



Aktuelles aus der Drogenanalytik, August 2010

Ethylglucuronid (EtG) - ein direkter Alkoholmarker

Sowohl in der Rechtsmedizin als auch zur Kontrolle einer erfolgreichen Abstinenz alkoholkranker Patienten hat ein neuer Alkoholmarker Bedeutung erlangt: EtG. Ethylglucuronid ist ein direkter Alkoholmetabolit, der nur in Anwesenheit von Ethanol durch Glucuronidierung in der Leber entsteht und damit alkoholspezifisch ist. Bereits beim Konsum geringer Mengen Alkohol ist dieser sehr sensible Parameter bis zu 80 Stunden im Urin nachweisbar; damit schließt sich das bislang offene diagnostische Zeitfenster zwischen direkter Messung der Blutalkoholkonzentration und Bestimmung von Langzeitmarkern (z.B. CDT). In Studien erweist sich EtG jedoch als störanfällig gegenüber einer Vielzahl von Faktoren. Dass die Anwendung von alkoholhaltigen Hautpflegemitteln, Mundwasser oder Desinfektionsmitteln bereits ausreichen, um ein positives EtG Testergebnis zu erhalten, ist schon längere Zeit bekannt. Fatal für den Einzelnen, wenn man die Folgen bedenkt. Damit sich der Nachweis von Ethylglucuronid zu einem verlässlichen Routine-

verfahren entwickeln kann, ist es wichtig, auch die Grenzen und Schwächen dieser Analysemethode zu kennen. Nur so sind Verbesserungen und eine kritische Interpretation von Testergebnissen möglich.

Bereits 2004 gingen Wissenschaftler in Basel der Frage nach, wie spezifisch der Nachweis von EtG im Urin für einen tatsächlich stattgehabten Alkoholkonsum ist und welche Störfaktoren eine Rolle spielen könnten. Urinproben von 453 Probanden wurden mittels LC-MS/MS untersucht und die Ergebnisse unter Berücksichtigung verschiedener Parameter statistisch ausgewertet. Vor allem Cannabiskonsum, Alter, Geschlecht, Nierenerkrankungen und Gesamtalkoholkonsum der letzten Monate

In dieser Ausgabe:

- Ethylglucuronid - Ein direkter Alkoholmarker
- Drogenschnelltest mit integrierter Kreatininbestimmung

weiter auf Seite 2

Drogenschnelltest mit integrierter Kreatininbestimmung

Urin ist das gebräuchlichste Untersuchungsmaterial in der Drogenanalytik. Bedingt durch die Art der Probengewinnung sind manipulative Verfälschungen nie sicher auszuschließen. Diese zu erkennen ist aber ein entscheidender Faktor für die Qualität der erhobenen Befunde. Insbesondere die Aufdeckung „dünnere“ (In-vivo Urinverdünnung durch Aufnahme großer Flüssigkeitsvolumina) oder „verdünnter“ (In-vitro Wasserbeimengung) Urine ist dabei von Bedeutung, da diese einen Abfall der Drogenkonzentrationen unter die Nachweisgrenze mit einem falsch-negativen Ergebnis bewirken können. Eine simultane Überprüfung der Urinkonzentration sollte deshalb ein regulärer Bestandteil einer jeden Urindrogenanalyse sein.

Als allgemein akzeptierte Kenngröße bei der Messung der Urinkonzentration dient die Bestimmung des Kreatinins, ein Abbauprodukt des Kreatins. Kreatinin wird glomerulär filtriert und dann ohne Reabsorption in den Urin ausgeschieden. Die tägliche Menge von Kreatinin im Urin korreliert linear mit der Muskelmasse, ist unter physiologischen Bedingungen relativ konstant und kann deshalb als ein Maß für die Urinkonzentration betrachtet werden. [9]

weiter auf Seite 4



weiter auf Seite 4

►► Fortsetzung von Seite 1:
Ethylglucuronid ein direkter Alkoholmarker

scheinen Einfluss zu haben auf die Korrelation zwischen gemessenem EtG-Wert und tatsächlich stattgehabtem Alkoholkonsum und sollten daher bei der Interpretation des Testergebnisses berücksichtigt werden.^[1]

