

Präanalytik - wie Transportzeit und Temperatur alles verändern können

Andrea Thiem · Dr. rer. nat. Christiane Kupsch · Dr. rer. nat. Steffen Tobisch

Die Stuhl Diagnostik gerät immer wieder in die Kritik, weil angezweifelt wird, dass die im Labor erhobenen Daten den Zustand im Darm zuverlässig widerspiegeln. Kritisch betrachtet werden insbesondere „die langen Transportzeiten, wodurch sich die Zusammensetzung der Mikroben komplett verändert“ (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.

Aufbau der Studie

Stuhlproben von insgesamt 107 Probanden wurden mit einem temperaturstabilen Kurierversand innerhalb von 24-48 Stunden nach Probennahme in unser Labor transportiert und je zweimal analysiert.

Die erste Analyse erfolgte sofort nach Probeneingang (Messung 1). Eine zweite Analyse wurde nach zusätzlich zwei Tagen Lagerung der Proben bei Raumtemperatur durchgeführt.

Die folgenden Analysen wurden durchgeführt:

Calprotectin, Zonulin, slgA, Gallensäuren, Pankreaselastase sowie die mikrobiologische Untersuchung der Mikrobiota.

Da bekannt ist, dass es beim Postversand zu erheblicher Hitze- und Kälteentwicklung kommen kann (2), wurden zusätzlich Stuhlproben von insgesamt 10 Patienten einem kurzen Hitze- bzw. Kältestress ausgesetzt. Je 5 Proben erhielten eine fünfständige Hitzebehandlung von 50 °C, bzw. eine Kältebehandlung bei -10 °C. Diese Bedingungen sind an die bekannten Temperaturschwankungen beim Postversand angelehnt (2). Die Proben wurden anschließend bei Raumtemperatur gelagert. Die Analyse der Proben erfolgte vor dem Temperaturstress sowie nach 24 h, 48 h und 72 h. Zu jedem Zeitpunkt wurden die folgenden Analysen durchgeführt: Alpha-1-Antitrypsin, Calprotectin, Histamin, sekretorisches Immunglobulin A (slgA) sowie die mikrobiologische Untersuchung der Mikrobiota.

Einfluss der Transportzeit auf die Mikrobiota

3-4 Transporttage verändern die Mikrobiota. In 21 % der nach Lagerung erstellten Befunde war *Lactobacillus* spp. im Vergleich zum Zeitpunkt der 1. Messung so stark erhöht, dass sich der Befundwert von „vermindert“ auf „normal“ änderte (Abb.1 oben). Dagegen war *Bifidobacterium* spp. bei 8 % der Proben nach Lagerung erhöht, aber bei 10 % der Proben im Vergleich zum Ausgangswert vermindert (Abb. 1 unten). Ein ähnliches Bild ergab sich für *Enterococcus* spp. mit 21 % im Vergleich zur 1. Messung erhöhten und 10 % verminderten Werten (Tab. 1). Ganz ähnliche Ergebnisse erzielten wir bereits in unserer Pilotstudie (3).

Ob sich bestimmte Bakterien in den Proben über die Zeit vermehren oder verringern, hängt vermutlich von der Gesamtzusammensetzung der Probe (Menge und Art der Verdauungsrückstände, dem pH-Wert und der Zusammensetzung der Gesamtmikrobiota) ab.

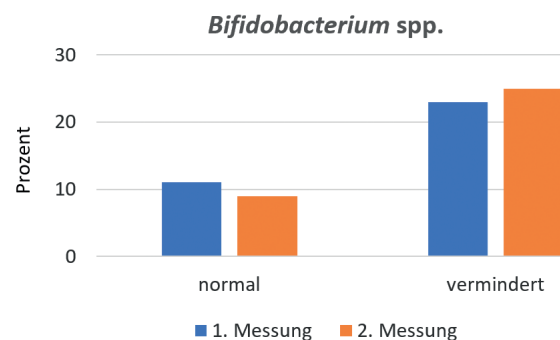
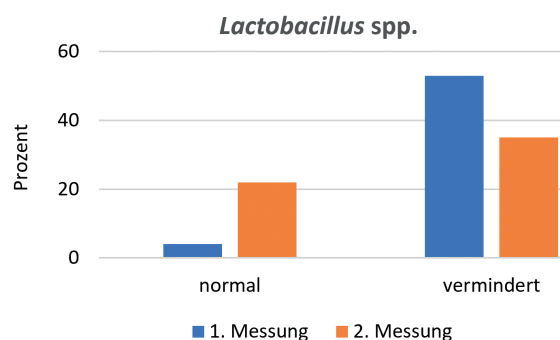


