

Möglichkeiten der Struktur-Funktions-Analyse der Dickdarm-Mikrobiota, Beispiele der Anwendung und Auswertung einzelner Werte

Bitte beachten Sie, dass die Struktur-Funktions-Analyse der Dickdarm-Mikrobiota trotz ihrer hohen Aussagekraft ungeeignet ist, um Tumorerkrankungen und Organveränderungen wie Stenosen oder Divertikeln zu diagnostizieren; in diesen Fällen kann sie die endoskopische Diagnostik nicht ersetzen. Ihre Hauptbedeutung liegt bei der Diagnostik von entzündlichen Darmerkrankungen und funktionellen Störungen.

Die Struktur-Funktions-Analyse der Stuhl-Mikrobiota kann als Basisuntersuchung, erweiterte Basisuntersuchung sowie Individuelle Analyse erfolgen. In der Sprechstunde führen wir routinemäßig vor allem Basisuntersuchungen durch. Die Parameter der Basisuntersuchungen sind so gewählt, dass sie trotz einer begrenzten Anzahl an untersuchten Bakteriengruppen, eine maximale Aussage über die Schwere der Darmerkrankung und Funktionsstörung ermöglichen.

Die Untersuchung einer größeren Anzahl von Bakteriengruppen und Parametern bedeutet einen hohen Aufwand und steigende Kosten, nicht aber einen vergleichbaren Zugewinn an sinnvoll nutzbarer Information.

Methodische Voraussetzungen

Anzahl der Proben:

Diät-Einflüsse, psycho-emotionaler Stress, Infektionen und Medikamente können kurzfristig zu erheblichen Schwankungen der Dickdarm-Mikrobiota führen. Die Aussagekraft der Struktur-Funktions-Analyse ist bei Untersuchung von mindestens 3 verschiedenen Stuhlproben über einen längeren Zeitraum deutlich besser. Für die Beurteilung chronischer Beschwerden und Erkrankungen empfehlen wir daher grundsätzlich drei in monatlichen Abständen durchgeführte Probenentnahmen. Das Untersuchungsbesteck für alle Varianten enthält somit stets drei Röhrchen. Die Untersuchungen sind arbeitsaufwendig: jede Analyse nimmt etwa 10 Tage in Anspruch. Gleich in welcher Variante, die Standard-Diagnostik nimmt daher 2 Monate + 10 Tage ein. Im Notfall können Proben-Abnahmen wöchentlich erfolgen wie z.B. im akuten Schub chronisch entzündlicher Darmerkrankungen, da hierdurch die Wirksamkeit der eingesetzten Therapie noch vor dem Rückgang der Beschwerden beurteilt und zeitnah optimiert werden kann. Die Stuhlproben werden in spezielle Röhrchen entnommen, die mit einer Fixierlösung bestehend aus reinem Essig und Alkohol gefüllt sind. Der Essiggeruch ist beim Öffnen der Röhrchen deutlich wahrnehmbar und vielleicht unangenehm. Die Fixierung erlaubt es jedoch, die entnommenen Stuhlproben bis zu einem halben Jahr bei Raumtemperatur ohne Nachteile für die Diagnostik zu lagern. Man muss sich weder mit der Entnahme noch mit dem Transport beeilen und kann den optimalen Zeitpunkt für beides selbst bestimmen.

Befundbeispiel der Struktur-Funktions-Analyse der Dickdarm-Mikrobiota und Erläuterung einzelner Varianten

Abgenommen				Obligate Hauptbakteriengruppen x 10 ¹⁰ /ml			Ersatz-Hauptbakteriengruppen x 10 ¹⁰ /ml			Individuelle-Bakteriengruppen x 10 ¹⁰ /ml		
	Pilze (alle)	Schleim- schicht in µg	Leuko- Zyten	F.prau Faecalibacterium prausnitzii	Bac Bacteroides	EREC Roseburia	Bif Bifido- bacteriaceae	Ebac Entero- bacteriaceae	Clit Clostridium Litoseburensis (difficile)	Ato	ACL	XXX
21.10.2012		0	0	8 (50%)	14	17	0	0	6	12	1	
22.11.2012		200	d	8 (50%)	4	20	0,4	0	0	0	2	
22.11.2013		50	s	8 (50%)	18	12(30%)	0	2	0		0	
Normwert :	<1%	<50	~ 0	>7	>10	>12	Die Auswertung erfolgt in Abhängigkeit von den obligaten Hauptbakteriengruppen					

