лабораторных исследований, в
28 обязательный перечень которых входят бактериологический, молекулярно-
29 генетический и иммунологический анализ.

30 Роль антител в формировании функционального иммунитета к
31 мелиоидозу неоднозначна, поскольку даже при наличии высоких уровней
32 антител возможно повторное заражение другим штаммом. Кроме того, при
33 мелиоидозе остается неясным период сероконверсии. Около 30% пациентов с
34 культурально подтвержденным мелиоидозом в течении 2 недель после
35 госпитализации остаются серонегативными и у значительной части
36 сероконверсии не происходит и в более поздние сроки [2]. Тем не менее, РНГА
37 остается востребованным методом быстрой диагностики мелиоидоза и
38 показатель нарастания титра антител в парных сыворотках является важным
39 критерием для установления диагноза. В связи с этим целью настоящей
40 работы был ретроспективный анализ длительной динамики антительного
41 ответа у погибших от мелиоидоза и контактных животных из вьетнамского
42 центра спасения медведей (VBRC) и молекулярно-генетический анализ
43 выделенных штаммов *B. pseudomallei*.

44 Животные, спасенные с нелегальных ферм по получению медвежьей
45 желчи, содержатся в VBRC в полуестественных открытых вольерах (общей
46 площадью около 30 000 м²). Медведям созданы оптимальные условия,
47 соответствующие международным этическим нормам, и обеспечен
48 пожизненный уход, в том числе ветеринарный
49 ([https://www.animalsasia.org/intl/our-work/bear-sanctuaries/vietnam-bear-](https://www.animalsasia.org/intl/our-work/bear-sanctuaries/vietnam-bear-sanctuary/vietnam-bear-sanctuary.html)
50 [sanctuary/vietnam-bear-sanctuary.html](https://www.animalsasia.org/intl/our-work/bear-sanctuaries/vietnam-bear-sanctuary/vietnam-bear-sanctuary.html)).

51 Проведен ретроспективный анализ 546 образцов сывороток от 226
52 медведей, отобранных при проведении планового контроля здоровья
53 животных в период с 2008 по 2023 гг., хранившихся в лаборатории центра при
54 -80°C. Реакцию непрямой гемагглютинации (РНГА) ставили в микроварианте
55 с применением эритроцитарного антигенного мелиоидозного диагностикума,
56 как описано ранее [3]. Идентификацию выделенных бактериальных культур
57 проводили на биохимическом анализаторе Vitek 2 с использованием карт для
58 идентификации клинически значимых грамотрицательных палочек VITEK® 2

59 GN (bioMerieux, Франция) и методом ПЦР, описанном ранее [4]. Выделенные
60 штаммы типировали по схеме MLST [5, 6] и типированием 4221 локусов
61 основного генома (cgMLST) [7] с использованием инструментария базы
62 данных PubMLST (<https://pubmlst.org/>).

63 В течение двух месяцев 2020 года в VBRC с признаками бактериального
64 сепсиса погибли 4 черных азиатских медведя (учетные номера V069, V044,
65 V161 и V200). Животные к моменту манифестации инфекции находились в
66 центре от двух до десяти лет, возраст к моменту гибели животных составлял
67 17-19 лет, то есть у всех присутствовал возрастной фактор, являющийся для
68 людей предрасполагающим к развитию мелиоидоза. Патоморфологическая
69 картина у всех погибших медведей была сходной – множественные абсцессы
70 печени, селезенки, гнойный перикардит, легочное кровотечение, что
71 характерно для мелиоидоза.

