

Tabelle 2: Auswahl von Analysen zur Diagnose pathologischer Veränderungen im Verdauungstrakt	
Maldigestion	
Pankreas-Elastase 1 im Stuhl	Insgesamt hat die Untersuchung eine Sensitivität von ca. 95% für die Diagnose der exokrinen Pankreasinsuffizienz und erfasst gegenüber anderen Verfahren auch leichter die mittelschweren und leichten Fälle.
Entzündungsparameter/Malabsorption	
Calprotectin im Stuhl	Diagnostik und Verlaufskontrolle bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (Morbus Crohn, Colitis ulcerosa), Abgrenzung <i>Colon irritabile</i> , Früherkennung des kolorektalen Karzinoms.
Albumin im Stuhl	Erhöhte Werte für Albumin im Stuhl werden bei chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen wie Morbus Crohn oder <i>Colitis ulcerosa</i> gefunden. Im Schub kommt es aufgrund des Plasmaaustritts von Albumin ins Darmlumen zu einer stärkeren Erhöhung.
Alpha-1-Antitrypsin im Stuhl	Die Bestimmung kann bei der Differenzierung von entzündlichen Darmerkrankungen (deutliche Erhöhung) und <i>Colon irritabile</i> helfen. Dabei sprechen erhöhte Werte für entzündliche Prozesse im Darm.
Beta-Defensin	Die Beta-Defensine besitzen ein antimikrobielles Wirkungsspektrum gegenüber Pilzen (Candida) und Bakterien.
EDN (Eosinophil-Derived Neurotoxin)	EDN (Eosinophil-Derived Neurotoxin) ist ein von aktivierten eosinophilen Granulozyten sezerniertes Glykoprotein mit antimikrobiellen Eigenschaften, das bei der Abwehr von Erregern beteiligt ist. Erhöhte EDN-Spiegel im Stuhl geben einen Hinweis auf eine chronische intestinale Entzündung wie <i>Colitis ulcerosa</i> und Morbus Crohn.
Laktoferrin im Stuhl	Laktoferrin ist in polymorphkernigen Granulozyten enthalten. Diese werden bei Entzündungen aktiviert und setzen Laktoferrin frei. Erhöhte Konzentrationen von Laktoferrin im Stuhl werden daher bei entzündlichen Darmerkrankungen gefunden.
Zonulin	Das Regulatorprotein Zonulin ist ein geeigneter Marker, um die Durchlässigkeit der Darmschleimhaut zu messen. Die Zonulin-Bestimmung eignet sich zur Abklärung eines Leaky-Gut-Syndroms bei: allergischen Erkrankungen, Autoimmunerkrankungen, Abdominalerkrankungen, multipler Sklerose und Zöliakie.
Immunparameter	
slgA im Stuhl	Das sekretorische IgA wird unabhängig vom Serum-IgA gebildet; ein Mangel kann daher auch bei unauffälligem Serum-IgA-Spiegel auftreten und kommt vor bei: rezidivierenden Schleimhautinfekten, Atopie und Autoimmunerkrankungen.
Tumorscreening	
Hämoglobin-Haptoglobin-Komplex im Stuhl	Mit dem immunologischen Nachweis von humanem Hämoglobin bzw. Hämoglobin-Haptoglobin-Komplex im Stuhl kann die Sensitivität und Spezifität der Screeningdiagnostik für das kolorektale Karzinom deutlich gegenüber herkömmlichen Stuhltests verbessert werden.

Autoren:
Dr. med. Konrad Bode, Dr. med. Anne-Marie Fahr, Dr. med. Michael Weizenegger, Dr. Anke Veldenzer, Dr. Herbert Hof; Limbach Gruppe

Literatur:

- Hooper LV, Littman DR, Macpherson AJ et al.: Interactions between the microbiota and the immune system. *Science* 2012; 336: 1268-1273.
- Turnbaugh PJ, Ley RE et al.: The Human Microbiome Project. *Nature* 2007; 449: 804-810.
- Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN et al.: Diversity of the Human Intestinal Microbial Flora. *Science* 2005; 308: 1635-1638.
- Carding S, Verbeke K, Vipond DT et al.: Dysbiosis of the gut microbiota in disease. *Microbial Ecology in Health and Disease* 2015; 26: 3854.
- Zhao L: The gut microbiota and obesity: from correlation to causality. *Nat Rev Micro* 2013; 11: 639-647.
- Guinane CM, Cotter PD: Role of the gut microbiota in health and chronic gastrointestinal disease: understanding a hidden metabolic organ. *Therapeutic Advances in Gastroenterology* 2013; 6: 295-308.
- Wright EK, Kamm MA, Teo SM et al.: Recent advances in characterizing the gastrointestinal microbiome in Crohn's disease: a systematic review. *Inflamm Bowel Dis* 2015; 21: 1219-1228.
- Cao Y, Shen J, Ran, ZH: Association between Faecalibacterium prausnitzii Reduction and Inflammatory Bowel Disease: A Meta-Analysis and Systematic Review of the Literature. *Gastroenterol Res Pract* 2014; 872725.
- Sokol H, Pigneur B, Watterlot L et al.: Faecalibacterium prausnitzii is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2008; 105: 16731-16736.
- Zeller G, Tap J, Voigt AY et al.: Potential of fecal microbiota for early-stage detection of colorectal cancer. *Mol. Syst. Biol.* 2014; 10: 766-766.
- Midtvedt T.: The gut: a triggering place for autism - possibilities and challenges. *Microbial Ecology in Health and Disease* 2012; 23: 237.
- Swidsinski A: Standards for bacterial identification by fluorescence In situ hybridization within eukaryotic tissue using ribosomal rRNA-based probes. *Inflamm Bowel Dis* 2006; 12: 824-6- author reply 826-7.