Die Bezeichnungen der Bakteriengruppen in dem Befund und die zugeordneten Zahlen ergeben für einen Nichtspezialisten wenig Sinn. Damit sich jeder eine eigene Meinung über den Befund bilden kann und die Zahlen und Ausdrücke im Befund ohne spezielle Ausbildung versteht, hier eine kurze Zusammenfassung der allgemeinen Prinzipien, nach denen die Beurteilung erfolgt.

Die Arbeitsweise des Dickdarms:

Der Dickdarm ist ein leistungsstarker Bioreaktor. Bei gesunden Menschen werden in diesem natürlichen Bioreaktor Bakterienkonzentrationen von 10¹³ aufrechterhalten. Bakterien zersetzen dabei unverdauliche Nahrungsbestandteile, gewinnen Energie und recyceln Wasser und Elektrolyte. Ein Großteil der biofermentativen Masse besteht aus habituellen Bakteriengruppen (diese werden im Befund als obligate Hauptbakteriengruppen bezeichnet). Hierzu gehören Roseburia, Bacteroides und Faecalibacterium prausnitzii. Diese Bakteriengruppen müssen für die Biofermentation sehr wichtig sein, da sie bei allen gesunden Menschen ohne Ausnahme in hohen Konzentrationen nachweisbar sind. Verglichen mit den habituellen Gruppen sind alle anderen Bakteriengruppen normalerweise niedrig konzentriert und können bei gesunden Menschen fehlen. Die nicht habituellen, gelegentlich vorkommenden Bakterien umfassen zusammen jedoch über 5000 Spezies, die bei jedem Menschen unterschiedlich zusammengesetzt sind und hierdurch ein einmaliges individuelles Profil ergeben. Durch ihre hohe Anzahl ist der summarische Anteil von gelegentlichen Bakterien an der Biomasse beträchtlich. Es wäre naiv zu erwarten, dass die Mehrheit der 5000 im Dickdarm vorhandenen Spezies dem Menschen wohl gesonnen ist. Das Gegenteil ist der Fall. Obwohl viele dieser Bakterien eindeutige Krankheitserreger sind, spielt ihre Pathogenität keine Rolle, solange eine dicke Schleimschicht die Dickdarmwand von den Bakterien der biofermentativen Arbeitszone des Stuhls trennt. (Zusätzliche Information finden sie auch unter www.charite.de/arbmk1.) Durch Entzug von Wasser wird der Schleim an der Dickdarmwand zugewandten Seite fest und lässt keine Bakterien durch. Diese Trennung erlaubt es, den Dickdarm-Bioreaktor sicher zu betreiben, ohne in Kontakt mit seinen gefährlichen Bestandteilen zu treten.

Auf der dem Stuhl zugewandten Seite wird die Schleimschicht (der Mukus) kontinuierlich aufgeweicht und erodiert. Die Festigkeit des Schleims nimmt mit der Entfernung von der Darmoberfläche ab. Bakterien wandern in die aufgeweichte Zone der schützenden Schleimschicht ein und werden hier festgehalten. Diese Verankerung von Bakterien in den äußeren Schichten des Schleims bedingt die Stabilität des individuellen Bakterien-Profiles des Menschen. Obwohl die meisten Bestandteile der sogenannten individuellen Dickdarm-Flora zufällig und durch den bisherigen Lebenswandel bedingt sind, ist ihr Verbleib im Dickdarm

