

Zeitschrift: Schweizer Archiv für Tierheilkunde SAT : die Fachzeitschrift für Tierärztinnen und Tierärzte = Archives Suisses de Médecine Vétérinaire
ASMV : la revue professionnelle des vétérinaires

Herausgeber: Gesellschaft Schweizer Tierärztinnen und Tierärzte

Band: 142 (2000)

Heft: 5

Artikel: Gensondendiagnostik in der Bakteriologie

Autor: Kuhnert, P. / Frey, J. / Boerlin, P.

DOI: <https://doi.org/10.5169/seals-591785>

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften auf E-Periodica. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen sowie auf Social Media-Kanälen oder Webseiten ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. [Mehr erfahren](#)

Conditions d'utilisation

L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. La reproduction d'images dans des publications imprimées ou en ligne ainsi que sur des canaux de médias sociaux ou des sites web n'est autorisée qu'avec l'accord préalable des détenteurs des droits. [En savoir plus](#)

Terms of use

The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. Publishing images in print and online publications, as well as on social media channels or websites, is only permitted with the prior consent of the rights holders. [Find out more](#)

Download PDF: 12.01.2026

ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, <https://www.e-periodica.ch>

Gensondendiagnostik in der Bakteriologie

P. Kuhnert, J. Frey, P. Boerlin und A. P. Burnens

Institut für Veterinär-Bakteriologie der Universität Bern

Einleitung

Die Forschung auf dem Gebiet der Pathogenese bakterieller Infektionen bildet einen Schwerpunkt am Institut für Veterinär-Bakteriologie der Universität Bern, wobei wir uns hauptsächlich auf den Erreger konzentrieren. Um eine Krankheit zu verursachen, benötigen Bakterien spezielle Komponenten, sog. Virulenzfaktoren, welche ihnen z.B. erlauben, sich an Wirtszellen anzuheften, in diese einzudringen und sich intrazellulär zu vermehren oder sich vor dem Angriff des Immunsystems zu schützen. Zudem produzieren die meisten pathogenen Bakterien Toxine, welche den Metabolismus oder die Struktur der Wirtszellen beeinflussen. Der Besitz solcher Virulenzfaktoren, bzw. der entsprechenden Gene, ist ein wesentliches Merkmal, durch welches sich pathogene Bakterien von kommensalen Keimen unterscheiden. Die Resultate der Erforschung der Virulenzfaktoren und ihrer Gene kommen am hiesigen Institut auf drei Ebenen zur Anwendung. Erstens erlauben sie, die Pathogenese virulenter Keime zu studieren, die molekularen Zusammenhänge, welche zur Krankheit führen, besser zu verstehen und entsprechende Strategien zu ihrer epidemiologischen Erfassung, Therapie, Prävention und Eradikation zu entwickeln. Zweitens eignen sich Virulenzgene, da sie spezifische Marker für pathogene Bakterien sind, hervorragend zur molekularen Diagnostik mittels Gensonden. Schliesslich sind Virulenzfaktoren geeignete Angriffspunkte für die Entwicklung von Impfstoffen.

Phänotypische Diagnostik vs. Gensondendiagnostik

Die klassische bakterielle Diagnostik beruht auf der phänotypischen Charakterisierung von Bakterien. Dabei werden das Färbeverhalten, metabolische Eigenschaften mittels biochemischer Reaktionen und Oberflächeneigenschaften durch serologische Methoden untersucht. Die herkömmliche Diagnostik von Bakterien ist durch jahrelange Erfahrung gut etabliert und meist kostengünstig, was gerade für die Veterinärmedizin ein wichtiges Kriterium ist. Dennoch halten auch molekularbiologische Methoden vermehrt Einzug in der Bakteriendiagnostik, insbesondere dort, wo die konventionellen Methoden an ihre Grenzen stossen. So

wie mit den herkömmlichen Verfahren phänotypische Eigenschaften für die Speziesbestimmung oder Typisierung verwendet werden, orientiert sich die Gensondendiagnostik an genetischen Merkmalen. Während in der konventionellen Diagnostik unterschiedliche Methoden zur Anwendung kommen, je nachdem welche Eigenschaften oder biochemischen Reaktionen untersucht werden, so hat die Gensondendiagnostik den Vorteil, dass immer dasselbe Molekül, die DNA, als Basis für die Differenzierung dient. Als Zielsequenzen für die Gensondendiagnostik dienen spezifische DNA-Sequenzen, welche oft einen direkten Bezug zur Pathogenese haben. In der medizinischen Bakteriologie sind dies vordergründig Gene der Virulenzfaktoren, welche das infektiöse Potential eines Keimes bestimmen.

