

Nationale Referenzzentrale für Diphtherie - Labor

Jahresbericht 2016

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

Zusammenfassung

Im Jahr 2016 wurden an der Nationalen Referenzzentrale für Diphtherie - Labor neun humane Proben untersucht. In acht Proben (stammend von sieben Patienten) konnte *Corynebacterium diphtheriae* und in einer Probe *Corynebacterium ulcerans* nachgewiesen werden. Es wurden zwei toxigene Korynebakterien (ein *Corynebacterium diphtheriae* und ein *Corynebacterium ulcerans*) nachgewiesen. Ein Fall von importierter Hautdiphtherie wurde im Dezember 2016 diagnostiziert. Die Infektion stammte aus Sri Lanka und wurde durch toxinogenes *Corynebacterium diphtheriae* ssp. *mitis* verursacht.

Summary

In 2016, nine human samples were tested at the National Reference Centre for Diphtheria – Laboratory. Eight samples (originating from seven patients) were positive for *Corynebacterium diphtheriae* and one sample was positive for *Corynebacterium ulcerans*. Toxigenic corynebacteria were detected in two cases. One case of imported cutaneous diphtheria occurred in December 2016. The infection originated from the Democratic Socialist Republic of Sri Lanka and was caused by toxigenic *Corynebacterium diphtheriae* ssp. *mitis*.

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 klassischen 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, Pertussis und Polio), ab dem vollendeten 60. Lebensjahr alle 5 Jahre. Im Jahr 2014 waren in Österreich erstmals nach 20 diphtheriefreien Jahren zwei Fälle von Wunddiphtherie registriert worden [1,2,3,4,5].

Resultate

Im Jahr 2016 wurden insgesamt 9 humane Proben zur Überprüfung eines Diphtherieverdachts an die Nationale Referenzzentrale für Diphtherie-Labor übermittelt (Tabelle 1). Es handelte sich um Isolate aus Wundabstrichen (n=5), aus einer Fistel (n=1), aus Punktat (n=1) und aus einem Nasenabstrich (n=1) und einem Wundabstrich (n=1). Zu einem Patienten wurden zwei Isolate/Teilproben eingesandt. Die neun Einsendungen verteilten sich auf sechs Monate (Auswertung nach Eingangsdatum der Isolate in der nationalen Referenzzentrale für Diphtherie-Labor). Die meisten Einsendungen stammten aus Wien (n=4), gefolgt von Vorarlberg (N=3), Kärnten (n=1) und Niederösterreich (n=1). Alle Patienten waren männlich. Im arithmetischen Mittel waren die Patienten 45,2 Jahre alt, im Median 50 Jahre (Spannweite 16-81 Jahre). Epidemiologisch und klinisch relevante Daten sind in der Tabelle 1 zusammengestellt.

Sechs Stämme konnten als *Corynebacterium diphtheriae* ssp. *mitis/belfanti*, zwei Stämme als *Corynebacterium diphtheriae* ssp. *gravis*, und ein Stamm als *Corynebacterium ulcerans* identifiziert werden.

Zwei Isolate [ein *C. ulcerans* (Eingangsdatum in die Referenzzentrale für Diphtherie-Labor: 14.12.2016) und ein *Corynebacterium diphtheriae* ssp. *mitis/belfanti* (2 Teilproben desselben Patienten; Eingangsdatum in die Referenzzentrale für Diphtherie-Labor: 22.12.2016)] konnten als toxinbildend identifiziert werden.

Das *C. ulcerans* - Isolat stammte von einem Wundabstrich eines 81-jährigen Patienten, ohne Diphtherie-Symptomatik. Der Diphtherie-Impfstatus des Patienten konnte nicht ermittelt werden.

Die beiden Teilproben des *Corynebacterium diphtheriae* ssp. *mitis/belfanti* – Isolats stammten von einem Wundabstrich eines 60-jährigen Patienten mit Panaritium nach einer Rückkehr aus einem einmonatigen Urlaub (23.11. - 21.12.2016) in der Demokratischen Sozialistischen Republik Sri Lanka [Abbildung 1]. Die beiden *C. diphtheriae* - Isolate wiesen eine in vitro Resistenz gegenüber Penicillin auf. Der Patient wurde erfolgreich mit Amoxicillin-Clavulansäure und Clindamycin therapiert. Der Patient hatte fünf Jahre zuvor eine Diphtherie – Auffrischungsimpfung erhalten. Es wurde kein Diphtherieantitoxin verabreicht.