gesetzmäßig und solange es nicht zu Katastrophen kommt, stabil. Die Bakterien-Biomasse wird uns nicht fertig von Eltern gegeben, sondern individuell aus einzelnen Bestandteilen zusammengesetzt und unterhalten. Dabei spielen beides, Mikroorganismus-Wirt als auch Mikroorganismus-Mikroorganismus Auseinandersetzungen, eine wichtige Rolle. Bestimmte Bakterien werden vom Wirt begünstigt. Bevor der Dickdarmbioreaktor richtig funktioniert und seine Biomasse eine dauerhafte Zusammensetzung erreicht, müssen einzelne Etappen in kurzer Reihenfolge durchgelaufen werden. Nach der Geburt und in Anschluss an eine schwere körperliche Erkrankungen, wenn die Darmbakterien dezimiert sind oder fehlen, wird die Biofermentation vorübergehend durch die schnell reagierende Ersatz-Hauptbakteriengruppen aufrechterhalten, die dann zahlenmäßig dominieren. Hierzu gehören: Bifidobacteriaceae, Enterobacteriaceae und Clostridium difficile. Sobald die habituellen Bakteriengruppen ihre Funktion aufnehmen und eine kritische Masse erreichen, gehen die Ersatz-Hauptbakteriengruppen zurück oder verschwinden völlig. Der Zustand der habituellen und der Ersatz-Hauptgruppen erlaubt somit die Funktion des Dickdarmbioreaktors mit hoher Genauigkeit zu beurteilen. Weitergehende Informationen finden Sie unter: www.charite.de/arbmkj.

Struktur-Funktions-Analyse

Anders als die klassischen mikrobiellen Methoden untersucht die Struktur-Funktion Analyse nicht nur welche Bakterien in welchen Mengen im Stuhl vorkommen, sondern vor allem wie und in welchen Mengen die einzelnen Bakteriengruppen im Verhältnis zu einander und dem schützenden Schleim angeordnet sind. Technisch gesehen wurde die Methode der Untersuchung von Erdschichten durch Bohrungen abgeleitet. Man nimmt einen Erdzylinder, schneidet diesen entlang der Achse und untersucht die Schichten. Entscheidend dabei ist nicht welche Elemente im Zylinder Vorkommen sondern wie diese angeordnet sind. Dabei wird deutlich, dass Granit und Sand, Steinkohle und Diamant trotz gleicher stofflicher Zusammensetzung stark unterschiedliche Materialien sind.

Ähnlich erfolgt die Struktur-Funktions-Analyse des Dickdarms anhand von Stuhlprobenzylindern. Besonderes Augenmerk wird dabei auf die Bakteriengruppen gerichtet, die für den normalen Ablauf der Biofermentation entscheidend sind. Bakterien werden nicht nach gut oder schlecht, sondern nach ihrem prädiktiven Wert für die Funktion und den Gesundheitszustand des Dickdarms ausgewählt.

Die diagnostische Auswertung umfasst die Mukus-Schicht mit Leukozyten sowie der Konzentration von Bakterien in der germinalen und der Arbeitszone des Bioreaktors. Bei gesunden Menschen zeigt die Struktur-Funktions-Analyse, dass die obligaten Hauptbakteriengruppen hoch konzentriert und gleichmäßig zwischen der germinalen und der Arbeitszone im Stuhlzylinder verteilt sind. Die Ersatz-Hauptbakterien sind niedrig konzentriert oder fehlen. Die Mukus-Schicht ist moderat ausgeprägt (<50 µm), Leukozyten fehlen, Pilze machen nicht mehr als 1% der Stuhlmasse aus. Die individuellen Bakteriengruppen schwanken in ihrer Zusammensetzung und Konzentration zwischen den einzelnen Messungen unwesentlich.

Jede Störung in der Funktion des Dickdarmbioreaktors führt zum Abfall seiner Leistung: die Konzentration der obligaten Hauptbakteriengruppen fällt ab, die Konzentration der Ersatz-Hauptbakteriengruppen steigt. Das Ausmaß der Veränderungen gegenüber der Norm hängt von der Schwere der Funktionsbeeinträchtigung ab.

Ist die Störung der Biofermentation kurzzeitig, betreffen die Veränderungen vor allem die fermentativen Hauptbakteriengruppen (obligate und Ersatzhauptgruppen). Die individuellen Bakteriengruppen sind in ihrer Zusammensetzung und Konzentrationen meist nicht betroffen und aufeinanderfolgende Untersuchungen fallen ähnlich, mitunter identisch aus. Ist die Störung anhaltend, kommt es zu massiven Verschiebungen aller Bakteriengruppen. Solange die germinale Zone jedoch nicht gestört ist, sind die Veränderungen vor allem quantitativ, das individuelle Profil der Mikrobiota bleibt konstant.

