

# Untersuchung präanalytischer Einflüsse der Probenlagerung bei Stuhlanalysen



## 1 Präambel

In mikrobiologischen Fachkreisen und bei Kostenträgern kämpft die Stuhl Diagnostik seit Jahren um wissenschaftliche Anerkennung und das, obwohl in den letzten 10 Jahren eine Vielzahl an wissenschaftlichen Publikationen die Bedeutung des Mikrobioms und auch der Darmimmunität und Darmschleimhautintegrität gut belegt. Vor allem die Rolle der Mikrobiota für die Prägung der Immuntoleranz zur Verhinderung von Allergie und Autoimmunität ist heute auch universitär unbestritten. In der gerade veröffentlichten S3-Leitlinie „Reizdarm“ der Deutschen Gesellschaft für Gastroenterologie wird vielfach auf die Bedeutung der mikrobiellen Diversität hingewiesen. Trotzdem bezeichnete Prof. Thomas Frieling auf der die Veröffentlichung begleitenden Pressekonferenz die gängige Stuhl Diagnostik als Voodoo-Medizin. Interessant ist die Begründung: „Diese sogenannten Stuhl-Ökogramme haben keine klinische Bedeutung. Ein grundlegendes Problem sind in der Praxis die langen Transportzeiten, wodurch sich die Zusammensetzung der Mikroben komplett verändert. Das, was also im Labor ankommt, ist nicht repräsentativ für das, was im Darm zu finden ist“ (1).

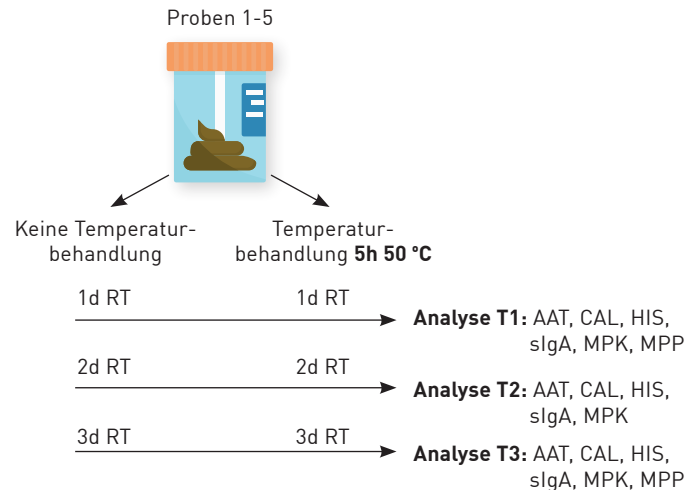
Für uns war das ein Anlass, die Stabilität bei den gängigen Verfahren der Probeneinsendung zu überprüfen, kritisch zu hinterfragen und unsere präanalytischen Mindestanforderungen entsprechend anzupassen.

## 2 Methodik

### Patientenproben

Stuhlproben von fünf Patienten wurden untersucht. Die Stuhlproben wurden portioniert und eine Hälfte bis zu drei Tagen bei Raumtemperatur (RT = 24 °C) gelagert. Um einen Probenversand per Post an einem heißen Sommertag zu simulieren, wurde die andere Hälfte am Tag 1 der Lagerung einem 5-stündigen Hitzestress von 50 °C ausgesetzt und anschließend ebenfalls bei RT bis zu drei Tage gelagert (Abb. 1). In früheren Untersuchungen mit Temperaturloggern konnten wir zeigen, dass 50°C im Sommer in Briefkästen und in nicht für den Proben transport zertifizierten Transportfahrzeugen (z.B. der Post) keine Ausnahme ist.

Die für die Praxis kürzest mögliche Zeit zwischen der Abnahme einer Stuhlprobe und ihrem Eintreffen im Labor beträgt ca. 24h. Zu diesem Zeitpunkt fand in dieser Erhebung die erste Messung statt (T1). 48 Stunden Lagerung bei RT entspricht einem Transport per Kurier, wenn die Probe am Folgetag der Abgabe in der Praxis abgeholt wird, oder einem Postexpressversand bei gemäßigten Außentemperaturen. Zu diesem Zeitpunkt erfolgte die zweite Messung (T2). Nach 72-stündiger Lagerung, die einem Transport per Post bei mäßigen Außentemperaturen entspricht, erfolgte die dritte Messung (T3). Zu jedem Zeitpunkt wurden die folgenden Analysen durchgeführt: Alpha-1-Antitrypsin, Calprotectin, Histamin, sekretorisches Immunglobulin A sowie die mikrobiologische und molekulargenetische Untersuchung der Mikrobiota (Abb. 1).