Der Nachweis dieser Gene erfolgt im wesentlichen durch zwei molekularbiologische Methoden, entweder durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) oder durch Hybridisierung mittels Gensonden. Die PCR hat sich vielerorts bereits in der Routinediagnostik etabliert (Fredericks and Relman, 1999) und findet auch in der Veterinärbakteriologie vielfach Anwendung. Dies sowohl als Detektionsmethode z.B. von *Mycoplasma conjunctivae*, dem Erreger der Gemsblindheit (Giacometti et al., 1999), wie auch als Identifikationstechnik, z.B. von *Mycoplasma bovis* und *Mycoplasma agalactiae* (Subramaniam et al., 1998) oder als Typisierungsverfahren, z.B. Muster der Apx-Toxin-Gene von *Actinobacillus pleuropneumoniae*, dem Erreger der Schweine-Pleuropneumonie (Beck et al., 1994). Demgegenüber ist die Hybridisierungstechnik relativ aufwendig und zeitintensiv und verlangt im Gegensatz zur PCR grössere Mengen von DNA, was eine vorgängige Kultur des Erregers notwendig macht. Trotzdem hat die Hybridisierungstechnik Vorteile, welche sie zu einer bevorzugten Methode machen. So ist sie weniger restriktiv als die PCR und erlaubt nebst der Detektion identischer Gensequenzen auch die der Varianten eines Gens (Kuhnert et al., 1997a). Mittels Hybridisierungsexperimenten können auch neue, ähnliche Gene nachgewiesen und gegebenenfalls weiter charakterisiert werden (Kuhnert et al., 2000). Ein entscheidender Vorteil schliesslich ist die Möglichkeit, grössere Serien von Keimen mittels Gensondenhybridisierung kostengünstig zu untersuchen (Boss et al., 1992; Burnens und Nicolet, 1992).

Die Dot-Blot Methode erlaubt die Hybridisierung ganzer Bakteriengenome mit spezifischen Gensonden und ist für Analysen in der Diagnostik besonders geeignet. Dabei wird das gesamte Erbmateriale eines Isolates punktförmig («Dot») auf eine Membran gebunden und in wässriger Lösung mit der markierten Gensonde inkubiert. Besteht genügend Ähnlichkeit der Gensonde mit einem Teil des Bakteriengenoms, so bindet sie sich an der betreffenden Stelle. Nach Wegwaschen nicht gebundener Gensonde und entsprechender Färbung sind Keime, welche das gesuchte Gen im Erbmateriale besitzen, als gefärbte Punkte auf der Membran erkennbar. Üblicherweise dient diese Methode der Analyse einer Vielzahl von Stämmen mit einer Gensonde. Wir haben das Verfahren so modifiziert, dass ein einzelner Stamm mit einer ganzen Serie von Gensonden getestet werden kann («Reverse Dot-Blot»). Damit etablierten wir eine diagnostische Methode für die Virulenzgenanalyse von Bakterien. Im folgenden Abschnitt wird dieser diagnostische Ansatz anhand der Typisierung von *Escherichia coli* dargestellt (Kuhnert et al., 1997b).