Das unterschiedliche Verhalten von Bakteriengruppen in der germinalen und Arbeitszone bei verschiedenen Erkrankungen ist diagnostisch wichtig.

Die Zerstörung der germinalen Zone tritt vor allem infolge schwerer lokaler chronischer Entzündungsprozesse auf. Sie ist typisch für Morbus Crohn, Colitis ulcerosa, nicht behandelten Sprue, progressiven Sklerodermie. Bei Colitis ulcerosa erfolgt die Zerstörung unmittelbar an der Grenze zwischen Mukus und Stuhl. Hier bildet sich eine Lage aus Leukozyten, die den Stuhlzylinder ummantelt und die Bakterien an deren Grenzfläche zwischen dem Stuhl und der Mukus-Schicht zerstört. Die Menge der Leukozyten im Mukus korreliert mit der Schwere der Entzündung bei Colitis. Bei Morbus Crohn erfolgt die Zerstörung der germinalen

Zone von innen. Die Entzündung setzt in den oberen Bereichen des Darmes antibakterielle Substanzen frei, die die Darmbakterien supprimieren. Die Unterdrückung von Bakterien bei Morbus Crohn ist daher, anders als bei Colitis ulcerosa, am stärksten im Zentrum der Stuhlmassen ausgeprägt, kann aber im fortgeschrittenen Stadium auch den gesamten Stuhlzylinder erfassen. Charakteristisch für chronisch entzündliche Darmerkrankungen ist nicht nur die Instabilität der mikrobiellen Zusammensetzung der Darmflora und der Leistungsabfall der Biofermentation, sondern mitunter ein komplettes anhaltendes Verschwinden einzelner obligater hauptfermentativer Gruppen. *Faecalibacterium prausnitzii* ist besonders empfindlich. Das komplette Fehlen von *Faecalibacterium prausnitzii* in drei aufeinanderfolgenden Stuhlzylindern ist charakteristisch für M Crohn.

Umfang und Möglichkeiten der Untersuchungspakete:

I. Basisuntersuchung:

Umfang: Analyse von Schleimschicht, entzündlichen Zellen im Schleim (Leukozyten), Konzentration und Verteilung von zwei obligaten Hauptbakteriengruppen, einer Ersatz-Hauptbakteriengruppen, sowie Pilzen im Stuhl.

Beispiel der Basisuntersuchung:

Abgenomme n	Qualitative			Obligate Hauptbakteriengruppen		Ersatz-Hauptbakteriengruppen			Individuelle-Bakteriengruppen			
	Pilze (alle)	Schleim- schicht In µg	Leuko- Zyten	F.prau Faecalibacterium prausnitzii		EREC Roseburia	Bif Bifido- bacteriac eae					
21.10.201 2		0	0	8 (50%)		17	0					
22.11.201 2		200	d	8 (50%)		20	0,4					
22.11.201 3		50	s	8 (50%)		12 (30%)	0					
Normwert :	<1%	<50	~ 0	>7		>10	<1					

Aussagekraft:

Einschätzung ob die Dickdarmfunktion normal oder beeinträchtigt ist,
Diagnosespezifische Bestätigung oder Ausschluss von aktivem Morbus Crohn oder Colitis ulcerosa,
Graduierung der Aktivität von Colitis ulcerosa in (deutliche, massive oder schwerste).

II. Erweiterte Basisuntersuchung:

Umfang: Basisuntersuchung sowie Analyse aller obligaten und Ersatz-Hauptbakteriengruppen

Beispiel der erweiterten Basisuntersuchung:

Abgenomme n				Obligate Hauptbakteriengruppen x 10 ¹⁰ /ml			Ersatz-Hauptbakteriengruppen x 10 ¹⁰ /ml			Individuelle-Bakteriengruppen x 10 ¹⁰ /ml		
	Pilze (alle)	Schleim- schicht In mp	Leuko- Zyten	F.prau Faecalibacterium prausnitzii	Bac Bacteroides	EREC Roseburia	Bif Bifido- bacteriaceae	Ebac Enterobacteriaceae	Clit Clostridium Litoseburensis (difficile)			
21.10.2012		0	0	8 (50%)	14	17	0	0	6			
22.11.2012		200	d	8 (50%)	4	20	0,4	0	0			
22.11.2013		50	s	8 (50%)	18	12 (30%)	0	2	0			
Normwert :	<1%	<50	~ 0	>7	>10	>10						

