

# Bioterroristisch relevante bakterielle Erreger

## Epidemiologie, Klinik, Diagnostik

### Zusammenfassung

Nach den bioterroristischen Anschlägen mit Milzbrandbriefen in den USA im Herbst 2001, den Tausenden daraufhin folgenden vermeintlichen Anschlägen auch in Deutschland und den vermuteten Waffenarsenalen in den so genannten „Schurkenstaaten“ rückte die Gefahr durch Biowaffen wieder in den Mittelpunkt des Interesses. Dabei wurde deutlich, wie wichtig eine schnelle und verlässliche Diagnostik bioterroristisch relevanter Erreger in allen möglichen Umweltproben sowie aus Patientenmaterial ist, um wirksam und angemessen auf eine mögliche Bedrohung reagieren zu können. Für die schnelle Diagnostik einer Vielzahl hochpathogener Erreger aus Umweltproben eignen sich am besten molekulargenetische Methoden wie die PCR, aber auch der direkte Nachweis spezifischer Antigene. Trotzdem sind auch die langjährig etablierten mikrobiologischen Methoden – Bakterioskopie und kulturelle Anzucht – unerlässlich, um die Lebensfähigkeit von Erregern zu bestätigen. Aufgrund ihrer möglicherweise starken mikrobiellen Verunreinigung und dem Vorhandensein von Inhibitoren stellen Umweltproben eine besondere Herausforderung für die Diagnostik dar, bei der auf Positivkontrollen großen Wert gelegt werden muss. Im Folgenden werden als bioterroristisch relevant eingestufte hochpathogene Erreger und die von ihnen hervorgerufenen Erkrankungen vorgestellt: Milzbrand, Pest, Tularämie, Rotz, Melioidose, Brucellose, Q-Fieber und Fleckfieber. Die diagnostischen Maßnahmen beim Verdacht auf Milzbranderreger werden ausführlich erläutert, und Methoden zur Diagnostik weiterer Erreger werden angesprochen.

### Schlüsselwörter

Bioterrorismus · Hochpathogene Bakterien · Milzbrand · Umweltproben · Diagnostik

Die mikrobiologische Diagnostik pathogener Erreger ist seit vielen Jahrzehnten etabliert und wird ständig um neue Methoden erweitert. Dabei stehen Kriterien wie kürzere Nachweiszeiten, Erhöhung der Spezifität und Selektivität und eine Automatisierbarkeit im Vordergrund. Nicht zuletzt soll ein optimaler Nachweistest preiswert, möglichst robust bei gleichzeitig hoher Empfindlichkeit und mit geringem technischen Aufwand durchführbar sein. Dabei ist das Ausgangsmaterial von entscheidender Bedeutung für die Wahl der Methode(n) bzw. für die ggf. notwendigen vorgeschalteten Extraktions- und Anreicherungsmethoden bei der (Spezies-)Diagnostik. Unter Einbeziehung moderner molekularbiologischer Methoden auf der Basis eines Nukleinsäurenachweises wurden Diagnostikprotokolle insbesondere für Patientenmaterial (Blut, Serum, Urin, Stuhl, Sputum, Gewebeproben etc.) und im Rahmen der Trinkwasser- und Lebensmitteldiagnostik für bestimmte Umweltproben (Badegewässer, Kläranlagen etc.) entwickelt und einer Qualitätskontrolle unterworfen.

Spätestens seit der Konfrontation mit vielen 10.000 weltweit eingegangenen Briefen oder sonstigen Umweltproben mit Verdacht auf bioterroristischen

Hintergrund ist die Notwendigkeit deutlich geworden, Diagnostikprotokolle zu entwerfen oder bestehende so zu modifizieren, dass auch für nahezu alle denkbaren Umweltproben eine schnelle, empfindliche und validierte Speziesdiagnostik aufgebaut oder weiterentwickelt und jederzeit vorgehalten werden muss. Bakterien, Viren und Toxine, die für eine bioterroristische Bedrohung in Frage kommen, wurden von der CDC (Centers for Disease Control and Prevention, USA) basierend auf ihrem Gefährdungspotenzial in 3 Kategorien eingeteilt (Tabelle 1). Beim Verdacht auf bioterroristisches Probenmaterial aus der Umwelt muss berücksichtigt werden, dass auch ein lokal begrenztes natürliches Vorkommen hochpathogener Erregerspezies existieren kann, so z. B. bei *Bacillus anthracis* (insbesondere Afrika, aber auch in Mitteleuropa), *Yersinia pestis* (Afrika, aber auch Regionen im Südwesten der USA), *Burkholderia pseudomallei* (Südostasien), *Francisella tularensis* (Endemiegebiete in Nordeuropa und in Südosteuropa) oder *Coxiella burnetii* (auch in einigen Regionen Deutschlands, insbesondere in Hessen, endemisch). In solchen Fällen ist es von Bedeutung zu erkennen, ob es sich beim Vorliegen eines positiven Befundes um eine natürliche Kontamination mit ei-

© Springer-Verlag 2003

Prof. Dr. B. Appel  
Zentrum für Biologische Sicherheit (ZBS 2),  
Robert Koch-Institut, Nordufer 20,  
13353 Berlin  
E-Mail: appelb@rki.de

S. R. Klee · D. Jacob · H. Nattermann  
B. Appel

## Bioterrorism-related bacterial agents. Epidemiology, clinical picture, and diagnostics

### Abstract

After the bioterrorist attacks with several anthrax-laden letters in the USA in autumn 2001, the subsequent thousands of pretended attacks also in Germany, and the assumed arsenals of the so-called rogue states, the threat of bioweapons became a focus of interest again. Thereby, it became clear just how important fast and reliable diagnostic methods are to detect bioterrorism-related agents in every possible environmental or clinical specimen to enable an effective and adequate reaction to a possible threat. For fast detection of a great number of highly pathogenic agents in environmental specimens, methods such as PCR or direct detection of specific antigens are most suitable. However, also the long-standing, well-established microbiological methods – bacterioscopy and cultivation – are indispensable to confirm the viability of bacterial agents. Due to their possibly strong microbial contamination and the presence of inhibitors, environmental specimens pose a special challenge for diagnostics, where great importance must be attached to positive controls. Highly pathogenic agents categorized as relevant for bioterrorism and the corresponding diseases are presented below: anthrax, plague, tularemia, glanders, melioidosis, brucellosis, Q fever, and typhus fever. The diagnostic measures that have to be taken in a case of suspicious anthrax are described in detail, and diagnostic methods for further bacterial agents are mentioned.

### Keywords

Bioterrorism · Highly pathogenic bacteria · Anthrax · Environmental specimens · Diagnostics

## Leitthema: Biologische Sicherheit

Tabelle 1

### Eingruppierung bioterroristisch relevanter Erreger und Toxine gemäß CDC

Kategorie A	Kategorie B
Höchstes Gefährdungspotenzial: Leichte Verbreitung (z. B. Ausbringen von Sporen bei <i>B. anthracis</i> , hohe Ansteckungsgefahr bei <i>Y. pestis</i> )	Geringeres Gefährdungspotenzial: Relativ leichte Verbreitung
Hohe Morbidität und Mortalität	Hohe Morbidität Geringere Mortalität
<i>Bacillus anthracis</i> (Milzbrand/Anthrax)	<i>Burkholderia mallei</i> (Rotz)
<i>Yersinia pestis</i> (Pest)	<i>Burkholderia pseudomallei</i> (Melioidose)
<i>Francisella tularensis</i> (Hasenpest/Tularämie)	<i>Brucella</i> spp. (Brucellose)
<i>Variola major</i> (Pocken)	<i>Coxiella burnetii</i> (Q-Fieber)
Viren, welche hämorrhagisches Fieber verursachen: Filoviren (z. B. Ebola, Marburg), Arenaviren (z. B. Lassa)	<i>Rickettsia prowazekii</i> (Fleckfieber), <i>Chlamydia psittaci</i> (Psittakose, Papageienfieber)
Botulinum-Toxin ( <i>Clostridium botulinum</i> )	Erreger, die Nahrungsmittel (z. B. Salmonellen, Shigellen, <i>E. coli</i> O157:H7) und Trinkwasser (z. B. <i>Vibrio cholerae</i> und <i>Cryptosporidium parvum</i> ) kontaminieren Viren, die Enzephalitiden verursachen: Alphaviren (z. B. Venezuelan equine encephalitis, eastern und western equine encephalitis) Ricin-Toxin ( <i>Ricinus communis</i> ) Epsilon-Toxin ( <i>Clostridium perfringens</i> ) Enterotoxin B ( <i>Staphylococcus aureus</i> )
<b>Kategorie C</b> umfasst unter anderem Erreger, die durch Veränderungen als mögliche biologische Waffen in der Zukunft in Frage kommen könnten (z. B. Hanta- und Nipah-Virus): Leichte Verfügbarkeit Leichte Produktion und Verbreitung Potenziell hohe Morbidität und Mortalität	

nem endemischen Erreger handelt oder ob der Erreger absichtlich ausgebracht wurde. Hierbei muss berücksichtigt werden, dass sich das durch eine biologische Waffe hervorgerufene klinische Krankheitsbild von der natürlich vorkommenden endemischen Form der Krankheit unterscheiden kann. Viele Krankheiten, die durch biologische Waffen ausgelöst werden, präsentieren sich zunächst mit unspezifischen klinischen Symptomen, die schwer als biologischer Anschlag zu erkennen und zu diagnostizieren sind. Das epidemiologische Krankheitsmuster, das sich entwickelt, ist ein wichtiger Faktor bei der Unterscheidung zwischen einem natürlichen Krankheitsausbruch und einem terroristischen Angriff. Solche epidemiologischen Hinweise sind z. B. das Auftreten einer Krankheit, die für eine bestimmte Region oder Jahreszeit ungewöhnlich

ist, das gehäufte Auftreten bestimmter, sonst seltener Krankheitsbilder oder das Auftreten einer Krankheit, die üblicherweise von einem Vektor übertragen wird, der in einer Region nicht heimisch ist [1].

### Problematik der Diagnostik von Umweltproben

Um bei einem bioterroristischen Ereignis möglichst wirksam therapeutisch eingreifen zu können, müssen die folgenden Zielstellungen erreicht werden:

- schneller Ausschluss oder Bestätigung eines BT-Ereignisses,
- schnelle Diagnostik eines Erregers bzw. einer Infektion,
- Abschätzung des Infektionsrisikos,
- möglichst frühe Einleitung von Abwehr-/Eindämmungsmaßnahmen.

Vor diesem Hintergrund hat das Robert Koch-Institut in Kooperation mit den Fachgesellschaften und ausgewählten Referenz- oder Konsiliarlaboratorien begonnen, so genannte „Standard Operation Procedures“ (SOPs) für die Diagnostik von hochpathogenen Erregern insbesondere aus Umweltproben zu erarbeiten, die der Fachöffentlichkeit zur Verfügung gestellt werden.

Im Gegensatz zur Untersuchung von klinischen Proben, bei denen die Krankheitsbilder und -symptome der entsprechenden Patienten gezielte laborgestützte Untersuchungen ermöglichen, gibt es bei Untersuchungen von Umweltproben keine Hinweise auf Epidemiologie und/oder Art der Erkrankung. Daher ist die laborgestützte Diagnostik von Umweltproben aufwändig (s. auch Beitrag von G. Pauli und H. Ellerbrok in diesem Heft). Für einen sicheren und schnellen Erregernachweis sind mehrere teilweise parallel ablaufende Untersuchungen notwendig:

**Bakterioskopie.** Die Mikroskopie gibt bei direkter Anwendung auf das Probenmaterial Aufschluss über die Keimdichte (ca.  $10^5$  Erreger/ml werden erfasst). Elektronenmikroskopisch können Viren ausgeschlossen und die Form (Kokken, Stäbchen) sowie Details von Bakterien (Sporen, Geißeln) bestimmt werden. Im Lichtmikroskop können Bakterien auf ihr Gram-Verhalten (Gram-Färbung) oder durch andere Färbungen auf weitere Eigenschaften untersucht werden: Bipolarität (Wayson-Färbung); Sporen (Rakette-Färbung); Kapseln (Färbung nach Foth).

