

Maleus (sakagija) - gotovo zaboravljena zoonoza



S. Špičić*, Karine Laroucau, Maja Zdelar-Tuk, Sanja Duvnjak, Ž. Pavlinec, Irena Reil, G. Kompes, B. Habrun, Maja Stepanić, D. Želježić i Ž. Cvetnić

Uvod

Maleus je kontagiozna bolest konja, magaraca i njihovih križanaca, a mogu oboljeti i mesojedi, uključujući i čovjeka. Obično je kronična, a očituje se tvorbom specifičnih čvorića u koži, potkožju, plućima i drugdje. Najčešće ju nazivaju maleus (*lat. malleus*), a ponekad i sakagija (*tur. sakaği*). Godine 1882. Loeffler i Schütz su u Njemačkoj, a Charrin i Captain u Francuskoj izdvojili mikroorganizam u čistoj kulturi, identificirali ga i dokazali da je uzročnik maleusa u konja (Cvetnić, 2013.). Bolest uzrokuje vrsta *Burkholderia (B.) mallei*, aerobne, gram-negativne, nesporulirajuće i nekapsulirajuće štapićaste bakterije, koje nisu pokretljive, a za rast trebaju dodatak 1-4% glicerola u hranjivoj podlozi. Identifikacija vrste temelji se na biokemijskim osobinama izolata, pokretljivosti na hranjivoj podlozi i molekularnim karakteristikama (Cvetnić, 2013., Habrun, 2014., OIE, 2017.). Bakterija je kroz povijest više puta mijenjala naziv poput: *Loefflerella mallei*, *Pfeifferella mallei*, *Malleomyces mallei*, *Actinobacillus mallei*, *Corynebacterium mallei*, *Mycobacterium mallei*, *Pseudomonas mallei* i *Bacillus mallei* (Whitlock i sur.,

2007.). U prošlom stoljeću maleus je u konja bio proširen u većini europskih zemalja, osobito tijekom Prvog svjetskog rata (Njemačka, Rusija i srednja Europa). Kasnijih godina, važnost konja kao transportne životinje se smanjila, a razvojem alergijskih i seroloških testova bolest je uspješno u mnogim zemljama suzbijena. Čovjek se može inficirati u dodiru s bolesnom životinjom. Najčešće su obolijevali ljudi koji su bili profesionalno izloženi dodiru s konjima: kočijaši, potkivači i veterinari (Cvetnić, 2013.). Danas se maleus najčešće pojavljuje na Bliskom istoku, u nekim dijelovima Azije (Iranu, Indiji, Pakistanu, Mongoliji, Ujedinjenim Arapskim, Emiratima i Kini), u Azijskom dijelu Turske, Africi i Južnoj Americi (Malik i sur. 2015.).

U Arhivi sojeva Laboratorija za bakterijske zoonoze, Hrvatskog veterinarskog instituta pronađen je liofilizat oznake *B. mallei* - Karlovac (5.2.1957.). Zbog iznimno rijetkog uzorka namjera je bila ponovno kultivirati soj te ga identificirati daljnjim standardnim i molekularnim testovima i potvrditi radi li se zaista o *B. mallei*.

Dr. sc. Silvio ŠPIČIĆ*, dr. vet. med., (dopisni autor, email: spicic@veinst.hr), Hrvatski veterinarski institut, Zagreb, Hrvatska; dr. sc. Karine LAROUCAU, dr. vet. med., ANSES, Laboratory for Animal Health, Bacterial Zoonosis Unit, European Union Reference Laboratory for Equine Diseases/Glanders, Maisons-Alfort, Francuska; dr. sc. Maja ZDELAR TUK, dr. med. vet., znanstvena savjetnica, dr. sc. Sanja DUVNJAK, mag. biol. mol., postdoktorandica, Željko PAVLINEC, mag. biol. mol., Irena REIL, dr. med. vet., asistentica, dr. sc. Gordan KOMPES, dr. vet. med., znanstveni suradnik, dr. sc. Boris HABRUN, dr. vet. med., izvanredni profesor, Maja STEPANIĆ, dr. vet. med., stručna suradnica, Darko ŽELJEŽIĆ, dr. vet. med., stručni suradnik, dr. sc. Željko CVETNIĆ, dr. vet. med., akademik, Hrvatski veterinarski institut, Zagreb, Hrvatska

