

Amtliche Methode und Falldefinition

Milzbrand

Inhaltsverzeichnis

Amtliche Methode	3
1. Charakterisierung der Infektion	3
1.1 Erreger	3
1.2 Klinische Symptomatik	3
1.3 Differentialdiagnostik.....	4
1.4 Diagnostische Indikation	4
1.5 Zuständige Untersuchungseinrichtung	4
1.6 Rechtsgrundlagen.....	4
2. Untersuchungsmaterial	4
2.1 Gewinnung.....	4
2.2 Transport und Lagerung	5
3. Untersuchungsgang	5
3.1 Erregernachweis	5
3.2 Genotypisierung, Gesamtgenomsequenzierung und Bioinformatik	8
Anhang	10
1. Nährmedien	10
2. Kapseldarstellung	11
2.1 Kapselfärbung mit AzurB (Owen <i>et al.</i> , 2013).....	11
2.2 Kapseldarstellung durch Tusche (nur aus Kulturmaterial)	12
3. Realtime-PCRs zum Nachweis von pathogenem <i>Bacillus anthracis</i>	13
3.1 TaqMan-Sonden PCR	13
3.2 TaqMan-Sonden-Multiplex PCR.....	14
3.3 FRET-Sonden	15
Falldefinition - Milzbrand; <i>Bacillus anthracis</i>	21

Amtliche Methode

1. Charakterisierung der Infektion

1.1 Erreger

Bacillus (B.) anthracis ist der Erreger des Milzbrandes, einer meist akuten und oft tödlich verlaufenden Infektionskrankheit mit septikämischem Charakter. Haus- und Wildwiederkäuer sind hochempfindlich für Milzbrand. Schweine, Fleischfresser und auch Menschen (eher mäßig) sowie Vögel (Ausnahme Strauß) gelten als fast resistent. Die Krankheit ist weltweit verbreitet und kommt am häufigsten in Asien (Naher und Ferner Osten, Indien), Afrika und Südamerika vor; in Europa sind der mediterrane Raum und Osteuropa am stärksten betroffen.

Die Ansteckung erfolgt gewöhnlich durch die Aufnahme von Milzbrandsporen mit dem Futter oder Trinkwasser. Nur in Ausnahmefällen wird die Krankheit von Tier zu Tier übertragen. Auch eine Ansteckung über Milzbrandsporen enthaltende Stäube und Aerosole ist möglich.

Der Milzbranderreger bildet Sporen als Dauerformen, die sich über Jahrzehnte im Erdboden als ansteckungsfähig erhalten können. Milzbrandsporen werden weder durch Fäulnis noch durch Eintrocknen oder beim Gerben der Häute vernichtet.

1.2 Klinische Symptomatik

Milzbrand ist am lebenden Tier selten mit Sicherheit festzustellen.

Beim Rind und Schaf treten meist plötzliche Todesfälle auf. Aus den Körperöffnungen (Anus, Vulva, Mund, Nase) tritt dunkles, schlecht gerinnendes Blut. Erst bei der Zerlegung ist ein Verdacht auf Milzbrand festzustellen. Wenn weitere Tiere mit hohem Fieber, unregelmäßigem Puls, beschleunigter Atmung und evtl. Kolikerscheinungen erkranken, liegt der Verdacht auf Milzbrand nahe. Tierärztliche Behandlung ist nur dann Erfolg versprechend, wenn sie frühzeitig einsetzen kann.

Beim Pferd: plötzlich hochfieberhafte Erkrankung mit Kolik, Schling- und Atembeschwerden, Atemnot wegen Schwellung im Kehlgangsbereich, auch scheinbare Besserung und Tod nach mehreren Tagen.

Beim Schwein können Krankheitserscheinungen am lebenden Tier fehlen, in vereinzelten Fällen sind Atembeschwerden infolge Rachenentzündung sowie Verfärbung und Schwellung im Bereich des Kehlkopfes (Milzbrandbräune) zu beobachten. Die größte Zahl der Milzbrandfälle wird erst bei der Fleischbeschau oder in der Tierkörperbeseitigungsanstalt festgestellt.

Milzbrand

1.3 Differenzialdiagnostik

Pasteurellose, Rauschbrand, Pararauschbrand, Vergiftungen

1.4 Diagnostische Indikation

gemäß Milzbrand-Rauschbrand-VO siehe 1.6.

1.5 Zuständige Untersuchungseinrichtung

- Zuständige Landesuntersuchungsämter
- Nationales Referenzlabor am Friedrich-Loeffler-Institut, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit, Institut für Bakterielle Infektionen und Zoonosen, Naumburger Str. 96a, 07743 Jena
- Konsiliarlaboratorium für *B. anthracis* in Umweltproben, Institut für Umwelt- und Tierhygiene, Universität Stuttgart, Emil-Wolff-Straße 14, 70599 Stuttgart.

1.6 Rechtsgrundlagen (in der jeweils geltenden Fassung)

- Verordnung (EU) 2016/429 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 9. März 2016 zu Tierseuchen und zur Änderung und Aufhebung einiger Rechtsakte im Bereich der Tiergesundheit („Tiergesundheitsrecht“)
- Tiergesundheitsgesetz in der jeweils geltenden Fassung
- VO (EU) 2016/429 Tiergesundheitsrecht, Anhang II „Liste der Seuchen“ (geändert durch VO (EU) 2018/1629): Milzbrand
- Verordnung über anzeigepflichtige Tierseuchen in der jeweils geltenden Fassung
- Verordnung zum Schutz gegen den Milzbrand und den Rauschbrand vom 23. Mai 1991 (BGBl. I S. 1172) in der jeweils geltenden Fassung.

2. Untersuchungsmaterial

2.1 Gewinnung

Zur Untersuchung sollte nur frisch entnommenes Material verwendet werden.

Vom lebenden Tier: Blut aus der Ohrvene (*B. anthracis* ist nur 16 bis 18 h vor dem Tod im Blut nachweisbar)

Vom toten Tier: Ganze Kadaver, Sektionsmaterial, aber auch Blutausstriche und tierische Produkte wie Häute, Haare, Wolle, Tierkörpermehle

2.2 Transport und Lagerung

Während des Transportes und evtl. notwendig werdender kurzzeitiger Lagerung ist das Material kühl bei $+7\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$ aufzubewahren.

