

# Nationale Referenzzentrale für Diphtherie - Labor

## Jahresbericht 2015

Österreichische Agentur für  
Gesundheit und Ernährungssicherheit (AGES)

Ansprechperson:  
Dr. Steliana Huhulescu

Institut für medizinische Mikrobiologie  
und Hygiene Wien  
Währingerstr. 25a  
A-1094 Wien  
Tel. 050 555 37111  
E-Mail: [humanmed.wien@ages.at](mailto:humanmed.wien@ages.at)

### Zusammenfassung

Im Jahr 2015 wurden an der Nationalen Referenzzentrale für Diphtherie - Labor dreizehn humane Proben untersucht. In sieben Proben (stammend von fünf Patienten) konnte *Corynebacterium diphtheriae* und in einer Probe *Corynebacterium ulcerans* nachgewiesen werden. Es wurden keine toxigenen Korynebakterien nachgewiesen.

### Summary

In 2015, thirteen human samples were tested at the National Reference Centre for Diphtheria – Laboratory. Seven samples (originating from five patients) were positive for *Corynebacterium diphtheriae* and one sample was positive for *Corynebacterium ulcerans*. Toxigenic corynebacteria were not detected.

## Einleitung

Korynebakterien sind grampositive, fakultativ anaerobe, nicht sporenbildende Stäbchenbakterien. Die meisten Vertreter dieser Gruppe sind opportunistische Keime (d.h. nur unter speziellen Bedingungen „krankmachend“). Die größte klinische Bedeutung haben toxinbildende Stämme von *Corynebacterium (C.) diphtheriae*, die klassische Erreger der Diphtherie. Auch toxigene Stämme von *Corynebacterium ulcerans* (die manchmal den Nasen-/Rachenraum von Mensch und Tier besiedeln) oder von *Corynebacterium pseudotuberculosis* können Diphtherie verursachen. Der Mensch ist das einzige Reservoir von *Corynebacterium diphtheriae*. Die Übertragung erfolgt hauptsächlich aerogen in Form von Tröpfchen, oder durch direkten Kontakt mit respiratorischen Sekreten oder Wundexudaten. Auch Erbrochenes oder kontaminierte Lebensmittel (z.B. Milch) und Gegenstände haben in der Vergangenheit eine Rolle bei der Übertragung gespielt. Die klassische Diphtherie ist eine schwere Infektionskrankheit, die ohne adäquate Therapie letal enden kann. In den entwickelten Ländern ist die Inzidenz der Erkrankung sehr niedrig. Die Diphtherie ist aber in vielen Regionen der Welt, wie etwa Fernost und Naher Osten, Südamerika und Afrika, endemisch. Die diagnostische Methode der Wahl ist die Anzucht des Erregers aus klinischem Untersuchungsmaterial: Abstriche von entzündeten Stellen (Nase, Rachen, Gaumenmandeln, Wunden) oder abgetragenes Membranmaterial. Darüber hinaus können je nach klinischem Verdacht auch andere Materialien (z.B. Blut) nach Absprache mit dem Labor eingesandt werden. Nach Anzucht von Korynebakterien ist der Nachweis von Toxinproduktion für die Diagnosesicherung erforderlich. Die Therapie soll so früh wie möglich (bereits bei vorläufiger klinischer Diagnose) eingeleitet werden und erfolgt simultan mit Antibiotika und – sofern verfügbar – mit Diphtherieantitoxin (Diphtherieserum). Die Prävention beginnt im Kindesalter und besteht in einer aktiven Immunisierung mit einem Toxoid-Impfstoff, einem inaktivierten Diphtherietoxin. Die Immunisierung sollte alle zehn Jahre aufgefrischt werden (in Kombination mit Tetanus). Im Jahr 2014 waren in Österreich erstmals nach 20 diphtheriefreien Jahren zwei Fälle von Wunddiphtherie registriert worden. [1,2,3,4,5], sowie ein Fall einer invasiven Infektion mit einem non-toxinogenen Stamm von *Corynebacterium diphtheriae* [6].