Abb. 1: Veränderung der Befundwerte für ausgewählte Bakterien nach 1-2 Tagen Kurierversand (1. Messung) und 3-4 Tagen Transportzeit (2. Messung) bei 107 Stuhlproben.

3 bis 4 Transporttage verändern biochemische Stuhlmarker

In 25 % der Proben verändert sich die Aussage auf dem Befund für slgA nach Lagerung von erhöht auf normal, bzw. von normal auf vermindert (Abb. 2). Die gleiche Tendenz wurde bei 10% der Messwerte für β -Defensin, Pankreaselastase und 3 % der Calprotectinwerte gemessen. Bei Zonulin und Gallensäuren gab es dagegen keinen vergleichbaren Trend.

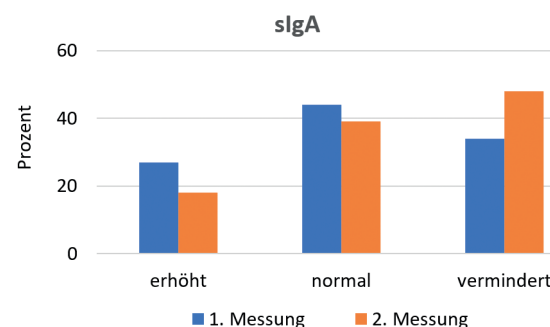


Abb. 2: Veränderung der Befundwerte für slgA nach 1-2 Tagen Kurierversand (1. Messung) und 3-4 Tagen Transportzeit (2. Messung) bei 107 Stuhlproben.

Hitze und Kälte während des Transports verstärken die Veränderungen der Mikrobiota

Sowohl Hitze als auch Kälte verstärkten den schon bei Raumtemperatur beobachteten Anstieg von *Lactobacillus* spp. (Abb. 3). *E. coli*, *Bacteroides* spp., *Bifidobacterium* spp. (Abb. 4) waren dagegen unter dem Einfluss der Temperaturschwankungen vermindert (zusammengefasst in Tab. 1).

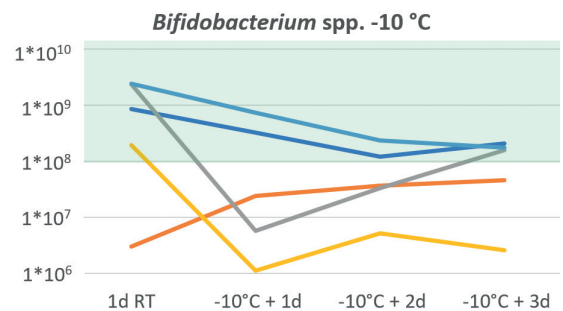
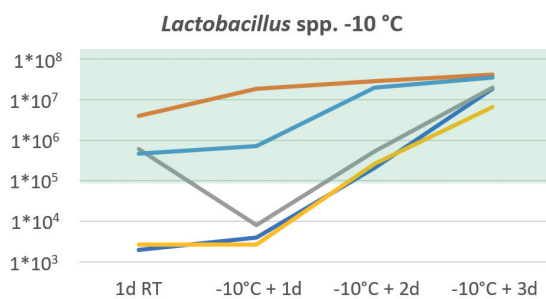
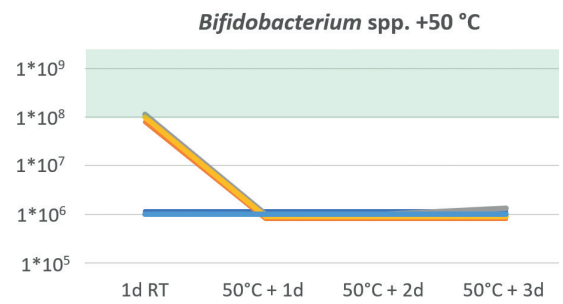
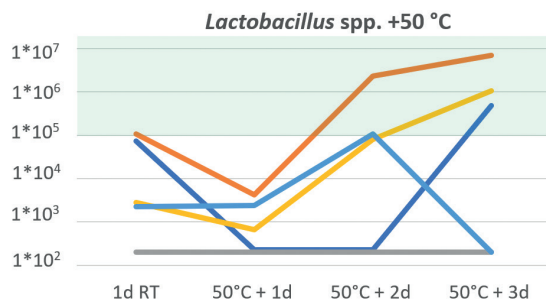