**Kultur.** Zur Anzucht der Bakterien muss das Probenmaterial in Anreicherungsmedien und auf feste Nährmedien gebracht werden. Hiermit wird der Nachweis lebensfähiger Erreger erbracht. Basierend auf den Ergebnissen der bakterioskopischen Untersuchungen (z. B. große grampositive oder kleine, gramnegative, bipolare Stäbchen) können spezifische Selektivmedien ausgewählt werden. Ein Problem besteht darin, dass Umweltproben neben einem potenziellen bioterroristischen Erreger auch eine Vielzahl verwandter natürlicher Erreger enthalten können, z. B. *Bacillus* sp., die eine umfangreiche Speziesdiagnostik notwendig machen. Aufgrund der Begleitflora könnte das Wachstum ver-

dächtiger Erreger auf Nährmedien übersehen werden. Darum müssen Selektivmedien (mit Antibiotikumzusatz oder anderen Inhibitoren) eingesetzt werden, oder die Begleitflora muss durch thermische Inaktivierung gehemmt oder durch Verdünnung der Anreicherung vor dem Ausstreichen reduziert werden. Des Weiteren können Umweltproben natürlicherweise, aber auch absichtlich, mit organischen oder anorganischen Materialien (z. B. Huminsäuren, Detergenzien u. a.) versetzt sein oder einen zu hohen oder zu niedrigen pH-Wert aufweisen, wodurch eine schnelle und gesicherte Diagnostik direkt aus der Umweltprobe inhibiert oder verzögert wird. Daher ist gerade bei der Diagnostik von Umweltproben das Mitführen geeigneter Indikatororganismen oder Positivkontrollen, so genannter „spikes“, von großer Wichtigkeit. Dies setzt allerdings voraus, dass die für die Diagnostik vorbereiteten Labors über die vorgeschriebenen räumlichen Kapazitäten (S3- oder S4-Sicherheitslabors) und über eine Sammlung hochpathogener Erreger verfügen müssen. Letztendlich ist bei einigen Bakterien zu berücksichtigen, dass aufgrund unterschiedlicher physiologischer Zustände, z. B. Sporenform oder Dormanz bei VBNC- (viable but not cultivable) Zuständen, eine längere Zeit einzuplanen wäre, bevor die Spezies anwächst und nachweisbar wird. Außerdem darf nicht außer Acht gelassen werden, dass bei einem bioterroristischen Angriff gentechnisch veränderte Erreger eingesetzt werden könnten, sodass mit Antibiotikaresistenzen oder erhöhter Virulenz zu rechnen ist.

**Molekularbiologie.** Genomspezifische Sequenzen der einzelnen Erreger werden durch molekulargenetische Methoden wie der PCR nachgewiesen, die auch die Detektion geringer Keimzahlen erlaubt. Allerdings kann die PCR bei einem Direktnachweis aus der Probe durch zu hohe Keimdichten, inhibierende Substanzen (z. B. Erdbestandteile oder Magnesiumionen) oder ungünstige pH-Werte gehemmt werden, sodass auch hier die Mitführung einer Positivkontrolle notwendig ist. Die Real-Time-PCR ist eine quantitative Methode, die Rückschlüsse auf die Menge des Erregers im Untersuchungsmaterial erlaubt. Dabei werden neben den Primern fluoreszenzmarkierte Oligonukleotidsonden einge-

setzt, die bei ihrer spezifischen Bindung innerhalb des zu amplifizierenden Produktes ein Fluoreszenzsignal hervorrufen, dessen Stärke proportional zur eingesetzten DNA-Menge ist. Diese molekulargenetischen Methoden geben jedoch keine Auskunft über die Lebensfähigkeit eines Erregers und seine Empfindlichkeit gegenüber Antibiotika und müssen daher im positiven Fall bei der Untersuchung von Umweltproben durch Wachstum in/auf Nährmedien bestätigt werden.

Eine verbreitete Methode zum Antigennachweis ist der „Capture“- oder „Sandwich“-ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay). Er eignet sich besonders gut, um sehr geringe Antigenmengen nachzuweisen. Dabei wird eine Mikrotiterplatte mit Antigen-spezifischen Antikörpern (capture antibodies) beschichtet, anschließend das zu testende Antigen zugegeben, an das im nächsten Schritt Enzym-markierte Antikörper (detecting antibodies) ebenfalls spezifisch binden. Zuletzt wird eine Substratlösung zugegeben, deren Farbumschlag das Vorhandensein von Antigen in der Testlösung anzeigt. Weitere Methoden zum Antigennachweis sind z. B. die direkte Immunfluoreszenz (Nachweis des Erregers durch Fluoreszenzmarkierte Antikörper) oder der Schnelltest durch den „Dipstick Assay“ (immunchromatographischer Nachweis für bestimmte Antigene).

Der Nachweis von Antikörpern im Patientenblut dient häufig als Nachweismethode für eine Infektion, ist aber für eine schnelle Diagnose ungeeignet, da Antikörper frühestens ein bis 2 Wochen nach der Infektion gebildet werden. Mangels anderer geeigneter Methoden spielen aber Antikörpernachweise (z. B. ELISA, Komplementbindungsreaktion, Serumagglutination, indirekte Immunfluoreszenz) bei der Diagnose vieler Erkrankungen immer noch eine wichtige Rolle. Im Folgenden wird auf eine ausführliche Darstellung der Antikörpernachweise bei den einzelnen Erregern verzichtet.

Die Kriterien zur Bewertung einer Probe werden in Verdacht, begründeter Verdacht und bestätigter Verdacht eingeteilt. Die diagnostischen Maßnahmen, die zu den jeweiligen Bewertungskriterien führen, sind für jeden Erreger gesondert zu betrachten. Allgemein muss bei einem begründeten Verdacht der Nach-

Tabelle 2  
**Charakteristika bioterroristisch relevanter Bakterien und mögliche Umwelt- und klinische Proben**

Erreger/Krankheit	Wichtigste Übertragungswege	Infektionsdosis	Tenazität	Umweltproben	Klinische Proben
<i>Bacillus anthracis</i> Milzbrand, Anthrax	Verzehr von oder Umgang mit infizierten Tieren oder deren Produkten; Inhalation von Sporen	8.000–10.000 Sporen	Extrem widerstandsfähige Sporen (mehr als 40 Jahre lebensfähig)	Erdproben, organische Materialien, Abklatsch/Spülungen von kontaminierten Flächen, Pulver und staubförmige Materialien	Abstriche von Hautläsionen, Blut, Sputum, Stuhl, Gewebe von Lunge oder Milz
<i>Yersinia pestis</i> Pest	Stiche infizierter Flöhe; Inhalation von Aerosolen (Übertragung von Mensch zu Mensch)	Unterschiedliche Angaben: 1–10 oder 100–500 Organismen	Bis zu 6 Monaten in Flöhen; bis zu einem Jahr in feuchtem Erdboden	Insekten, Erdproben, Abklatsch/Spülungen von kontaminierten Flächen, Luftkeimsammelfilter	Bubonenaspirat, Sputum, Blut, Liquor, postmortale Gewebeproben
<i>Francisella tularensis</i> Tularämie, Hasenpest	Über Arthropoden; Kontakt mit infiziertem Tiermaterial über Haut oder Verdauungstrakt; Inhalation von infektiösem Staub	10–50 Organismen	Bei niedrigen Temperaturen wochenlang in Wasser, feuchtem Boden, Heu, Stroh und Tierkadavern	Insekten, Erdproben, Abklatsch/Spülungen von kontaminierten Flächen, Wasser, Luftkeimsammelfilter	Eiter, Lymphknotenpunktat, Hautgeschwüre, Konjunktivalsekret, Blut, Sputum, tracheobronchiale Sekrete, postmortale Gewebeproben
<i>Burkholderia mallei</i> Rotz, Malleus	Hautkontakt mit infizierten Tieren, Inhalation von Aerosolen	Gering	Monatelang an dunklen und feuchten Orten	Erdproben, Abklatsch/Spülungen von kontaminierten Flächen, Luftkeimsammelfilter, Wasser	Ausscheidungen (Eiter, Stuhl, Urin), Blut, Rachenabstriche, Gewebe auch postmortal (Abszess, Haut, Leber, Milz)
<i>Burkholderia pseudomallei</i> Melioidose	Über Verletzungen der Haut oder über Aerosole	Gering	Monatelang an feuchten Orten oder im Wasser	Erdproben, Abklatsch/Spülungen von kontaminierten Flächen, Luftkeimsammelfilter, Wasser	Ausscheidungen (Eiter, Stuhl, Urin), Gewebe auch postmortal (Abszess, Haut, Leber, Milz), Blut, Rachenabstriche
<i>Brucella</i> spp. Brucellose	Milchprodukte infizierter Tiere oder Inhalation der hochinfektiösen Aerosole	10–100 Organismen	Bis zu mehreren Monaten bei Umgebungstemperatur und hoher Luftfeuchtigkeit	Erdproben, Tiere, Abklatsch/Spülungen von kontaminierten Flächen, Lebensmittel, Luftkeimsammelfilter	Blut, Knochenaspirat, Liquor, Serum, postmortal gewonnene nicht fixierte Gewebeproben
<i>Coxiella burnetii</i> Q-Fieber	V.a. durch Inhalation von infektiösem Staub; durch Umgang mit infizierten Tieren oder ihren Produkten	1–10 Organismen	Jahrelang durch trockenresistente Dauerformen	Zecken, Erdproben, Heu, Tierprodukte (z. B. Wolle), Luftkeimsammelfilter	Blut, Liquor, Knochenmark, Herzklappen, Leberbiopsien, Plazenta
<i>Rickettsia prowazekii</i> Fleckfieber	Einreiben von Kot infizierter Läuse in die Haut; Inhalation von läusekothaltigem Staub	Nicht bekannt	Im Läusekot längere Zeit überlebensfähig, ansonsten instabil	Läuse, Läusekot, Luftkeimsammelfilter	Blut, Liquor, Hautbiopsien

Angaben u.a. aus Referenz [1]

weis eines bakteriellen Erregers in einer Umweltprobe durch seine Vermehrungsfähigkeit in Kombination mit dem Nachweis seiner Virulenz erbracht werden. Aufgrund der weit reichenden Konsequenzen eines positiven Befundes in einer Umweltprobe mit möglichem bioterroristischen Hintergrund muss dieser Befund von einem weiteren Labor bestätigt werden (bestätigter Verdacht).

Im Folgenden werden die Epidemiologie, das klinische Erscheinungsbild sowie die gängigen diagnostischen Methoden für bakterielle Erreger der CDC-Kategorien A und B aus Umweltproben behandelt. Tabelle 2 gibt einen Überblick über die Erreger, ihre Übertragungswege, Infektionsdosis und Persistenz in der Umwelt sowie die jeweils zu erwartenden Umweltproben und klinischen Proben.

## **Bacillus anthracis – Milzbrand, Anthrax**

### **Epidemiologie**

Der von *Bacillus anthracis* hervorgerufene Milzbrand (Anthrax) ist eine weltweit verbreitete Zoonose. Der Name Milzbrand bezieht sich auf die dunkel gefärbte und wie verbrannt aussehende Milz erkrankter Tiere. In den meisten europäischen Ländern und Nordamerika tritt Anthrax sporadisch, in Ungarn, Rumänien, Albanien und Mazedonien endemisch und in Spanien, Griechenland und in der Türkei hyperendemisch auf. Nur wenige Länder (Dänemark, Schweden, Österreich) sind frei, und einige weitere sind als wahrscheinlich frei einzustufen. Weltweit werden pro Jahr etwa 2.000 Anthraxfälle beim Menschen registriert. In Deutschland wurde die letzte Erkrankung 1994 gemeldet. In Spanien traten dagegen 1996 noch 50 Milzbrandfälle auf. Ein gewisses berufsbedingtes Infektionsrisiko tragen Personen, die Tierhäute und Felle, tierische Knochen oder anderes Tiermaterial verarbeiten, sowie Beschäftigte in der Tiermedizin, in der Land-, Forst- und Jagdwirtschaft, die mit infizierten Tieren in Berührung kommen. Eine Übertragung der Erkrankung von Mensch zu Mensch wurde nicht beobachtet.