Materijal

Tijekom godišnje kontrole arhivskih sojeva u Laboratoriju za bakterijske zoonoze i molekularnu dijagnostiku bakterijskih bolesti pronađen je liofilizat bakterijske kulture označen *B. mallei* - Karlovac 5.2.1957. S obzirom na to da se radi o vrlo rijetkom nalazu, o istome smo obavijestili i EU Referentni laboratorij za bolesti konja, Odjel za bakterijske zoonoze, Laboratorij za maleus, ANSES, Maisons-Alfort, Francuska (dr. Karine Laroucau, voditeljica laboratorija), kojem je i tijekom 2017. godine dostavljena DNK soja radi genotipizacije. Osim bočice s liofiliziranim sojem i navedenom oznakom nisu pronađeni dodatni epizootički podatci pa stoga pretpostavljamo, da se radi o izolatu koji je izdvojen iz oboljelog konja s područja grada Karlovca, sredinom prošlog stoljeća. Naša namjera je bila ponovno kultivirati soj i izolirati DNK radi potvrde pripadnosti vrsti i daljnjih istraživanja.

Metode

Bakteriološka pretraga. Liofilizirani soj je otopljen dodavanjem 1,2 mL sterilne destilirane vode. Po 250 μ L suspektne otopine naciepljeno je na selektivno TSA hranilište (Trypton Soja Agar), kojem je dodano 4% glicerola. Osim glicerola, hranilištu je dodano 1000 IU polymyxina E, 1250 IU bacitracina i 0,25 mg actidiona na 100 mL hranilišta.

Naciepljene ploče inkubirane su u aerobnim uvjetima na 37 °C.

Molekularna pretraga. Izolacija DNK je provedena pomoću QIAcube sistema koristeći QIAamp DNK Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Njemačka). Koncentracija izolirane DNK izmjerena je na DS-11 spektrofotometru (DeNovix, SAD). Identifikacija vrste provedena je metodom lančane reakcije polimerazom (PCR) (Scholz i sur., 2006.).

Rezultati

Bakteriološke pretrage. Liofilizirani izolat *B. mallei* opisanim bakteriološkim postupcima nismo uspjeli kultivirati.

Molekularne pretrage. Izvršili smo i izolaciju DNK iz uzorka otopljenog liofilizata. *B. mallei* je fenotipski, ali i genotipski visoko homologna vrsta s *B. pseudomallei* i sa sigurnošću ga je moguće identificirati samo molekularnim metodama. Koncentracija izolirane DNK izmjerena je na DS-11 spektrofotometru (DeNovix, SAD) (Tabela 1).

Umnožavanjem za vrstu *B. mallei* specifičnog *fliP*-IS407A odsječka veličine 989-bp za soj „*B.mallei* Karlovac 5.2.1957.“ je utvrđeno da se radi o vrsti *B. mallei* (Slika 1).

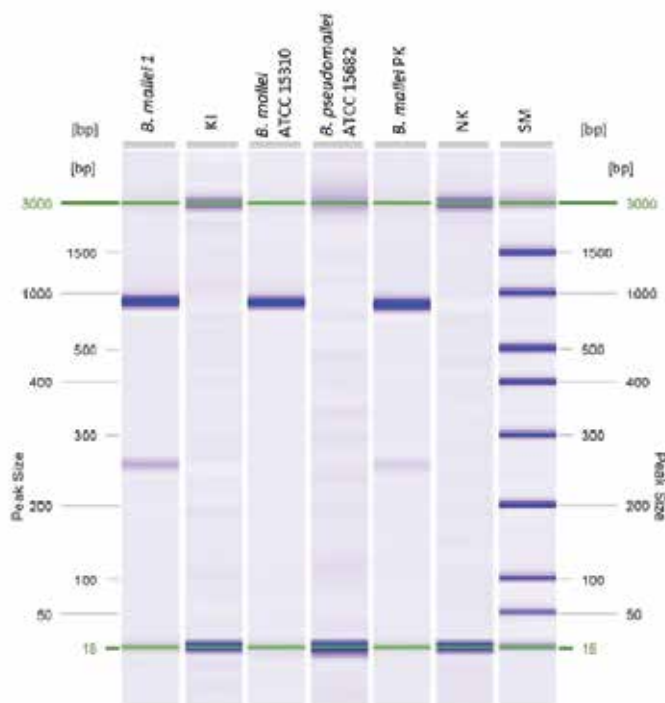
Rasprava

Maleus je opasna i teška bakterijska zoonoza. Zbog povremenih pojava u endemskim dijelovima svijeta bolest se

Tabela 1. Koncentracije bakterijske DNK soja *B. mallei* Karlovac 5.2.1957. izražena kao prosjek 3 mjerenja.