**Abb. 1:** Aufbau der Studie. AAT = Alpha-1-Antitrypsin, CAL = Calprotectin, HIS = Histamin, slgA = sekretorisches Immunglobulin A, MPK = Mikrobiotaprofil Kultur, MPP = Mikrobiotaprofil PCR

### Mikrobiologische Untersuchungen

Für das mikrobiologische Mikrobiotaprofil wurden von fünf Patienten zu jedem Messzeitpunkt je drei Einzelproben (Triplikate) untersucht und für die Auswertung Mittelwerte gebildet. Es wurden die Keimzahlen in KBE/g Stuhl für *Bacteroides* spp., *Bifidobacterium* spp., *Enterococcus* spp., *Escherichia* (*E.*) *coli* und *Lactobacillus* spp. ermittelt. Dafür wurden ca. 500 mg Stuhl in 4,5 ml 0,9%iger NaCl homogenisiert. Aus dieser Lösung wurden Verdünnungsreihen in 0,9%iger NaCl erstellt und je zwei Verdünnungsstufen auf Spezialmedien plattiert und inkubiert. Nach der anaeroben, bzw. im Fall von *E.coli* und *Enterococcus* aeroben Inkubation wurden die Kolonien gezählt. Aus der Kolonienzahl, dem Stuhlgewicht und dem Verdünnungsfaktor wurden koloniebildende Einheiten je Gramm Stuhl (KBE/g) berechnet.

### Nachweis von biochemischen Markern im Stuhl

Die Analyse von vier biochemischen Markern (Tab. 1) erfolgte nach Herstellerangaben in automatischer Abarbeitung über den automatischen ELISA-Prozessor DSX®.

Parameter	Kit	Firma
Alpha-1-Antitrypsin	IDK® α1-Antitrypsin ELISA (K 6760)	Immundiagnostik AG
Calprotectin	IDK® Calprotectin ELISA (K 6927)	Immundiagnostik AG
Histamin	FD HIS-SUB ELISA (FD E-3000)	FROST Diagnostika GmbH
Sekretorisches IgA	IDK® slgA ELISA (K8880)	Immundiagnostik AG

**Tab. 1:** biochemische Marker und verwendete Kits

# Untersuchung präanalytischer Einflüsse der Probenlagerung bei Stuhlanalysen

## Molekulargenetische Untersuchungen

Für die molekulargenetische Analyse der Darmmikrobiota wurde der GA-map® Dysbiosis Test der Firma Genetic Analysis AS nach Herstellerangaben verwendet. Der Test beruht auf der PCR-Amplifikation von im Stuhl enthaltenen Bakterien und ihrer Detektion mit fluoreszenzmarkierten Sonden, die einen großen Bereich des bakteriellen 16S-rRNA-Gens abdecken. Die Auswertung der Daten erfolgt über einen vom Hersteller validierten Algorithmus (2). Als Ergebnisse werden ein Dysbiose-Index (Werte von 1 bis 5), die bakterielle Diversität, die Ergebnisse sogenannter funktioneller Profile (Butyrat-bildende Bakterien, Darmepithel-/Mukosa-protective Bakterien, proinflammatorische Bakterien) sowie die Einzelergebnisse der detektierten Bakterien semiquantitativ ausgegeben.