Stand: Juni / 2016

Ihr Ansprechpartner:
Dr. med. Gabriela Sitaru
 Fachbereich Mikrobiologie
 E-Mail: g.sitaru@mvz-clotten.de
 Telefon: +49 761 31905-303

Mikrobiomanalytik

Neues Zeitalter der Darmfloradiagnostik – „Next Generation Sequencing“ (NGS) ermöglicht die Analyse des komplexen Mikrobioms



Klinischer Hintergrund

Der menschliche Körper wird auf seiner gesamten Oberfläche durch eine Vielzahl von Mikroorganismen besiedelt. Jeder Teil dieser sowohl äußeren als auch inneren Oberflächen weist eine für die jeweilige Körperlokalisierung typische Zusammensetzung an Mikroorganismen auf. Die Gesamtheit dieser Mikroorganismen wird als Mikrobiota bezeichnet, der Nachweis der entsprechenden Geninformation als Mikrobiom.

Darmflora beim Gesunden

Besonders im Darm findet sich eine Vielfalt an verschiedenen Bakterien, Pilzen und anderen Mikroorganismen mit bis zu 1.000 verschiedenen Spezies.

Während die Besiedlung im oberen Dünndarm beim gesunden Menschen gering ist (<10⁵ Keime/g Darminhalt), finden sich im Enddarm ca. 10¹¹ Mikroorganismen/g Stuhl. Viele dieser Mikroorganismen entwickeln eine enge Symbiose mit dem Wirtsorganismus. Zum einen bietet der Wirtsorganismus optimalen Schutz und optimale Wachstumsbedingungen für viele Mikroorganismen, zum anderen unterstützen diese den Wirt in vielerlei Art und Weise, z.B. durch die Bereitstellung von Vitaminen und anderen Nährstoffen aus schwer verdaulichen Nahrungsbestandteilen, durch die Stimulation des Immunsystems und durch Schutz vor der Invasion von Pathogenen. All das unterstützt die Fitness des Wirtsorganismus.

Das Wichtigste auf einen Blick

- Neuere Daten zeigen die essenzielle Bedeutung einer ausgewogenen mikrobiellen Besiedlung des Darmes.
- Verschiebungen in der Zusammensetzung der intestinalen Mikrobiota können zu vielfältigen Gesundheitsstörungen führen.
- Mikrobiomanalytik durch „Next Generation Sequencing“ (NGS) ermöglicht die Analyse der Gesamtheit der Mikroorganismen eines komplexen Mikrobioms.

Gleichzeitig aber muss sich der Wirtsorganismus vor der Penetration der potenziell pathogenen Mikroorganismen in die Mukosa schützen. Dies erfolgt durch den Aufbau einer Schutzbarriere bestehend aus der Schleimhaut (Epithel, Submukosa mit Phagozyten und T-Zellen), der Sekretion antimikrobieller Substanzen (z.B. Defensine) und von Antikörpern. Auf der anderen Seite ist die Steuerung der Zusammensetzung der mikrobiellen Besiedlung durch den Wirt, aber auch durch die gegenseitige Beeinflussung der Mikroorganismen von entscheidender Bedeutung zur Vorbeugung eines Eindringens von Pathogenen in den Körper.

Jeder gesunde Erwachsene hat eine singuläre, über die Zeit relativ stabile Mikrobiota. Trotz extremer interindividueller Unterschiede gibt es einige konservierte Anteile, die eine ausbalancierte Mikrobiota charakterisieren. Auffallend ist die Dominanz von obligat anaeroben Bakterien, die zu der phylogenetischen Abteilung der *Bacteroidetes* (z.B. *Bacteroidaceae* und *Prevotellaceae*) und *Firmicutes* (z.B. Clostridien, Ruminokokken und Eubacteriaceae) gehören (Tabelle 1). *Actinobacteria*, *Proteobacteria* (wie z.B. *Enterobacteriaceae*) und *Fusobacteria* hingegen, können zwar in einer ausgeglichenen Mikrobiota nachgewiesen werden, sind quantitativ aber von untergeordneter Bedeutung.