Untersuchungsmaterial vorschriftsmäßig gemäß der entsprechenden Gefahrgutverordnung Straße (ADR) und Eisenbahn (RID), Luftverkehr (IATA-DGR), DIN EN 829 in der jeweils geltenden Fassung, in dicht schließenden Behältnissen verpackt, gekennzeichnet, zusammen mit Vorbericht und Untersuchungsantrag nach vorheriger telefonischer Absprache schicken.

Wegen möglicher Gefährdungen während des Transportes sollte Milzbrand-verdächtigtes Untersuchungsgut durch Kurier übermittelt werden.

Die Proben sind mit dem entsprechende Einsendebogen an das FLI zu senden. Dieser kann unter folgendem Link heruntergeladen werden: <https://www.fli.de/de/institute/institut-fuer-bakterielle-infektionen-und-zoonosen-ibiz/referenzlabore/nrl-fuer-milzbrand/>

3. Untersuchungsgang

Dazu siehe auch:

- Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2021; Chapter 3.1.1. Anthrax (version adopted in May 2018)

Vorsichtsmaßnahmen

Der Umgang mit potentiell *B. anthracis*-haltigem Material und Kulturen ist genehmigungspflichtig und darf nur in einem Labor der Sicherheitsstufe 3 vorgenommen werden und die entsprechenden Maßnahmen für biologische Sicherheit sind zu beachten.

3.1 Erregernachweis

Der Nachweis von *B. anthracis* sollte durch eine Kombination von mikroskopischen, kulturellen und molekularbiologischen Untersuchungen durchgeführt werden.

3.1.1 Kulturelle Untersuchung

Die kulturelle Anzucht gilt als sehr sichere Nachweismethode. Als Ausgangsmaterial werden o. g. Materialien empfohlen. (Rezepturen s. Anhang)

Anreicherung

Eine Anreicherung ist üblich besonders bei der Untersuchung von Futtermitteln, die Tierkörpermehle enthalten, aber auch bei Häuten, Haaren, Wolle, Oberflächentupfern und Umweltproben. Beimpfung einer Nährbouillon, die mindestens 18 h bei 37 °C aerob bebrütet wird. Kontaminiertes Material sollte mit der selektiven Anreicherungsbouillon für *B. anthracis*/*B. cereus*-Sporen angereichert werden.

Milzbrand

Schon nach 6 h Schütteln bei 37 °C wird die exponentielle Wachstumsphase erreicht und man kann auf Selektivnährmedien (s. u.) überimpfen. Zur Sicherheit sollte die angesetzte Bouillonkultur bis 18 h bei 37 °C weiter bebrütet und danach auf Selektivnährmedien ausgestrichen werden.

Wird das Untersuchungsmaterial zur Ausschaltung der vegetativen Kontaminanten für 20 min bei 65 °C erhitzt, kann die angegebene Anreicherungsbouillon für *B. anthracis*/*B. cereus* auch ohne Hemmstoffe verwendet werden. Dadurch verkürzt sich die Anreicherungszeit auf 4 h Schütteln bei 37 °C (Reissbrodt et al., 2004).

Bei Untersuchung von frischem Kadavermaterial entfällt die Erhitzung vor der Anreicherung.

Direktkultur

Diese erfolgt auf festen Nährmedien wie Blutagar oder den unten angeführten Selektivnährmedien. Hierbei sind stets mehrere Platten zu verwenden. Die Beimpfung erfolgt direkt oder nach Vorbehandlung und/oder Anreicherung (s. o.). Die Platten werden mindestens 18 h bei 37 °C aerob bebrütet.

Infolge morphologischer Ähnlichkeiten kommt der Abgrenzung zwischen *B. anthracis* und seinen taxonomisch nächsten Verwandten *B. cereus*, *B. thuringiensis* und *B. mycoides* (*B. cereus*-Gruppe) besondere praktische Bedeutung zu.

Weiterhin sind differentialdiagnostisch einige Antibiotika bildende Arten von Interesse, wie z. B. *B. polymyxa* (Polymyxin B), *B. brevis* (Tyrothricin), *B. subtilis* bzw. *B. licheniformis* (Bacitracin).

Auch *B. megaterium* (Erdbazillus) kann im Rahmen der Differentialdiagnostik eine Rolle spielen.

Nach 18- bis 24-stündiger Bebrütung sind Kolonien von *B. anthracis* mittelgroß bis groß (etwa 0,5 cm), mattglänzend oder trocken, flach, nicht pigmentiert, mit flockig-spiraliger Oberfläche und von butterartiger Konsistenz, „Eischnееffekt“, auf Blutagar ohne Hämolyse.

Selektive Nährmedien

TMSP-Agar

Auf diesem semiselektiven Nährboden finden *Bacillus* spp. eine gute Nährstoffbasis, um schnell zu charakteristischen großen Kolonien auszuwachsen. Das Wachstum von *B. subtilis* und *B. megaterium* ist vollständig gehemmt. Das Wachstum von Staphylokokken, von Enterobacteriaceae, *Pseudomonas aeruginosa* und Enterokokken ist entweder ebenso vollständig gehemmt oder stark reduziert. Der Zusatz von Schafblut unterstützt das Wachstum, gleichzeitig ist das Auftreten einer starken Hämolyse um die Kolonien der anderen *Bacillus* spp. - wie *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. mycoides*, *B. licheniformis* - ein hervorragendes Differenzierungsmerkmal zu *B. anthracis*. *B. anthracis*-Stämme wachsen als weiße, große Kolonien (2 bis 6 mm im Durchmesser) mit charakteristischer stumpfer Oberfläche ohne Hämolyse (Tab. 2).

