

In Vitro Study of Bacterial Degradation of Ethyl Glucuronide and Ethyl Sulfate

Stefanie Baranowski¹, Claudia C. Halter¹, Annerose Serr², Markus Grosse Perdekamp¹, Wolfgang Weinmann¹

Abstract

Objectives: Recent studies show that ethyl glucuronide (EtG) but not ethyl sulfate (EtS) can be decomposed by bacteria causing urinary tract infections. The aim of this study is to examine the effect of post mortem bacterial colonisation (putrefaction) on the alcohol consumption markers EtG and EtS.

Material and methods: Bacteria (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Clostridium sordellii*) were isolated from autopsy material (liver, heart blood, urine, ascites, pericardial fluid, pleural fluid) and added to nutrient deficient medium containing EtG and EtS. After incubation at 36 °C, samples were taken after various intervals up to 11 days. EtG and EtS were determined by electrospray ionization tandem mass-spectrometry (LC-ESI-MS/MS).

Results: Experiments were carried out with nutrient deficient media containing EtG or EtS, both EtG and EtS and with blank medium as control sample. In all cases, EtG was degraded by the different strains of bacteria, complete degradation occurred in the range of 2-5 days. EtS was not affected within 11 days of incubation.

Conclusion: The results show, that EtS can be the more suitable marker for the assessment of ante mortem alcohol ingestion in corpses as it is not degraded by the strains of bacteria tested in our study.

1. Ethylglucuronid und Ethylsulfat und ihre Stabilität

Ethylglucuronid (EtG) und Ethylsulfat (EtS) sind Alkoholkonsummarker, welche schon nach dem einmaligen Konsum geringer Mengen von Alkohol Stunden bis Tage im Urin nachweisbar sind.

Untersuchungen zur In-vitro-Stabilität bei Lagerung von EtG- und EtS-haltigen Proben erbrachten unterschiedliche Ergebnisse: Nach Helander und Dahl [1] war EtG im Gegensatz zu EtS im Urin bei Patienten mit Harnwegsinfekten bei Lagerung bei 22°C teilweise nicht stabil. Schloegl et al. [3] beschrieb EtG in Urin bei 4°C und Raumtemperatur sowie postmortalem Gewebe (Leber und Skelettmuskulatur) bei Raumtemperatur als stabil bzw. im Urin im fünfwöchigen Untersuchungszeitraum in beiden Versuchsaufbauten detektierbar, auch in Gewebeproben konnte EtG vier Wochen lang nachgewiesen werden. Hoiseth et al. [2] beobachteten in mit EtG angereichertem Leichenblut bei Aufbewahrung bei 40 °C nach 22 Tagen einen kompletten Abbau von EtG.

2. Bakterienisolierung

Zur Bestimmung der allgemeinen Bakterienbesiedelung von Leichenaservaten wurden Gewebeproben (Herzblut, Urin, Aszites, Brusthöhlenflüssigkeit, Herzbeutel­flüssigkeit, Lebergewebe) von 13 nicht vorselektierten Leichen im Rahmen der gerichtlich angeordneten Obduktionen entnommen und die Bakterienbestimmung am Institut für Mikrobiologie in Freiburg durchgeführt.

Bei der mikrobiologischen Untersuchung wurde in erster Linie Fäkalflora nachgewiesen. außerdem Staphylokokkus aureus und die Koagulase Negative Staphylokokken (Hautkeime). Für die weiteren Experimente wurden Escherichia coli, Clostridium sordellii und Klebsiella pneumoniae ausgewählt.

3. Studiendesign

Pro Bakterium wurden fünf Ansätze (vgl. Tab.1) über jeweils 11 Tage bei 36°C auf dem Schüttler inkubiert. Aus den täglich abgenommenen Proben wurde EtG und EtS per LC-ESI-MS/MS bestimmt.

Tab. 1: Zusammenfassung des Studienaufbaus

	MM (10 ml)	Bakterien	EtG (10 mg/l)	EtS (10 mg/l)
1. Kontrolle	+	-	+	+
2. Kontrolle	+	+	-	-
3. EtG	+	+	+	-
4. EtS	+	+	-	+
5. EtG+EtS	+	+	+	+

In jedem Ansatz befanden sich 10ml Mangelmedium (MM, Flüssigmedium ohne Kohlenstoffquelle, die Bakterienmenge betrug 10 µl aus ca. 1*10⁴ KBE/ mL (koloniebildende Einheiten/ mL), weitere Zusammensetzung s. Tabelle 1.

4. Ergebnisse

EtG wurde sowohl im Ansatz mit MM, Bakterien und EtG, als auch im Ansatz mit MM, Bakterien, EtG und EtS nach 96 h von E. coli und C. sordellii vollständig abgebaut. Durch K. pneumoniae fand kein Abbau statt (vgl. Abb. 1 und 2). Der Anstieg der EtG-Konzentration im Ansatz mit Klebsiella ist trotz Verschluss der Kulturgefäße mit Parafilm durch Verdunstung und Kondensation von Flüssigkeitstropfen an Deckel und Wänden der Kulturflaschen erklärbar. EtS wurde von keinem der untersuchten Bakterien abgebaut (vgl. Abb. 3 und 4).