Die besondere Eignung der Milzbrandbakterien als BT-Erreger beruht auf der Bildung äußerst widerstandsfähiger Dauerformen [2]. Diese UV- und

hitzeresistenten Sporen können Tiere über Futter oder Wasser noch nach Jahrzehnten infizieren. Anthraxerreger sind einfach zu züchten, und die Sporenbildung ist leicht induzierbar. Das Material könnte in flüssiger oder in getrockneter Form produziert werden, für die Nutzung in Waffenform stabilisiert und als Aerosolwolke entweder von einem Flugzeug aus oder durch eine Sprüheinrichtung freigesetzt werden [3].

### **Klinik**

Abhängig vom Infektionsweg unterscheidet man 3 klinische Erkrankungsformen: Haut-, Lungen- und Darmmilzbrand. Der Hautmilzbrand wird am häufigsten beobachtet (95% aller Infektionen). Man findet ihn meist an Händen, Armen, Hals oder im Gesicht. Die Infektion erfolgt mit Sporen oder Bakterien über Verletzungen der Haut und führt zur Bildung eines schorfbedeckten nekrotischen Geschwürs (Milzbrandkarbunkel, *Pustula maligna*). Unbehandelt tritt in etwa 20% der Fälle eine Sepsis auf, die zum Tod des Patienten führen kann. Der letzte in Deutschland bekannt gewordene Milzbrandfall verlief als Hautmilzbrand. Darmmilzbrand tritt nach Verzehr von nicht durchgegartem, kontaminiertem Fleisch infizierter Tiere auf. Symptome sind Bauchschmerzen, in der Regel mit blutigem Erbrechen bzw. blutigem Durchfall, gefolgt von Fieber und Anzeichen einer Sepsis. Unbehandelt verläuft die Infektion in der Regel letal. Der Lungenmilzbrand ist normalerweise eine sehr seltene Erkrankung, die bei Arbeitern auftrat, die Häute, Wolle, Haare oder Felle von infizierten Tieren verarbeiteten und Sporen einatmeten. Die Infektionsdosis (ID<sub>50</sub>) beträgt schätzungsweise 8.000–10.000 Sporen [4]. Die Erkrankung beginnt nach einer Inkubationszeit von einem bis 6 Tagen (evtl. bis zu 60 bzw. 100 Tagen) ähnlich wie ein grippaler Infekt mit Fieber, Muskelschmerzen, Mattigkeit und evtl. respiratorischen Symptomen (Husten). Nach diesem Initialstadium entwickelt sich ein schweres Krankheitsbild mit hohem Fieber bis hin zur Sepsis, Lungen- und Herz-Kreislauf-Versagen. Bei ca. 50% der Infizierten kommt es zu einer meist letalen Meningitis. Die Mortalität bei unbehandeltem Lungenmilzbrand liegt bei 100%. In den USA wurden im 20. Jahrhundert etwa 20 spora-

dische Lungenmilzbrandfälle gemeldet. Bedingt durch die bioterroristischen Anschläge im Jahr 2001 erkrankten dort 11 Personen an Lungenmilzbrand, 5 der Patienten verstarben. Nach einem Unfall im Jahr 1979 in einer Anlage für die Herstellung von biologischen Waffen in Svertlovsk (ehemalige UdSSR) erkrankten 94 Personen an Lungenmilzbrand, von denen 64 verstarben.

### **Diagnostik**

Das dargestellte Fließdiagramm (Abb. 1) ist eine Orientierung zur Diagnostik von *B. anthracis* mit den 3 Säulen der Diagnostik – bakterioskopischer, kultureller und molekularbiologischer (basierend auf DNA-Sequenzen und/oder spezifischen Antigenen) Nachweis. Als Untersuchungsmaterialien sind Beispiele für Umwelt- und klinische Proben genannt. Bei klinischen Proben reicht bei entsprechenden Symptomen die Bestätigung mittels molekularbiologischer Nachweismethoden aus. Bei Umweltproben sollten positive molekularbiologische Ergebnisse auf jeden Fall durch die Kultivierung bestätigt werden. Bei Anschlägen mit biologischen Waffen muss damit gerechnet werden, dass die verwendeten Erreger Antibiotikaresistenzen aufweisen [5]. Zudem könnten auch gentechnisch veränderte *B. anthracis*-Stämme für den Einsatz als Biowaffe hergestellt werden [6].

**Bakterioskopie.** Für die Bakterioskopie wird die Elektronenmikroskopie (EM) und hier vor allem die Transmissions-Elektronenmikroskopie (TEM) als Schnellverfahren empfohlen [7]. Weiterhin sollten die Gram-Färbung zur Beurteilung des Gram-Verhaltens und die Rakette-Färbung zum Nachweis von Sporen durchgeführt werden. Bei *B. anthracis* handelt es sich um grampositive, plumpe Stäbchen mit meist eckigen Enden. In vitro bilden die Bakterien lange Ketten (Abb. 2), in vivo liegen sie oft einzeln. Die Sporen sitzen meist mittelständig und treiben das Stäbchen nicht auf. Bei der Rakette-Färbung sind die Sporen grün, die vegetativen Zellen rot angefärbt [2].

**Kultur.** *B. anthracis* ist unbeweglich und wächst in Flüssigkulturen mit Bodensatz bei klarem Überstand. Beim Aufschüteln der Flüssigkultur nimmt der Boden-

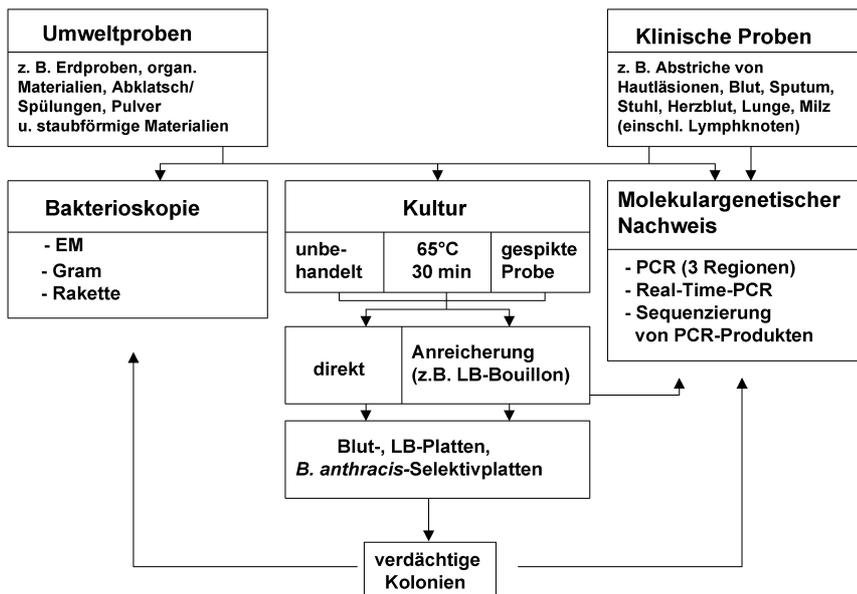


Abb. 1 ▲ Fließdiagramm zur Diagnostik von *B. anthracis* aus Umweltproben und klinischen Proben. Die Erklärung erfolgt im Text

satz ein wolkiges Aussehen an. Nach Bebrütung bei 37°C über Nacht bildet *B. anthracis* auf festen Nährböden Kolonien mit einem Durchmesser von 2–5 mm und sehr zäher Konsistenz („Eischnee-Effekt“ beim Abheben der Kolonien). Die rauen, trockenen Kolonien, deren Oberfläche grauweiß und matt glänzend ist, bilden am Rand parallele Bakterienfäden, die bogenartig zur Kolonie zurücklaufen. Dieses im Durchlichtmikroskop sichtbare sog. „Medusenhaupt“ tritt allerdings auch bei verwandten *Bacillus*-Arten auf. *B. anthracis*-Kolonien zeigen im Gegensatz zu den meisten Stämmen der *Bacillus cereus*-Gruppe keine Hämolyse auf Blutplatten.

Das Probenmaterial sollte für die kulturelle Diagnostik in mindestens 3 Aliquots unterteilt werden. Einmal wird das Probenmaterial unbehandelt in ein Anreicherungsmedium, wie z. B. LB-Bouillon, und auf Nährmedien (Blut-, LB-Platten und *B. anthracis*-Selektivplatten) gegeben. Eine weitere Probe wird 30 min bei 65–70°C inkubiert und danach weiterbearbeitet. Die Hitzeinaktivierung führt zur Abtötung vegetativer Zellen (vegetative *B. anthracis*, auch Begleitflora in z. B. Erdproben) und zum Auskeimen möglicher vorhandener Sporen. Der Zusatz einer definierten Menge an Sporen eines avirulenten *B. anthracis*-Stammes zu einer dritten Probe wird als „spiken“ bezeichnet. Hiermit wird überprüft, ob von dem Untersuchungs-

material eine mögliche Hemmung des Wachstums ausgeht. Wenn in der Umweltprobe (z. B. Erde) hohe Keimdichten zu erwarten sind, sollte auch die gespikete Probe für 30 min auf 65–70°C erwärmt werden. Verdächtige Kolonien aus den Direktausstrichen oder aus den Anreicherungen werden weiter differenziert: Lyse durch Gamma-Phagen [8], Wachstum auf unterschiedlichen Selektivplatten (s. unten) und Penicillinempfindlichkeit. Es kommen folgende Selektivplatten für *B. anthracis* und andere Arten der *B. cereus*-Gruppe zur Anwendung:

- ▶ Blut-Trimethoprim-Agar (mit Trimethoprim, Sulfamethoxazol, Polymyxin; kommerziell erhältlich): semiselektive Anreicherung von *B. anthracis* und *B. cereus*,

- ▶ Chromogen-Agar (kommerziell erhältlich): zur Abgrenzung von *B. anthracis* von *B. cereus* und *B. thuringiensis*; *B. anthracis* zeigt eine negative Phospholipase-C-Reaktion,
- ▶ Cereus-Selektiv-Agar nach Mossel (mit Mannitol, Eigelb, Polymyxin; kommerziell erhältlich): für *B. cereus*-Gruppe; fehlende Mannitvergärung und positive Lezithinase-Reaktion,
- ▶ PLET-Agar (mit Polymyxin, Lysozym, EDTA, Thalliumacetat): grenzt *B. anthracis* von anderen Mitgliedern der *B. cereus*-Gruppe ab, allerdings können andere *Bacillus* spp. (z.B. *B. megaterium*) ebenfalls wachsen!