Toxintypisierung von von *E. coli* mittels Gensonden

Die Spezies *Escherichia coli* zeichnet sich durch mannigfaltige Varianten aus. Während sich die Darmflora von Tier und Mensch aus harmlosen oder nützlichen Vertretern dieser Bakterienart zusammensetzt, können andere *E.-coli*-Typen bei Mensch und Tier zu Infektionen wie Durchfall (Colidiarrhoe), Ödemkrankheit und hämorrhagischer Colitis führen. *E. coli* ist auch der häufigste Verursacher von Harnwegsinfektionen. Die pathogenen Varianten von *E. coli* sind gekennzeichnet durch die Präsenz unterschiedlicher Virulenzfaktoren, welche die vielfältigen klinischen Symptome verursachen (Boerlin et al., 1999). Die Pathotypen von *E. coli* können durch ihr Virulenzgenmuster identifiziert werden. Um dies zu bewerkstelligen, haben wir alle wichtigen Virulenzgene, welche für *E. coli* beschrieben sind, als Gensonden auf eine Membran gebunden. Diese Membran mit mehr als 20 spezifischen Gensonden für *E. coli* wird anschliessend mit dem gesamten, mit Leuchtstoffen markierten Erbmateriale des zu untersuchenden Stammes hybridisiert. Ist ein entsprechendes Virulenzgen im Bakteriengenom vorhanden, so färbt sich wie beim herkömmlichen Dot-Blot der jeweilige Punkt auf der Membran, wo die Gensonde lokalisiert ist. Sind mehrere Virulenzgene vorhanden, so ergibt sich ein Muster, das Rückschlüsse auf den Pathotyp erlaubt (Kuhnert et al., 2000). In Abbildung 1 ist ein Beispiel einer solchen Analyse dar-

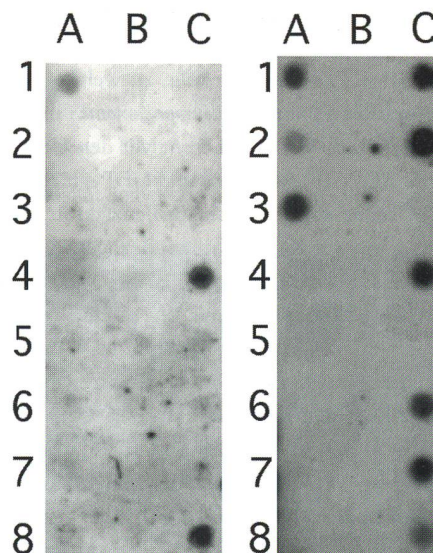


Abbildung 1: Hybridisierungsergebnisse zweier *E.-coli*-Stämme, deren Erbmateriale mit einer Reihe von Gensonden für Virulenzfaktoren untersucht wurde. Links ist ein Laborstamm, welcher nur mit den 3 Kontrollsonden A1, C4 und C8 reagiert. Rechts ist ein klinisches Isolat, welches zusätzlich zu den Kontrollen mit Gensonden, die typischerweise in uropathogenen *E. coli* vorkommen, reagiert (A2, A3, C1, C2, C6, C7).

gestellt. Dabei ist ein nichtpathogener Sicherheits-Laborstamm einem klinischen Isolat gegenübergestellt. Während der Laborstamm nur mit den drei Kontrollsonden reagiert (A1, C4, C8), zeigt das klinische Isolat ein für uropathogene *E. coli* typisches Hybridisierungsmuster.

Die hier dargestellte Methode findet nicht nur in der medizinischen Diagnostik von *E. coli* Anwendung, sondern auch in der Qualitätskontrolle von Wasser und Nahrungsmitteln oder in der Sicherheitskontrolle von *E. coli*, welche als Produktionsstämme in der Biotechnologie oder der Impfstoffherstellung verwendet werden. Sie geht aber in ihrer Bedeutung weit über eine simple Diagnostik hinaus, indem sie auch Informationen über horizontalen Gentransfer geben kann. Häufig befinden sich Virulenzgene auf mobilen genetischen Elementen und können relativ einfach von einem Bakterium auf ein anderes übertragen werden. Dadurch entstehen neue Kombinationen, welche zu neuen Varianten oder gar Pathotypen von *E. coli* führen. Mit der dargestellten Gensondendiagnostik lassen sich solche neu auftretenden Varianten und damit verbundene Erkrankungen und mögliche Zoonosen frühzeitig erkennen.

Ausblick

Das anhand von *E. coli* dargestellte Testverfahren lässt sich auf andere pathogene Keime ausdehnen. Wir haben diesen Ansatz erfolgreich weiterverfolgt, indem wir Gensondensets für ganze Familien