## 3 Ergebnisse

### Einfluss von Probenlagerung bei Raumtemperatur

#### Mikrobiologische Untersuchungen nach Lagerung bei Raumtemperatur

Bei *E. coli* sowie den Gattungen *Bifidobacterium*, *Enterococcus* und *Lactobacillus* lagen die Abweichungen zum Zeitpunkt T2 im Vergleich zu T1 bei weniger als einer Zehnerpotenz, was bei mikrobiologischen Untersuchungen als akzeptabel gilt. Zum Zeitpunkt T3 wurden allerdings bei je einer von fünf Proben für *Bifidobacterium* ein Abfall und *Lactobacillus* ein Anstieg von mehr als einer Zehnerpotenz festgestellt. Bei *Lactobacillus* zeigte sich bei allen Patienten tendenziell ein Anstieg über die Lagerzeit, bei drei Probanden war dieser deutlich (Abb. 2). *Bacteroides* spp. reagierte eher unempfindlich auf die Lagerung. Bei zwei Proben wurde allerdings eine Verminderung von  $> 1 \cdot 10^8$  KBE/g auf bis zu  $1 \cdot 10^6$  festgestellt (Daten nicht gezeigt).

#### Biochemische Untersuchungen nach Lagerung bei Raumtemperatur

Bei slgA zeigen sich bei allen Probanden deutlich verminderte Werte nach drei Tagen Lagerung. Bei vier der fünf Patienten war schon nach zwei Tagen eine Tendenz zu verminderten Werten erkennbar. Calprotectin, Alpha-1-Antitrypsin und Histamin waren über drei Tage stabil (Abb. 3).

#### Molekulargenetische Untersuchungen nach Lagerung bei Raumtemperatur

Bei der molekulargenetischen Testung veränderte sich der Dysbiose-Index von 3 (leichte Dysbiose) auf 2 (keine Dysbiose) nach der Lagerung von drei Tagen. Abgesehen von dieser Abweichung waren die diagnostischen Aussagen bei allen Proben durch die 3-tägige Lagerung nicht beeinträchtigt. Die Aussagen für die bakterielle Diversität und die funktionellen Profile änderten sich nach Lagerung bei RT bei keiner der Proben. Der Prozentsatz der Sonden, die vor und nach der Lagerung ein abweichendes Ergebnis zeigten (z.B. „vermindert“ anstelle von „leicht vermindert“), lag bei allen Proben unter 20%, was bei dem heterogenen Material Stuhl als akzeptable Abweichung gilt (Daten nicht gezeigt).