## Resultate

Im Jahr 2015 wurden insgesamt 13 humane Proben zur Überprüfung eines Diphtherieverdachts an die Nationale Referenzzentrale für Diphtherie - Labor übermittelt (Tabelle 1). Es handelte sich um Isolate aus einem Rachenabstrich und aus fünf Wundabstrichen sowie um Abstriche von Nasen (n=1), Wunden (n=2) und Rachen (n=3). Zu Patient A wurden zwei Abstriche und zu Patient B drei Proben (2 Abstriche und 1 Isolat) eingesandt. Für einen Patienten wurde die Entnahmestelle nicht mitgeteilt. Die dreizehn Einsendungen verteilten sich auf sieben Monate (Auswertung nach Eingangsdatum der Isolate in der nationalen Referenzzentrale für Diphtherie-Labor). Die meisten Einsendungen stammen aus Wien (n=7), gefolgt von Tirol (n=2), Vorarlberg (N=2), Steiermark (n=1) und Niederösterreich (n=1). Epidemiologisch relevante Daten sind in der Tabelle 1 zusammengestellt.

Vier Stämme konnten als *Corynebacterium diphtheriae* ssp. *mitis/belfanti*, drei Stämme als *Corynebacterium diphtheriae* ssp. *gravis*, und ein Stamm als *Corynebacterium ulcerans* identifiziert werden. In einem Fall wurde ein *Corynebacterium pseudodiphthericum* nachgewiesen. In zwei Rachenabstrichen stammend von Patienten mit Diphtherie-Verdacht, konnten keine pathogenen Korynebakterien isoliert werden. Bei einem weiteren Patienten mit Kontakt (im Dezember 2014) zu einem Fall von kutaner Diphtherie, verursacht von toxigenem *Corynebacterium diphtheriae* ssp. *mitis*, konnten im Nasen-bzw. Rachenabstrich keine toxigenen Korynebakterien nachgewiesen werden. Keiner der nachgewiesenen Korynebakterium-Stämme war toxinbildend.

Alle acht Isolate wurden in vitro mittels Blättchendiffusionstest auf Empfindlichkeit gegenüber sechs Antibiotika getestet: Penicillin G, Clindamycin, Rifampicin, Vancomycin, Ciprofloxacin und Linezolid. In Ermangelung von spezies-spezifischen Breakpoints des European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) für *Corynebacterium diphtheriae* wurden die EUCAST-Breakpoints für *Corynebacterium* sp. für die Interpretation der in vitro-Empfindlichkeit herangezogen. Alle Isolate waren empfindlich gegenüber Rifampicin, Vancomycin, Ciprofloxacin und Linezolid. Alle acht Isolate waren in vitro resistent gegenüber Penicillin G, ein Isolat war resistent gegenüber Clindamycin. Die Ergebnisse der in vitro Empfindlichkeitstestung sind in Abbildung 1 dargestellt.

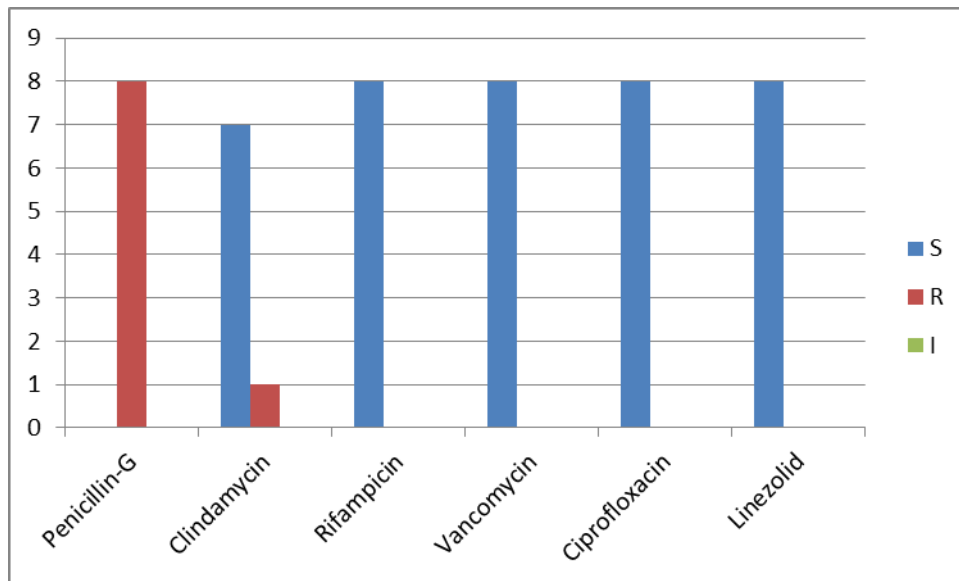
**Tab. 1:** Einsendungen von humanen Proben an die Nationale Referenzzentrale für Diphtherie – Labor, Österreich 2015