Alle neun 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 Linezolid und Vancomycin. Ein Isolat wies reduzierte Empfindlichkeit gegenüber Rifampicin auf, ein Isolat war resistent gegenüber Ciprofloxacin. Acht der neun Isolate waren in vitro resistent gegenüber Penicillin G, drei Isolate waren resistent gegenüber Clindamycin. Die Ergebnisse der in vitro Empfindlichkeitstestung sind in Abbildung 2 dargestellt.

Tab. 1: Einsendungen von humanen Proben an die Nationale Referenzzentrale für Diphtherie – Labor, Österreich 2016

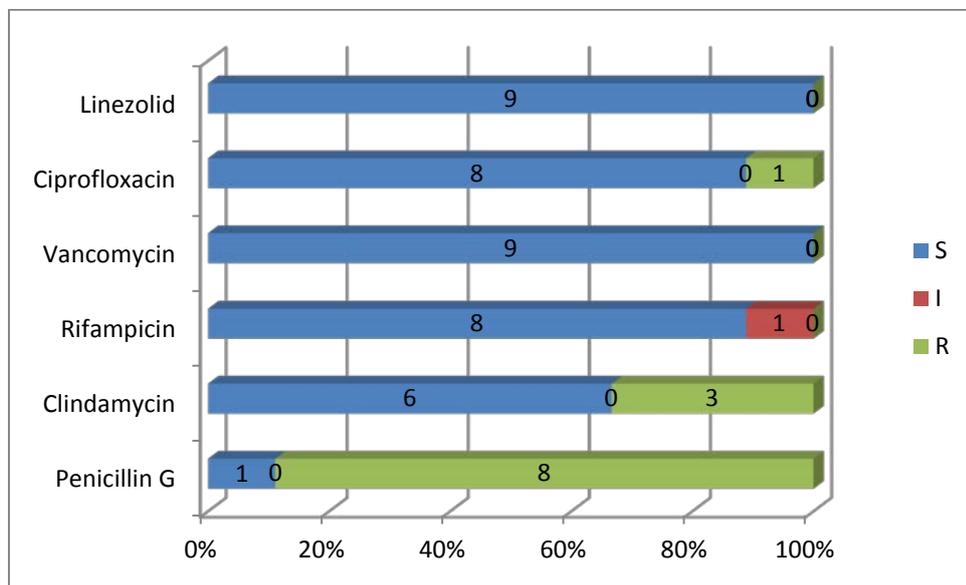
#	Ein-gangs-datum	Patient (Alter)	Sex m/W	Einsender (Erreger isoliert in...)	Probenart	Symptome/ Erkrankung	Kultur-Ergebnis	PCR-Toxin-nachweis (Subunits A und B)
1	28.04.16	19	m	Landeskrankenhaus Feldkirch (Institut für Pathologie)	Isolat aus Nasenabstrich	Rhinitis	<i>C. diphtheriae</i> ssp. <i>mitis/belfanti</i>	A: negativ B: negativ
2	22.06.16	49	m	Landeskrankenhaus Feldkirch (Institut für Pathologie)	Isolat aus Wunde	Mal perforans Großzehe	<i>C. diphtheriae</i> ssp. <i>mitis/belfanti</i>	A: negativ B: negativ
3	22.06.16	55	m	SMZ Süd Kaiser Franz Josef Spital (Pathologisch bakteriologisches Institut)	Isolat aus Wunde	Wunde-Knie	<i>C. diphtheriae</i> ssp. <i>mitis/belfanti</i>	A: negativ B: negativ
4	30.08.16	31	m	Landeskrankenhaus Feldkirch (Institut für Pathologie)	Isolat aus Punktat	Eitrige Sinusitis	<i>C. diphtheriae</i> ssp. <i>mitis/belfanti</i>	A: negativ B: negativ
5	30.09.16	16	m	AKH Wien (Klinische Abteilung für klinische Mikrobiologie)	Isolat aus Fistelabstrich	Fistel Calcaneus	<i>C. diphtheriae</i> ssp. <i>gravis</i>	A: negativ B: negativ
6	02.10.16	51	m	UKH Lorenz Böhler (AGES-IMED-Wien)	Wundabstrich	Fistel Oberschenkel	<i>C. diphtheriae</i> ssp. <i>gravis</i>	A: negativ B: negativ
7	14.12.16	81	m	Laboratorium Dr. Kosak u. Partner	Isolat aus Wunde	Wunde-Knöchel	<i>C. ulcerans</i>	A: positiv B: negativ
8 ^A	28.12.16	60	m	Klinikum Klagenfurt am Wörthersee (Institut für Labordiagnostik und Mikrobiologie)	Isolat aus Wundabstrich	Panaritium – re. Fuß	<i>C. diphtheriae</i> ssp. <i>mitis/belfanti</i>	A: positiv B: positiv
8 ^A	28.12.16	60	m	SMZ Süd Kaiser Franz Josef Spital (Pathologisch bakteriologisches Institut)	Isolat aus Wundabstrich	Panaritium – re. Fuß	<i>C. diphtheriae</i> ssp. <i>mitis/belfanti</i>	A: positiv B: positiv