Allgemein gilt eine hohe Diversität der Mikrobiota, das heißt das Vorliegen einer besonders großen Vielfalt an Mikroorganismen, als Zeichen einer gesunden

Darmbesiedlung. Auch erhöhtes Vorkommen einzelner „besonderer“ Bakterienspezies, wie z. B. *Faecalibacterium prausnitzii*, korreliert mit einer gesunden Darmflora.

Fehlbesiedlung (Dysbakterie) und ihre Folgen

Eine Abnahme physiologisch wichtiger Mikroorganismen oder der physiologischen Diversität sowie eine Zunahme von potenziell pathogenen Bakterien kann zu einer Fehlbesiedlung führen (Dysbakterie).

Dysbakterie wird häufig charakterisiert durch die Zunahme von Bakterien, die nicht zur Klasse der *Bacteroidia* oder *Clostridia* gehören. Eine der häufigsten Auffälligkeiten einer solchen Dysbakterie ist die Zunahme von fakultativ anaeroben *Enterobacteriaceae*. In neueren Untersuchungen wurde nachgewiesen, dass abhängig vom Grad einer solchen Dysbakterie vielfältige Gesundheitsstörungen auftreten oder ungünstig beeinflusst werden können. Hierzu zählt unter anderem eine Förderung des Risikos einer

Adipositas und ihrer Folgeerkrankungen, wie Diabetes und Arteriosklerose.

Auch bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen wird einer Dysbakterie eine pathogenetisch relevante Rolle zugesprochen. In verschiedenen experimentellen Tiermodellen entzündlicher Darmerkrankungen fiel eine Dysbakterie mit stark erhöhter Zahl der *Enterobacteriaceae* auf. In Übereinstimmung mit diesem experimentellen Befund fand sich auch bei Patienten, die an Morbus Crohn erkrankt sind, eine Erhöhung der Zahl der *Enterobacteriaceae*. Außer der Zunahme von *Enterobacteriaceae* wird bei Patienten mit entzündlichen Darmerkrankungen eine Verminderung von *F. prausnitzii* beschrieben. Eine starke Verminderung von *F. prausnitzii* bei Patienten mit Morbus Crohn scheint mit einer erhöhten Rezidiv-Häufigkeit der Erkrankung assoziiert zu sein. Auch bei malignen Erkrankungen des Darmes werden Veränderungen in der Zusammensetzung der Darmflora beobachtet. Diese Veränderungen scheinen so deutlich zu sein, dass ein

diagnostischer Nutzen einer quantitativen Analyse der intestinalen Mikrobiota zur Früherkennung des kolorektalen Karzinoms diskutiert wird.

Seit langer Zeit ist bekannt, dass Antibiotikatherapie durch Zerstörung der physiologischen Mikrobiota zu latenten und auch klinisch manifesten Entzündungen der Darmschleimhaut führen kann. Neben den diätetischen und gastroenterologischen Störungen scheinen sogar neurologische Erkrankungen mit Veränderungen in der Intestinalbesiedlung einherzugehen. Einige Veröffentlichungen legen einen Zusammenhang zwischen Autismus und intestinaler bakterieller Fehlbesiedlung nahe.

Indikation

Die Methode eignet sich zur Bestimmung der Zusammensetzung des intestinalen Mikrobioms. Eine Verschiebung der intestinalen Flora ergibt z. B. einen Hinweis auf Erkrankungen des Darmtraktes oder auf verschiedene Stoffwechselerkrankungen.

Diagnostik der Dysbakterie

In der etablierten klassischen kulturellen Stuhl-diagnostik werden die Bakterien auf einer Vielzahl verschiedener Nährmedien unter aeroben und anaeroben Bedingungen angezüchtet und quantitativ beurteilt. Es liegen eingehende Erfahrungen darüber vor, in welcher Weise qualitative und/oder quantitative Änderungen, die bei der Anzucht von Bakterien und Pilzen gefunden werden, auf pathologische Veränderungen rückschließen lassen. Es muss aber berücksichtigt werden, dass mit dem kultivierbaren Teil der Mikrobiota nur der Nachweis eines Teils (40 %, Tabelle 1) der Mikroorganismen der intestinalen Flora möglich ist.