Die Bestimmung der EtG-Konzentration im Urin erfolgt überwiegend mittels Enzym-Immunoassay. Obwohl dafür sehr spezifische Antikörper verwendet werden, die für den Nachweis gezielt und ausschließlich an die gesuchte Substanz binden sollen, sind Kreuzreaktionen und damit falsch positive Ergebnisse ein durchaus bekanntes Problem dieser Nachweismethode. Arndt et al. zeigten, dass im Urin-EtG-Screening mit dem DRI® EtG Enzyme Immunoassay

*„Falsch-positiver
 EtG-Nachweis
 im Enzym-Immunoassay bei
 gleichzeitiger
 Schlafmittelmedikation:
 Kreuzreaktion mit
 Chloralhydrat Metaboliten“*

(Thermo Fisher Scientific Microgenics), die Einnahme von Chloralhydrat auch unter Alkoholabstinenz zu positiven Ergebnissen führen kann. Grund dafür scheint zu sein, dass ein Metabolit von Chloralhydrat, Trichlorethylglucuronid, mit den im Test verwendeten Antikörpern kreuzreagiert.^[2]

In einer schwedischen Studie wurde 2007 gezeigt, dass nach Gewinnung der zu untersuchenden Urinprobe, nämlich in der Zeit bis zum eigentlichen Analyseverfahren, Veränderungen der EtG-Werte möglich sind. Ursache hierfür können Bakterien sein, die als Erreger von Harnwegsinfektionen bereits im Urin enthalten sind, oder mit denen die Probe nachträglich kontaminiert wurde. Sowohl falsch negative als auch falsch positive Ergebnisse für EtG scheinen so

möglich. Falsch negative Ergebnisse kamen in der Untersuchung durch die Kontamination der Testproben mit *Escherichia coli* zustande, einen der häufigsten Erreger von Harnwegsinfektionen. *E. coli* verfügt über das Enzym β -Glucuronidase, das imstande ist, EtG zu hydrolysieren. Hierdurch sinkt die

*„Bakterien können
 die Konzentration von EtG
 im Urin
 verändern“*

EtG-Konzentration in der Probe bereits innerhalb von 24 Stunden signifikant ab.

Umgekehrt beobachtete man in der Studie, dass *E. coli* mittels der mikrobiellen Enzyme Uridin-Diphosphat-Glucuronosyltransferase (UGT) und Sulfotransferase (SULT) aus Ethanol EtG synthetisieren kann. Ethanol kann im Urin entweder in geringer Menge enthalten sein, weil ein Teil des konsumierten Alkohols auf diesem Weg unverändert ausgeschieden wird, oder durch Kontakt mit Desinfektionsmitteln in die Probe gelangen. Am bedeutendsten ist jedoch die natürliche Fermentation aus Glucose zur Energiegewinnung durch *Candida albicans*, der sehr häufig in Urinproben auch klinisch gesunder Probanden nachgewiesen werden kann. Wird nun dieses Ethanol mittels der mikrobiellen UGT und SULT zu Ethylglucuronid abgebaut, kommt es zu einem falsch positiven Testergebnis.^[3]

Die bakteriell verursachten Veränderungen des EtG-Wertes konnten auch nicht durch Einfrieren der Probe oder Versetzung mit Natriumfluorid verhindert werden. Nach den Ergebnissen einer Freiburger Studie 2008 könnte jedoch der Zusatz von Konservierungsmitteln zur Urinprobe einen bakteriellen Abbau von Ethylglucuronid verhindern. Mit *E. coli* kontaminierte Testproben zeigten unter Zugabe von Chlorhexidin, Borsäure sowie einem käuflichen Vacutainer-

System mit Chlorhexidin und Benzylparaben keine Veränderungen der EtG-Konzentrationen. Die Analyseergebnisse wurden dabei nicht beeinträchtigt, so dass die Verwendung von Konservierungsmitteln zur forensischen EtG-Bestimmung aus Urin hier empfohlen werden kann.^[4]