#	Ein-gangs-datum	Patient (Alter)	Geschlecht	Einsender	Probenart	Symptome/ Erkrankung	Kultur-Ergebnis	PCR-Toxinnachweis (Subunits A und B)
1 <sup>A</sup>	15.01.15	68	m	BH Kufstein (AGES IMED Wien)	Nasenabstrich	keine (UU zu einem Diphtherie-Fall)	negativ	---
2 <sup>A</sup>	15.01.15	68	m	BH Kufstein (AGES IMED Wien)	Rachenabstrich	keine (UU zu einem Diphtherie-Fall)	negativ	---
3	06.03.15	??	?	AKH Wien (Klinische Abteilung für klinische Mikrobiologie)	Isolat aus Rachenabstrich	Kolonisation bei positivem Wunde-Befund	<i>C. diphtheriae</i> ssp. <i>gravis</i>	A: negativ B: negativ
4	18.03.15	63	m	Univ. Klinikum Krems (Pathologisches Institut)	Isolat aus Hautwunde	Ulcus cruris	<i>C. ulcerans</i>	A: negativ B: negativ
5	15.04.15	2 Mo	m	Institut für Gerichtsmedizin Graz (Inst. für Hygiene, Mikrobiologie und Umweltmedizin)	Isolat ?	SIDS (Sudden Infant Death Syndrome)	<i>C. pseudo diphthericum</i>	A: negativ B: negativ
6 <sup>B</sup>	23.04.15	39	w	Krankenhaus Hietzing Wien (Pathologie und klinische Bakteriologie)	Wundabstrich	Ulcus-li. Unterschenkel	<i>C. diphtheriae</i> ssp. <i>mitis/belfanti</i>	A: negativ B: negativ
7 <sup>B</sup>	23.04.15	39	w	Krankenhaus Hietzing Wien (Pathologie und klinische Bakteriologie)	Wundabstrich	Ulcus-re. Unterschenkel	<i>C. diphtheriae</i> ssp. <i>mitis/belfanti</i>	A: negativ B: negativ
8 <sup>B</sup>	30.04.15	39	w	SMZ Süd Kaiser Franz Josef Spital (Pathologisch bakteriologisches Institut)	Isolat aus Hautwunde	Ulcus-li. Unterschenkel	<i>C. diphtheriae</i> ssp. <i>mitis/belfanti</i>	A: negativ B: negativ
9	21.05.15	43	m	Niedergelassener Arzt-(Lab. Dr. Mustafa/Richter)	Isolat aus Wunde	Ulzera-li. Unterschenkel	<i>C. diphtheriae</i> ssp. <i>gravis</i>	A: negativ B: negativ
10	25.06.15	54	m	Landeskrankenhaus Feldkirch (Institut für Pathologie)	Isolat aus Wunde	Infizierte Wunde re. Ferse	<i>C. diphtheriae</i> ssp. <i>mitis/belfanti</i>	A: negativ B: negativ
11	29.06.15	69	w	Wilhelminenspital Wien (AGES IMED Wien)	Rachenabstrich	V. a. Diphtherie	negativ	---
12	31.07.15	55	w	Landeskrankenhaus Feldkirch (AGES IMED Wien)	Rachenabstrich	Fieberhafte Angina, V. a. Diphtherie nach Ägyptenreise	negativ	---
13	11.09.15	15	m	SMZ-Ost Donauespital (pathologisch-bakteriologisches Institut)	Isolat aus Wunde	Wunde Ellbogen	<i>C. diphtheriae</i> ssp. <i>gravis</i>	A: negativ B: negativ

Abk.: C.: Corynebacterium; A: Diphtherietoxin Subunit A; B: Diphtherietoxin Subunit B; ssp.: Subspecies

<sup>A</sup>: Teilproben von Patient A; <sup>B</sup>: Teilproben von Patient B

**Abb. 1:** Ergebnisse der in vitro Empfindlichkeitstestung von acht *Corynebacterium* sp.-Isolaten des Jahres 2015  
 Interpretation nach EUCAST-Empfehlungen für *Corynebacterium* sp.  
 (R: resistent; I: intermediär; S: empfindlich).