### Lagerung bei Raumtemperatur

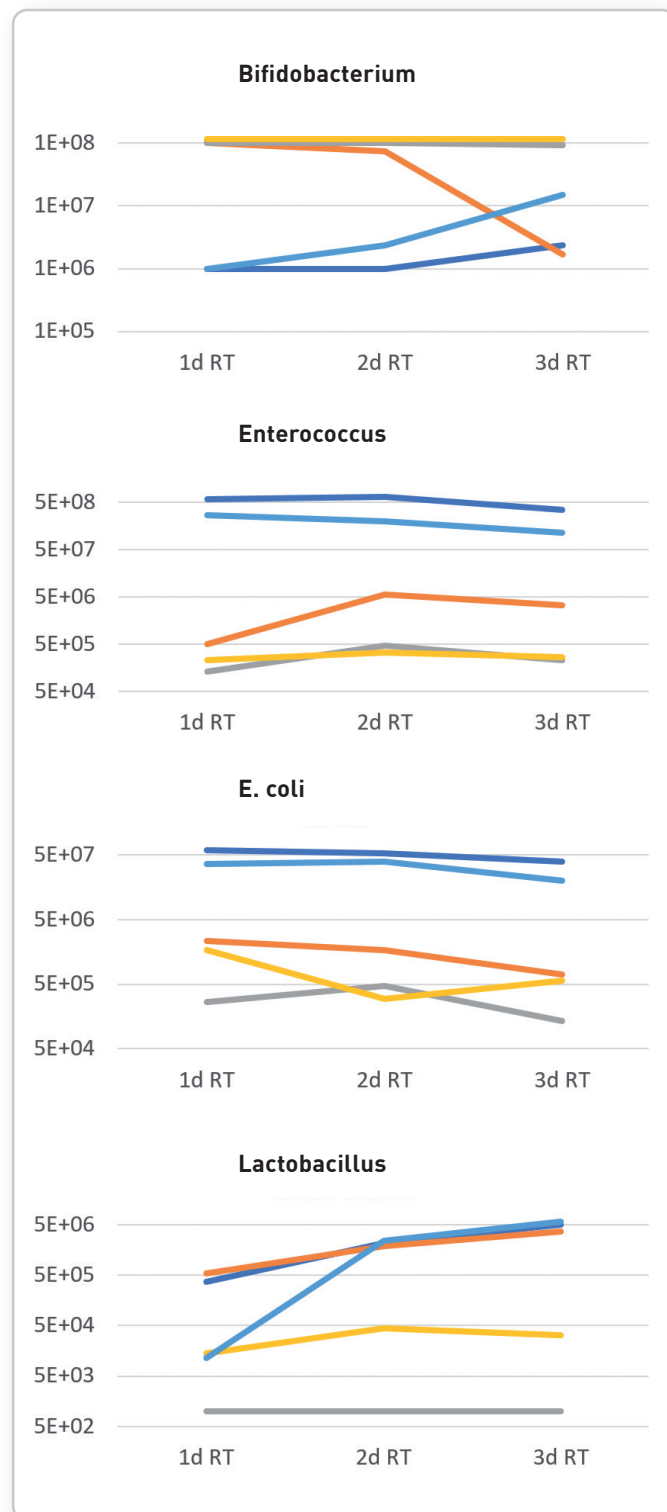


Abb. 2: Veränderung der KBE/g von abundanten Darmbakterien während dreitägiger Lagerung

# Untersuchung präanalytischer Einflüsse der Probenlagerung bei Stuhlanalysen

## Lagerung bei Raumtemperatur

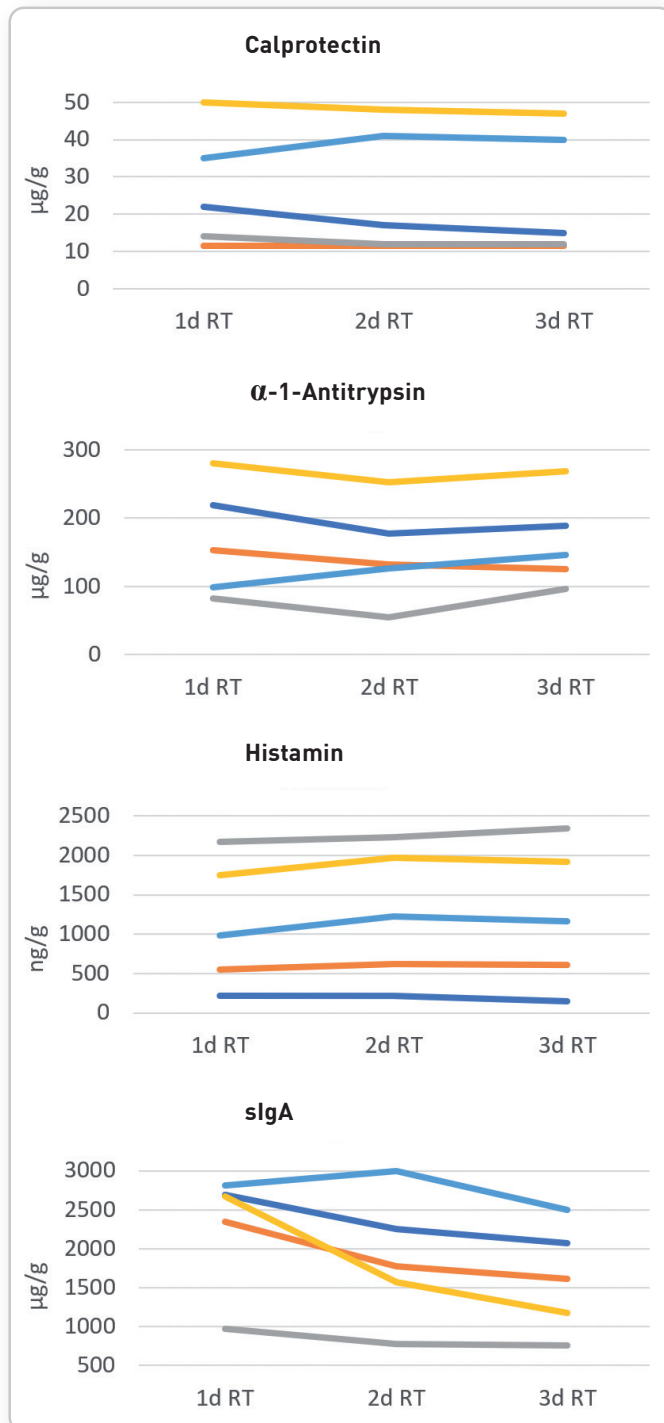


Abb. 3: Veränderung der Werte für biochemische Marker während dreitägiger Lagerung