**Molekularbiologie.** Zur Beschleunigung der Diagnostik und zum Nachweis der Virulenz müssen neben den klassischen mikrobiologischen Methoden molekulargenetische Nachweise erbracht werden. Der molekulargenetische Nachweis von *B. anthracis* wird hauptsächlich mittels PCR geführt. Er kann von der Originalprobe [9], von der Anreicherung oder von verdächtigen Kolonien vorgenommen werden. Wenn das Material ohne vorhergehende DNA-Präparation direkt aus der Anreicherung eingesetzt wird, muss durch Zugabe eines Spikes als Positivkontrolle eine Hemmung der PCR durch Inhibitoren in der Originalprobe oder durch zu hohe Keimdichten ausgeschlossen werden. Wichtig für den PCR-Nachweis ist, dass sowohl DNA-Sequenzen aus dem Bakterienchromosom (*rpoB*-Gen für RNA-Polymerase) als auch aus den beiden Plasmiden, die die Virulenz kodieren, nachgewiesen werden müssen [10]. Auf dem Plasmid pXO1 liegen unter anderem die Gene für den

Abb. 2 ▶ Gram-Färbung von Milzbrandbakterien, die auf Blutagar kultiviert wurden (Vergr. 1.000:1). Die Abbildung wurde einer Internetseite der CDC entnommen (Laboratory Response Network, LRN; Level A Laboratory Procedures for Identification of *Bacillus anthracis*, <http://www.bt.cdc.gov/agent/anthrax/LevelAProtocol/anthraxlabprotocol.pdf>)



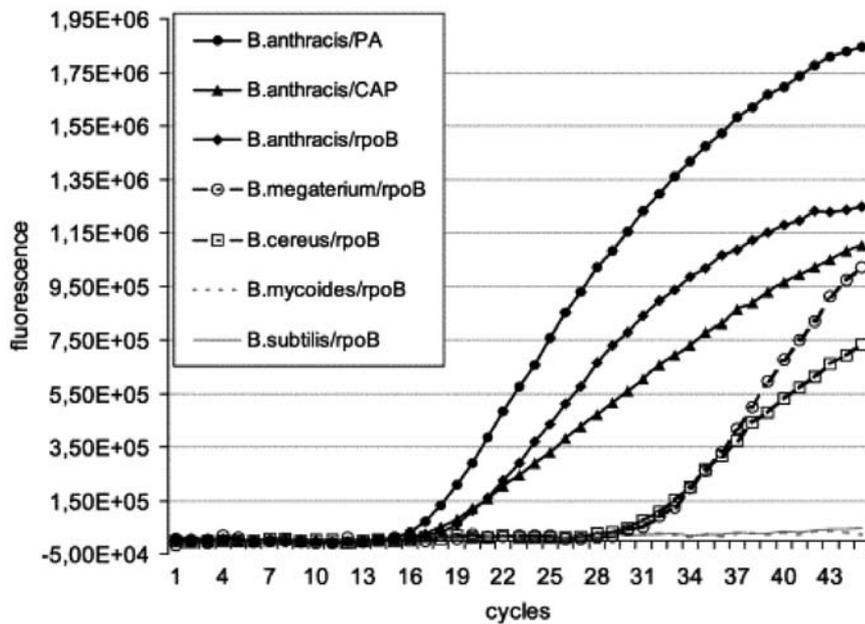


Abb. 3 ▲ *B. anthracis*-spezifische Real-Time-PCR mit Bakterienkolonien. Kolonien verschiedener *Bacillus*-Arten wurden mit sterilen Zahnstochern gepickt und in den vorgelegten PCR-Mix überführt. Die Bakterien wurden auf das Vorhandensein der *pag*- und *capC*-Gene auf den Plasmiden pXO1 bzw. pXO2 sowie auf das chromosomale *rpoB*-Gen überprüft. Für die Nicht-Anthraxis-Stämme ist nur die *rpoB*-PCR gezeigt; mit *pag* und *capC* waren die Stämme negativ. In der *rpoB*-PCR wird das Fluoreszenzsignal bei *B. anthracis* schon nach etwa 16 Zyklen detektiert, während es bei *B. mycooides* und *B. subtilis* gar nicht und bei *B. megaterium* und *B. cereus* erst nach etwa 28 Zyklen detektiert wird. Die Abbildung wurde entnommen aus Referenz [10]

Ödem- und Letalfaktor sowie das Gen für das „schützende Antigen“ (protective antigen, PA). Auf dem Plasmid pXO2 liegen die Gene für die Kapselbildung (CAP). Die Real-Time-PCR für PA und CAP ist spezifisch für *B. anthracis*-Isolate, während *rpoB* auch mit anderen *Bacillus*-Arten positive Signale, allerdings verzögert, liefern kann [10] (Abb. 3). Die meisten der bisher eingesetzten Antigennachweisverfahren weisen keine hohe Spezifität für *B. anthracis* auf, da kreuzreagierende Antigene zwischen verschiedenen *Bacillus* spp. existieren. Die Thermopräzipitation nach Ascoli [11] ist weltweit das am häufigsten angewandte Schnellverfahren zum Antigennachweis von Milzbrand. Der Test ist aber nur bedingt geeignet, da er in klinischen Materialien zu falsch negativen und in Umweltproben zu falsch positiven Ergebnissen führen kann. Kürzlich wurde ein relativ spezifischer und sensitiver Test entwickelt, der Kapsel- und Zellwand-Antigene von *B. anthracis* mittels Fluoreszenz-markierter monoklonaler Antikörper nachweist [12].

## *Yersinia pestis* – Pest

### Epidemiologie

Bei der Pest handelt es sich um eine Zoonose, die durch Flöhe übertragen wird. *Y. pestis* ist gegenwärtig in Naturherden Afrikas (z. B. Kongo, Tansania, Sambia, Madagaskar), Asiens (Kasachstan, Mongolei, Vietnam, Myanmar) und Amerikas (Peru, Kolumbien, Südwesten der USA) teilweise endemisch verbreitet. In Westeuropa gibt es keine Pestherde. Weltweit wurden 1999 2.603 Pestfälle registriert, wovon 212 tödlich endeten (Quelle: WHO). Allein in den USA treten durchschnittlich 10 Fälle pro Jahr auf. Bei der aktuellen Pestepidemie im Kongo wurden schon im 1. Quartal 2002 300 Fälle registriert. Zum ersten Mal seit 4 Jahrzehnten ist in diesem Jahr (2003) in Algerien die Pest ausgebrochen. In den letzten Jahren wurde eine Zunahme der Pesterkrankungen beobachtet, wobei das Auftreten multiresistenter Stämme besonders problematisch ist [13]. Der Erreger kann in Flöhen, im Erdboden, auf Kleidung, in Wasser und auf Lebensmitteln mehrere Wochen überleben, ist aber anfällig gegen Sonnenlicht und

hohe Temperaturen (s. auch den Beitrag von A. Rakin in diesem Heft).

### Klinik

Infektionen mit *Y. pestis* manifestieren sich klinisch als Beulen- (Bubonen)pest, Pestseptikämie und Lungenpest. Durch den Stich eines infizierten Flohs werden Tausende Bakterien unter die Haut inokuliert. Die Bakterien gelangen durch die Lymphbahnen zu den regionalen Lymphknoten, wo sie sich schnell vermehren und unter zunehmender Verschlechterung des Allgemeinzustandes und hohem Fieber zu einer Lymphknotenentzündung mit bis zu taubenei-großen Schwellungen (Bubonen) führen. Die Inkubationszeit beträgt 2–6 Tage. Unbehandelt verläuft die Beulenpest in über 50% der Fälle tödlich. Bei fehlender oder inadäquater antimikrobieller Therapie kann die Bubonenpest in eine sekundäre Pestseptikämie mit Generalisation in verschiedene Organe übergehen. Wenn die Lunge betroffen ist, entsteht eine hochinfektiöse sekundäre Pestpneumonie.

Bei dieser durch Aerosole übertragbaren Form wird die Infektionsdosis auf 1–10 Erreger geschätzt (s. A. Rakin in diesem Heft), andere Quellen sprechen von bis zu 100–500 Erregern [1]. Die primäre Pestpneumonie tritt innerhalb von 1–3 Tagen nach Inhalation von Bakterien akut und fulminant ein. Klinisch finden sich Abgeschlagenheit, hohes Fieber, Schüttelfrost, Kopf- und Muskelschmerzen und Husten mit Produktion eines spärlichen blutigen Sputums. Ohne oder bei zu spät einsetzender Behandlung beträgt die Letalität annähernd 100% [14]. Der Tod resultiert aufgrund eines akuten Atemversagens, Kreislaufkollaps und hämorrhagischen Diathese (Blutungsneigung). Dieses Krankheitsbild ist bei einem terroristischen Anschlag mittels Stäuben oder Aerosolen, aber aufgrund der hohen Ansteckungsgefahr auch nach absichtlicher Verbreitung durch infizierte Selbstmordattentäter zu erwarten.

### Diagnostik

**Bakterioskopie und Kultur.** *Y. pestis* ist ein kleines, pleomorphes, gramnegatives bipolares Stäbchen. Um die Bipolarität darzustellen, eignet sich die Wayson-, Wright- oder auch Giemsa-Färbung

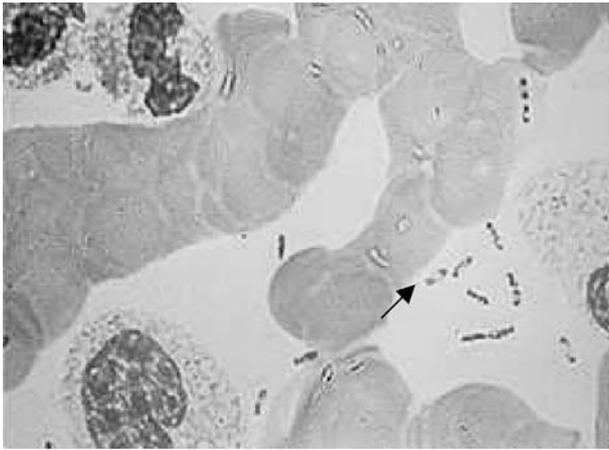


Abb. 4 ◀ **Blutausstrich mit *Y. pestis*, Wayson-Färbung, Vergr. 1.000:1. Die Bipolarität oder „Sicherheitsnadel-form“ der Bakterien ist zu erkennen (s. Pfeil). Die Abbildung wurde einer Internetseite der CDC entnommen (<http://www.cdc.gov/ncidod/dvbid/plague/bacterium.htm>)**

(Abb. 4). *Y. pestis* wächst schneller bei 28°C als bei 37°C und sollte mindestens 48 h kultiviert werden. Das Untersuchungsmaterial sollte einmal direkt und über die Anreicherungen (LB-Bouillon, mod. CIN) auf Plattenmedien gebracht werden. *Y. pestis* spaltet sich beim Wachstum auf Nährmedien häufig in mehrere Kolonieförmigkeiten auf und wächst auf Blutplatten ohne Hämolyse. Auf modifiziertem CIN-Agar kann man virulente Isolate (Vorhandensein des Virulenzplasmides) durch kleineres Wachstum bei 37°C von avirulenten Isolaten (größere Kolonieförmigkeit) unterscheiden. Auf dem Kongorot/Galaktose-Agar wachsen virulente Isolate als rot pigmentierte Kolonien. Wichtige Hinweise auf *Y. pestis* zur Abgrenzung gegenüber *Y. pseudotuberculosis* sind das Fehlen der Motilität bei 28°C und die Hydrolyse von Harnstoff.

**Molekularbiologie.** Verdächtige Kolonien sollten aus Zeitgründen mit molekular-genetischen Nachweismethoden, wie z. B. der (Real-Time-)PCR, identifiziert werden. Bei virulenten Stämmen können im Allgemeinen DNA-Sequenzen der 3 Plasmide (ca. 75 kb großes Virulenzplasmid pYV, ca. 110 kb großes Plasmid pTOX, ca. 9,5 kb großes Plasmid pPCP1) und des Chromosoms nachgewiesen werden [15]. Das Virulenzplasmid ist auch bei *Y. pseudotuberculosis* und *Y. enterocolitica* vorhanden, die beiden anderen Plasmide sind spezifisch für *Y. pestis*. Das 110 kb Plasmid ist unter anderem für die Bildung des Kapselantigens (Fra1 oder F1) verantwortlich, das in Kultur jedoch nur bei 37°C synthetisiert wird. Das Kapselantigen kann serologisch mit einem chromatischen

Dipstick [16] oder durch Capture-ELISA nachgewiesen werden. Dieser serologische Nachweis muss vor allem bei einem negativen Befund bei Patienten mit Pestsymptomen durch einen kulturellen Befund bestätigt werden, da auch Isolate beschrieben wurden, die das F1-Kapselantigen nicht ausbilden [17].