## Diskussion

In mikrobiologischen Laboratorien in Europa werden Rachen-/Nasenabstriche im Regelfall nicht mehr mittels Selektiv- oder Indikatoragar-Platten (z. B. Hoyle's Agar) auf potentiell toxinogene Korynebakterien untersucht. Lediglich auf spezielle Anforderung hin wird gezielt nach toxinbildendem *Corynebacterium diphtheriae* gesucht. Das *European Laboratory Network for Diphtheria* (EUDIPLab-Net) organisiert alle eineinhalb Jahre Kontrollversuche, an denen sich viele nationale Referenzlaboratorien beteiligen. Die österreichische Referenzzentrale für Diphtherie - Labor hat erfolgreich an allen bisherigen externen Qualitätssicherungstests teilgenommen.

Das *European Diphtheria Surveillance Network* (ESDN) organisiert im Auftrag des ECDC ein jährliches Treffen von europäischen und nicht-europäischen Vertretern der nationalen Referenzzentren sowie von Vertretern des öffentlichen Gesundheitsdienstes. Auf diese Weise wird dem Umstand begegnet, dass europäische Referenzlabore sporadisch über Einzelfälle von Diphtherieerkrankungen durch toxinogene Stämme von *Corynebacterium diphtheriae* oder *Corynebacterium ulcerans* berichten, andererseits aber aufgrund der Seltenheit von Fällen die

praktische Erfahrung der Sanitätsbehörden im Risikomanagement auf nationaler Ebene sehr begrenzt ist.

Eine retrospektive Analyse der zwischen 2000-2009 im europäischen Raum gemeldeten Daten ergab eine kontinuierliche Abnahme der Inzidenz der Erkrankungsfälle durch toxigenes *Corynebacterium diphtheriae*, während toxinbildende Stämme von *Corynebacterium ulcerans* zunehmend als Erreger identifiziert werden [7].

Während die klassische Diphtherie, verursacht durch toxigene Stämme von *C. diphtheriae* var. *gravis*, *intermedius*, *mitis* oder *belfanti*, ausschließlich von Mensch zu Mensch übertragen wird, ist bei *C. ulcerans* auch ein tierisches Reservoir beschrieben. Im Jahr 2011 ist das erste Mal eine molekularbiologische Bestätigung der Übertragung von toxigenem *C. ulcerans* vom Haustier auf den Menschen gelungen [8]. Die Mehrzahl (75%) der im Erwachsenenalter auftretenden Diphtherie-ähnlichen Infektionen mit *C. ulcerans* treten bei Personen mit einem kompletten oder inkompletten Diphtherie-Impfzyklus auf [9]. In Österreich war letztmalig im Jahr 2013 aus dem Wundabstrich einer 84-jährigen Patientin ein toxinbildendes *C. ulcerans* angezüchtet worden.

Für Österreich konnte in den letzten drei Jahren gegenüber den vier Jahren davor eine Zunahme der an die Nationale Referenzzentrale für Diphtherie - Labor eingesandten Proben festgestellt werden [1-4, 10].

Nicht-toxigene Stämme von *Corynebacterium diphtheriae* werden seit den späten 1990-er Jahren in mehreren Ländern der Welt zunehmend als Ursache für schwere invasive Erkrankungen, wie Endokarditis, Fremdkörperinfektion, Gelenkinfektion und Bakteriämie, beschrieben [6, 11]. Alkoholismus, Obdachlosigkeit, intravenöser Drogenkonsum oder Zahnkaries gelten als Risikofaktoren. Im Jahr 2014 wurden in Österreich erstmals nach über 20 diphtheriefreien Jahren zwei Fälle von importierter Wunddiphtherie diagnostiziert. Beide Infektionen stammten aus Afrika und wurden durch *Corynebacterium diphtheriae* ssp. *mitis* verursacht. Zudem wurde ein Fall einer invasiven Infektion mit einem non-toxinogenen Stamm von *Corynebacterium diphtheriae* registriert [6].