72 От погибших животных были выделены бактериальные культуры –
73 штамм VP069 идентифицирован на Vitek 2 как *Burkholderia cepacia*, штаммы
74 VP044, VP161 и VP200 – как *B. pseudomallei*. Методом мультиплексной ПЦР
75 показано, что все 4 штамма являются *B. pseudomallei*. Для внутривидового
76 типирования использовали шотган полногеномные последовательности,
77 депонированные ранее в GenBank NCBI, номера доступа – JAOZIV000000000,
78 JAOZIU000000000, JAOZIT000000000, JAOZIS000000000. Мультилокусное
79 сиквенс типирование (MLST) показало, что штаммы VP069 и VP044 имели
80 одинаковый ранее не описанный сиквенс тип (ST), штаммы VP161 и VP200
81 также имели общий ST541. То есть две пары медведей были инфицированы
82 разными штаммами. Идентичность внутри пар штаммов VP044/VP069 и
83 VP044/VP069 была подтверждена cgMLST – штаммы VP044 и VP069
84 отличались всего по 4 локусам из 4221 (BPSEU00110, BPSEU03110,
85 BPSEU25620, BPSEU25835) штаммы VP161 и VP200 – по 5 (BPSEU08565,
86 BPSEU28315, BPSEU25620, BPSEU22515, BPSEU19005). Полученные данные

87 позволили установить неклональный характер вспышки мелиоидоза с двумя
88 разными источниками инфекции.

89 На наличие антител к возбудителю мелиоидоза исследовали парные
90 сыворотки от 215 животных без клинических признаков инфекции и 11
91 погибших, в том числе 4-х с бактериологически подтвержденным
92 мелиоидозом и 7-и с патоморфологическими характеристиками,
93 позволяющими заподозрить мелиоидоз (бактериологическое исследование не
94 проводилось, пригодный для анализа в ПЦР материал отсутствовал). Среди
95 здоровых животных серопозитивных (с титром сывороток 1:320 и выше)
96 оказалось 55 особей (24%).

97 Все погибшие от мелиоидоза животные были серопозитивными – титры
98 последних отобранных сывороток варьировали от 1:320 до 1: 5120. Причем у
99 двух из них в долгосрочной динамике (2-10 лет) отмечено повышение титра, у
100 одного – титр оставался неизменным, еще у одного наблюдали транзиторную
101 серореверсию (рис. 1, А). Среди животных с подозрением на мелиоидоз титры
102 последних отобранных сывороток варьировали от 1:640 до 1: 5120, с течением
103 времени в 5 случаях наблюдалось повышение титра, в двух – снижение (рис.
104 1, В).