Chromogene Selektivnährmedien

Zur weiteren Differenzierung der *Bacillus* spp. kann ein kommerzieller *B. cereus* Agar mit Supplement (z. B. Thermo Scientific™ Brilliance™ *Bacillus-Cereus*-Agarbasis (CM1036B) Artikelnummer 10528623; Thermo Scientific™ Brilliance *Bacillus Cereus*, Selektiv-Ergänzungstoff Artikelnummer 13265409) entsprechend Herstellerangaben (<http://www.chromagar.com/>) empfohlen werden. Das Wachstumsverhalten der verschiedenen *Bacillus* spp. ist in Tabelle 2 des Anhangs beschrieben.

Phagentest

Der Phagentest wird unter Anwendung des für *B. anthracis* spezifischen Gamma-Phagen durchgeführt. Als Ausgangskultur kann einerseits eine 3- bis 4-stündige Nährbouillonkultur oder eine leicht trübe Suspension des verdächtigen Koloniematerials in steriler physiologischer Kochsalzlösung oder auch mit dem resuspendierten Koloniematerial direkt verwendet werden. Stets sollte als Positivkontrolle ein gut charakterisierter Milzbrandstamm und als Negativkontrolle ein *B. cereus*-Stamm bei gleicher Präparationstechnik in die Untersuchung einbezogen werden.

Durchführung:

Auf Blutagar wird auf der Rückseite der Petrischale mit Schablone eine kreisrunde Fläche (Ø 2 cm) markiert. Auf dieser Fläche wird das Probenmaterial verteilt. Den Inhalt einer Öse mit Phagensuspension (Titer mindestens 108) exzentrisch auf diesen Bereich auslaufen lassen, (Flüssigkulturen müssen vorher erst eintrocknen). Im günstigen Falle erkennt man schon nach 4 bis 6 Stunden ein zartes Wachstum und das typische Phagenloch, wenn es sich um *B. anthracis* handelt.

Der Ansatz wird bei 37 °C bebrütet und frühestens nach 5 Stunden und optimal nach 24 Stunden abgelesen.

Beweglichkeitstest

Die Prüfung der Beweglichkeit des Bakteriums erfolgt auf halbfestem Agar. Tetrazoliumsalze sind farblos, werden aber bei Bakteriumwachstum in die Zellen aufgenommen und zu einem roten Farbstoff (Formazan) reduziert. Die Beweglichkeit kann damit durch „Ausschwärmen“ der Bakterien auf dem Nährmedium sichtbar gemacht werden.

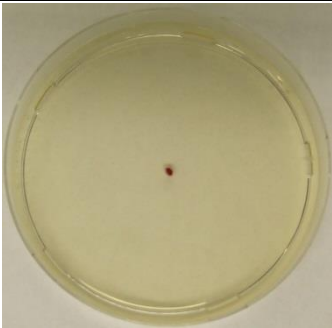

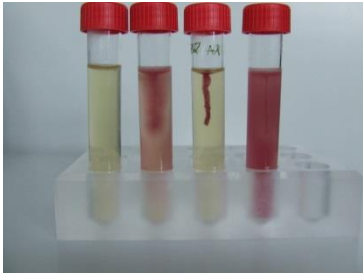
Durchführung:

Koloniematerial (nur wenig!) wird nur mit der Pipettenspitze angetippt und in die Mitte eines halbfesten TTC-haltigen Nähragars gedrückt.

Platte nicht umdrehen, 24 Stunden bebrüten bei 37 °C.

Milzbrand

Auswertung:

Unbeweglich: <i>B. anthracis</i>	Beweglich: <i>B. cereus</i>	Alternativ im Röhrchen: a-unbeimpft, b,d-beweglich c-unbeweglich a b c d
		

3.1.2 Kapseldarstellung

Virulente bekapselte *B. anthracis* sind im Gewebe, Blut oder anderen Körperflüssigkeiten von frisch an Milzbrand verendeten Tieren präsent (s. Anhang). Nach Kultivierung auf künstlichen Nährmedien geht die Kapsel jedoch rasch verloren. Der Kapselnachweis in Kulturen ist nur möglich, wenn diese auf bikarbonathaltigen Nährböden unter 5- bis 7%iger CO₂-Atmosphäre kultiviert wurden, kann aber auch hier teilweise nur begrenzt erfolgen (s. Anhang). Auch eine Kultivierung in defibriniertem Pferde-, Rinder- oder Schafblut führt nicht regelmäßig zur Ausprägung einer deutlichen Kapsel. Gelingt die Kapseldarstellung jedoch, ist sie ein Hinweis auf das Vorhandensein eines virulenten *B. anthracis*, da andere *Bacillus* spp., wie z. B. *B. subtilis*, *B. mesentericus*, *B. cereus* keine Kapsel haben.

3.1.3 Molekulare Nachweisverfahren

Für den Nachweis von *B. anthracis* in DNA-Präparationen aus Blut- oder Organmaterial bzw. aus Kulturmaterial stehen verschiedene Realtime-PCRs mit TaqMan- oder FRET-Sonden zur Verfügung. Der Nachweis der beiden Virulenzplasmide pX01 (kodierend für protektives Antigen) und pX02 (kodierend für Kapselantigen) reicht für den Nachweis eines virulenten *B. anthracis* Isolates aus.

Nicht alle beschriebenen chromosomalen Marker sind spezifisch für *B. anthracis*. Der chromosomale Marker PL3 (Prophage LambdaBa03) wurde als besonders spezifischer Marker identifiziert. (Agren *et al.*, 2013; s. Anhang).

3.2 Genotypisierung, Gesamtgenomsequenzierung und Bioinformatik

Zu den Standard-Genotypisierungsmethoden für *B. anthracis* gehören die kanonische Einzel-Nukleotid-Polymorphismen (canSNP) und Multilocus-Analyse mit variabler Anzahl tandem repeats (VNTRs) Analyse (MLVA).

Bei der canSNP-Typisierung werden 13-19 repräsentative verzweigungsspezifische SNPs analysiert. Auf der Grundlage der canSNP-Analyse kann *B. anthracis* in drei Hauptstämme unterteilt werden: A, B und C, die sich in Unterlinien mit typischer geografischer Verteilung unterteilen (Girault et al., 2014; Van Ert et al., 2007; Marston et al., 2011; Bruce et al., 2020). MLVA verwendet Tandem Repeats zur weiteren Unterteilung von *B. anthracis*-Isolaten durch Analyse von bis zu einunddreißig VNTR-Loci und ermöglicht die genauere Differenzierung von Stämmen mit identischem SNP-Genotyp (Rondinone et al., 2020).