Im März 2015 wurden vom WHO Reference Centre for Diphtheria and Streptococcal Infections at Public Health England (PHE), London, Colindale neue Richtlinien

veröffentlicht [12]. Darin sind vom deutschen Konsiliarlabor evaluierte Nachweismethoden zum Toxinnachweis mittels real-time PCR angeführt [13] sowie Methoden zur Speziesdifferenzierung mittels Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) Massenspektrometrie [14]. Der Erregernachweis mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie wurde an der Nationalen Referenzzentrale für Diphtherie - Labor in Wien bereits im Jahr 2011 implementiert. Auch die Bestätigung aller humanen *Corynebacterium diphtheriae*-Isolate der Jahre 2012-2014 als nicht-toxinogen erfolgte an der Referenzzentrale bereits mittels PCR. Unsere positiven Toxin-PCR-Tests wurden vom WHO Reference Centre for Diphtheria and Streptococcal Infections, PHE Colindale mittels Elek-Ouchterlony-Immundiffusionstest bestätigt. Die zeitgleich durchgeführte Abschaffung des diagnostischen Tierversuches an der Nationalen Referenzzentrale für Diphtherie - Labor steht auch im Einklang mit der Verordnung des Bundesministers für Wissenschaft und Forschung zur Durchführung des Tierversuchsgesetzes 2012 (Tierversuchs-Verordnung 2012 – TVV 2012).

Der Nachweis von toxinbildendem *C. diphtheriae* stellt in Österreich unverändert ein sehr seltenes Ereignis dar. In Österreich war Diphtherieantitoxin (Diphtherieserum) von 2011 bis 2015 nicht zu beziehen. Seit Herbst 2015 ist **die 4. Med. Abteilung mit Infektionen und Tropenmedizin** (Abteilung Hr. Primarius Doz. Dr. Wenisch) des SMZ-Süd, Kundratstrasse 3, A-1100 Wien (Tel: 01601912401) die Auskunftsstelle bezüglich Behandlung von Diphtheriefällen in Österreich.

### **Danksagung**

Wir bedanken uns bei folgenden Einsenderinnen und Einsendern: Pathologisch-bakteriologisches Institut Sozialmedizinisches Zentrum Ost Wien; Pathologie und klinische Bakteriologie KH Hietzing Wien; BH Kufstein; Institut für Hygiene, Mikrobiologie und Umweltmedizin Graz; Institut für Pathologie Landeskrankenhaus Feldkirch; Pathologisch-bakteriologisches Institut Wilhelminenspital Wien; Klinische Abteilung für klinische Mikrobiologie AKH Wien; Labor Dr. Mustafa/Richter Salzburg; Pathologisches Institut Univ. Klinikum Krems; Pathologisches Institut SMZ Süd Wien.