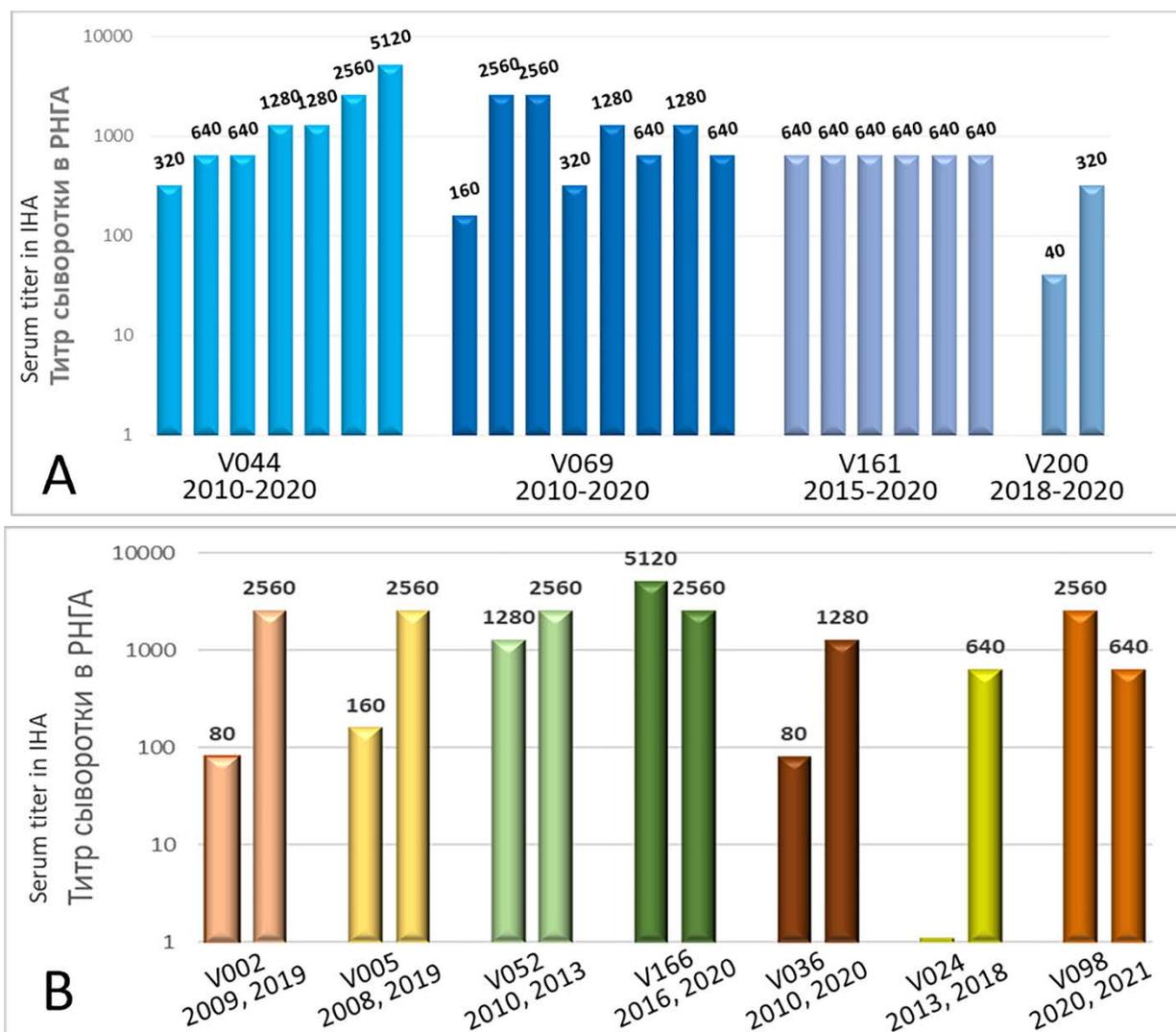
105 Серопозитивных в отношении *B. pseudomallei* среди исследованных
106 здоровых медведей оказалось 24%, что выше, чем у диких макак (14%) в
107 Таиланде [8]. Возможно, это отражает различную видовую восприимчивость
108 к мелиоидозу. Также нельзя исключать территориальный фактор, поскольку у
109 здорового населения эндемичных по мелиоидозу стран уровень
110 серопозитивности также отличается – 30% на севере Вьетнама, 20% в Индии
111 и 38% в Таиланде [2, 3, 9]. Вопрос является ли серопозитивность
112 против *B. pseudomallei* как у здоровых людей, так и у животных показателем
113 латентной инфекции или иммунитета после перенесенного заболевания
114 остается открытым [2].

115 Изучение длительной динамики антительного ответа при мелиоидозе у
116 людей затруднительно, максимальный срок наблюдения за выжившими
117 пациентами составлял 52 недели. Сыворотки от медведей отбирали в течение
118 2-10 лет, что позволило ретроспективно оценить динамику уровня антител к
119 *B. pseudomallei* в течение длительного времени. Обнаружено, что у людей и
120 медведей прослеживается общая тенденция динамики антительного ответа. В
121 обоих случаях реакция макроорганизма на *B. pseudomallei* индивидуальна и,
122 вероятно, непредсказуема. Так же, как у людей [2] у медведей при
123 бактериологически подтвержденном мелиоидозе обнаружено как повышение
124 и снижение титра сывороток, так и неизменный и достаточно высокий титр,
125 что показывает диагностическую неэффективность показателя нарастания
126 титра антител в парных сыворотках при мелиоидозе.

РИСУНКИ

Рисунок 1. Динамика антительного ответа у погибших животных: А – с бактериологически подтвержденным мелиоидозом, В – с подозрением на мелиоидоз.

Figure 1. Dynamics of the antibody response in dead animals: А – with bacteriologically confirmed melioidosis, В – with suspected melioidosis.