### **Francisella tularensis – Tularämie, Hasenpest**

#### **Epidemiologie**

Der Erreger der Tularämie, *F. tularensis*, kommt in der gesamten nördlichen Hemisphäre (am häufigsten in den USA, Kanada, Skandinavien, Russland, Japan) in infizierten Tieren und in der Umwelt vor [18]. Im Wasser sind die Bakterien vermutlich mit Amöben assoziiert [19]. Klinisch relevant sind im Wesentlichen 2 Subspezies. In den USA und Kanada kommt vor allem *F. tularensis* ssp. *tularensis* (Jellison Typ A) vor. Diese Subspezies ist hochvirulent. Vorherrschend ist in Europa die weniger virulente Subspezies *F. tularensis* ssp. *holarctica* (Jellison Typ B). In Deutschland wurden nach dem 2. Weltkrieg noch 100–200 Erkrankungen jährlich erfasst. Heute werden pro Jahr nur noch wenige Fälle gemeldet (3 Fälle im Jahr 2001, 5 Fälle im Jahr 2002 [20]), aber eine hohe Dunkelziffer wird vermutet. Die Bakterien überleben wochenlang in Wasser, feuchtem Boden, Kadavern und Tierhäuten und jahrelang in gefrorenem Fleisch, können aber durch Hitze oder Desinfektionsmittel abgetötet werden [1]. *F. tularensis* hat ein breites Wirtsspektrum (über 150 verschiedene Säugetierarten) und kann vor allem unter freilebenden Nagern, beson-

ders Hasen, endemisch sein. Vektoren (Zecken, Stechmücken u. a. Arthropoden) spielen sowohl bei der Übertragung zwischen Wildtieren als auch auf den Menschen eine Rolle. Die Infektion erfolgt durch Kontakt mit infiziertem Tiermaterial über die intakte Haut, die Schleimhaut, den Verdauungstrakt (z. B. Verzehr von nicht ausreichend erhitztem, kontaminiertem Fleisch) und die Lunge (Inhalation von infektiösem Staub). Besondere Gefährdung im Umgang mit dem Erreger besteht für das Laborpersonal. Eine Übertragung von Mensch zu Mensch ist nicht bekannt. Da der Erreger natürlicherweise in ländlichen Gebieten vorkommt, kann das gehäufte Auftreten von Erkrankungen in der Stadt als ein Hinweis auf einen bioterroristischen Anschlag gelten.

#### **Klinik**

Für eine Infektion mit der virulenten Subspezies *tularensis* über die Atemwege oder die Haut sind nur 10–50 Organismen erforderlich. Die Inkubationszeit beträgt typischerweise 3–6 Tage (Spannbreite 1–21 Tage). Das klinische Bild der Tularämie richtet sich im Allgemeinen nach der Eintrittspforte des Erregers. Die häufigste Form ist die ulzeroglanduläre Tularämie, die durch den Stich oder Biss eines infizierten Vektors oder durch den Umgang mit infiziertem Fleisch und Eindringen des Erregers über kleine Hautverletzungen übertragen wird. Die Krankheit beginnt mit grippeähnlichen Symptomen, und an der Infektionsstelle bildet sich ein Geschwür. Von dort aus breiten sich die Bakterien über die Lymphknoten, die stark anschwellen, zu anderen Geweben und Organen aus. Selbst unbehandelt verläuft die ulzeroglanduläre Form selten tödlich (Mortalitätsrate unter 3%). Eine seltene Variante der ulzeroglandulären Krankheitsform ist die okuloglanduläre Tularämie, die auftritt, wenn die Bakterien mit den Fingern auf die Bindehaut übertragen werden. Die Aufnahme der Erreger mit infizierter Nahrung oder Trinkwasser führt zur oropharyngealen oder gastrointestinalen Tularämie. Erstere bedingt Rachen- und Mandelentzündungen, während die gastrointestinale Tularämie von leichtem Durchfall bis zu einer tödlichen Erkrankung mit Darmgeschwüren reichen kann. Eine akute Form der Erkrankung

ist die typhoidale Tularämie mit einer Mortalitätsrate von 30–60%, die nach Inhalation des Erregers auftritt und sich als Sepsis ohne Lymphadenopathie äußert. Die schwerste Form der Erkrankung ist die pulmonale Tularämie (z. B. Lungenentzündung), die ebenfalls nach Inhalation der Bakterien, aber auch als Komplikation der zuvor genannten Krankheitsformen auftreten kann [18]. Da *F. tularensis* in einem Biowaffenanschlag vermutlich als Aerosol angewandt würde, wären hauptsächlich die pulmonale und die typhoidale Form zu erwarten.

### Diagnostik

**Bakterioskopie und Kultur.** Bei *F. tularensis* handelt es sich um ein sehr kleines gramnegatives Stäbchen, das keine Sporen bildet und unbeweglich ist. Die Bakterien sind fakultativ intrazellulär und können im Phagosom von Makrophagen überleben [18]. Auf Nährböden wächst *F. tularensis* langsam und stellt höchste Wachstumsanforderungen. Die Anzucht ist unter Verwendung von Blut-Cystein-Agar oder koaguliertem Eidotternährboden möglich. Auch Blut- (Sheep blood agar, SBA), Cystein-supplementierte Agarplatten (Chocolate, Thayer-Martin) und Thioglycolat-Bouillon-Kultur eignen sich zur Kultivierung von *F. tularensis*. Nach 2- bis 7-tägiger aerober Bebrütung bei 37°C bilden sich runde, feuchte, opaque Kolonien. Auf Cystein-supplementierten Agarplatten wachsen kleine, feucht aussehende Kolonien mit Schwärzung des Agars.

**Molekularbiologie.** Der erste Test zur schnellen Identifikation durch Antigen-nachweis besteht in der direkten Fluoreszenz-Färbung mit Antikörpern oder der Objektträgeragglutination mit monospezifischem *F. tularensis*-Antiserum. Die serologische Differenzierung erlaubt jedoch keine Unterscheidung der Subspezies. Außerdem weist *F. tularensis* Antigengemeinschaften mit Brucellen, Salmonellen, Legionellen und *Y. enterocolitica* O:9 auf, die zu serologischen Kreuzreaktionen führen und u. U. die Diagnostik der Tularämie erschweren können. Ein kürzlich entwickelter Capture-ELISA für die Detektion des LPS mit monoklonalen Antikörpern und ein immunchromatographischer Schnelltest erlauben die spezifische Identifizierung

von *F. tularensis* ohne Kreuzreaktion mit anderen Antigenen [21]. Zum schnellen Nachweis von *F. tularensis* können ebenfalls molekulargenetische Nachweismethoden wie die PCR eingesetzt werden [21], mit denen der Erreger auch in kontaminiertem Wasser nachgewiesen werden kann [22].

## **Burkholderia mallei – Rotz und Burkholderia pseudomallei – Melioidose**

### **B. mallei: Epidemiologie**

Der von *B. mallei* (früher: *Pseudomonas mallei*) verursachte Rotz ist eine Infektionskrankheit der Equiden, die durch Kontakt übertragen und durch eine hohe Tierdichte begünstigt wird. Heutzutage ist der Pferderotz in Westeuropa und Nordamerika ausgerottet, aber endemische Herde wurden für die Staaten der früheren UdSSR, die Türkei, Irak, Iran, Mongolei, China, Mexiko und Brasilien beschrieben. Menschen werden in der Regel durch Kontakt mit infizierten Pferden, deren Ausscheidungen oder Produkten (Fleisch) angesteckt. Der Erreger wird durch kleine Verletzungen wie Riss- oder Schürfwunden aufgenommen.

Infektionen mit Aerosolen verlaufen mit hoher Letalität. Eine Übertragung von Mensch zu Mensch wurde nur in wenigen Fällen beschrieben. In den letzten Jahrzehnten wurde nur ein Fall beim Menschen (Laborunfall) in der Literatur dokumentiert [23]. Der Erreger ist empfindlich gegenüber externen Faktoren wie Austrocknung, Sonnenlicht oder Wärme, kann aber an dunklen und feuchten Orten monatelang überleben.

### **B. mallei: Klinik**

Die Infektionsdosis ist sehr gering. Die Inkubationszeit beträgt bis zu 14 Tagen. Das Anfangsstadium der Erkrankung ist gekennzeichnet durch Appetitlosigkeit, Fieber, Schüttelfrost oder Übelkeit und Gliederschmerzen. Im fortgeschrittenen Krankheitsstadium entwickeln sich, insbesondere subkutan und in den Muskeln, Granulationsgeschwülste und Abszesse. Kurz vor dem Tod ist ein Pustelausschlag mit Hautblutungen und Knötchen zu beobachten. Der Patient befindet sich in der Regel in einem allgemeinen Erschöpfungszustand und

stirbt unbehandelt innerhalb von 6–32 Tagen. Die chronische Rotzkrankung verläuft untypisch und kann jederzeit, sogar nach 15 Jahren, wieder aufbrechen und akut werden.

### **B. pseudomallei: Epidemiologie**

*B. pseudomallei* (früher: *Pseudomonas pseudomallei*), der Erreger der Melioidose, ist ein Saprophyt, der in Wasser (Reisfeldern), Erdreich und feuchten Orten monatelang überleben kann [24]. Hauptverbreitungsgebiete sind Südostasien (Thailand, Malaysia, Vietnam), Singapur und Nord-Australien. In Thailand treten pro Jahr 2.000–5.000 Fälle auf. In Europa ist die Melioidose eine seltene Reiseerkrankung. Seit 1994 wurden im deutschsprachigen Raum 7 Fälle registriert, die nach Reisen in die oben genannten Länder auftraten. Die Infektion erfolgt in der Regel über kleine Verletzungen wie Riss- oder Schürfwunden, z. B. beim Baden in Oberflächengewässern. Auch eine Infektion über Aerosole ist möglich. Eine Übertragung von Mensch zu Mensch über Blut oder andere Körperflüssigkeiten wurde nur in vereinzelten Fällen beschrieben [25].

### **B. pseudomallei: Klinik**

*B. pseudomallei* ist ein opportunistischer Erreger, der häufiger chronisch Kranke mit Grunderkrankungen, wie z. B. Diabetes, Leukämie, Lungen- und Nierenerkrankungen, infiziert. Die Infektionsdosis ist vermutlich gering. Im Tierversuch am Hamster sind 1–10 Bakterien tödlich, wenn sie als Aerosol verabreicht werden [1]. Die Inkubationszeit beträgt 1–21 Tage (durchschnittlich 9 Tage). Der Krankheitsverlauf reicht von einem asymptomatischen Verlauf bis zu einem akuten Krankheitsbild; ca. 12% der Infektionen verlaufen chronisch. Der milde, subklinische Verlauf mit erkältungsähnlichen Symptomen dürfte in Endemiegebieten die häufigste Form sein, wo 20% der einheimischen Bevölkerung Serokonversion zeigen. Der akute Verlauf äußert sich am häufigsten in einer Pneumonie, weitere häufige Symptome sind Haut- und Weichteilabszesse, Knochenentzündung sowie Läsionen bei verschiedenen Organen. Die schwerste Verlaufsform der Melioidose, verbunden mit einer sehr hohen Mortalitätsrate, ist die Sepsis. Etwa 15% der Pa-

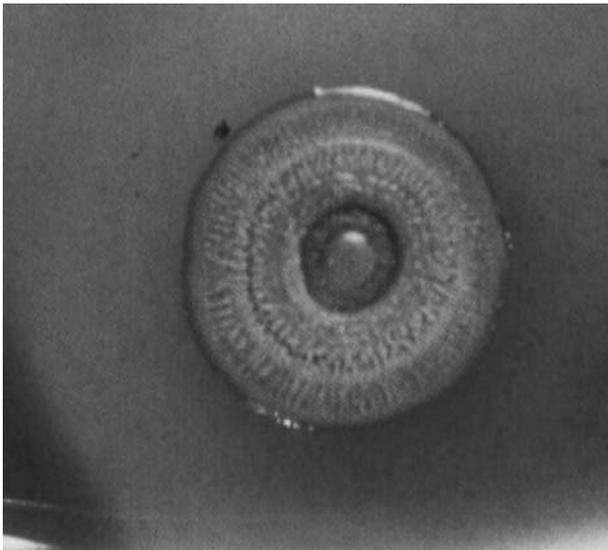


Abb. 5 ◀ **Kolonie von *B. pseudomallei* auf Blutagar. Quelle: Prof. M. Krüger, Universität Leipzig**

tienten erleiden einen oder sogar mehrere Rückfälle [26]. Latente Infektionen können bei Personen, die sich zuvor symptomlos in endemischen Gebieten infiziert hatten, nach Jahren wieder aufbrechen. Beschrieben wurde der Fall eines Patienten, der erst 26 Jahre nach der ersten Exposition erkrankte [27].