## Referenzen

1. Huhulescu S. (2012) Diphtherie – Jahresbericht 2011 der Nationalen Referenzzentrale-Labor für das Jahr 2011 Mitteilungen für das österreichische Gesundheitswesen, Public Health Newsletter des BMG [http://www.bmg.gv.at/cms/home/attachments/3/1/3/CH1338/CMS1355497459929/jb\\_diphtherie\\_2011\\_v5.pdf](http://www.bmg.gv.at/cms/home/attachments/3/1/3/CH1338/CMS1355497459929/jb_diphtherie_2011_v5.pdf)
2. Huhulescu S. (2013) Diphtherie – Jahresbericht 2012 der Nationalen Referenzzentrale-Labor für das Jahr 2011 Mitteilungen für das österreichische Gesundheitswesen, Public Health Newsletter des BMG [http://www.bmg.gv.at/cms/site2/attachments/4/0/4/CH1400/CMS1363096481972/jb\\_diphtherie\\_2012\\_v\\_do\\_7\\_3\\_13\\_-\\_form\\_el\\_belazi\\_11032013.pdf](http://www.bmg.gv.at/cms/site2/attachments/4/0/4/CH1400/CMS1363096481972/jb_diphtherie_2012_v_do_7_3_13_-_form_el_belazi_11032013.pdf)
3. Huhulescu S. (2014) Diphtherie – Jahresbericht 2013 der Nationalen Referenzzentrale-Labor für das Jahr 2011 Mitteilungen für das österreichische Gesundheitswesen, Public Health Newsletter des BMG [http://www.ages.at/fileadmin/AGES2015/Themen/Krankheitserreger\\_Dateien/Diphtherie/Diphtherie-Labor\\_Jahresbericht\\_2013.pdf](http://www.ages.at/fileadmin/AGES2015/Themen/Krankheitserreger_Dateien/Diphtherie/Diphtherie-Labor_Jahresbericht_2013.pdf)
4. Huhulescu S. (2015) Diphtherie – Jahresbericht 2014 der Nationalen Referenzzentrale-Labor für das Jahr 2011 Mitteilungen für das österreichische Gesundheitswesen, Public Health Newsletter des BMG [http://www.bmg.gv.at/cms/home/attachments/6/7/7/CH1470/CMS1426080556625/jb\\_diphtherie\\_2014\\_-\\_format\\_elbel\\_10032015.pdf](http://www.bmg.gv.at/cms/home/attachments/6/7/7/CH1470/CMS1426080556625/jb_diphtherie_2014_-_format_elbel_10032015.pdf)
5. Huhulescu S, Hirk S, Zeinzinger V, Hasenberger P, Skvara H, Mullegger R, Allerberger F, Indra A. Letter to the Editor: Cutaneous diphtheria in a migrant from an endemic country in east Africa, Austria May 2014 Euro Surveill. 2014 Jul 3;19(26). pii: 20845.
6. Lenger AU, Szell M, Asboth F, Parth E, Janata O. Case Report and Review of the Literature: Invasive Infection caused by non toxigenic *Corynebacterium diphtheriae* ssp. *gravis* – Spondylodiscitis. Poster, 8. Österreichischer Infektionskongress 2-5 April 2014 Brandlhof/Saalfelden.
7. Wagner KS, White JM, Lucenko I, Mercer D, Crowcroft NS, Neal S, *et al.* Diphtheria in the postepidemic period, Europe, 2000–2009. Emerg Infect Dis [serial on the Internet]. 2012 Feb [date cited: 11. Jan. 2014]. <http://dx.doi.org/10.3201/eid1802.110987>
8. Epidemiologisches Bulletin 27/2011. Diphtherie : Erkrankung durch toxische Corynebacterium ulcerans nach Katzenkontakt – Fallbericht Epidemiologisches Bulletin 27/2011 <http://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Archiv/2011/27/Tabelle.html>
9. Dias AA, Santos LS, Sabbadini PS *et al.*: Corynebacterium ulcerans diphtheria: an emerging zoonosis in Brazil and worldwide. Rev Saude Publica. 2011 Dec;45(6):1176-91.
10. Huhulescu S. (2014) Diphtherie – Jahresbericht 2013 der Nationalen Referenzzentrale-Labor für das Jahr 2013 [http://www.bmg.gv.at/cms/home/attachments/9/5/5/CH1435/CMS1394195658140/1\\_jb\\_diphtherie\\_2013\\_3.pdf](http://www.bmg.gv.at/cms/home/attachments/9/5/5/CH1435/CMS1394195658140/1_jb_diphtherie_2013_3.pdf)
11. Zakikhany K, Neal S, Efstratiou A. Emergence and molecular characterisation of non-toxicogenic toxin gene-bearing Corynebacterium diphtheriae biovar mitis in the United Kingdom, 2003–2012. Euro



Surveill. 2014;19(22):pii=20819. Available online:

<http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=20819>

12. Public Health England (PHE). Diphtheria Guidelines Working Group. Public health control and management of diphtheria (in England and Wales). March 2015. London: PHE; 2015. Available from: [https://www.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment\\_data/file/416108/Diphtheria\\_Guidelines\\_Final.pdf](https://www.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/416108/Diphtheria_Guidelines_Final.pdf)

13. Schuegger R, Lindermayer M, Kugler R *et al.*: Detection of toxigenic *Corynebacterium diphtheriae* and *Corynebacterium ulcerans* strains by a novel real-time PCR. J Clin Microbiol 2008; 46: 2822-2823.

14. Konrad R, Berger A, Huber I *et al.*: Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry as a tool for rapid diagnosis of potentially toxigenic *Corynebacterium* species in the laboratory management of diphtheria-associated bacteria. Euro Surveill 2010; 15:pii=19699.