ТИТУЛЬНЫЙ ЛИСТ_МЕТАДААННЫЕ

Блок 1. Информация об авторе ответственном за переписку

Захарова Ирина Борисовна, д.б.н., доцент, ведущий научный сотрудник лаборатории патогенных буркхольдерий ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, г. Волгоград, Россия;

адрес: 400066, г. Волгоград, ул. Голубинская, 7;

телефон: (8442)37-37-74;

факс: (8442)39-33-36;

e-mail: zib279@gmail.com

Zakharova Irina Borisovna, Doctor of Biological Sciences, Associate Professor, Leading Researcher at the Laboratory of Pathogenic Burkholderia Volgograd Plague Control Research Institute, Federal Service for Surveillance in the Sphere of Consumers Rights Protection and Human Welfare, Volgograd, Russia;

address: 400066, Volgograd, Golubinskaya st., 7;

telephone: (8442)37-37-74;

fax: (8442)39-33-36;

e-mail: zib279@gmail.com

Блок 2. Информация об авторах

Терешко Д.Л., научный сотрудник лаборатории иммунодиагностических препаратов, ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, г. Волгоград, Россия

Tereshko D.L., Researcher, Laboratory of Immunodiagnostic Preparations, Federal Service for Surveillance in the Sphere of Consumers Rights Protection and Human Welfare, Volgograd, Russia

Чирсков П.Р., научный сотрудник лаборатории патогенных буркхольдерий, ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, г. Волгоград, Россия

Chirskov P.R., Researcher, Laboratory of Pathogenic Burkholderia, Volgograd Plague Control Research Institute, Federal Service for Surveillance in the Sphere of Consumers Rights Protection and Human Welfare, Volgograd, Russia

Bui Thi Lan Anh, к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии, Российско-Вьетнамский Тропический научно-исследовательский и технологический центр, г. Ханой, Вьетнам

Bui Thi Lan Anh, PhD (Biology), Senior Researcher, Laboratory of molecular biology Russian-Vietnamese Tropical Research Center, Hanoi, Vietnam

Thomson S., BVSc MBA (бакалавр ветеринарных наук, магистр делового администрирования), старший ветеринарный хирург, Вьетнамский центр спасения медведей, национальный парк Там Дао, Вьетнам

Thomson S., BVSc MBA (Bachelor of Veterinary Science, Master of Business Administration), Senior Veterinary Surgeon, Vietnam Bear Rescue Centre, Tam Dao National Park, Vietnam

Новицкая И.В., к.м.н., доцент, ведущий научный сотрудник лаборатории иммунодиагностических препаратов, ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, г. Волгоград, Россия

Novitskaya I.V., Ph.D. (Medicine), Associate Professor, Leading Researcher, Laboratory of Immunodiagnostic Preparations, Federal Service for Surveillance in the Sphere of Consumers Rights Protection and Human Welfare, Volgograd, Russia

Блок 3. Метаданные статьи

РЕТРОСПЕКТИВНАЯ ОЦЕНКА ГУМОРАЛЬНОГО ОТВЕТА ПРИ
МЕЛИОИДОЗЕ ЖИВОТНЫХ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МНОГОЛЕТНИХ
ДАННЫХ

A RETROSPECTIVE ASSESSMENT OF THE ANTIBODY RESPONSE IN
ANIMALS MELIOIDOSIS USING LONG-TERM DATA

Сокращенное название статьи для верхнего колонтитула:

ГУМОРАЛЬНЫЙ ОТВЕТ ПРИ МЕЛИОИДОЗЕ

HUMORAL RESPONSE IN MELIOIDOSIS

Ключевые слова: мелиоидоз, *Burkholderia pseudomallei*, антитела, РНГА,
типирование на основе WGS, геномный надзор.

Keywords: melioidosis, *Burkholderia pseudomallei*, antibodies, IHA, WGS-based
typing, molecular surveillance.

Краткие сообщения.

Количество страниц текста – 5, количество таблиц – 0, количество рисунков –
1.

30.05.2024

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Порядковый номер ссылки	Авторы, название публикации и источника, где она опубликована, выходные данные	ФИО, название публикации и источника на английском	Полный интернет-адрес (URL) цитируемой статьи и/или doi
1	Meumann E.M., Limmathurotsakul D., Dunachie S.J., Wiersinga W.J., Currie B.J. Burkholderia pseudomallei and melioidosis. Nat Rev Microbiol., 2024, vol. 22, no. 3, pp. 155-169.	-	https://www.nature.com/articles/s41579-023-00972-5 https://doi.org/10.1038/s41579-023-00972-5
2	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. Antibodies in Melioidosis: The Role of the Indirect Hemagglutination Assay in Evaluating Patients and Exposed	-	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6283516/ https://doi.org/10.4269/ajtmh.17-0998