Da eine Verbreitung von *B. mallei* und *B. pseudomallei* als Aerosol effizient wäre und die Krankheitsbilder in der westlichen Welt kaum bekannt sind, werden die beiden Erreger als potentielle B-Waffen angesehen. Während des 1. Weltkrieges wurden vermutlich Pferde und Maultiere mit Rotz infiziert, und im 2. Weltkrieg soll der Erreger zur vorsätzlichen Infektion von Pferden, Zivilisten und Kriegsgefangenen eingesetzt worden sein [1]. Rotzkrankungen beim Menschen, die nicht im Zusammenhang mit tierischen Erkrankungen stehen, sprechen für einen bioterroristischen Anschlag.

#### ***B. mallei* und *B. pseudomallei*: Diagnostik**

**Bakterioskopie und Kultur.** *B. mallei* und *B. pseudomallei* sind pleomorphe, gramnegative, bipolare Stäbchen mit abgerundeten Enden. Beide Erreger bilden eine Kapsel aus Exopolysaccharid. Ein wichtiges Merkmal zur Differenzierung von *B. mallei* gegenüber *B. pseudomallei* ist die Unbeweglichkeit von *B. mallei*. Typische Kolonien von *B. mallei* und *B. pseudomallei* sind weißlich bis cremefarben. Auf Blutagar ist keine Hämolyse feststellbar. Für die Kultivierung von

*B. mallei* eignen sich z. B. Blut- und Kartoffel-Dextrose-Agar mit Zusatz von 3–4% Glycerin. Die Kolonien wachsen glatt, feucht-zähklebrig und neigen zum Zerfließen. Bei stark kontaminierten Proben ist eine Vorbehandlung mit Penicillin erforderlich, und die Probe sollte auf Selektivmedium mit Polymyxin E, Bacitracin und Actidione ausgestrichen werden. Verschiedene Farbstoffe wie Kristallviolett, Malachitgrün oder Brillantgrün unterdrücken das Wachstum grampositiver Organismen.

*B. pseudomallei* ist kulturell weniger anspruchsvoll. Für seine Anzucht aus klinischen Proben können Standardkulturmedien wie Blut-, MacConkey- oder Cystein-Laktose-Elektrolyt-Mangel-Agar und Blutkulturmedium verwendet werden. Ältere Kolonien (72–96 h) sind gewellt, trocken und riechen erdig (Abb. 5). Hervorzuheben ist die auffallende Variabilität der Kulturmorphologie. Die Verwendung von Selektivmedien wird für die Anzucht von Kulturen aus dem Respirationstrakt oder Umweltproben empfohlen, um die Begleitflora zu unterdrücken (Ashdown's Agar [28]).

**Molekularbiologie.** Ein Problem ist die Differenzierung von *B. mallei* und *B. pseudomallei* auf der molekulargenetischen Ebene. Die Sequenz des 16S-rRNA-Gens, das in der Bakteriologie häufig für die Differenzierung von Arten eingesetzt wird, ist bei *B. mallei* und *B. pseudomallei* identisch. Auf Basis des Flagellin C-Gens konnte eine sensitive und spezifische PCR mit anschließender Restriktionsanalyse zum Nachweis von

*B. mallei*, *B. pseudomallei* und dem nahe verwandten apathogenen Bodenbakterium *B. thailandensis* entwickelt und evaluiert werden [29]. Eine Diskriminierung erfolgt optimal mittels PCR und Sequenzierung [30] und ist in den meisten Fällen über Restriktionsenzymverdau der Amplikone möglich. Ein spezifischer Nachweis gelingt auch mit einem temperenten Phagen aus der nahe verwandten apathogenen Spezies *Burkholderia thailandensis*, der nur auf *B. mallei*, aber nicht auf *B. pseudomallei* Plaques bildet [31]. Die Latexagglutination [32] von Kolonien gilt als schnelle Methode zum Antigennachweis. Mittels Immunfluoreszenzmikroskopie [33] und Capture-ELISA, basierend auf monoklonalen Antikörpern gegen verschiedene Antigene [34], können *B. mallei* und *B. pseudomallei* direkt aus Reinkulturen und klinischen Proben (z. B. Ausscheidungen, Biopsien, Rachenabstriche, Blut) nachgewiesen werden.

## ***Brucella* spp. – Brucellose**

### **Epidemiologie**

Die Brucellose des Menschen kommt im Mittelmeerraum, in Südosteuropa (Balkanstaaten, Bulgarien), in den Anrainerstaaten des arabischen Golfs, in Afrika, Zentral- und Südamerika sowie in Teilen Asiens (Indien) endemisch vor. Im Jahr treten weltweit etwa 500.000 Fälle auf. In Deutschland wurden im Jahr 2001 25 Fälle, im Jahr 2002 34 Fälle gemeldet [20]. In Industrienationen ist die Brucellose eine Infektionskrankheit einzelner Berufsgruppen (Schlachter, Landwirte, Schäfer, Viehzüchter, Veterinäre, Arbeiter in Molkereibetrieben, Laborpersonal); Touristen in Endemiegebieten können nach Verzehr nicht pasteurisierter Milchprodukte erkranken. Die Erreger sind empfindlich gegen Sonnenlicht, Hitze und Desinfektionsmittel, überleben jedoch bis zu mehreren Monaten bei Umgebungstemperatur und hoher Luftfeuchtigkeit in Staub, Wasser, Erde oder Schlamm. Die Übertragung erfolgt im Allgemeinen durch Milchprodukte (Schafs- und Ziegenkäse aus nicht pasteurisierter Milch), in Endemiegebieten aufgrund von Tierausscheidungen auch durch die Haut oder durch Inhalation der hochinfektösen Aerosole. Eine Übertragung von Mensch zu Mensch wurde nur sehr selten beobachtet [35, 36].

## Klinik

Die Infektionsdosis bei Aerosolen wird auf 10–100 Bakterien geschätzt [1]. Die durchschnittliche Inkubationszeit beträgt 2–3 Wochen [36] mit einer Spanne von 5–60 Tagen. Die Brucellose ist meist eine Allgemeininfektion ohne spezifische klinische Merkmale. 90% der Infektionen verlaufen subklinisch und werden nur über den Antikörperrnachweis erkannt. 98% aller Erkrankten leiden an Fieber, das einen diurnalen Verlauf zeigt. Dabei tritt am Nachmittag und Abend Fieber mit erhöhten Werten auf, die morgens in den Normbereich zurückkehren (Schwankung zwischen 37,5°C und mehr als 40°C). Diese Fieberepisoden mit einer Dauer von 7–21 Tagen werden von fieberfreien Intervallen unterbrochen, weshalb man auch von *febris undulans* (undulierendes Fieber) spricht [36]. Durch diese Fieberschwankungen wird oft die Fehldiagnose Malaria gestellt. Weitere häufige Symptome sind Schüttelfrost, Kopf-, Glieder-, Gelenkschmerzen, Lumbalgien, Appetitlosigkeit, Müdigkeit und Abgeschlagenheit. Auch unbehandelt liegt die Mortalität unter 5%. Todesfälle treten vor allem nach Komplikationen wie Endokarditis oder Meningitis auf. Trotz intensiver Therapiemaßnahmen erleiden 5% aller Brucellosepatienten einen Rückfall, der bis zu 2 Jahre nach der Erkrankung auftreten kann. Die Krankheitsdauer beträgt im Allgemeinen Wochen bis Monate, aber auch chronische Verläufe mit einer Krankheitsdauer von mehr als einem Jahr sind bekannt. Humanpathogene Arten, die beim Menschen eine Brucellose verursachen, sind in der Reihenfolge der Krankheitshäufigkeit *B. melitensis* (Maltafieber; höchste Pathogenität; Übertragung durch Ziegen, Schafe, Kamele; in 3–6% aller Fälle letal), *B. abortus* (Morbus Bang, Todesfälle selten), *B. suis* und in seltenen Fällen *B. canis*.

Brucellen wurden zwar als erste Erreger im damaligen Offensivwaffenprogramm der USA waffenfähig gemacht, aber mittlerweile vernichtet. Die Nutzung von Brucellen für einen bioterroristischen Anschlag ist eher unwahrscheinlich, da sie zwar zu hoher Morbidität, aber geringer Mortalität führen. Sie bleiben jedoch eine Bedrohung, da die Krankheit lange dauert und den Erkrankten schwächt. Große Aerosolmengen könnten die Inkubationszeit verkür-

zen und die klinische Erkrankungsrate erhöhen [1]. Außerdem könnte der Erreger zur Kontamination von Lebensmitteln (z. B. Milch) benutzt werden.

## Diagnostik

**Bakterioskopie und Kultur.** Brucellen sind gramnegative, kleine, kokkoide, unbewegliche Stäbchen ohne Kapsel. Für das Wachstum der fakultativ intrazellulären Bakterien ist teilweise eine erhöhte CO<sub>2</sub>-Konzentration (5–10%) erforderlich. Für die kulturelle Anzucht benötigten Brucellen sehr komplex zusammengesetzte Nährmedien. Als Wachstumsfaktor und Hauptenergielieferant gilt der vierwertige Alkohol Erythritol. Im Idealfall können Brucellen bereits nach 2- bis 4-tägiger Bebrütungszeit bei 37°C nachgewiesen werden, in Blutkulturen aber erst nach bis zu 3 Wochen. Um eine mögliche Begleitflora zu unterdrücken, sollten zur Anzucht antibiotikahaltige Selektivmedien (u. a. mit Bacitracin, Polymyxin B, Vancomycin) auf der Basis eines Serum-Dextrose-Agars (Farrell's SDA-Medium) verwendet werden. Auf diesem Agar wachsen Brucellen als runde, konvexe Kolonien mit einer schwach glänzenden Oberfläche und einer honiggelben Farbe.

**Molekularbiologie.** Mithilfe molekulargenetischer Techniken wie der PCR lassen sich die Brucellen mit hoher Sensitivität und Spezifität nachweisen. Etabliert hat sich die AMOS-PCR [37], mit der sich mittels eines Sets von 5 Primern verschiedene Biovare von *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. ovis* und *B. suis* nachweisen lassen. Auch eine Real-Time-PCR ist verfügbar [38]. Aus Reinkulturen kann mittels Agglutination das LPS-Antigen nachgewiesen werden. Immunfluoreszenztechniken können verwendet werden, um das Antigen direkt im Präparat sichtbar zu machen.

## *Coxiella burnetii* – Q-Fieber

### Epidemiologie

Das von *C. burnetii* verursachte Q-Fieber (Query Fever, Balkan-Grippe) ist eine mit Ausnahme von Neuseeland weltweit verbreitete Zoonose. Das relevante Reservoir stellen infizierte Paarhufer (Schafe, Rinder, Ziegen) dar, darüber hinaus auch Katzen, Hunde, Kaninchen, Wildtiere und Vögel. Wichtige Vek-

toren sind Zecken und andere Arthropoden. Bei infizierten Tieren verläuft die Krankheit meist asymptomatisch. Insbesondere Plazenta, Fruchtwasser und die Ausscheidungen solcher Tiere sind für den Menschen hochinfektiös. Gefährdet sind daher Personen, die engen Umgang mit Tieren oder ihren Produkten haben (z. B. Schlachter, Tierfellverarbeiter) sowie Laborpersonal [39]. In Deutschland wurden im Jahr 2001 292 Fälle und im Jahr 2002 184 Fälle gemeldet [20]. Die Fähigkeit von *C. burnetii*, Dauerformen zu bilden, und die hohe Resistenz gegenüber Austrocknung ermöglichen es, in Staub, auf Heu, Wolle usw. jahrelang zu überleben. Menschliche Infektionen durch Inhalation von infektiösem Staub wurden bis zu 2 km entfernt von infizierten Tierherden verzeichnet [40]. Übertragung durch Nahrungsmittel (Rohmilch) ist möglich, spielt aber eine untergeordnete Rolle. Zecken sind vor allem für die Übertragung zwischen Haus- und Wildtieren wichtig. Eine horizontale Übertragung von Mensch zu Mensch ist selten, allerdings ist eine vertikale Übertragung auf den Fötus möglich [39]. Aufgrund seiner Stabilität und der Möglichkeit der Verbreitung über die Luft wird *C. burnetii* zu den bioterroristisch relevanten Erregern gezählt. Da jedoch nur ein Teil der Infizierten erkrankt und die Mortalität gering ist, gilt der Erreger nur als „Kampfkraft schwächend“ (incapacitating agent).