Abk.: C.: *Corynebacterium*; A: Diphtherietoxin Subunit A; B: Diphtherietoxin Subunit B; ssp.: Subspecies
^A: Teilproben von Patient A;

Abb. 1: Kutane Diphtherie: eitrig belegtes Ulkus im Nagelbett (Panaritium) bei einem 60-jährigen Patienten nach Rückkehr aus Sri Lanka. (© Dr. Hermann Laferl – Infektionsambulanz, 4. Med. Abt., KFJ Spital, Wien).



Abb. 2: Ergebnisse der in vitro Empfindlichkeitstestung von neun *Corynebacterium* sp.-Isolaten des Jahres 2016
 Interpretation nach EUCAST-Empfehlungen für *Corynebacterium* sp.
 (R: resistent; I: intermediär; S: empfindlich).



Diskussion

In mikrobiologischen Laboratorien in Europa werden Rachen-/Nasenabstriche in der täglichen Routine 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. Die österreichische Referenzzentrale für Diphtherie-Labor hat erfolgreich an allen bisherigen externen Qualitätssicherungstests organisiert von *European Laboratory Network for Diphtheria* (EUDIPLab-Net) teilgenommen. Das *European Diphtheria Surveillance Network* (ESDN) organisiert im Auftrag des ECDC regelmäßige 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 zwar sporadisch Einzelfälle von Diphtherieerkrankungen durch toxinogene Stämme von *Corynebacterium diphtheriae* oder *Corynebacterium ulcerans* identifizieren, 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 zunehmend toxinbildende Stämme von *Corynebacterium ulcerans* als Erreger identifiziert werden [6]. Von 2010 bis 2014 wurden 131 Fälle von Diphtherie in der EU gemeldet, 76 davon laborbestätigt. Dies entspricht einem leichten Anstieg, im Vergleich zu den Vorjahren. Die meisten Diphtherie-Fälle wurden in Lettland (n = 42, 38 dieser Fälle wurden laborbestätigt) und bei nicht-geimpften Personen, bzw. bei Personen mit unbekanntem Impfstatus registriert [7].

Im Jahr 2016 verlief in Belgien ein Fall von Rachendiphtherie bei einem 3-jährigen nicht geimpften Kind tödlich [8]. Im Jahr 2015 war ein tödlicher Fall von Rachendiphtherie bei einem 6-jährigen nicht geimpften Kind in Spanien dokumentiert worden [9].

In Venezuela wurde über einen Anstieg an gemeldeten Diphtherie-Fällen nach mehreren Jahrzehnten Diphtheriefreiheit berichtet, in Pakistan sogar über epidemisches Auftreten [10].

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 möglich. Im Jahr 2011 ist das erste Mal eine molekularbiologische Bestätigung der erfolgten

Übertragung von toxischem *C. ulcerans* vom Haustier auf den Menschen gelungen [11]. Die Mehrzahl (75%) der im Erwachsenenalter auftretenden Diphtherie-ähnlichen Infektionen mit *C. ulcerans* betreffend Personen nach einem kompletten oder inkompletten Diphtherie-Impfzyklus [12]. Vor dem Fall aus 2016, war in Österreich im Jahr 2013 aus dem Wundabstrich einer 84-jährigen Patientin ein toxinbildendes *C. ulcerans* angezüchtet worden.

Für Österreich konnte in den letzten fünf Jahren, im Vergleich mit den Jahren davor, eine Zunahme der an die Nationale Referenzzentrale für Diphtherie - Labor eingesandten Proben festgestellt werden [1-5].

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 [13,14]. Alkoholismus, Obdachlosigkeit, intravenöser Drogenkonsum oder Zahnkaries gelten als Risikofaktoren. Im Jahr 2014 waren in Österreich - erstmals nach über 20 diphtheriefreien Jahren - zwei Fälle von importierter Wunddiphtherie diagnostiziert worden. Beide Infektionen stammten aus Afrika und wurden durch *Corynebacterium diphtheriae* ssp. *mitis* verursacht.