Mjerenje	c (ng/ μ L) *	A260	260/230	260/280
1	41,783	0,8357	2,03	2,19
2	42,895	0,8579	2,37	1,96
3	40,543	0,8109	2,35	2,12
prosjek	41,740	0,835	2,250	2,090

*c- koncentracija DNK u ng/ μ L; A260- vrijednost absorbancije uzorka pri valnoj duljini od 260 nm; 260/230- omjer absorbancije uzorka pri valnim duljinama od 260 i 230 nm; 260/280- omjer absorbancije uzorka pri valnim duljinama od 260 i 280 nm



Slika 1. Molekularni dokaz pripadnosti izolata Karlovac 1957 vrsti *B. mallei*

Legenda: *B. mallei* 1 - *B. mallei* Karlovac 5.2.1957;
 KI - kontrola izolacije DNK;
B. mallei ATCC1510 - standardni soj *B. mallei*;
B. pseudomallei ATCC15682 - standardni soj *B. pseudomallei*;
 PK – pozitivna kontrola (soj *B. mallei* izoliran iz antigena za RVK, Bioveta);
 NK - negativna kontrola;
 SM - markeri veličine produkta umnožavanja DNK od 50 do 1500 bp

smatra re-emergentnom (Khan i sur., 2013.). Međutim veliko iznenađenje dogodilo se u Europi gdje se maleus pojavio 2015. godine u konja u Njemačkoj, po prvi puta od 1955. Provedeno je opsežno testiranje konja koji su bili u kontaktu sa zaraženim konjem, no nikada nije utvrđen izvor zaraze (OIE, 2015.). Njemački slučaj ukazuje na nužnost stalnog opreza i kontrole jer se bolest bez obzira na visoke standarde držanja i kontrole u europskim uzgojima može pojaviti. U Turskoj su godine 1999. od 1128 maleiniziranih konja, pozitivne reakcije utvrđene u njih 35 (3,10%) (Aru i sur., 1999.).

U Hrvatskoj je posljednji slučaj bolesti u konja evidentiran 1961. godine (Habrun, 2014.). U Liječničkom vjesniku iz 1877. godine (broj 7. i 8.), u glavnom izvješću za bolesti domaćih životinja, spominje se i učestalost sakagije za godinu 1875. u Hrvatskoj. U spisu je navedeno da se sakagija među konjima većinom javlja u Slavoniji, a u ostalim dijelovima Hrvatske samo ponegdje. Od sakagije je oboljelo: u Vukovarskoj podžupaniji 34 konja, Rumskoj 5 konja, Osječkoj 5, Djakovačkoj 3, Virovitičkoj 2 konja, Sisačkoj 12 konja, grad Zagreb i u gradu Varaždinu 1 konj. Jurak (1943.) navodi da je sakagija

rijetka bolest u Hrvatskoj i da od osnutka Veterinarskog fakulteta 1919. pa sve do 1939. godine nije bilo pojave bolesti, kada je bolest utvrđena u 37 konja, godine 1940. u 2 konja, 1941. u ni jednog, a 1942. u 52 konja. Autor napominje da je bolest zastupljena u istočnim krajevima i da preko Makedonije, Rumunjske i Srbije dolazi u Hrvatsku. Fališevac i Bezjak (1950.), spominju podatak da se u jednom službenom izvješću iz Pruske od 1920. do 1922. spominje da je od maleusa oboljelo 1307 konja, i da su zabilježena tri slučaja oboljenja ljudi. Isti autori navode da je prema podacima Saveznog veterinarskog instituta Zagreb (današnji Hrvatski veterinarski institut, Zagreb) u Hrvatskoj od 1946. do 1949. maleus utvrđen u 59 konja, a u istom razdoblju je utvrđen jedan slučaj čovjeka oboljelog od maleusa.