	Populations. Am J Trop Med Hyg., 2018, vol. 99, no. 6, pp.1378-1385.		
3	Терешко Д.Л., Новицкая И.В., Захарова И.Б., Чиен Д., Кузнецов А.Н., Кулаков М.Я., Будченко А.А., Пушкарь В.Г., Викторов Д.В., Топорков А.В. Получение и использование эритроцитарного антигенного мелиоидозного диагностикума при анализе проб сывороток от лиц из эндемичных по мелиоидозу провинций Ха Занг, Лангшон и Куангнинь Социалистической Республики Вьетнам // Инфекция и иммунитет. 2022. Т. 12, №5. С. 919-928.	Tereshko D.L., Novitskaya I.V., Zakharova I.B., Trien D., Kuznetsov A.N., Kulakov M.Y., Budchenko A.A., Pushkar V.G., Viktorov D.V., Toporkov A.V. Obtaining and using erythrocyte antigenic melioidosis diagnostic agent in the analysis of serum samples from melioidosis-endemic provinces Ha Giang, Lang Son and Quang Ninh of the Socialist Republic of Vietnam. Russian Journal of Infection and Immunity, 2022, vol. 12, no. 5, pp. 919-928.	https://iimmun.ru/iimm/article/view/1933 https://doi.org/10.15789/2220-7619-OAU-1933
4	Zakharova I., Teteryatnikova N., Toporkov A., Viktorov D. Development of a multiplex PCR assay for the detection and	-	https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0001706X17301171?via%3Dihub

	differentiation of <i>Burkholderia pseudomallei</i> , <i>Burkholderia mallei</i> , <i>Burkholderia thailandensis</i> , and <i>Burkholderia cepacia</i> complex. Acta Trop., 2017, vol. 174, pp. 1-8.		https://doi.org/10.1016/j.acta tropica.2017.06.016
5	Godoy D., Randle G., Simpson A.J., Aanensen D.M., Pitt T.L., Kinoshita R., Spratt B.G. Multilocus sequence typing and evolutionary relationships among the causative agents of melioidosis and glanders, <i>Burkholderia pseudomallei</i> and <i>Burkholderia mallei</i> . J Clin Microbiol., 2003, vol. 41, no. 5, pp. 2068-2079	-	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC154742/ https://doi.org/10.1128/jcm.41.10.4913.2003
6	Price E.P., MacHunter B., Spratt B.G., Wagner D.M., Currie B.J., Sarovich D.S. Improved multilocus sequence typing of <i>Burkholderia pseudomallei</i> and closely	-	https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/jmm/10.1099/jmm.0.000312

	related species. J Med Microbiol. 2016, vol. 65, no.9, pp. 992-997.		https://doi.org/10.1099/jmm.0.000312
7	Lichtenegger S., Trinh T.T., Assig K., Prior K., Harmsen D., Pesl J., Zauner A., Lipp M., Que T.A., Mutsam B., Kleinhappl B., Steinmetz .I, Wagner G.E. Development and Validation of a Burkholderia pseudomallei Core Genome Multilocus Sequence Typing Scheme To Facilitate Molecular Surveillance. J Clin Microbiol., 2021, vol. 59, no.8, pp. e0009321.	-	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8373231/ https://doi.org/10.1128/JCM.00093-21
8	Saechan V., Tongthainan D., Fungfuang W., Tulayakul P., Ieamsaard G., Ngasaman R. Natural infection of leptospirosis and melioidosis in long-tailed macaques	-	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9177388/

	(<i>Macaca fascicularis</i>) in Thailand. J Vet Med Sci., 2022, vol. 84, no. 5, pp. 700-706.		https://doi.org/10.1292/jvms.21-0514
9	Raj S., Sistla S., Melepurakkal Sadanandan D., Kadiravan T., Chinnakali P. Estimation of seroprevalence of melioidosis among adult high risk groups in Southeastern India by indirect Hemagglutination assay. PLOS Glob Public Health, 2022, vol.2, no. 5, pp. e0000431.		https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10021966/ https://doi.org/10.1371/journal.pgph.0000431