Besonders die quantitativ dominierenden obligat anaerob wachsenden Bakterien lassen sich nur zum Teil anzüchten. Der Nachweis dieser Keime erfordert moderne molekularbiologische Verfahren. Hier stehen vor allem Methoden wie die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) oder DNA-Hybridisierungsverfahren zur Verfügung. Bei diesen Methoden werden spezies-spezifische Unterschiede in der Geninformation genutzt, um die verschiedenen Mikroorganismen zu identifizieren und zu quantifizieren.

Da bei diesen Methoden nicht mehr die lebenden Mikroorganismen nachgewiesen werden, sondern ihre Geninformation, ist man dazu übergegangen, nicht mehr von „Mikrobiota“, sondern vom „Mikrobiom“ zu sprechen. Ein Nachteil dieser Methode ist, dass nur gezielt nach einzelnen Mikroorganismen untersucht werden kann. Mit der PCR beziehungsweise dem DNA-Hybridisierungsverfahren ist es möglich,

Befundmitteilung Mikrobiom

- Der Befund beinhaltet eine tabellarische Darstellung der 30 häufigsten Bakterien sowie einiger wichtiger Indexkeime.
- Der Enterotype
- Die α -Diversität, das heißt die quantitative Angabe, wie viele verschiedene Bakterienarten in der Probe detektiert werden.
- Die β -Diversität, das heißt ein Vergleich des Mikrobioms der Probe mit einem gesunden Kontrollkollektiv, das bezüglich Alter, Geschlecht und Ernährungszustand vergleichbar ist.
- Auf Wunsch werden die Daten der gesamten Analyse zur Verfügung gestellt.
- Die Ergebnisse der Mikrobiomanalyse bilden einen Istzustand der Darmflora ab. Die Daten können nur im Zusammenhang mit dem klinischen Bild interpretiert werden. Eine Diagnose oder eine Therapieempfehlung kann daher nicht vom Labor erfolgen.

auf wichtige Mikroorganismen zu screenen. Die Gesamtheit des Mikrobioms lässt sich jedoch mit dieser Methode nicht erfassen.

Der Durchbruch in der Mikrobiomanalytik erfolgte in den letzten Jahren durch die Weiterentwicklung des sogenannten „Next Generation Sequencing“ (NGS). Beim NGS handelt es sich um eine Sequenziermethode, bei der Millionen von kurzen DNA-Fragmenten parallel analysiert werden. Die einzelnen Sequenzabschnitte werden verwendet, um die verschiedenen Mikroorganismen zu identifizieren. Über die Häufigkeit, mit der bestimmte Sequenzen gefunden werden, ist eine Quantifizierung der verschiedenen Mikroorganismen möglich. Durch Einsatz dieser Methode kann innerhalb kürzester Zeit die Zusammensetzung der Gesamtheit der Bakterien oder der Pilze eines komplexen Mikrobioms analysiert werden.

Ergänzend zur Mikrobiomanalytik bzw. klassischen kulturellen Dysbakteriediagnostik eignet sich die Analyse einiger zusätzlicher Parameter, um pathologische Veränderungen im Verdauungstrakt zu diagnostizieren (Tabelle 2).

Tabelle 1: Wichtige Bestandteile des humanen intestinalen Mikrobioms

Phylum	Klasse/Familie		Genus/Spezies	
<i>Bacteroidetes</i>	<i>Bacteroidia</i>		<i>Bacteroides spp.</i> *	
			<i>Prevotella spp.</i> *	
<i>Firmicutes</i>	<i>Clostridia</i>		<i>Clostridium spp.</i> *	
			<i>Faecalibacterium spp.</i>	
			<i>Ruminococcus spp.</i>	
			<i>Roseburia spp.</i>	
			<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>	
			<i>Lachnospira multipara</i>	
			<i>Eubacterium rectale</i>	
			<i>Peptostreptococcus spp.</i>	
			<i>Veilonella spp.</i>	
			<i>Lactobacillus spp.</i>	
			<i>Enterococcus spp.</i>	
			<i>Streptococcus spp.</i>	
		<i>Staphylococcus spp.</i>		
<i>Proteobacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>			
	<i>Betaproteobacteria</i>		<i>Burkholderia spp.</i>	
	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>		<i>Escherichia coli</i>
				<i>Proteus spp.</i>
				<i>Klebsiella spp.</i>
	<i>Pseudomonadaceae</i>		<i>Pseudomonas spp.</i>	
<i>Actinobacteria</i>			<i>Bifidobacterium spp.</i> *	
			<i>Collinsella</i>	
<i>Fusobacteria</i>			<i>Fusobacterium spp.</i>	
<i>Verrucomicrobia</i>			<i>Akkermansia muciniphila</i>	

Bakterien, die üblicherweise in der klassischen kulturellen Stuhl-diagnostik nachgewiesen werden können, sind unterstrichen.

* Kultureller Nachweis nur für einige Spezies möglich.