Im März 2015 wurden vom WHO Reference Centre for Diphtheria and Streptococcal Infections at Public Health England (PHE), London, Colindale neue Richtlinien veröffentlicht [15]. Darin sind vom deutschen Konsiliarlabor evaluierte Nachweismethoden zum Toxinnachweis mittels real-time PCR angeführt [16] sowie Methoden zur Speziesdifferenzierung mittels Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) Massenspektrometrie [17]. Der Erregernachweis mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie wurde an der Nationalen Referenzzentrale für Diphtherie - Labor in Wien im Jahr 2011 implementiert. Die Untersuchung von *Corynebacterium diphtheriae*-Isolate auf Toxigenität erfolgte an der Referenzzentrale seit 2012 mittels PCR. Positive Toxin-PCR-Testergebnisse werden zur Bestätigung mittels Elek-Ouchterlony-Immundiffusionstest an das WHO Reference Centre for Diphtheria and Streptococcal Infections, PHE Colindale gesandt. Die zeitgleich durchgeführte Abschaffung des diagnostischen Tierversuches an der Nationalen Referenzzentrale für Diphtherie - Labor steht 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. Wir weisen darauf hin, dass –Reisen in und aus Ländern, in denen Diphtherie endemisch ist, immer noch ein Risiko für das Wiederauftreten der Krankheit darstellen kann, was die Bedeutung einer geeigneten Diphtherieimpfung unterstreicht.

In Österreich war Diphtherieantitoxin (Diphtherieserum) 2011 bis 2015 nicht erhältlich. Seit 2016 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 Verfügbarkeit von Diphtherieantitoxin in Österreich.

Danksagung

Wir bedanken uns bei folgenden Einsenderinnen und Einsendern: Pathologisch-bakteriologisches Institut Sozialmedizinisches Zentrum Süd – Kaiser Franz Josef Spital Wien; Unfallkrankenhaus Lorenz Böhler Wien; Institut für Pathologie Landesklinikum Feldkirch; Institut für Labordiagnostik und Mikrobiologie Klinikum Klagenfurt am Wörthersee; Laboratorium Dr. Kosak und Partner Wien; Klinische Abteilung für klinische Mikrobiologie AKH Wien;

Referenzen

1. Huhulescu S. (2013) Diphtherie – Jahresbericht 2012 der Nationalen Referenzzentrale-Labor für das Jahr 2012 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
2. Huhulescu S. (2014) Diphtherie – Jahresbericht 2013 der Nationalen Referenzzentrale-Labor für das Jahr 2013 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
3. Huhulescu S. (2015) Diphtherie – Jahresbericht 2014 der Nationalen Referenzzentrale-Labor für das Jahr 2014 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

4. Huhulescu S. (2016) Diphtherie – Jahresbericht 2015 der Nationalen Referenzzentrale-Labor für das Jahr 2015 Mitteilungen für das österreichische Gesundheitswesen http://www.bmgf.gv.at/cms/home/attachments/4/9/1/CH1184/CMS1459496240165/nl_1_quartal_2016.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. 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. 2012 Feb. <http://dx.doi.org/10.3201/eid1802.110987>
7. European Centre for Disease Prevention and Control. Annual Epidemiological Report 2016 – Diphtheria. Stockholm: ECDC; 2016. Available from: <http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/Diphtheria/Pages/Annual-epidemiological-report-2016.aspx> - See more at: <http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/diphtheria/pages/annual-epidemiological-report-2016.aspx#sthash.ywsNMYDc.dpuf>
8. European Centre for Disease Prevention and Control. A fatal case of diphtheria in Belgium, 24 March 2016. Stockholm: ECDC, 2016.
9. European Centre for Disease Prevention and Control. A case of diphtheria in Spain, 15 June 2015. Stockholm: ECDC, 2015.
10. <http://outbreaknewstoday.com/tag/diphtheria/>
11. Epidemiologisches Bulletin 27/2011. Diphtherie : Erkrankung durch toxigene *Corynebacterium ulcerans* nach Katzenkontakt – Fallbericht Epidemiologisches Bulletin 27/2011 <http://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Archiv/2011/27/Tabelle.html>
12. 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.
13. 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.
14. Zakikhany K, Neal S, Efstratiou A. Emergence and molecular characterisation of non-toxigenic tox 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>
15. 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
16. Schuhegger R, Linder Mayer 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.

17. 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:p19699.