## Einfluss der Probenlagerung nach Hitzestress (Simulation des Postversands im Sommer)

Die von fünf Patienten gewonnenen Stuhlproben wurden vor der Lagerung aufgeteilt. Je eine Hälfte wurde vor der Lagerung bei RT über ein, zwei und drei Tage einem 5-stündigen Hitzestress von 50 °C unterzogen (Simulation des Postversands im Sommer).

### Mikrobiologische Untersuchungen nach Hitzestress

Für *E. coli* und *Bifidobacterium* spp. wurde eine drastische Reduktion der KBE/g beobachtet. Lediglich *Enterococcus* spp. erwies sich als relativ unempfindlich gegenüber der Lagerung für zwei Tage nach Hitzestress. Bei *Lactobacillus* spp. war nach Lagerung nach dem Hitzestress bei vier Proben ein deutlicher Anstieg zu verzeichnen. Bei der 5. Probe stieg die Keimzahl am zweiten Tag deutlich an und fiel nach drei Tagen wieder auf  $<10^3$  KBE/g ab (Abb. 4). Die Hitzebehandlung verstärkt also den schon bei RT beobachteten Anstieg durch die Lagerung. *Bacteroides* spp. lag bei allen Proben initial bei  $>1 \cdot 10^8$  KBE/g. Nach dem Hitzestress waren die *Bacteroides* spp. bei allen Proben nicht mehr anzüchtbar (Daten nicht gezeigt).

### Biochemische Untersuchungen nach Hitzestress

Für Calprotectin traten an den drei Messtagen Schwankungen auf, die höher waren als bei Lagerung bei RT. Insgesamt wurde ein Trend zu verminderten Werten festgestellt. Alpha-1-Antitrypsin und Histamin waren ähnlich stabil wie bei Lagerung ohne Hitzestress.

Ein dramatischer Effekt wurde allerdings bei slgA festgestellt. Hier fielen die Werte schon am Tag 1 der Lagerung nach der Inkubation bei 50°C unter die Messbarkeitsgrenze von 150 µg/g (Abb. 5).

### Molekulargenetische Untersuchungen nach Hitzestress

Die molekulargenetische Analyse der Mikrobiota nach Hitzestress und anschließender Lagerung bei RT für drei Tage zeigte lediglich bei einer Probe eine Verschiebung des Dysbiose-Index von 1 auf 2 (beide Werte stehen für das Nichtvorliegen einer Dysbiose). Bei derselben Probe war das funktionelle Profil „butyratbildende Bakterien“ vermindert, während es vor der Lagerung als normal ausgegeben wurde. Die prozentuale Anzahl der Sonden mit einem diskrepanten Ergebnis vor und nach der Lagerung liegt bei dieser und einer weiteren Probe bei  $>20\%$  und damit deutlich höher als bei Lagerung ohne Hitzeeinwirkung (Daten nicht gezeigt).