Abb. 3: Einige Bakterien (gezeigt *Lactobacillus* spp.) steigen durch Hitze- und Kälteeinfluss während des Probenverkehrs an.

Abb. 4: Einige Bakterien (gezeigt *Bifidobacterium* spp.) fallen durch Hitze- und Kälteeinfluss während des Probenverkehrs ab.

slgA ist extrem hitzeempfindlich

Die Untersuchung der biochemischen Marker zeigte einen dramatischen Effekt von Hitze auf slgA. Hier fielen die Werte sofort nach Hitze einwirkung unter die Messbarkeitsgrenze von 150 µg/g. Calprotectin zeigte unter Hitze einwirkung einen Trend hin zu verminderten Werten (3). Kälte hatte dagegen keinen nennenswerten Einfluss auf die Messergebnisse von Alpha-1-Antitrypsin, Calprotectin, Histamin oder slgA. **Für eine verlässliche Stuhlanalytik empfehlen wir daher dringend einen Kurierversand über Nacht auch bei moderaten Außentemperaturen.**

Parameter	Lagerung > 3 Tage	Hitze	Kälte
<i>Enterococcus</i> spp.	21 % falsch hoch 10 % falsch niedrig	20 % falsch hoch 20 % falsch niedrig	100 % falsch hoch
<i>E. coli</i>	15 % falsch hoch 13 % falsch niedrig	40 % falsch niedrig	20 % falsch niedrig
<i>Bacteroides</i> spp.	gleichbleibend	100 % falsch niedrig	40 % falsch niedrig
<i>Bifidobacterium</i> spp.	10 % falsch hoch 8 % falsch niedrig	40 % falsch niedrig	1/5 falsch niedrig
<i>Lactobacillus</i> spp.	21 % falsch hoch 4 % falsch niedrig	40% falsch hoch	40% falsch hoch
Calprotectin	3% falsch hoch	gleichbleibend	gleichbleibend
slgA	4 % falsch hoch 25 % falsch niedrig	100 % falsch niedrig	gleichbleibend
β-Defensin	4 % falsch hoch 10 % falsch niedrig	n.u.	n.u.
Pankreaselastase	3 % falsch hoch 10 % falsch niedrig	n.u.	n.u.
Gallensäuren	4 % falsch hoch 3 % falsch niedrig	n.u.	n.u.
Zonulin	8 % falsch hoch 8 % falsch niedrig	n.u.	n.u.
Alpha-1-Antitrypsin	gleichbleibend	gleichbleibend	gleichbleibend
Histamin	gleichbleibend	gleichbleibend	gleichbleibend

Tab. 1: Prozentsatz der durch den Probenverkehr veränderten Laborbefunde. Fett hervorgehoben sind alle Veränderungen, die mehr als 20 % der Laborbefunde betreffen. n.u. = nicht untersucht

Literatur

1. <https://www.doccheck.com/de/detail/articles/39263-reizdarm-mythen-neuer-heisser-scheiss>; 2. Deutsche Apothekerzeitung online „Temperaturen im Päckchen erreichen 60 Grad“ 31.07.2019; 3. Kupsch, C., Tobisch, S., Thiem, A. „Warum die Stuhl Diagnostik seit Jahren in der Schulmedizin einen schweren Stand hat“ OM&Ernährung (2023) SH28.