Sakagija nije često zabilježena bolest u ljudi, ali je uglavnom bila smrtonosna. Nemčić (1907.), spominje dva slučaja sakagije u ljudi, u kočijaša starih 39 i 70 godina, koji su bili vrlo lošeg zdravstvenog stanja, s apscesima po koži, bolovima u mišićima, kašljem i visokom temperaturom, i obojica su umrla. U plućima su utvrđeni čvorići, od sitnih pa sve do veličine oraha. Smatra se da je bolest prenesena s bolesnih konja nehigijenom noktiju i ogrebotinama. Prognoza oboljelih ljudi od sakagije je loša, osobito onih u kojih se pojavi akutni oblik bolesti. Hirsch (1924.), spominje maleus u kočijaša iz Đakova koji je imao flegmonu na desnoj podlaktici i visoku temperaturu i bolest je završila smrću. Jurak (1943.), navodi da se pristojnom higijenom može izbjeći oboljenje ljudi od maleusa. Postoji zapis da je tijekom Prvog svjetskog rata u jednom stacionaru 100 ljudi njegovalo 100 do 150 konja bolesnih od maleusa, no usprkos lošim higijenskim uvjetima, uvjetovanih ratnim zbivanjima, niti jedan čovjek nije obolio.

U arhivi sojeva Laboratorija za bakterijske zoonoze i molekularnu

dijagnostiku bakterijskih bolesti, Hrvatskog veterinarskog instituta u Zagrebu čuvan je liofilizirani soj oznake „*B.mallei* Karlovac 5.2.1957.“ za koji nam nisu bili dostupni nikakvi dodatni podatci. Pretpostavili smo da se radi o soju uzročnika izdvojenog iz konja oboljelog od maleusa s Karlovačkog područja, iz razdoblja dok je bolest još uvijek bila prisutna na ovim prostorima. Soj smo pokušali kultivirati opisanim bakteriološkim postupcima, ali bez uspjeha. Ujedno smo izvršili i izolaciju DNK iz uzorka otopljenog liofilizata. *B. mallei* je fenotipski, ali i genotipski visoko homologna vrsta s *B. pseudomallei* i moguće ga je sa sigurnošću identificirati samo molekularnim metodama. Umnožavanjem za vrstu *B. mallei* specifičnog *fliP*-IS407A odsjeka veličine 989-bp za soj „*B.mallei* Karlovac 5.2.1957.“ utvrđeno je da se radi o vrsti *B. mallei*.

Molekularna genotipizacija našeg soja provedena je primjenom HRM (high-resolution melting) PCR metode na 15 filogenetski značajnih polimorfizama jedne baze vrste *B. mallei* (Girault i sur., 2018.). Hrvatski soj izdvojen 1957. godine nalazi se u grupi filogenetski srodnih sojeva iz Italije, Mađarske, Turske i Irana iz istog vremenskog razdoblja. Stavljajući ove rezultate u kontekst načina prijenosa i putova širenja bolesti može se pretpostaviti da se to dogodilo u razdoblju do završetka Prvog svjetskog rata. Nalazi uzročnika u konja sredinom 20. stoljeća u različitim zemljama govore u prilog tezi da se radilo o nekada geografski jedinstvenoj epidemiji. Po svemu sudeći bolest se širila zbog ratnih zbivanja tijekom Prvog svjetskog rata kada se koristilo puno konja, mula i mazgi za transport ljudi i oružja, tako da je bolest bila zastupljena u svim područjima tadašnjih ratnih zbivanja. Smatra se da se maleus tijekom Prvog svjetskog rata širio velikim brojem zaraženih ruskih konja i mazgi na istočnom frontu, što je bio slučaj i u

Drugom svjetskom ratu tamo gdje je bilo konja (Lehavi i sur., 2002.).

Maleus je klasična, re-emergentna bakterijska zoonoza i bolest koja ne poznaje granice kako po klinički nespecifičnoj slici i kroničnim oblicima bolesti bez vidljivih simptoma tako i po činjenici da se slučajevi bolesti u konja dijagnosticiraju i danas u zemljama s višegodišnjim statusom bez bolesti. Kontrola konja u međunarodnom prometu je i dalje neophodna.