Aussagekraft:

Die erweiterte Grunduntersuchung ermöglicht eine genauere Analyse funktioneller Störungen des Dickdarmbioreaktors, vor allem wenn diese im Zusammenhang mit schweren konsumierenden Erkrankungen auftreten: Kachexie, Enteropathie, schwere Depression, Schlaganfall, Rekonvaleszenz nach intensivtherapeutischer Behandlung. Bei schweren konsumierenden Erkrankungen sind mitunter andere hauptfermentative Gruppen stärker beeinträchtigt als Faecalibacterium prausnitzii. Nach Episoden der Darmischämie kann zum Beispiel Bacteroides noch vor dem Faecalibacterium prausnitzii aus dem Stuhl verschwinden. In der Rekonvaleszenz kommt es zum Anstieg der Ersatz-Hauptgruppen. Obwohl Bifidobacteriaceae am häufigsten beeinträchtigt sind und daher für die Grunduntersuchung ausreichen, liegt in vielen Fällen der Rekonvaleszenz ein Hauptanstieg der Ersatzgruppen bei Enterobacteriaceae oder Clostridium difficile Gruppen vor, deren Beurteilung wertvolle Informationen zur Charakterisierung des Stadiums und der Besserung oder Verschlechterung der Erkrankung darstellt.

Die erweiterte Grunduntersuchung ist vor allem dann interessant, wenn die Funktion des Bioreaktors im Anschluss an schwere Erkrankungen untersucht werden soll, um die Effektivität der durchführenden Therapie und Diätversuche zu beurteilen.

III. Individuelle Untersuchung

Umfang: Die individuelle Untersuchung erfasst eine beliebige Anzahl weiterer anderer Bakteriengruppen des Dickdarmes

Befundbeispiel der individuellen Untersuchung:

Abgenommen				Obligate Hauptbakteriengruppen x 10 ¹⁰ /ml			Ersatz-Hauptbakteriengruppen x 10 ¹⁰ /ml			Individuelle-Bakteriengruppen x 10 ¹⁰ /ml		
	Pilze (alle)	Schleim- schicht in mp	Leuko- Zyten	F.prau Faecalibacterium prausnitzii	Bac Bacteroides	EREC Roseburia	Bif Bifido- bacteriaceae	Ebac Entero- bacteriaceae	Clit Clostridium Litoseburensis (difficile)	Ato	ACL	XXX
21.10.2012		0	0	8 (50%)	14	17	0	0	6	12	1	
22.11.2012		200	d	8 (50%)	4	20	0,4	0	0	0	2	
22.11.2013		50	s	8 (50%)	18	12(30%))	0	2	0		0	
Normwert :	<1%	<50	~ 0	>7	>10	>12	Die Auswertung erfolgt in Abhängigkeit von den obligaten Hauptbakteriengruppen					

Aussagekraft:

Die individuelle Untersuchung ist vor allem bei speziellen Fragestellungen wichtig. So sind z.B. bei Kurzdarmsyndrom Lactobazillen stark erhöht und für die Lactacidose verantwortlich. Subgruppen von Bifidobacteriaceae wie Bifidobacterium longum sind bei selbst-limitierender Colitis erhöht etc. Alle Beispiele lassen sich hier nicht anführen. Die Auswertung und Auswahl soll vom Spezialisten empfohlen werden.

Grundsätzlich gilt: je mehr Bakteriengruppen untersucht werden, desto genauer ist die Charakterisierung der individuellen Dickdarm-Mikrobiota und deren Stabilität. Untersuchungen mit erweitertem Spektrum sind besonders dann interessant, wenn es darum geht zu verfolgen, welchen Einfluss Antibiotika oder verschiedene Diäten auf die Darmfunktion und die Stabilität der Darmmikrobiota haben.