Heute ist die Ganzgenomsequenzierung (WGS) die Methode der Wahl, um genomweite SNPs in *B. anthracis* zu identifizieren, was die Definition neuer genetischer Abstammungslinien ermöglicht, aber auch die Auflösung phylogenetischer Analysen bei Ausbruchssituationen erhöht.

Für die WGS mit anschließender bioinformatischer Analyse für Ausbruchsanalysen bieten sich die Illumina- und/ oder MinION -Plattformen an. DNA-Isolation und Erstellung von Libraries werden jeweils nach Herstellerangaben durchgeführt.

Core genome multilocus sequence typing (cgMLST) ist eine Methode zur bakteriellen Subtypisierung, die WGS-Daten verwendet, um eine hochauflösende Stammcharakterisierung zu ermöglichen und steht für *B. anthracis* zur Verfügung (Abdel-Gil et al., 2021). Das Schema umfasst 3 803 Gene, die in *B. anthracis*-Genomen konserviert sind und die gesamte Phylogenie umspannen. Die cgMLST-Ergebnisse bestätigten die klassische canSNP-Gruppierung von *B. anthracis* in Hauptkladen und Subkladen. Die auf der Grundlage von cgMLST berechneten genetischen Abstände sind vergleichbar mit den Abständen aus der SNP-Analyse auf Ganzgenombasis. Die Anwendung des cgMLST-Schemas auf epidemiologisch verbundene Stämme in Ausbruchsgeschehen ermöglicht eine hochauflösende Stammgenotypisierung.

Eine linuxbasierte Pipeline zur automatischen Analyse von Gesamtgenomdaten für *B. anthracis* ist unter https://gitlab.com/FLI_Bioinfo/WGSBAC kostenfrei verfügbar.

Milzbrand

Anhang

1. Nährmedien

Blutagar

Brucella-Agar (oder andere Blutagarbasis, siehe z. B. die folgende Rezeptur) mit Zusatz von 5 % defibriniertem Blut von Schafen, Pferden, Rindern oder Kaninchen. Weiter wird empfohlen:

Bacto-Pepton	10,0 g
Natriumchlorid	5,0 g
Na ₂ HPO ₄ × 12H ₂ O	2,0 g
Fleischextrakt	6,0 g
Aqua dest. Ad	1000,0 ml
pH = 7,2 ± 0,2	

TMSP-Agar

Standard-Agar	40,0 g
Trimethoprimlactat Salz	13,1 mg
Sulfamethoxazol	20,0 mg
Polymyxin B	30 000 Einheiten
Schafblut	50,0 ml
Aqua dest. Ad	1000,0 ml
pH 7,3 ± 0,2	

Die Zusätze werden als Sterilfiltrate präpariert und nach Abkühlung des autoklavierten Agarmediums auf 50 °C zugesetzt. Trimethoprim kann als 100-fache Stammlösung in Wasser angesetzt und bei -20 °C in Aliquots gelagert werden.

Eine 100-fache Lösung von Sulfamethoxazol kann durch Zusatz von 600 µl 10 % NaOH zu 100 ml Wasser und Erhitzung der Lösung auf 80 °C hergestellt werden.

Anreicherungsbouillon für *B. anthracis*/*B. cereus* (Rassbach und Reissbrodt, 2002)

Basis	
Nutrient Broth (Difco, BD)	für 1 l
Tryptone (Difco, BD)	5,0 g
NaCl	5,0 g
K ₂ HPO ₄	4,0 g
Sterilisation 15 min 121 °C	
pH 7,3 ± 0,1	
Supplemente (als sterile Lösungen zugeben)	
D-Glucose	2,0 g
Trimethoprim	0,0032 g
Sulfamethoxazol	0,016 g
Polymyxin B	0,020 g
Cycloheximid	0,200 g

Halbfestes Nährmedium zur Beweglichkeitsprüfung

Tetrazoliumsalze sind farblos, werden aber bei Bakteriumwachstum in die Zellen aufgenommen und zu einem roten Farbstoff (Formazan) reduziert. Die Beweglichkeit kann damit durch „Ausschwärmen“ der Bakterien auf dem Nährmedium sichtbar gemacht werden.

NB I- Bouillon	für 1 L
Standard-Agar	2,5 g
lösen, autoklavieren (15 min bei 121 °C)	
2,3,5,-Triphenyltetrazolium chlorid (steril zusetzen)	0,05 g
Aqua dest. ad	1000,0 ml

2. Kapseldarstellung

2.1 Kapselfärbung mit AzurB (Owen *et al.*, 2013)

Herstellung der Färbelösung: 0,003 g Azur B (Fa. Sigma) in 3 ml 95%igem Ethanol oder Methanol lösen
 Färbelösung ist sofort einsetzbar
 Haltbarkeit bei Raumtemperatur (dunkel) mind. 12 Monate

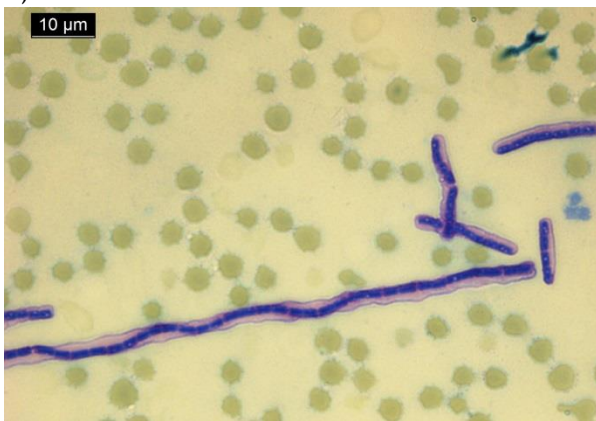
Für einen Direktausstrich einen Tropfen Blut auf ein Ende des Objektträgers bringen und mit Hilfe eines angeschliffenen Deckglases einen sehr dünnen Ausstrich bzw. ein Abklatschpräparat von Gewebeproben anfertigen. Die Kapselbildung kann auch durch Kultivierung in defibriniertem Pferde-, Rinder- oder Schafblut angeregt werden.

