

Stabilitätsuntersuchungen zu Ethylglucuronid bei bakteriell kontaminierten Urinen

Carsten Bartling^{1,*} und Michael Böttcher²

¹MVZ Labor Dr. Quade und Kollegen, GmbH, D-50933 Köln; *corresponding author
bartling@lab-quade.de

²MVZ Labor Dessau, GmbH, D-06847 Dessau

Aims: This study intends to give further data on the prevalence of β -glucuronidase activity (β -GLU) in urine samples and its pre-analytical relevance with regard to EtG testing. **Methods:** 108 randomly selected urine samples from routine drugs of abuse testing in our labs were tested for bacterial contamination and expression of β -GLU (enzymatic cleavage of p-nitrophenyl- β -D-glucuronide; Rosco DiagnosticaTM). Ten urine samples with $>10^5$ CFU/ml *E. coli* and β -GLU + were selected from routine clinical microbiology testing and spiked with EtG ad 1mg/ml. EtG concentration was monitored at different storage times and storage conditions using our forensic accredited UPLC-MS/MS method. Methanol was added (1+1, v+v) to the samples to precipitate β -GLU and inhibit bacterial growth. **Results and Discussion:** Only 44% of all drug urines showed no bacterial contamination. In 55% of the contaminated samples β -GLU activity was detectable, so that 31% of all samples were at risk of being affected by β -GLU if EtG testing had been requested. From the spiked infected samples 7 out of 10 revealed the influence of β -GLU: after 72h storage at room temperature EtG was reduced or even not detectable. Storage at 4-8°C could extend this period significantly. Adding methanol to the urine samples kept the EtG concentration stable for at least 72 hours. **Conclusion:** A significant influence of bacterial contamination or β -GLU respectively on urinary EtG concentration was detectable. Statistically approximately every 3rd urine had to be regarded as being able to cleave EtG by β -GLU. A use of preserving methods is to be recommended particularly in case of postal dispatch or longer storage time. The urine samples should be stored at fridge temperature at least.

1. Einleitung

Ethylglucuronid (EtG) als Phase 2 Mindermetabolit des Ethanols wird häufig zum Nachweis einer Alkoholabstinenz herangezogen. Die Bestimmung kann sowohl in Blut, Urin als auch in Haarproben erfolgen. Wegen der einfachen Gewinnung und der zeitnahen und kostengünstigen Testungsmöglichkeit durch automatisierte Immunoassays wird die Bestimmung aus Urin zur Zeit bevorzugt. Bei Urinproben stellt die Kontamination durch Bakterien ein Problem in der Präanalytik dar, da die Enzymausstattung der Keime die Konzentration des Analyten sowohl durch β -Glucuronidasen (β -Glu) reduzieren [1], als auch durch post-Collection Synthese von EtG [2] ein positives Resultat bedingen kann. Ziel der Studie war es, Informationen über das Risiko der Beeinflussung der Proben durch β -Glu bildende Bakterien und Möglichkeiten zur Stabilisierung von EtG zu erhalten.

2. Material und Methoden

2.1. Prävalenz von Kontamination in Urinproben

108 zufällig ausgewählte Urinproben aus dem arbeitstäglichen Probeneingang zur Drogenanalytik wurden auf bakterielle Kontamination und bei Wachstum von Bakterien diese

Proben konnte nach Ablauf der 72h kein EtG detektiert werden. Bei Lagerung bei Kühlschranktemperatur (4°C - 8°C) (Messreihe B) reduzierte sich die EtG Konzentration nur bei einer Probe. Die Zugabe von Methanol verhinderte einen Abfall der EtG-Konzentration. Auffällig war eine Probe, deren EtG-Gehalt in allen Messreihen auf mehr als das zweifache der Ausgangskonzentration anstieg.

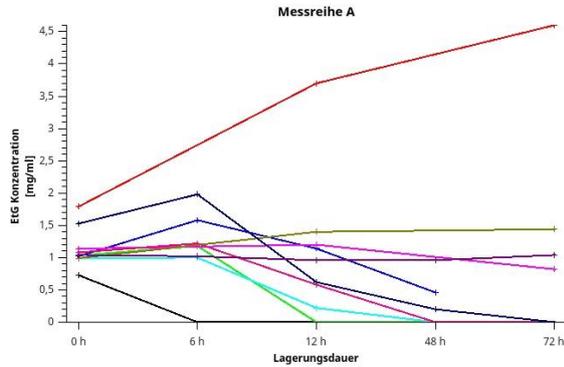


Abb. 3. Messreihe A.

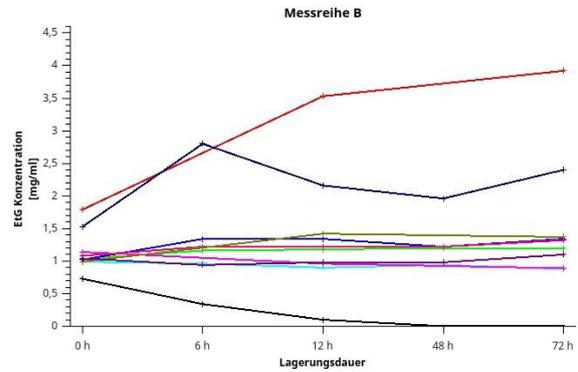


Abb. 4. Messreihe B.

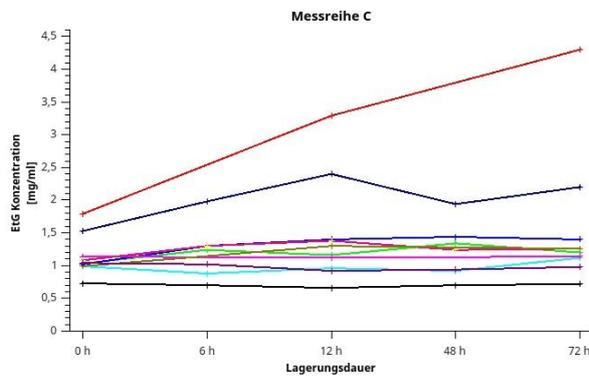


Abb. 5. Messreihe C.

4. Schlussfolgerungen

Bei 31% der Urinproben, die auf EtG untersucht werden sollen, können in Abhängigkeit von der Lagerungsdauer durch β -Glu bildende Bakterien erniedrigte EtG Konzentrationen erwartet werden. Insbesondere bei Postversand oder nicht arbeitstäglicher Abarbeitung muss dies Berücksichtigung finden. Eine Reduktion des EtG-Abbaus kann durch die Lagerung bei Kühlschranktemperaturen erreicht werden. Eine komplette Hemmung der β -Glu Aktivität ist in dieser Versuchsreihe nur durch die Zugabe von Methanol möglich.

5. Literatur

- [1] Baranowski S, Serr A, Thierauf A, Weinmann W, Große Perdekamp M et al. In vitro study of bacterial degradation of ethyl glucuronide and ethyl sulphate. *Int Journal Legal Med* 2008;122:389–393.
- [2] Helander A, Olsson I, Dahl H. Postcollection synthesis of ethyl glucuronide by bacteria in urine may cause false identification of alcohol consumption. *Clinical Chemistry* 2007;53:1855–1857.