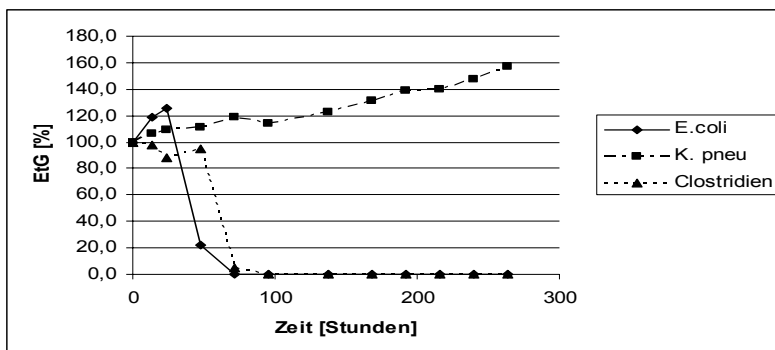


Abb. 1.
EtG in MM und EtG

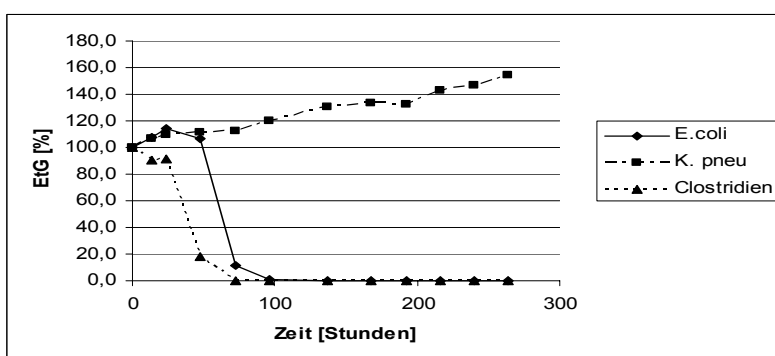


Abb. 2.
EtG in MM, EtG und EtS

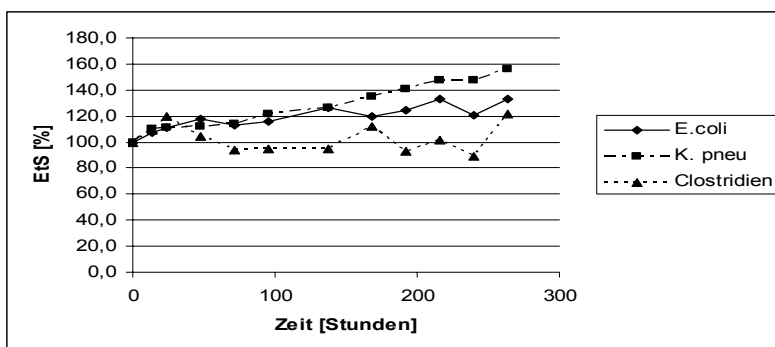


Abb. 3.
EtS in MM und EtS

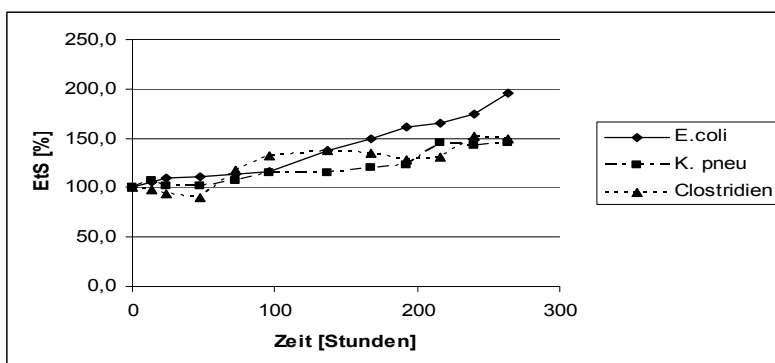


Abb. 4.
EtS in MM, EtG und EtS

In den anderen Ansätzen wurden weder Neubildung noch Zerfall von EtG oder EtS beobachtet.

5. Diskussion

EtG kann von verschiedenen Fäulnisbakterien abgebaut werden. EtS wurde in der vorliegenden Studie nicht abgebaut. Deshalb ist die Bestimmung von EtG und EtS gemeinsam erfolgsversprechender für den Nachweis des Alkoholkonsums vor dem Todeszeitpunkt, gerade unter dem Aspekt, dass hierfür kein zusätzlicher Arbeitsaufwand erforderlich ist.

6. Ausblick

Da hier nur eine geringe Anzahl von Bakterienstämmen untersucht wurde, wäre eine Ausweitung auf andere Stämme und ihre Testung auf β -Glucuronidase-Aktivität wünschenswert. Weitere Variablen können in der Temperatur bzw. dem Medium (Vollmedium, Organhomogenisat) bestehen.

7. Literaturverzeichnis

- [1] Helander A, Dahl H (2005) Urinary tract Infection: A Risk Factor for False-Negative Urinary Ethyl Glucuronide but not Ethyl Sulfate in the Detection of Recent Alcohol Consumption. Clin. Chem 51 (9): 1728-1730
- [2] Hoiseh G (2006) Vortrag TIAFT 2006 Ljubljana
- [3] Schloegl H (2006) Stability of ethyl glucuronide in urine, post-mortem tissue and blood samples. Int J Leg Med 120: 83-88

Stefanie Baranowski
Claudia C. Halter
Markus Grosse Perdekamp
Wolfgang Weinmann
Institute of Forensic Medicine
Forensic Toxicology
University Hospital Freiburg,
Albertstrasse 9
79104 Freiburg

Annerose Serr
Department of Microbiology
and Hygiene
University Hospital Freiburg
Hermann-Herder-Strasse 11
79104 Freiburg