Milzbrand

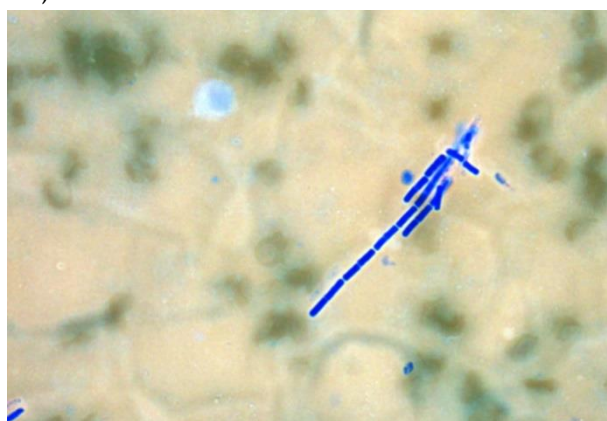
- Präparat lufttrocknen
- in absolutem Ethanol oder Methanol für 10 Minuten fixieren
- mit Azur B-Lösung 5 Minuten färben
- mit Leitungswasser abspülen, und trocknen lassen
- mikroskopische Beurteilung bei 1000-facher Vergrößerung

Ergebnis:

A)



B)



Kapselfärbung mit AzurB nach Kultivierung in defibriniertem Pferdeblut: *B. anthracis* (A, mit rosa angefärbter Kapsel) und *B. cereus* (B, ohne Kapsel).

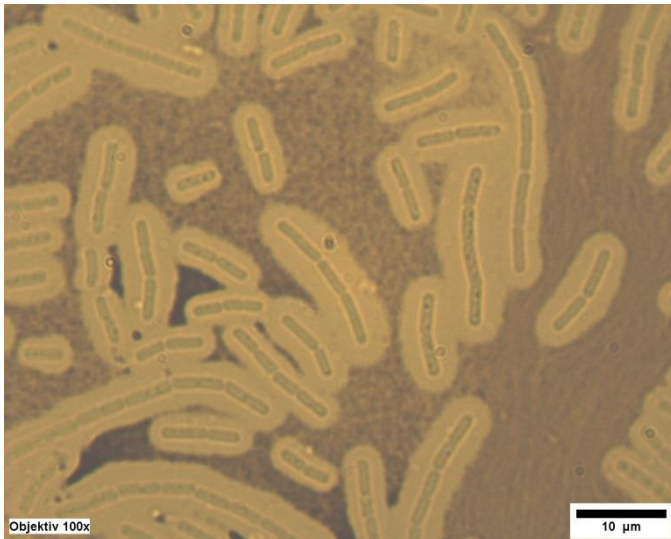
2.2 Kapseldarstellung durch Tusche (nur aus Kulturmateriale)

Der Kapselnachweis in Kulturen durch Tusche ist nur möglich, wenn diese auf bikarbonathaltigen Nährböden unter 5 bis 7%iger CO₂-Atmosphäre kultiviert wurden.

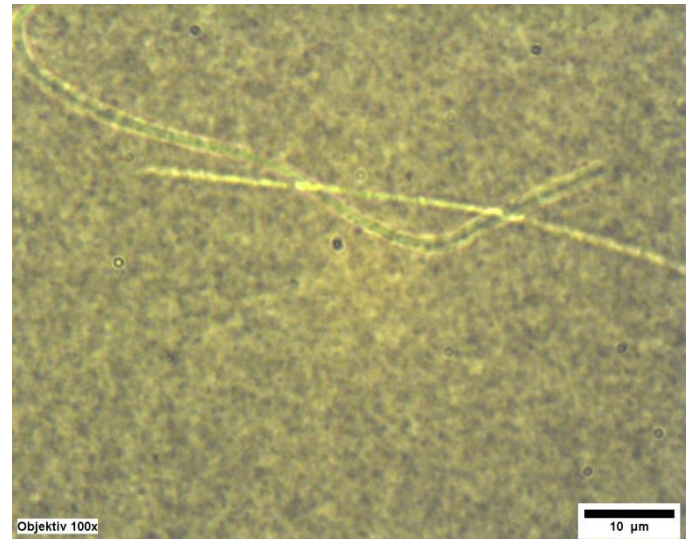
- eine Öse Bakterienmasse von einer bikarbonathaltigen Agarplatte in 1 ml 10%ige Formaldehydlösung resuspendieren, 1 h bei Raumtemperatur stehen lassen
- zentrifugieren 5 min, 13000 rpm
- Überstand verwerfen
- Sediment 1x mit aqua. dest. waschen und zentrifugieren, Überstand verwerfen
- ein Tropfen vom Sediment mit einem Tropfen Tusche in einem 1,5 ml-Tube mischen
- davon 1 Tropfen auf einen Objektträger übertragen und mit Deckglas abdecken
- Beurteilung bei 1000-facher Vergrößerung

Ergebnis:

A)



B)



Kapseldarstellung durch Tusche: *B. anthracis* (A, mit hell leuchtender Kapsel), *B. cereus* (B, ohne Kapsel)

3. Realtime-PCRs zum Nachweis von pathogenem *Bacillus anthracis*

3.1 TaqMan-Sonden PCR

Der Nachweis basiert auf der Amplifikation *B. anthracis*-spezifischer Sequenzabschnitte: dem Gen des protektiven Antigens auf Plasmid pXO1 sowie dem Gen des Kapselantigens auf Plasmid pXO2 (Ellerbroek, H. *et al.*, 2002).