### Klinik

Die geschätzte Infektionsdosis ist mit 1–10 Organismen sehr gering [41]. Die Inkubationszeit ist abhängig von der Infektionsdosis und beträgt in der Regel 2–3 Wochen. Zirka 50% aller Infektionen verlaufen asymptomatisch oder mit milden grippeähnlichen Symptomen und heilen spontan in 1–2 Wochen aus. Die akute Infektion beginnt meist mit hohem Fieber, Schüttelfrost und Muskelschmerzen. Im weiteren Verlauf können eine atypische Pneumonie oder eine granulomatöse Hepatitis auftreten. Seltene Komplikationen sind Myokarditis bzw. Perikarditis oder Meningoenzephalitis. Bei Infektionen in der Schwangerschaft kann es zum Abort oder zur Frühgeburt kommen. In etwa 1% aller Infektionen entsteht eine chronische Infektion. Der Erreger kann in vielen Organen

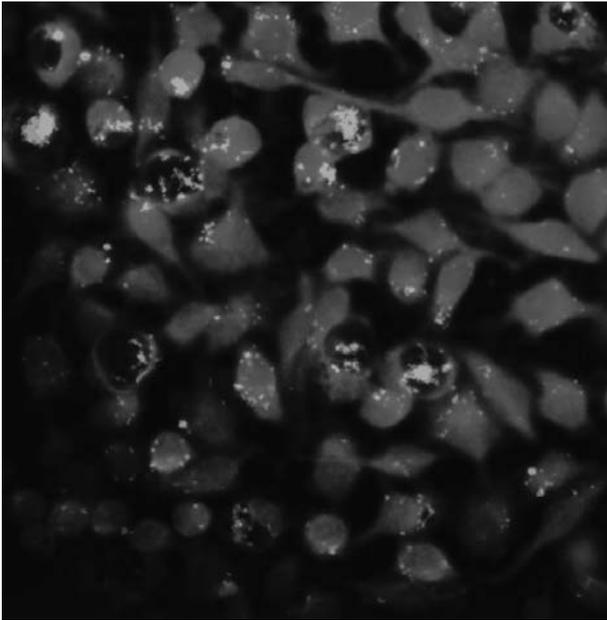


Abb. 6 ◀ „Shell vial assay“ zur Kultivierung intrazellulärer Coxiellen. Der Nachweis der Bakterien erfolgte durch direkte Immunfluoreszenz mit FITC-konjugierten monoklonalen Antikörpern gegen *C. burnetii* (Vergr. 870:1). Die Abbildung wurde entnommen aus Referenz [43]

persistieren. Die häufigste Organmanifestation ist die Q-Fieber-Endokarditis, die unbehandelt eine hohe Letalität aufweist, aber fast nur bei vorbestehender Herzklappenerkrankung oder bei Immunsuppression entsteht [39]. Eine Endokarditis kann 6 Monate bis zu über 10 Jahre nach der Primärinfektion auftreten [40].

### Diagnostik

Coxiellen sind kleine, unbewegliche, polymorphe Bakterien mit gramnegativer Zellwand. Trotzdem lassen sie sich im Allgemeinen nicht mittels der Gram-Technik anfärben, weshalb normalerweise die Gimenez-Methode angewandt wird. Als obligat intrazelluläre Organismen können die Bakterien nur in Zellkultur kultiviert werden. Die Bakterien wachsen zwar langsam im Phagolysosom, können aber hohe intrazelluläre Dichten erreichen, ohne dass die Wirtszelle dadurch abgetötet wird. Ein komplexer intrazellulärer Zyklus führt zur Bildung Sporen-ähnlicher Dauerformen [42]. Aufgrund ihrer Lebensweise wurden die Coxiellen früher den Rickettsien zugeordnet. Neuere molekulargenetische Untersuchungen (16S rRNA) weisen aber auf eine nahe Verwandtschaft mit den Legionellen hin [39]. Aus klinischen Proben (Blut, Liquor, Knochenmark, Herzklappen, Leberbiopsien, Plazenta, Feten nach Abort) kann der Erreger isoliert und in Zellkultur kultiviert werden. Erregerhaltige Proben können

zur Inokulierung von Zell-Monolayern beim „shell vial assay“ benutzt werden [44] (Abb. 6). Nach 5–7 Tagen kann der langsam wachsende Erreger durch Gimenez-Färbung oder Immunfluoreszenz nachgewiesen werden. In Geweben kann der Erreger durch Immunoperoxidase-Färbung oder Capture-ELISA detektiert werden [43]. Der Erreger kann durch PCR auch in Milch, Gewebeproben, Zellkultur und Staub nachgewiesen werden [45, 46].

### *Rickettsia prowazekii* – Fleckfieber

#### Epidemiologie

Das von *R. prowazekii* verursachte Fleckfieber (epidemischer Typhus, Flecktyphus) kommt weltweit hauptsächlich in gemäßigten Klimazonen vor. Häufungen werden in Afrika und den Hochebenen Südamerikas beobachtet. Der Mensch ist neben einer im Osten der USA verbreiteten Eichhörnchenart das Hauptreservoir. Die Übertragung erfolgt vor allem durch Kleiderläuse. Der Erreger vermehrt sich im Magen-Darm-Trakt der Läuse. Zur Infektion des Menschen kommt es, wenn der rickettsienhaltige Kot durch Kratzen an der Bissstelle in die Haut gelangt [47]. Eine Ansteckung ist auch durch Inhalation von kontaminierten Läusefäzes möglich, da die Erreger dort mehrere Tage überlebensfähig sind [48]. Vom infizierten Menschen können die Erreger beim

Saugakt erneut von Läusen aufgenommen werden. Eine direkte Übertragung von Mensch zu Mensch ist nicht möglich. Ein Fleckfieberausbruch beruht auf der schnellen Übertragung von Mensch zu Mensch durch die infizierten Läuse. Die Läuse sterben innerhalb von 1–3 Wochen an der Infektion, ohne den Erreger an die Nachkommen weiterzugeben.

Fleckfieber tritt insbesondere bei engem Zusammenleben größerer Menschenmengen unter schlechten hygienischen Bedingungen seuchenartig auf. Es wird davon ausgegangen, dass im 1. Weltkrieg ca. 30 Millionen Menschen erkrankt waren und etwa 3 Millionen daran verstarben. Während des 2. Weltkrieges wurden darum systematische Hygienemaßnahmen (Entlausung) durchgeführt. Heutzutage tritt Fleckfieber noch in Kriegsgefangenenlagern oder in Flüchtlingslagern auf. Der größte Ausbruch seit dem 2. Weltkrieg trat 1997 in einem Flüchtlingslager in Burundi auf [49]. Der Erreger ist zwar sehr infektiös, und die Erkrankung verläuft unbehandelt oft letal, aber aufgrund der geringen Stabilität der Rickettsien außerhalb des Wirtes oder Vektors und der aufwändigen Anzucht und schwierigen Verbreitung (z. B. über infizierte Läuse oder Läusekot) ist ein Einsatz als bioterroristisches Agens eher unwahrscheinlich.

#### Klinik

Die Infektionsdosis ist nicht bekannt, und die Inkubationszeit beträgt in der Regel 1–2 Wochen. Die Erkrankung beginnt plötzlich mit starken Kopf- und Gliederschmerzen, Schüttelfrost und rasch ansteigendem hohem Fieber. Meist kommt es am 4.–6. Krankheitstag zum Auftreten eines in der Axillarregion beginnenden Exanthems (zunächst pinkfarbener, fleckenförmiger Hautausschlag), das sich auf den gesamten Körper mit Ausnahme von Gesicht, Handflächen und Fußsohlen ausbreitet und zunehmend dunkler wird. Bei Beteiligung des Gehirns im Rahmen einer Enzephalitis werden Benommenheit und Verwirrheitszustände, gelegentlich auch Taubheit oder Tinnitus beobachtet. Bei unkompliziertem Verlauf verschwinden die Symptome auch ohne Therapie nach ca. 2 Wochen. Ohne Behandlung kann es sowohl infolge der Enzephalitis als auch infolge eines Kreislaufversagens

bei schwerem Befall des Herzmuskels in 10–40% der Fälle zum Tod des Patienten (insbesondere alte Menschen) kommen. Viele Jahre nach der Ersterkrankung können durch die Persistenz des Erregers ohne Assoziation mit Läusen Rückfälle auftreten, die aber wesentlich milder verlaufen. Diese späte Form des Fleckfiebers wird als Brill-Zinser-Erkrankung bezeichnet [47].

## Diagnostik

Rickettsien sind kleine, unbewegliche, polymorphe Bakterien mit gramnegativer Zellwand. Trotzdem lassen sie sich nicht mittels der Gram-Technik anfärben, weshalb normalerweise die Gimenez- oder Giemsa-Methode angewandt wird [50]. Als obligat intrazelluläre Organismen können die Bakterien nur in Zellkultur kultiviert werden. Die Bakterien liegen frei im Zytoplasma vor, und ihre massive Replikation führt nach mehreren Tagen zum Absterben der infizierten Zellen und Freisetzung der Bakterien [51]. Aus verschiedenen Proben (Blut, Plasma, nekrotisches Gewebe, Hautbiopsie, Läuse) kann der Erreger isoliert und in Zellkultur vermehrt werden. Im „shell vial assay“ können die Bakterien durch Immunfluoreszenz, Giemsa- oder Gimenez-Färbung nachgewiesen werden. In infizierten Läusen (Umweltprobe) oder in klinischen Proben (z. B. Hautbiopsie mit Exanthem) kann der Erreger durch direkte Immunfluoreszenz mit monoklonalen Antikörpern nachgewiesen werden [52]. Der Erreger kann mittels PCR und evtl. anschließende Sequenzierung auch in infizierten Läusen, Zellkultur, Liquor, Hautbiopsien oder Blut diagnostiziert werden [50, 53].