Sažetak

Maleus je kontagiozna bolest konja, magaraca i njihovih križanaca, a mogu oboljeti i mesojedi, uključujući i čovjeka. Obično je kronična, a očituje se tvorbom specifičnih čvorica u koži, potkožju, plućima i drugdje u organizmu. U Hrvatskoj je bolest zadnji puta zabilježena 1961. godine. U Arhivi sojeva Laboratorija za bakterijske zoonoze, Hrvatskog veterinarskog instituta pronađen je liofilizat oznake *B. mallei* - Karlovac (5.2.1957.). Zbog iznimno rijetkog uzorka namjera je bila ponovno kultivirati soj te ga identificirati daljnjim standardnim i molekularnim testovima potvrditi radi li se zaista o vrsti *Burkholderia* (*B.*) *mallei*. Liofilizirani izolat *B. mallei* nismo uspjeli kultivirati opisanim bakteriološkim postupcima. Izvršili smo izolaciju DNK iz uzorka otopljenog liofilizata. Koncentracija izolirane DNK izmjerena je na DS-11 spektrofotometru (DeNovix, SAD). Umnožavanjem za vrstu *B. mallei* specifičnog *flp*-IS407A odsječka veličine 989-bp za soj „*B.mallei* Karlovac 5.2.1957.“ utvrđeno je da se radi o vrsti *B. mallei*. Prema trenutno dostupnim podacima molekularne genotipizacije primjenom high resolution melting PCR metode na 15 filogenetski značajnih polimorfizama jedne baze vrste *B. mallei*, hrvatski soj izdvojen 1957. godine nalazi se u grupi filogenetski srodnih sojeva iz Italije, Mađarske, Turske i Irana iz istog vremenskog razdoblja. Maleus je klasična, re-emergentna bakterijska zoonoza i bolest koja ne poznaje granice kako po klinički nespecifičnoj slici i kroničnim oblicima bolesti

bez vidljivih simptoma tako i po činjenici da se slučajevi bolesti u konja dijagnosticiraju i danas u zemljama s višegodišnjim statusom bez bolesti. Kontrola konja u međunarodnom prometu je i dalje neophodna.

Ključne riječi: *Burkholderia mallei*, genotipizacija, Maleus, Hrvatska

Literatura

1. ARU, S., H. NEUBAUER, A. GUREL, G. AYILDIZ, B. KUSCU, T. YESILDERE, H. MEYER and W. HERMANN (1999): Equine glanders in Turkey. Vet. Rec. 144, 255-258.
2. CVETNIĆ, Ž. (2013): Infekcije vrstama iz roda *Burkholderia*. U: Bakterijske i gljivične zoonoze. Medicinska naklada, Zagreb. Str. 54-59.
3. FALIŠEVAC, J. i V. BEZJAK (1950): Terapija maleusa sulfonamidima. Liječnički vjesnik 6-7, 228-231.
4. GIRAULT, G., P. WATTIAU, M. SAQIB, B. MARTIN, M. ENGELSMAN, H. J. ROEST, S. ŠPIČIĆ, R. GRUNOW, N. VICARI, S. C. J. DE KEERSMAECKER, N. H. C. ROOSENS, M. FABBI, S. ZIENTARA, N. MADANI and K. LAROUCAU (2018): High-Resolution Melting PCR Analysis for rapid genotyping of *Burkholderia mallei*. Rad u objavi.
5. HABRIN, B. (2014): Vrsta *Pseudomonas aeruginosa* i rod *Burkholderia*. U: Klinička veterinarska bakteriologija. Medicinska naklada, Zagreb, Str. 229-233.
6. HIRSCH, S. (1924): Infekcija maleusa kod čovjeka. Liječnički vjesnik 12, 631-633.
7. JURAK, LJ. (1943): Neobičan tok bolesti i neobičan razudbeni nalaz kod akutne sakagije čovjeka (*Malleus humidus acutus hominis*). Liječnički vjesnik, 65, 185-191.
8. KHAN, I., L. H. WIELER, F. MELZER, M. C. ELSCHNER, G. MUHAMMAD, S. ALI, L. D. SPRAGUE, H. NEUBAUER and M. SAQIB (2013): Glanders in animals: a review on epidemiology, clinical presentation, diagnosis and countermeasures. Transbound. Emerg. Dis. 60, 204-221.
9. LEHAVI, O., O. AIZENSTIEN, L. H. KATZ and A. HOURVITZ (2002): Glanders - a potential disease for biological warfare in humans and animals. Harefuah 141, 88-91.
10. LIJEČNIČKI VIJESNIK (1877): Godišnje glavno zdravstveno izvješće za područje Kr. hrv. slav. dalm. zem. vlade od god 1875. B. Zdravstveni odnošaj kod domaćeg živinstva. 4. Sakagija. Liječnički vjesnik 7, 106-107.
11. LIJEČNIČKI VIJESNIK (1877): Godišnje glavno zdravstveno izvješće za područje Kr. hrv. slav. dalm. zem. vlade od god 1875. B. Zdravstveni odnošaj kod domaćeg živinstva. 4. Sakagija. Liječnički vjesnik 8, 134.