Primer	Sonde	Sequenz (5'-3')
BAPA- S		CGGATCAAGTATATGGAATATAGCAA
BAPA- R		CCGGTTTAGTCGTTTCTAATGGAT
	BAPA-TM	5'-FAM-CTCGAACTGGAGTGAAGTGTTACCGCAAAT BHQ-1-3'
CAP-S		ACGTATGGTGTTC AAGATTCATG
CAP-R		ATTTTCGTCTCATTCTACCTCACC
	CAP-TM	5'-FAM-CCACGGAATTC AAAAATCTCAAATGGCAT-BHQ-1-3'

Milzbrand

Verdächtiges Koloniematerial (in 1 ml HPLC-Wasser resuspendieren, erhitzen bei 110 °C, 20 Minuten, filtrieren durch 0,2 µm Filter) kann direkt als PCR-Template eingesetzt werden. DNA-Isolierung (z. B. QIAamp DNA Mini Kit, QIAGEN, Invisorb Spin Tissue Mini Kit, InVitek;) entsprechend den Hinweisen der Hersteller.

PCR-Ansatz:

12,5 µl	Fertig-Reaktionmix (z. B. Taqman Universal Mastermix #4304437, 2x)
7 µl	HPLC-Wasser
1,5 µl	je Primer (10 µM)
0,5 µl	Sonde (10 µM)
2 µl	Template

PCR-Bedingungen (MX3000 Stratagene):

Dekontamination bei 50 °C, 2 min; initiale Denaturierung bei 95 °C, 10 min; 50 Zyklen Amplifikation: 95 °C, 25 sek; 60 °C, 1 min.

3.2 TaqMan-Sonden-Multiplex PCR

Der Nachweis basiert auf der parallelen Amplifikation spezifischer Sequenzabschnitte aus drei unterschiedlich kodierenden Regionen: auf Plasmid pXO1, auf Plasmid pXO2 sowie dem auf dem bakteriellen Chromosom.

Charakteristische Parameter der PCR (modifiziert nach Wielinga *et al.*, 2011)

Zielgen	pXO1 Marker (Ödemfaktorgen <i>cya</i>)	pXO2 Marker (<i>capB</i> -Gen)	Chromosomaler Marker (Prophage lambdaBa03 -PL3)
Primerpaar	cyapri_f/ cyapri_r	caBpri2_f/ caBpri2_r	PL3_f/ PL3_r
Sonde	Tqpro_cya HEX	Tqpro_caB CY5	Tqpro_PL3 FAM

Primer und Sonden:

Primer	Sonde	Sequenz (5'-3')
PL3_f		AAAGCTACAAACTCTGAAATTTGTAAATTG
PL3_r		CAACGATGATTGGAGATAGAGTATTCTTT
	Tqpro_PL3	FAM-AACAGTACGTTTCACTGGAGCAAAATCAABHQ1
cyapri_f		AGGTAGATTTATAGAAAAAACATTACGGG
cyapri_r		GCTGACGTAGGGATGGTATT
	Tqpro_cya	Hex-CCACTCAATATAAGCTTTATTACCAGGAGCBHQ1
caBpri2_f		AGCAAATGTTGGAGTGATTGTAAATG
caBpri2_r		AAAGTAATCCAAGTATTTCACTTTCAATAG
	Tqpro_caB	CY5-AGGTCCCATAACATCCATATGATCTTCTAABHQ2a

Der chromosomale Marker PL3 wird als besonders spezifisch für *B. anthracis* angesehen (Agren *et al.*, 2013).

PCR-Ansatz:

12,5 µl	Fertig-Reaktionmix (z.B. TaqMan Environmental Mastermix, 2x)
7 µl	HPLC-Wasser
1,5 µl	je Primer (10 µM)
0,5 µl	Sonde (10 µM)
2 µl	Template

PCR-Bedingungen (z.B. MX3000 Stratagene, CFX96 Biorad, Pikoreal):

Dekontamination bei 50 °C, 2 min; initiale Denaturierung bei 95 °C, 10 min; 50 Zyklen Amplifikation: 95 °C, 25 sek; 60 °C, 1 min.

3.3 FRET-Sonden

Der Nachweis basiert auf der parallelen Amplifikation spezifischer Sequenzabschnitte aus drei unterschiedlich kodierenden Regionen: dem Gen des protektiven Antigens (*pag*) auf Plasmid pXO1, dem Gen des Kapselantigens (*capC*) auf Plasmid pXO2 sowie spezifischer genomischer Sequenzen auf dem *sasp*-Gen (small acid soluble spore protein). Der Nachweis der genomischen Sequenzen auf dem *sasp*-Gen allein ist nicht spezifisch für *B. anthracis*.

Primer	Sonde	Sequenz (5'-3')
BAPA-S ³		CGGATCAAGTATATGGGAATATAGCAA
BAPA-R ³		CCGGTTTAGTCGTTTCTAATGGAT
	BAPA-FL ¹	TGCGGTAACACTTCACTCCAGTTCTGA
	BAPA-LC ¹	Red 640 CCTGTATCCACCCTCACTCTTCCATTTTC-P
CapS ³		ACGTATGGTGTTCAGATTCATG
Cap A ^{**2}		GATTGCAAATGTTGCACCACTTA
	CapC-FL ⁺¹	TATTGTTATCCTGTTATGCCATTTGAGATTTTT
	CapC-LC ¹	Red640 AATCCGTGGTATTGGAGTTATTGTTCC- P
ANT-F ⁺²		GCTAGTTATGGTACAGATTTGCGAC
ANT-Amt ¹		CCATAACTAGCATTTGTGCTTTGAAT
	ANT-FL ¹	CAAGCAAACGCACAATCAGAAGCTAAG
	ANT-LC ¹	Red640 GCGCAAGCTTCTGGTGCTAGC-P

¹Beyer *et al.*, 2003; ²Mauch, H. *et al.*, 2008; ³Ellerbroek, H. *et al.*, 2002

Milzbrand

PCR-Ansatz:

4 µl	Fertig-Reaktionmix (z. B. LighCycler: Lightcycler FastStart DNA Master Plus Hybprobe, Roche, 5x)
8,6 µl	HPLC-Wasser
1 µl	je Primer (10 µM)
1 µl	je Sonde (4 µM)
2 µl	Template

