



Bijlage I Isolatie en identificatie van *Yersinia pestis*

1. Algemeen

1.1 Doel

Het aantonen van *Y. pestis* in klinische materialen.

1.2 Doelgroep

Deze richtlijn is bestemd voor analisten, die door de leiding van een afdeling geautoriseerd zijn het onderzoek, of gedeelten daarvan, uit te voeren.

2. Bacteriologische kenmerken

Yersinia pestis is een facultatief anaeroob, niet-beweeglijk, niet-sporenvormend micro-organisme behorend tot de familie van *Enterobacteriaceae*. Deze bestaat uit elf species waarvan *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis* en *Y. enterocolitica* voor de mens pathogeen zijn. In grampreparaten zijn ze te herkennen als pleomorfe, gramnegatieve, coccobacillaire staafjes van 0,6 x 1,5 µm. Zowel Wayson als Giemsa-kleuring geven het micro-organisme een bipolair uiterlijk wat doet denken aan een gesloten veiligheidsspel. Met Gram-kleuring is de bipolariteit minder duidelijk zichtbaar.

De groei verloopt optimaal op schapenbloed agar en McConkey agar bij een temperatuur van 25-28°C en een pH van 7.2-7.6. Meestal zijn de kolonies, die aanvankelijk kleiner zijn dan die van andere *Enterobacteriaceae*, pas na 48 uur incubatie goed zichtbaar en hebben dan een verheven grijswit uiterlijk met vele onregelmatigheden dat ook wel wordt beschreven als 'beslagen koper'. De CIN-plaat is een selectief medium voor het isoleren van *Yersinia* spp. Binnen het genus *Yersinia* kan *Y. pestis* fenotypisch onderscheiden worden van de overige species, maar er is nauwelijks verschil met *Y. pseudotuberculosis*.

3. Verantwoordelijkheden en veiligheid

3.1 Verantwoordelijkheden

De werkzaamheden worden uitgevoerd onder eindverantwoordelijkheid van de arts-microbioloog. De verantwoordelijkheid voor het uitvoeren van de analyse en van de verslaglegging van het testresultaat volgens de in het laboratorium vigerende protocollen berust bij degene(n) die de feitelijke werkzaamheden uitvoert (uitvoeren).

3.2 Veiligheid

Y. pestis is een risicoklasse 3 micro-organisme en een potentiële verwekker van laboratoriuminfecties. Conform de richtlijn 'Veilig Werken' van de NVMM geldt dat bij vermoeden van pest het beschermingsniveau op de werkvloer moet worden aangepast. Om deze reden dient de behandelende arts vooraf te overleggen met de arts-microbioloog. Als dat niet is gebeurd en uit de aanvraag blijkt dat gedacht wordt aan pest, moet de arts-microbioloog worden gewaarschuwd voordat het materiaal in behandeling wordt genomen, zodat de handelingen naar een BSL3-laboratorium verplaatst worden.

4. Materialen

4.1 Biologisch materiaal

Aspiraten/biopen van builen (lymfeklieren)
Sputum, bronchusspoelsel, keelwat
Bloed (in bloedkweekflesjes)

4.2 Media en reagentia

4.2.1 Media

Schapenbloed agar (SBA)

Cefsulodin-Irgasan-Novobiocine (CIN) agar (selectie)
Aminozuurreductiemedium met ornithine (Ornithine decarboxylase reactie [ODC])
Peptonwater met L-rhamose (zuurvorming door fermentatie)
Peptonwater met D-sucrose (zuurvorming door fermentatie)
Tryptonwater (Indolreactie)
U-buis of Craigietube met slappe ager (Beweeglijkheid)
(hangendedruppeltechniek is af te raden, kans op aerosolen)
Ureum agar volgens Christensen (urease)
Voges-proskauer medium (VP)

4.2.2 Reagentia

Kovac's reagens t.b.v. indolreactie
40% KOH (VP)
alpha-nahtol (VP)

5. Uitvoering

5.1 Microscopisch preparaat

Klinische preparaten van pest-verdachte patiënten kunnen gekleurd worden door middel van Gram-, Wayson- en Giemsa-kleuring.
Preparaten van gekweekte bacteriecellen kunnen het beste met methanolfixatie op een voorwerpsglas worden aangebracht. Suspenderen in fysiologisch zout ten behoeve van de vlamfixatietechniek kan aerosolvorming veroorzaken.
Yersinia pestis is te zien als een Gramnegatieve coccoïde staafje (0,6 X 1,5 µm). De bipolaire structuur (veiligheidsspeld-vorm) is beter zichtbaar in Waisson- en Giemsa-kleuring.