## Literatur

- U.S. Army Medical Research Institute of Infectious Diseases (2001) USAMRIID'S Medical Management of Biological Casualties Handbook (Blue Book). <http://usamriid.de-trick.army.mil/education/bluebook.html>
- Böhm R (1995) Milzbrand. In: Blobel H, Schließer T (Hrsg) Handbuch der bakteriellen Infektionen bei Tieren, Band II, Teil 3, 2. Aufl. Gustav Fischer, Stuttgart
- Schmid G, Kaufmann A (2002) Anthrax in Europe: its epidemiology, clinical characteristics, and role in bioterrorism. *Clin Microbiol Infect* 8:479–488
- Cieslak TJ, Eitzen EMJ (1999) Clinical and epidemiologic principles of anthrax. *Emerg Infect Dis* 5:552–555
- Stepanov AV, Marinin LI, Pomerantsev AP, Staritsin NA (1996) Development of novel vaccines against anthrax in man. *J Biotechnol* 44:155–160
- Pomerantsev AP, Staritsin NA, Mockov Y, Marinin LI (1997) Expression of cereolysine AB genes in *Bacillus anthracis* vaccine strain ensures protection against experimental hemolytic anthrax infection. *Vaccine* 15:1846–1850
- Gelderblom HR, Philipp S (1995) Standardisierung in der elektronenmikroskopischen Virusdiagnostik (Rapid Viral Diagnosis, Ringversuche). *Bundesgesundheitsblatt* 38:55–58
- Brown ER, Cherry WB (1955) Specific identification of *Bacillus anthracis* by means of a variant bacteriophage. *J Infect Dis* 96:34–39
- Luna VA, King D, Davis C et al. (2003) Novel sample preparation method for safe and rapid detection of *Bacillus anthracis* spores in environmental powders and nasal swabs. *J Clin Microbiol* 41:1252–1255
- Ellerbrok H, Nattermann H, Ozel M et al. (2002) Rapid and sensitive identification of pathogenic and apathogenic *Bacillus anthracis* by real-time PCR. *FEMS Microbiol Lett* 214:51–59
- Ascoli A (1957) Die Präzipitation bei Milzbrand. *Zbl Bakt I Orig* 58:63–70
- De BK, Bragg SL, Sanden GN et al. (2002) A two-component direct fluorescent-antibody assay for rapid identification of *Bacillus anthracis*. *Emerg Infect Dis* 8:1060–1065
- Galimand M, Guiyoule A, Gerbaud G et al. (1997) Multidrug resistance in *Yersinia pestis* mediated by a transferable plasmid. *N Engl J Med* 337:677–680
- Perry RD, Fetherston JD (1997) *Yersinia pestis* – etiologic agent of plague. *Clin Microbiol Rev* 10:35–66
- Neubauer H, Meyer H, Prior J et al. (2000) A combination of different polymerase chain reaction (PCR) assays for the presumptive identification of *Yersinia pestis*. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 47:573–580
- Chanteau S, Rahalison L, Ralafiarisoa L et al. (2003) Development and testing of a rapid diagnostic test for bubonic and pneumonic plague. *Lancet* 361:211–216
- Friedlander AM, Welkos SL, Worsham PL et al. (1995) Relationship between virulence and immunity as revealed in recent studies of the F1 capsule of *Yersinia pestis*. *Clin Infect Dis* 21 [Suppl 2]:S178–181
- Ellis J, Oyston PC, Green M, Titball RW (2002) Tularemia. *Clin Microbiol Rev* 15:631–646
- Berdal BP, Mehl R, Meidell NK et al. (1996) Field investigations of tularemia in Norway. *FEMS Immunol Med Microbiol* 13:191–195
- Robert Koch-Institut (2003) Aktuelle Statistik meldepflichtiger Infektionskrankheiten. *Epidemiologisches Bulletin* 03/2003. [http://www.rki.de/INFEKT/EPIBULL/2003/03\\_03.PDF](http://www.rki.de/INFEKT/EPIBULL/2003/03_03.PDF)
- Grunow R, Spletstoesser W, McDonald S et al. (2000) Detection of *Francisella tularensis* in biological specimens using a capture enzyme-linked immunosorbent assay, an immunochromatographic handheld assay, and a PCR. *Clin Diagn Lab Immunol* 7:86–90
- Berdal BP, Mehl R, Haaheim H et al. (2000) Field detection of *Francisella tularensis*. *Scand J Infect Dis* 32:287–291
- Srinivasan A, Kraus CN, DeShazer D et al. (2001) Glanders in a military research microbiologist. *N Engl J Med* 345:256–258
- Wuthiekanun V, Smith MD, White NJ (1995) Survival of *Burkholderia pseudomallei* in the absence of nutrients. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 89:491
- White NJ (2003) Melioidosis. *Lancet* 361:1715–1722
- Chaowagul W, Suputtamongkol Y, Dance DA et al. (1993) Relapse in melioidosis: incidence and risk factors. *J Infect Dis* 168:1181–1185
- Mays EE, Ricketts EA (1975) Melioidosis: recrudescence associated with bronchogenic carcinoma twenty-six years following initial geographic exposure. *Chest* 68:261–263
- Ashdown LR (1979) An improved technique for isolation of *Pseudomonas pseudomallei* from clinical specimens. *Pathology* 11:293–297
- Sprague LD, Zysk G, Hagen RM et al. (2002) A possible pitfall in the identification of *Burkholderia mallei* using molecular identification systems based on the sequence of the flagellin *fljC* gene. *FEMS Immunol Med Microbiol* 34:231–236
- Bauernfeind A, Roller C, Meyer D et al. (1998) Molecular procedure for rapid detection of *Burkholderia mallei* and *Burkholderia pseudomallei*. *J Clin Microbiol* 36:2737–2741
- Woods DE, Jeddloh JA, Fritz DL, DeShazer D (2002) *Burkholderia thailandensis* E125 harbors a temperate bacteriophage specific for *Burkholderia mallei*. *J Bacteriol* 184:4003–4017
- Smith MD, Wuthiekanun V, Walsh AL, Pitt TL (1993) Latex agglutination test for identification of *Pseudomonas pseudomallei*. *J Clin Pathol* 46:374–375
- Walsh AL, Smith MD, Wuthiekanun V et al. (1994) Immunofluorescence microscopy for the rapid diagnosis of melioidosis. *J Clin Pathol* 47:377–379
- Anuntagool A, Intachote P, Naigowit P, Sirisinha S (1996) Rapid antigen detection assay for identification of *Burkholderia (Pseudomonas) pseudomallei* infection. *J Clin Microbiol* 34:975–976
- Ruben B, Band JD, Wong P, Colville J (1991) Person-to-person transmission of *Brucella melitensis*. *Lancet* 337:14–15
- Young EJ (1995) An overview of human brucellosis. *Clin Infect Dis* 21:283–289
- Bricker BJ, Halling SM (1994) Differentiation of *Brucella abortus* bv. 1, 2, and 4, *Brucella melitensis*, *Brucella ovis*, and *Brucella suis* bv. 1 by PCR. *J Clin Microbiol* 32:2660–2666

38. Redkar R, Rose S, Bricker B, DelVecchio V (2001) Real-time detection of *Brucella abortus*, *Brucella melitensis* and *Brucella suis*. Mol Cell Probes 15:43–52
39. Maurin M, Raoult D (1999) Q fever. Clin Microbiol Rev 12:518–553
40. Robert Koch-Institut (2002) Q-Fieber. Epidemiologisches Bulletin 37/2002. [http://www.rki.de/INFEKT/EPIBULL/2002/37\\_02.PDF](http://www.rki.de/INFEKT/EPIBULL/2002/37_02.PDF)
41. Norlander L (2000) Q fever epidemiology and pathogenesis. Microbes Infect 2:417–424
42. Heinzen RA, Hackstadt T, Samuel JE (1999) Developmental biology of *Coxiella burnetii*. Trends Microbiol 7:149–154
43. Fournier PE, Marrie TJ, Raoult D (1998) Diagnosis of Q fever. J Clin Microbiol 36:1823–1834
44. Raoult D, Vestris G, Enea M (1990) Isolation of 16 strains of *Coxiella burnetii* from patients by using a sensitive centrifugation cell culture system and establishment of the strains in HEL cells. J Clin Microbiol 28:2482–2484
45. Lorenz H, Jager C, Willems H, Baljer G (1998) PCR detection of *Coxiella burnetii* from different clinical specimens, especially bovine milk, on the basis of DNA preparation with a silica matrix. Appl Environ Microbiol 64:4234–4237
46. Yanase T, Muramatsu Y, Inouye I et al. (1998) Detection of *Coxiella burnetii* from dust in a barn housing dairy cattle. Microbiol Immunol 42:51–53
47. Robert Koch-Institut: Steckbriefe seltener und „importierter“ Bakterien – Fleckfieber. [http://www.rki.de/INFEKT/STECKBRF/STBR\\_B/BAKTERIE.HTM](http://www.rki.de/INFEKT/STECKBRF/STBR_B/BAKTERIE.HTM)
48. Houhamdi L, Fournier PE, Fang R et al. (2002) An experimental model of human body louse infection with *Rickettsia prowazekii*. J Infect Dis 186:1639–1646
49. Kelly DJ, Richards AL, Temenak J et al. (2002) The past and present threat of rickettsial diseases to military medicine and international public health. Clin Infect Dis 34 [Suppl 4]:S145–169
50. La Scola B, Raoult D (1997) Laboratory diagnosis of rickettsioses: current approaches to diagnosis of old and new rickettsial diseases. J Clin Microbiol 35:2715–2727
51. Hackstadt T (1996) The biology of rickettsiae. Infect Agents Dis 5:127–143
52. Fang R, Houhamdi L, Raoult D (2002) Detection of *Rickettsia prowazekii* in body lice and their feces by using monoclonal antibodies. J Clin Microbiol 40:3358–3363
53. Fournier PE, Ndiokubwayo JB, Guidran J et al. (2002) Human pathogens in body and head lice. Emerg Infect Dis 8:1515–1518

## Neue Versionen für das Jahr 2004

Die Abrechnung mit dem neuen Entgeltsystem (G-DRG) wird im Jahr 2004 in den Krankenhäusern obligatorisch. Zur Vorbereitung darauf hat das DIMDI am 15. August 2003 die neuen Versionen der ICD-10 und des OPS-301 auf seinen Webseiten veröffentlicht.

### ICD-10-GM und Diagnosesynthesaurus

Die derzeit noch gültigen getrennten Versionen der Internationalen Klassifikation der Krankheiten - ICD-10 - für den ambulanten und den stationären Bereich werden wieder zu einer gemeinsamen Version zusammengeführt, der ICD-10-GM. (Nach den international üblichen ICD-Kürzeln steht GM für "German Modification") Entsprechend gibt es auch wieder einen gemeinsamen ICD-10-Diagnosesynthesaurus, der das zugehörige alphabetische Verzeichnis zur ICD-10-GM darstellt.

### OPS-301 jetzt mit alphabetischem Verzeichnis

Mehr als 100 Vorschläge zur Anpassung des Operationenschlüssels - OPS-301 - an die Erfordernisse des neuen Entgeltsystems haben in die neue Version Eingang gefunden. Ein Teil der Vorschläge wurde in den (nicht amtlichen) Erweiterungskatalog zum OPS-301 eingearbeitet, um das Kalkulationsverfahren durch die Möglichkeit zur differenzierteren Prozedurenverschlüsselung weiter zu unterstützen. Erstmals erscheint zusammen mit dem (systematischen) OPS-301 ein alphabetisches Verzeichnis, das alle Prozeduren des amtlichen OPS-301 enthält.

### Neue einheitliche Versionsnummern

Ab dem Jahr 2004 haben ICD-10, OPS-301 und die zugehörigen alphabetischen Verzeichnisse alle die gleiche einheitliche Versionsnummer. Sie entspricht immer dem Jahr, in dem eine neue Version in Kraft tritt. Die jetzt veröffentlichten neuen Versionen tragen daher alle die Versionsnummer 2004.

### DIMDI druckt die Klassifikationen im Eigenverlag

Erstmals bietet das DIMDI auch gedruckte Ausgaben von ICD-10, OPS-301 und den zugehörigen alphabetischen Verzeichnissen an. Bestellungen können online aufgegeben werden über die Web-Seite [www.dimdi.de](http://www.dimdi.de) - Klassifikationen - Buchbestellung. Dort finden Sie auch eine Preisliste.

Weitere Informationen über die neuen Versionen sowie Dateien zum Download finden Sie wie gewohnt auf den Web-Seiten des DIMDI unter [www.dimdi.de](http://www.dimdi.de) - Klassifikationen - Download. Ansprechpartner zur ICD: Dr. med. Michael Schopen, Tel.: 0221-4724325, E-Mail: [schopen@dimdi.de](mailto:schopen@dimdi.de), zum OPS: Dr. med. Birgit Krause, Tel.: 0221-4724430, E-Mail: [krause@dimdi.de](mailto:krause@dimdi.de)

Das Deutsche Institut für Medizinische Dokumentation und Information (DIMDI) in Köln stellt ein hochwertiges Informationsangebot mit mehr als 70 Datenbanken für alle Bereiche des Gesundheitswesens zur Verfügung. Zu den gesetzlichen Aufgaben des DIMDI gehören u.a. die Herausgabe deutscher Versionen von medizinischen Klassifikationen wie ICD-10, ICF, Operationenschlüssel OPS-301, MeSH und UMDNS sowie der Aufbau von Informationssystemen für Arzneimittel (AMIS), Medizinprodukte und Health Technology Assessment (HTA).

Michael Schopen