# Untersuchung präanalytischer Einflüsse der Probenlagerung bei Stuhlanalysen

## Postversand im Sommer

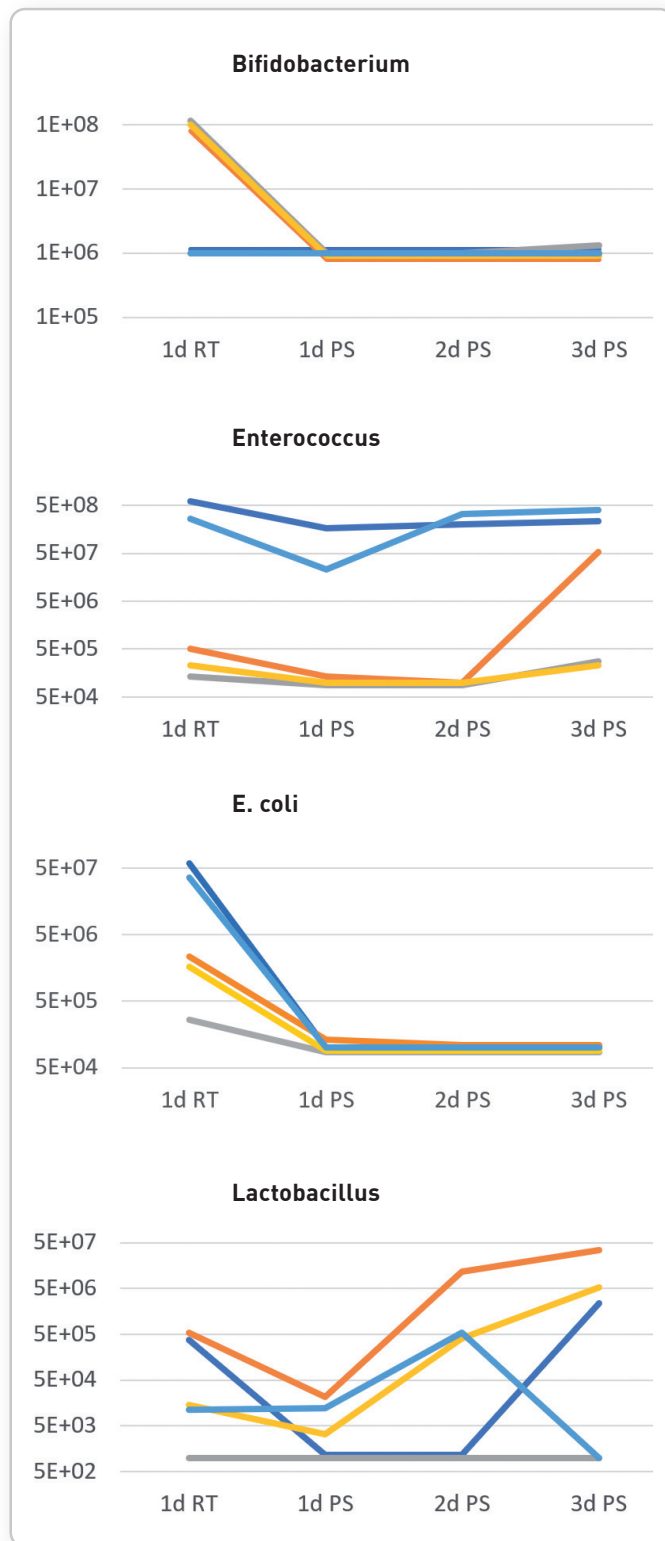


Abb. 4: Veränderung der KBE/g von abundanten Darmbakterien während dreitägiger Lagerung nach 5-stündiger Inkubation bei 50°C