5.2 Kweek

5.2.1 Vloeibare kweek

Vloeibare kweek zoveel mogelijk vermijden in verband met aerosolvorming

5.2.2 Vaste voedingsbodems

Beënt 2x SBA en incubeer 24-48 uur een plaat bij 28°C en de ander bij 35-37°C.
Beënt CIN bij 28°C. *Y. pestis* groeit optimaal bij 28°C en vormt grijswitte, matglanzende, ruwe kolonies van 1-2 mm doorsnede, met na verloop van tijd een iets verheven, onregelmatige rand ('beslagen koper' of 'gebakken ei' vorm). *Y. pestis* is niet hemolytisch. CIN-platen zijn selectief voor *Yersinia*.

5.3 Identificatie

5.3.1 Fenotypische identificatie

Incubatie bij 28 °C is van belang voor een goede identificatie. Bij sommige geautomatiseerde systemen (bijv Vitek) kan dit problematisch zijn. API 20 E dient in tegenstelling tot het voorschrift van de fabrikant bij 28 °C geïncubeerd te worden.

30°C.

De volgende combinatie van eigenschappen is karakteristiek voor *Y. pestis*:

Gram-kleuring	gram negatief coccoïde staafje
Wayson- of Giemsa kleuring	bipolair (veiligheidsspeld)
CIN-plaat	groei
Beweeglijkheid	onbeweeglijk
Urease	negatief (er zijn uitzonderingen)
Indol	negatief
Ornithine decarboxylase	negatief
L-Rhamnose	negatief (er zijn uitzonderingen)
D-sucrose	negatief
VP	negatief

5.3.2 Identificatie d.m.v. MALDI-TOF

Identificatie systemen op basis van MALDI-TOF zijn (volgens de fabrikanten) goed in staat *Y. pestis* te onderscheiden. Belangrijk hiervoor is echter dat er voldoende

Y. pestis stammen in de MALDI-TOF-databank zijn opgenomen. Dit dient te worden nagegaan bij verdenking op *Y. pestis*.
De bacterie kan van tevoren worden geïnactiveerd (vanwege het zeer kleine risico op aerosolvorming) door in een veiligheidskabinet een kolonie te suspenderen in 70% ethanol, te vortexen en een uur te laten incuberen bij kamertemperatuur (Ayyadurai 2010).

5.4 Moleculair-biologische methoden

5.4.1 16S rDNA sequentie-analyse

Yersinia pestis kan met behulp van 16S sequentie-analyse onderscheiden worden van andere *Yersinia species*, maar niet van *Y.pseudotuberculosis*.

Real-time PCRs gericht op 2 plasmide-genen coderend voor respectievelijk plasminogeen activator protease en F1-kapselantigeen, beide specifiek voor *Y. pestis* zijn operationeel bij het RIVM Avirulente stammen bezitten deze genen niet. Inzending van enig materiaal dient te worden voorafgegaan door overleg met de dienstdoende arts-microbioloog van RIVM-IDS (zie: www.rivm.nl/Onderwerpen/Onderwerpen/I/Infectieziekte_informatie_voor_professionals/Diagnostiek).

Deze techniek kunnen zowel op gekweekte stammen als op patiëntenmateriaal uit "steriele" compartimenten toegepast worden.

6. Verdere acties

Bewaar iets van het ingezonden materiaal.

Waarschuw de dienstdoende arts van de GGD.

Maak verdacht materiaal of cultuur verzendklaar volgens voorschrift en waarschuw tevoren de lokale microbioloog.

7. Literatuur

Ayyadurai S, Flaudrops C, Raoult D, Drancourt M. Rapid identification and typing of *Yersinia pestis* and other *Yersinia species* by MALDI-TOF mass spectrometry. *BMC Microbiol* 2010; 10: 285.