

Antrax – miltvuur

A22

Bijlage III Isolatie en identificatie van *Bacillus anthracis*

1. Inleiding

1.1 Ziekte

Bacillus anthracis is de veroorzaker van antrax, een zoönose die primair voorkomt bij herbivoren. De besmetting is overdraagbaar op mensen door het hanteren of consumeren van besmette dierlijke producten. Infectie kan ook optreden door inhalatie van *B. anthracis*-sporen tijdens het verwerken van besmette huiden of vachten of door opzettelijke verspreiding tijdens een bioterroristische aanval in de vorm van een aerosol of als poeder in brieven of pakjes. Overdracht van mens op mens komt niet voor.

Antraxsporen zijn bijzonder resistent en kunnen, eenmaal in de natuur terechtgekomen, jarenlang infectieus blijven.

Zowel onder dieren in het wild als onder landbouwhuisdieren komt de ziekte veel voor in Afrika, Zuid- en Midden-Amerika, Oost-Europa en Rusland, en het Midden-Oosten. Vogels, amfibieën, reptielen en vissen zijn niet gevoelig voor antraxinfecties.

Humane antrax, miltvuur, komt voor in drie vormen: cutane antrax, gastro-intestinale antrax en inhalatie-antrax. In 95% van de natuurlijk voorkomende gevallen betreft het de cutane vorm. Eén tot zeven dagen na contact met het besmette materiaal ontstaat ter plaatse een pijnloze papel. Deze groeit uit tot een traag-helende zweer bedekt met een zwarte korst (eschar). In 10-20% van de onbehandelde gevallen ontstaat een dodelijk verlopende sepsis als gevolg van uitbreiding van de infectie via de lymfvaten. Bij tijdige behandeling is de sterfte gering.

Inhalatie-antrax verloopt onbehandeld vrijwel altijd dodelijk. Er ontstaat een ernstige hemorragische mediastinitis met sepsis en/of meningitis. De incubatietijd is bij deze vorm twee tot zestig! dagen; blijktbaar zijn geïnhalede sporen in staat zich lange tijd in een sluimerfase ter plaatse te handhaven.

Antrax is in een vroeg stadium goed behandelbaar met een penicilline. Ook doxycycline en ciprofloxacin worden toegepast. Dezelfde middelen komen eveneens in aanmerking in het kader van een postexpositie profylaxe.

1.2 Doel

Het aantonen van *B. anthracis* in klinisch materiaal.

1.3 Principe

Het isoleren en identificeren van *B. anthracis* uit klinisch materiaal met behulp van microscopie, koloniemorfologie en groei-eigenschappen.

1.4 Doelgroep

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

1.5 Veiligheid

B. anthracis is een risicoklasse 3-organisme en een potentiële verwekker van laboratoriuminfecties. Bij vermoeden van antrax moet de behandelend arts vooraf overleggen met de arts-microbioloog. Als dat niet is gebeurd en uit een aanvraag blijkt dat gedacht wordt aan antrax, dan moet de arts-microbioloog worden gewaarschuwd vóór het materiaal in behandeling wordt genomen. Het beschermingsniveau dient dan te worden aangepast conform de richtlijn Veilig Werken (1999) van de NVMM (zie hoofdstuk 6).

Speciale aandacht moet worden geschonken aan:

- het consequent uitvoeren van alle handelingen in een veiligheidskabinet klasse II;

- het vermijden van aerosolen;
- de desinfectie van de werkvlakken onmiddellijk na ieder gebruik met 0,5% natriumhypochloriet;
- het desinfecteren van gemorst materiaal: bij een lage besmettingsgraad is de noodzakelijke minimale inwerktijd 5 minuten; voor hoogbesmet gemorst materiaal of bij een besmetting in de koeling of de vriezer is een minimale inwerktijd van 1 uur noodzakelijk. Alternatief: formaldehyde 4%, minimale inwerktijd 2 uur;
- het uittrekken van de handschoenen (binnenstebuiten keren) en het handen wassen.

2. Verantwoordelijkheden

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

3. Biologisch materiaal

- Blaasjesvocht
- Uitstrijk onder de rand van de korst
- Bloed in bloedkweekflesje(s)
- Bronchussecret
- Feces
- Liquor

4. Uitvoering

4.1 Gramkleuring

Interpretatie

4.1.1. Direct preparaat van klinisch materiaal (maak ook een grampreparaat van bloed, ingestuurd in een bloedkweekflesje vóór incubatie in de bloedkweekautomaat!): korte ketens van 2-4 cellen gekapselde grote grampositieve staven vormt een sterke aanwijzing dat het materiaal *B. anthracis* bevat. Kapsels zijn te herkennen als heldere, ongekleurde zones rond de staafjes; in een Oost-Indische inktpreparaat zijn ze beter te onderscheiden.