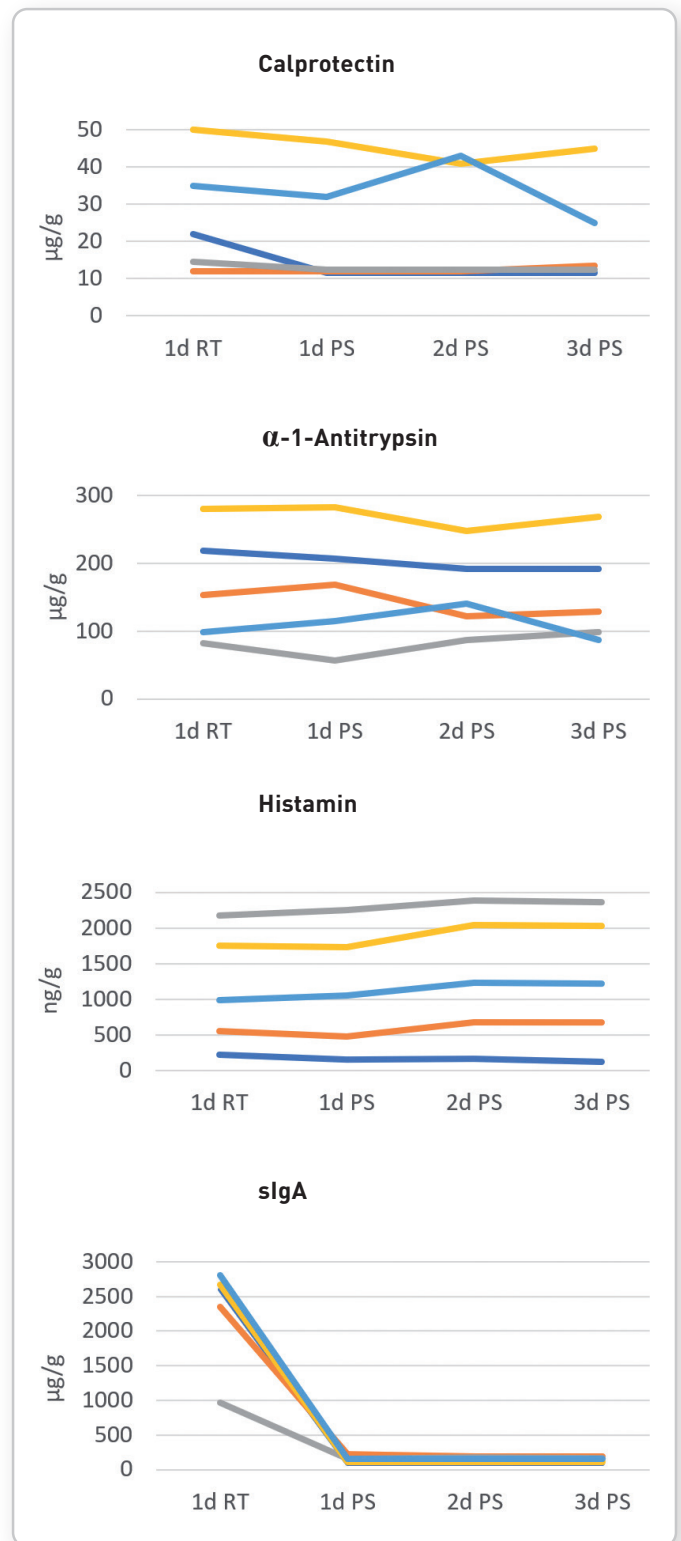


Abb. 5: Veränderung der Werte für biochemische Marker während dreitägiger Lagerung nach 5-stündiger Inkubation bei 50°C

# Untersuchung präanalytischer Einflüsse der Probenlagerung bei Stuhlanalysen

## 4 Diskussion

Mit den hier durchgeführten Analysen konnten wir zeigen, dass der von etablierten Stuhllaboren in Deutschland empfohlene Postversand der Stuhlproben über drei oder sogar vier Tage ins Labor für einige Parameter nicht akzeptabel ist.

### Schon bei Raumtemperatur treten nach drei Tagen signifikante Veränderungen auf

Lactobazillen und Bifidobakterien zeigen nach drei Tagen Lagerung signifikante Veränderungen. Lactobazillen zeigen nach drei Tagen einen deutlichen Anstieg. Bei Bifidobakterien gibt es Schwankungen der Werte in beide Richtungen. Für diese beiden Bakterien ist eine maximale Transportzeit von zwei Tagen von der Probenabnahme bis zur Laboranalyse essentiell. Das sIgA zeigt einen fallenden Trend, teilweise bereits nach zwei Tagen. *Bacteroides* spp., *Enterococcus* spp. und *E. coli* verändern sich dagegen kaum während einer 3-tägigen Lagerung unter Idealtemperaturen, gleiches gilt für die Marker Alpha-1-Antitrypsin, Calprotectin und Histamin.

### Kurzzeitiger Hitzeeinfluss verstärkt die Lagerungsschäden dramatisch

Der Postversand von Stuhlproben birgt neben der nicht kalkulierbaren Transportzeit zusätzlich das Problem der Temperaturinstabilität. In den heißen Sommermonaten werden sowohl in Briefkästen als auch in nicht für den Probentransport zertifizierten Transportfahrzeugen nicht selten 50 °C und mehr erreicht.