von Virulenzfaktoren erarbeitet haben. So wurde ein Satz von Breitspektrum-Gensonden für die Familie der RTX-Toxine erstellt, zu welchen auch die Apx-Toxine von *A. pleuropneumoniae* und das Hämolysin von *E. coli* gehören. Mit den Gensonden für ADP-ribosylierende und UDP-glucosylierende Toxine werden auch Virulenzfaktoren von Gram-positiven Keimen miteinbezogen. Weitere Familien wie z.B. Phospholipasen, Cholesterolbindende Toxine und Superantigene sind noch in Erarbeitung bzw. Planung. Mit der sich rasant entwickelnden «Chip-Technologie» lassen sich in naher Zukunft alle diese entwickelten Gensonden zusammen mit Antibiotikaresistenzgenen auf einem DNA-Chip vereinigen, der nicht grösser als ein Objektträger ist und bis 10 000 verschiedene Sonden tragen kann. Dadurch können die Arbeitsabläufe automatisiert und die Hybridisierungstechnik routinetauglich gemacht werden. Kombiniert mit ergänzenden Gensonden, welche auch eine Speziesbestimmung erlauben, lässt sich bald einmal ein universeller «Diagnostik-Chip» entwickeln, dessen Aussagekraft weit über die momentane bakterielle Diagnostik hinausgeht. Er gibt Auskunft sowohl über die Art eines Keims als auch über seine Pathogenität, ausgedrückt durch das Virulenzgenmuster und seine Antibiotikaresistenzen. Deshalb wird die Gensondendiagnostik nicht nur das Bild der klassischen Diagnostik verändern, sondern in einem verstärkten Mass auch Auswirkungen auf Therapien und Behandlungsansätze in der Klinik haben.

Literatur

- Beck M., Van den Bosch J.F., Jongenelen I.M.C.A., Loeffen P.L.W., Nielson R., Nicolet J., Frey J. (1994): RTX toxin genotypes and phenotypes in *Actinobacillus pleuropneumoniae* field strains. J.Clin.Microbiol. 32, 2749–2754.
- Boerlin P., McEwen S.A., Boerlin-Petzold F., Wilson J.B., Johnson R.P., Gyles C.L. (1999): Associations between virulence factors of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and disease in humans. J.Clin.Microbiol. 37, 497–503.
- Boss P., Monckton R.P., Nicolet J., Burnens A.P. (1992): Nachweis von Toxigenen verschiedener *E.-coli*-Pathotypen beim Schwein mit nichtradioaktiv markierten Sonden. Schweiz.Arch.Tierheilk. 134, 31–37.
- Burnens A.P., Nicolet J. (1992): Detection of *Campylobacter upsaliensis* in diarrheic dogs and cats, using a selective medium with cefoperazone. Am.J.Vet.Res. 53, 48–51.
- Fredericks D.N., Relman D.A. (1999): Application of polymerase chain reaction to the diagnosis of infectious diseases. Clin.Inf.Dis. 29, 475–488.
- Giacometti M., Nicolet J., Johansson K.E., Naglic T., Degiorgis M.P., Frey J. (1999): Detection and identification of *Mycoplasma conjunctivae* in infectious keratoconjunctivitis by PCR based on the 16S rRNA gene. Zentralbl.Veterinärmed. [B] 46, 173–180.
- Kuhnert P., Boerlin P., Frey J. (2000): Target genes for virulence assessment of *Escherichia coli* isolates from water, food and the environment. FEMS Microbiol.Rev., 24, 107–117.
- Kuhnert P., Hacker J., Mühlendorfer I., Burnens A.P., Nicolet J., Frey J. (1997b): Detection system for *Escherichia coli*-specific virulence genes: Absence of virulence determinants in B and C strains. Appl.Environ.Microbiol. 63, 703–709.
- Kuhnert P., Heyberger-Meyer B., Burnens A.P., Nicolet J., Frey J. (1997a): Detection of RTX toxin genes in Gram-negative bacteria with a set of specific probes. Appl.Environ.Microbiol. 63, 2258–2265.
- Kuhnert P., Heyberger-Meyer B., Nicolet J., Frey J. (2000): Characterization of PaxA and its operon: a cohemolytic RTX toxin determinant from pathogenic *Pasteurella aerogenes*. Inf.Immun. 68, 6–12.
- Subramaniam S., Bergonier D., Poumarat F., Capaul S.E., Schlatter Y., Nicolet J., Frey J. (1998): Species identification of *Mycoplasma bovis* and *Mycoplasma agalactiae* based on the *uvrC* genes by PCR. Mol.Cell.Probes 12, 161–169.

Korrespondenzadresse

Dr. P. Kuhnert
Institut für Veterinär-Bakteriologie der Universität Bern
Länggass-Strasse 122
CH-3012 Bern