Er zijn géén sporen te zien.

Waarschuw bij een verdacht grampreparaat direct de arts-microbioloog en via deze de behandelaar.

4.1.2. In grampreparaten van culturen is *B. anthracis* te herkennen als grote grampositieve staven (1-1,5 x 3-5 µm), liggend in lange ketens, met ovale, centrale tot subterminale sporen (1-1,5 µm) die niet uitpuilen. Een kapsel is niet aanwezig.

Sporen kunnen zichtbaar gemaakt worden m.b.v. fase-contrast microscopie of met een sporenkleuring (M·Fadyean).

4.2 Kweek

Voedingsbodems

- Schapenbloedplaat (SBA)
- MacConkey (McC)
- Thioglycolaat boullion (thio) of trypticase soya boullion (TSB) als aankweekmedium
- Bloedkweekmedium
 - (- phenylethylalcohol bloedagarplaat (PEA))
 - (- nutrient agar met 0,8% natriumbicarbonaat)
 - (- beweeglijkheidsmedium (halfvaste agar))

Incubatie

De voedingsbodems worden geïncubeerd bij 35-37°C onder normale condities, de bicarbonaat-agar echter bij 5% CO₂. Aflezen na 18-24 uur; groei is echter soms al na 8 uur waarneembaar.

Interpretatie

- Groei op SBA: na 15-24 uur incubatie zijn de kolonies van *B. anthracis* 2-5 mm in drs, grijs-wit, plat of licht convex, met onregelmatige rand en een matglas-aspect. Er zijn slingerende uitlopers te zien vanuit de rand van de kolonie, die deze het aspect geven van een 'Medusa hoofd'. De kolonies hebben de consistentie als van geklopt eiwit. Er is geen hemolyse.
- McC: geen groei.
- PEA: geen groei.
- Bicarbonaat-agar: op deze voedingsbodem vormen virulente stammen van *B. anthracis* kapsels.
- Bewegelijksmedium (of natief preparaat vanuit aankweekmedium): *B. anthracis* is onbeweeglijk.
- Bloedkweekmedium: wordt veelal snel als positief gesignaleerd en bevat dan nog gekapselde staafjes.

Aanvullende identificatie: gevoeligheid voor penicilline m.b.v. schijfje 5µg: *B. anthracis* is penicilline gevoelig. Stammen die gebruikt worden als biologisch wapen kunnen echter een afwijkend gevoeligheidspatroon bezitten.

Identificatie overzicht

- | | |
|----|--|
| a. | in het klinisch materiaal worden gekapselde grampositieve staven gezien |
| | ↓ |
| b. | kweek aerob: grampositieve plumpe staven met sporen → <i>Bacillus sp.</i> |
| | ↓ |
| c. | sporen ovaal en niet uitpuilend; de kolonies hebben een matglas aspect → <i>Bacillus</i> morfologie groep 1 (<i>B. anthracis</i> , <i>B. cereus</i> , <i>B. thuringiensis</i> , <i>B. cereus var mycoides</i>) |
| | ↓ |
| d. | onbeweeglijk → <i>B. anthracis</i> en <i>B. cereus var mycoides</i> |
| | ↓ |
| e. | niet-hemolytisch → <i>Bacillus anthracis</i> |

4.3 Aanvullende testen

- Faagtypering (CVI-Lelystad)
- PCR voor detectie van toxine- en kapselantigeenvorming

5. Verdere acties

- Bewaar iets van het ingezonden materiaal.
- Waarschuw de arts infectieziekten van de GGD bij vermoeden.
- Maak verdacht materiaal of cultuur verzendklaar volgens voorschrift (zie hoofdstuk 5.8 van ref. 5) t.b.v. verder onderzoek bij het CVI-Lelystad. Een speciaal transportmedium is niet nodig. Waarschuw tevoren de microbioloog aldaar (tel 06-59904960).

6. Literatuur

Dit laboratoriumvoorschrift is een bewerking van de richtlijn "Laboratoriumdiagnostiek van aandoeningen door *Bacillus anthracis*" van JE Degener en MF Peeters, dat in oktober 2001 aan alle artsen-microbioloog in Nederland per e-mail werd toegestuurd.

Basic Laboratory Protocols for the presumptive identification of *Bacillus anthracis*. CDC april 2001.

Veilig werken met micro-organismen, parasieten en cellen in laboratoria en andere werkruimten. NVMM 1999. ISBN 90-804745-1-7.