Bis auf die Gattung *Enterococcus* veränderten sich die Werte der getesteten Bakterien bei den kulturellen Methoden drastisch. *Bacteroides* spp., *Bifidobacterium* spp. und *E. coli* waren um ein bis zwei Zehnerpotenzen vermindert, während Lactobazillen um bis zu zwei Zehnerpotenzen stiegen. Zudem ist das sekretorische IgA nach Hitzeeinwirkung schon nach einem Lagerungstag nicht mehr messbar. Calprotectin zeigt im Fall von erhöhten Ausgangswerten eine Tendenz zur Normalisierung.

### Schlussfolgerungen

Wir konnten zeigen, dass eine Probenlagerung über drei Tage und vor allem Hitzeeinwirkung einen großen Effekt auf die Vitalität und Anzuchtverhalten der Darmbakterien, das sekretorische IgA und Calprotectin hat.

Für eine verlässliche Stuhlanalytik empfehlen wir dringend einen Kurierversand über Nacht auch bei moderaten Außentemperaturen. Sollte dieser nicht möglich sein, stellt die PCR-Analytik eine akzeptable Alternative dar.

Für Parameter wie sIgA oder Calprotectin ist der Kuriertransport alternativlos.

Andere Studien bestätigen unsere Ergebnisse. Crowther et al. haben bereits 1971 übereinstimmend mit unseren Daten gezeigt, dass eine erhöhte Temperatur (hier 32 °C für 48h) zu einem um zwei Zehnerpotenzen erhöhten Wachstum von Lactobazillen führte. Andere untersuchten Keime (*Enterobacteria*, *Veillonella* und *Streptococcus salivarius*) waren signifikant vermindert, andere (z.B. *Enterococcus*) blieben stabil (3).

Die von uns beobachtete bessere Stabilität der molekulargenetischen Analysen wird ebenfalls in der Literatur bestätigt. Roesch et al. zeigten, dass nach Lagerung von Stuhlproben für 12h - 72h bei RT eine geringe, aber graduell mit der Lagerungszeit ansteigende prozentuale Abweichung der bakteriellen Diversität (3% nach 12h bis 10% nach 72h) zu beobachten war (4).

Der Versand der Proben für die PCR-Analyse ist also weniger zeitkritisch als die kulturelle Diagnostik. Ein Postversand kann dennoch in den Sommermonaten nicht empfohlen werden, denn unsere Analysen zeigten nach Hitzestress eine deutlich höhere prozentuale Abweichung der Ergebnisse und bei einer Probe ein falsch positives Ergebnis für eines der funktionellen Profile.

### Resümee

Gerade weil zu lange Probentransportzeiten und unkontrollierbare Lagerungsbedingungen immer wieder als Argument verwendet werden, um die Stuhldiagnostik in Misskredit zu bringen, sollte darauf in Zukunft mehr Wert gelegt werden. Ähnlich wie das bei der Blutdiagnostik inzwischen etabliert ist, sollte auch bei der Stuhldiagnostik ein zertifizierter Übernacht-Kurier eingesetzt werden, der die Stuhlprobe bis zum Folgetag im Labor abgeliefert. Die Tatsache, dass nach zwei Tagen Probenlagerung bei RT im Unterschied zu drei Tagen noch bei allen Parametern akzeptable Ergebnisse resultieren, ist aus praktischen Erwägungen wichtig. Wenn der Patient die Probe am späten Nachmittag in der Praxis abgibt, dann kann diese durchaus am Folgetag (Lagerung bei RT vorausgesetzt) vom Kurierfahrer mitgenommen werden, da sie somit spätestens zwei Tage nach Probennahme im Labor verarbeitet wird.

### Quellen:

1. <https://www.doccheck.com/de/detail/articles/39263-reizdarm-mythen-neuer-heisser-scheiss>
2. Casen, C., et al. „Deviations in human gut microbiota: a novel diagnostic test for determining dysbiosis in patients with IBS or IBD.“ *Alimentary pharmacology & therapeutics* 42.1 (2015): 71-83.
3. Crowther, J. S. „Transport and storage of faeces for bacteriological examination.“ *Journal of Applied Bacteriology* 34.2 (1971): 477-483.
4. Roesch, Luiz FW, et al. „Influence of fecal sample storage on bacterial community diversity.“ *The open microbiology journal* 3 (2009): 40.