Literatur

- ABDEL-GLIL MY, CHIAVERINI A, GAROFOLO G, FASANELLA A, PARISI A, HARMSSEN D, JOLLEY KA, ELSCHNER MC, TOMASO H, LINDE J, GALANTE D. A Whole-Genome-Based Gene-by-Gene Typing System for Standardized High-Resolution Strain Typing of *Bacillus anthracis*. *J Clin Microbiol.* 2021 Jun 18;59(7):e0288920. doi: 10.1128/JCM.02889-20. Epub 2021 Jun 18. PMID: 33827898.
- ÅGREN J, RADITIJO A HAMIDJAJA, TRINE HANSEN, ROBIN RUULS, SIMON THIERRY, HÅKAN VIGRE, INGMAR JANSE, ANDERS SUNDSTRÖM, BO SEGERMAN, MIRIAM KOENE, CHARLOTTA LÖFSTRÖM, BART VAN ROTTERDAM, AND SYLVIANE DERZELLE: In silico and in vitro evaluation of PCR-based assays for the detection of *Bacillus anthracis* chromosomal signature sequences *Virulence* 4:8, 671-685; November 15, 2013
- BEYER, W., BARTLING, C., NEUBAUER, H., Zum Stand der Nachweisverfahren für *Bacillus anthracis* in klinischen und Umweltproben. *Tierärztliche Umschau* 58, 653-662 (2003)
- BROWN, E. R. and Cherry, W. B. (1955): Specific identification of *Bacillus anthracis* by means of a variant bacteriophage. *J. infect. Dis.* 96, 34-39.
- BRUCE SA, SCHIRALDI NJ, KAMATH PL, EASTERDAY WR, TURNER WC. 2020 A classification framework for *Bacillus anthracis* defined by global genomic structure. *Evolutionary applications* 13(5): 935-944.
- DEDIÉ, K., BOCKEMÜHL, J., KÜHN, H., VOLKMER, K.-J. und WEINKE, TH. (1993): Epidemiologie, Pathologie, Klinik, Diagnostik und Bekämpfung. In: Bakterielle Zoonosen bei Mensch und Tier, Kapitel 12 Milzbrand. Ferdinand Enke Verlag Stuttgart, S. 181-197.
- ELLERBROEK, H., NATTERMANN, H., ÖZEL, M., BEUTIN, L., APPEL, B., PAULI, G. Rapid and sensitive identification of pathogenic and apathogenic *Bacillus anthracis* by realtime PCR. *FEMS Microbiol.Lett.*, 2002; 214(1): 51-9.
- GIRAULT G, THIERRY S, CHERCHAME E, DERZELLE S. 2014. Application of High-Throughput Sequencing: Discovery of Informative SNPs to Subtype *Bacillus anthracis*. *Advances in Bioscience and Biotechnology* 05:9.
- HALLMANN, L. (1961): Ausgewählte Untersuchungsmethoden für das bakteriologische und serologische Laboratorium. In: Bakteriologie und Serologie. Georg Thieme Verlag Stuttgart, 3. Aufl.
- MARSTON CK, ALLEN CA, BEAUDRY J, PRICE EP, WOLKEN SR, PEARSON T, KEIM P, HOFFMASTER AR. 2011. Molecular Epidemiology of Anthrax Cases Associated with Recreational Use of Animal Hides and Yarn in the United States. *PLoS One* 6:e28274.
- MAUCH, H. PODBIELSKI, A, HERRMANN, A. KIEHL, E. MIQ 26 Teil I, 2008- Mikrobiologische-infektiologische Qualitätsstandards. ELSEVIER Urban & Fischer, München, Jena
- RONDINONE V, SERRECCHIA L, PARISI A, FASANELLA A, MANZULLI V, CIPOLLETTA D, GALANTE D. 2020. Genetic characterization of *Bacillus anthracis* strains circulating in Italy from 1972 to 2018. *PLoS One* 15:e0227875.
- REISSBRODT, R, A. RASSBACH, B.BURGHARDT,I. RIENÄCKER, H. MIETKE, J. SCHLEIF, H. TSCHÄPE, M. LYTE, AND P.H.WILLIAMS (2004): Assessment of a New Selective Chromogenic *Bacillus cereus* Group

Milzbrand

Plating medium and Use of Enterobacterial Autoinducer of Growth for Cultural Identification of Bacillus Species. *Journal of Clinical Microbiology*, 3795- 3798

- QI, Y., G. PATRA, X. LIANG, L.E. WILLIAMS, S. ROSE, R.J. REDKAR AND V.G. DE VECCHIO (2001) Utilization of the rpoB Gene as a specific chromosomal marker for real-time PCR detection of Bacillus anthracis. *Appl. Env. Microbiol.* 67, 3720-3727.
- OIE: Chapter 3.1.1. Anthrax. In: *Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines*. Office International des Epizooties, World organisation for animal health.
- OWEN, M.P., SCHAUWERS, W., HUGH-JONES, M.E., KIERNAN, J.A., TURNBULL, P.C.B, BEYER, W. A simple, reliable M'Fadyean stain for visualizing the Bacillus anthracis capsule simple, reliable M'Fadyean stain for visualizing the Bacillus anthracis capsule. *Journal of Microbiological Methods* 92 (2013) 264-269.
- PETER R. WIELINGA, RADITIJO A. HAMIDJAJA, JOAKIM ÅGREN, RICKARD KNUTSSON, BO SEGERMAN, MARTINA FRICKER, MONIKA EHLING-SCHULZ, ASTRID DE GROOT, JANE BURTON, TIM BROOKS, INGMAR JANSE, BART VAN ROTTERDAM; A multiplex real-time PCR for identifying and differentiating B. anthracis virulent types *International Journal of Food Microbiology* 145 (2011) S137-S144.
- VAN ERT MN, EASTERDAY WR, HUYNH LY, OKINAKA RT, HUGH-JONES ME, RAVEL J, ZANECKI SR, PEARSON T, SIMONSON TS, U'REN JM, KACHUR SM, LEADEM-DOUGHERTY RR, RHOTON SD, ZINSER G, FARLOW J, COKER PR, SMITH KL, WANG B, KENEFIC LJ, FRASER-LIGGETT CM, WAGNER DM, KEIM P. 2007. Global genetic population structure of Bacillus anthracis. *PLoS One* 2:e461.
- WHO 2008: *Anthrax in Humans and Animals*, 4th edition., ISBN 978-92-4-154753-6