12. MALIK, P., H. SINGHA, S. K. GOYAL, K. KHURANA, B. N. TRIPATJI, A. DUTT, D. SINGH, N. SHARMA and S. JAIN (2015): Incidence of *Burkholderia mallei* infections among indigenous equines in India. *Vet. Rec. Open*. 2 (2). e000129, doi. 10.1136/vetreco-2015-000129.
13. NEMČIĆ, S. (1907): Dva slučaja sakagije kod čovjeka. *Liječnički vjesnik* 9, 245-250.
14. OIE - World Organisation for Animal Health (2015): Immediate Notification Glanders in Germany. Report No. 17092 Date 30/01/2015. http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Reviewreport/Review?page_refer=MapFullEventReport&reportid=17092
15. OIE - World Organisation for Animal Health (2017): Glanders. Chapter 2.5.11. In: *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*. OIE.
16. SCHOLZ, H. C., M. JOSEPH, H. TOMASO, S. AL DAHOUK, A. WITTE, J. KINNE, R. M. HAGEN, R. WERNERY, U. WERNERY and H. NEUBAUER (2006): Detection of the reemerging agent *Burkholderia mallei* in a recent outbreak of glanders in the United Arab Emirates by a newly developed fliiP-based polymerase chain reaction assay. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 54, 241-247.
17. WHITLOCK, G. C., D. M. ESTES and A. G. TORRES (2007): Glanders: off the race with *Burkholderia mallei*. *FEMS Microbiol. Lett.* 277, 115-122.

Glanders - an almost forgotten zoonosis

Silvio ŠPIČIĆ, DVM, PhD, Scientific Advisor, Croatian Veterinary Institute, Zagreb, Croatia; Karine LAROUCAU, DVM, PhD, Scientific Advisor, ANSES, Laboratory for Animal Health, Bacterial Zoonosis Unit, European Union Reference Laboratory for Equine Diseases/Glanders, Maisons-Alfort, France; Maja ZDELAR TUK, DVM, PhD, Scientific Advisor, Sanja DUVNJAK, MSc, BSc, PhD, Postdoctoral student, Željko PAVLINEC, BSc, MSc, Irena REIL, DVM, Assistant, Gordan KOMPES, DVM, PhD, Scientific Associate, Boris HABRUN, DVM, PhD, Associate Professor, Maja STEPANIĆ, DVM, Professional Associate, Darko ŽELJEŽIĆ, DVM, Professional Associate, Željko CVETNIĆ, DVM, PhD, Academician, Croatian Veterinary Institute, Zagreb, Croatia

Glanders is a contagious disease of horses, donkeys and their crossbreeds, though it is also known to infect carnivores, including humans. The disease is usually chronic and is manifested by the formation of specific nodes in skin, subcutaneous tissue, lungs and elsewhere. In Croatia, the last record of the disease was in 1961. In the archive of strains in the Laboratory for Bacterial Zoonoses at the Croatian Veterinary Institute, a lyophilisate marked *B. mallei* – Karlovac (5.2.1957) was found. As these specimens are exceptionally rare, the intention was to re-cultivate the strain and identify it with further standard and molecular tests, to confirm whether it was really *Burkholderia* (*B.*) *mallei*. The lyophilized isolate could not be cultivated using the described bacteriological procedures. DNA extraction from the sample of dissolved lyophilizate was performed and a concentration of extracted DNA was measured on the DS-11 Spectrophotometer (DeNovix,

USA). By amplifying *B. mallei* specific, 989-bp long, flip-IS407A region, it was possible to determine that the strain “*B. mallei* Karlovac 5.2.1957” belongs to the *B. mallei* species. According to the currently available data on molecular genotyping using high-resolution melting PCR method on 15 phylogenetically significant single nucleotide polymorphisms of *B. mallei*, the Croatian strain isolated in 1957 falls within the group of phylogenetically related strains from Italy, Hungary, Turkey and Iran from the same time period. Glanders is a classical, re-emerging bacterial zoonosis and a disease that knows no boundaries, both in the clinically unspecific and chronic forms of illness without visible symptoms, and in the fact that the cases of the disease in horses are still diagnosed today in countries with long-term disease-free status. The control of horses in international traffic is still necessary.

Key words: *Burkholderia mallei*, Genotyping, Glanders, Croatia