Milzbrand

Tabelle 1: Einige Differenzierungsmerkmale zwischen *B. anthracis* und anderen *Bacillus* spp. (nach Dedie *et al.*, 1993, mod.)

	spezifische Tests				weniger spezifische Tests		
	Beweglichkeit	Hämolyse	Phagenlysis	Mäusepathogenität	Kolonieform	Wachstum in Bouillon	Penicillinempfindlichkeit
<i>B. anthracis</i>	-	keine Hämolyse (selten späte Vergrünung)	+	+ (bekapselte Stämme)	Matt glänzend oder trocken, flach, nicht pigmentiert	klar mit feinflockigem Bodensatz	+ (70 %)
<i>B. cereus</i>	+ (90 %*)	meist starke b-Hämolyse	-	± (25 bis 80 %*)	flach, rauh, rhizoid	trüb mit Sediment	-
<i>B. mycoides</i>	- (meist)	± (positiv: Pferdeblut; variabel: Schafblut)	-	- (10 %*)	Oberfläche stumpf	klar, anfangs mit Häutchen, das absinkt	-
<i>B. megaterium</i>	± (meist schwach beweglich)	b-Hämolyse	-	-	rund, glattrandig	trüb	+

* Zahl in Klammern: Prozentsatz der Stämme mit positiven Reaktionen

Tabelle 2: Wachstum und Koloniemorphologie von *Bacillus spp.* auf verschiedenen Nährmedien (37 °C, 20 - 24 h)

Nährmedien	TMSP-Agar		Blutagar		B. cereus-Supplement-Agar
	Wachstum	Hämolyse	Wachstum	Hämolyse	
<i>B. anthracis</i>	groß, weiß	∅	weiß	∅	groß, weiß
<i>B. cereus</i> -Wildstämme	groß, cremef.	+ (meist)	weiß	+	groß, meist türkis*, **
<i>B. thuringiensis</i>	weiß	+	weiß	+	helltürkises Zentrum weißer Rand **
<i>B. subtilis</i>	kein	-	weiß	+	k.W.
<i>B. mycoides</i>	grauweiß, fädig	+	weiß	+	k. W.
<i>B. lichenformis</i>	kein	-	hell	∅	kleine helltürkise Kol.
<i>B. megaterium</i>	kein	-	weiß	∅	Gehemmt, klein weiß bis cremefarben

*teilweise türkiser Hof um Kolonien ** ausnahmsweise weiß wachsende Kolonien möglich

Falldefinition - Milzbrand; *Bacillus anthracis*

Klinisches Bild

Milzbrand ist eine weltweit verbreitete Zoonose. Der Name Milzbrand bezieht sich auf die meist dunkel gefärbte und wie verbrannt aussehende Milz erkrankter Tiere. Am lebenden Tier ist Milzbrand selten mit Sicherheit festzustellen. Der Krankheitsverlauf kann perakut, akut oder chronisch sein. Aus den Körperöffnungen (Anus, Vulva, Mund, Nase) tritt dunkles, schlecht gerinnendes Blut, wobei auch Schling- und Atembeschwerden, Atemnot wegen Schwellung im Kehlgangsbereich (Milzbrandbräune) beobachtet werden können. Beim Menschen kommt Milzbrand vorwiegend als lokale Hauterkrankung (Hautmilzbrand) oder als systemische Erkrankung der Atmungs- (Lungenmilzbrand) und der Verdauungsorgane (Darmmilzbrand) vor.

Inkubationszeit: ca. ein bis sieben Tage

Labordiagnostischer Nachweis

Erregernachweis:

- Bakteriologische und molekularbiologische Untersuchungen

Zusatzinformation

B. anthracis ist in der Lage, extrem widerstandsfähige Sporen zu bilden, welche unter natürlichen Bedingungen über Jahrzehnte lebensfähig und infektiös sind.

Gezielte Tätigkeiten mit dem Erreger müssen in Laboratorien der Sicherheitsstufe 3 erfolgen.

Differenzialdiagnose

Vergiftungen, Pasteurellose, Rauschbrand, Pararauschbrand

Epidemiologischer Zusammenhang

Haus- und Wildwiederkäuer sind hochempfindlich für Milzbrand. Schweine, Fleischfresser und auch Menschen (eher mäßig) und Vögel (Ausnahme Strauß) gelten als fast resistent.

Die Infektion erfolgt beim Tier vorwiegend über mit Milzbrandsporen kontaminiertes Futter.

Der Mensch infiziert sich vorwiegend durch direkten Kontakt mit infizierten Tieren bzw. tierischen Produkten.

In Gebieten, in denen Milzbrandfälle beobachtet wurden, sollte bei jedem akuten Todesfall Milzbrand differenzialdiagnostisch berücksichtigt werden.

Milzbrand

Voraussetzung für den Verdacht

Vorliegen verdächtiger klinischer Symptome oder pathologisch-anatomischer Veränderungen

Durch TSN zu übermittelnder Fall

Voraussetzungen für die Feststellung eines Falles:

- Erregernachweis durch Erregerisolierung und -identifizierung

Rechtsgrundlagen

- Verordnung (EU) 2016/429 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 9. März 2016 zu Tierseuchen und zur Änderung und Aufhebung einiger Rechtsakte im Bereich der Tiergesundheit („Tiergesundheitsrecht“)
- VO (EU) 2016/429 Tiergesundheitsrecht, Anhang II „Liste der Seuchen“ (geändert durch VO (EU) 2018/1629): Milzbrand
- ~~Tiergesundheitsgesetz in der jeweils geltenden Fassung~~
 - Verordnung über anzeigepflichtige Tierseuchen in der jeweils geltenden Fassung
 - Verordnung zum Schutz gegen den Milzbrand und den Rauschbrand vom 23. Mai 1991 (BGBl. I S. 1172) in der jeweils geltenden Fassung.
- ~~Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines der OIE~~

Friedrich-Loeffler-Institut, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit
Südufer 10, D-17493 Greifswald - Insel Riems, www.fli.de