Bei einem also doch recht störanfälligen Parameter ist deshalb die Festlegung eines Cut-off-Wertes nicht einfach. Der Cut-off-Wert ist ein Wert, der gewählt wird um festzulegen, dass alle Testergebnisse oberhalb dieses Wertes als positiv und alle Ergebnisse unterhalb dieses Wertes als negativ gelten. Um ihn definieren zu können, muss jedoch die Fragestellung berücksichtigt und oft ein Kompromiss zwischen Sensitivität und Spezifität gemacht werden. Ein niedriger Cut-off bedeutet zwar eine hohe Sensitivität und damit die Erfassung möglichst aller tatsächlich positiven Proben; gleichzeitig steigt jedoch die Zahl falsch positiver Ergebnisse an, und der Test verliert an Spezifität. Zur Verdeutlichung: 2007 wurden in einer Studie Ergebnisse von EtG-Immunoassays mit massenspektrometrischen EtG-Bestimmungen verglichen. Zwei verschiedene Cut-off-Werte wurden festgelegt, 0,5 mg/L und 1,0 mg/L. Die qualitative Übereinstimmung erreichte in beiden Fällen 98,2%. Mit der LC-MS als Referenzmethode, lag die Sensitivität des EtG-Immunoassays für den Cut-off von 0,5 mg/L bei 98,7% (Spezifität 98,0%); beim Cut-off von 1,0 mg/L sank die Sensitivität auf 97,9%, die Spezifität dagegen stieg auf 98,4%.^[6]

Einen optimalen Cut-off-Wert gibt es wohl demzufolge nicht, weshalb es besonders wichtig ist, mit einzelnen Testergebnissen kritisch umzugehen. In der Praxis ist eine positive EtG-Testung im EtG-Immunoassays erst forensisch verwertbar, wenn sie mit einer massenspektrometrischen Analyseverfahren bestätigt wurde. Insofern scheint es derzeit als vertretbar, den üblichen Cut-off-Wert relativ niedrig und sensibel bei 0,5 mg/L anzusiedeln.

Angesichts der Störanfälligkeit der alleinigen EtG-Analyse wird mehr und mehr proklamiert, die Spezifität zu verbessern, indem man die Interpretation eines Testergebnisses von mehreren Parametern abhängig macht. Ideal erscheint die gleichzeitige zusätzliche Bestimmung von EtS. Ethylsulfat ist ebenfalls ein direkter Alkoholmarker mit ähnlichem Nachweisfenster wie EtG; sein Metabolismus erfolgt jedoch auf anderem Wege, unabhängig von EtG. Nachgewiesen ist, dass EtS gegenüber mikrobiellen Enzymaktivitäten in der Urinprobe stabil ist.^[5] Allerdings ist aufgrund der chemischen Struktur des EtS auf absehbare Zeit nicht mit einem

*„Ethylsulfat
scheint weniger
störanfällig“*

Enzym-Immunoassay zu rechnen. Der Nachweis von EtS ist somit bisher nur

können. Schließlich wird mit Ethanol ein Metabolit und nicht seine Ausgangssub-

*„Beeinflussen körpereigene
Enzymsysteme die
EtG-Konzentration?“*

stanz nachgewiesen, so dass etwa pathologische Alterationen solcher Zwischenschritte eine Rolle spielen könnten. Als zentrales Enzym sei hier die UDP-Glucuronyltransferase genannt. Ihre Aktivität ist zum Beispiel bei Erkrankungen der Leber, nämlich dem Gilbert-Meulengracht-Syndrom oder dem Crigler-Najjar-Syndrom herabgesetzt. Somit könnte bei diesen Erkrankungen der prozentuale Anteil des zu EtG metabolisierten Ethanols geringer sein, ein falsch negatives Ergebnis wäre die Folge. Zu klären wäre auch, welche Bedeutung die Gabe von Medikamenten mit enzyminduzierender Wirkung (z.B. Phenobarbital, Lamotrigin) auf die UDP-

ADH und ALDH die besondere Eigenschaft der Induzierbarkeit, was dazu führt, dass sich bei chronischem Alkoholkonsum im Sinne einer Adaptationsreaktion die Enzymaktivität von CYP2E1 erhöht und so der Alkoholabbau via MEOS anteilig höher wird. Ob eine solche Selbstinduzierbarkeit beim chronischen Alkoholabusus auch für die UDP-Glucuronyltransferase vorliegt, ist eine wichtige Frage. Nur so kann geklärt werden, ob die EtG-Werte von Gelegenheitstrinkern vergleichbar sind mit de-

*„EtG Konzentration
bei chronischem Alkoholabusus
vermindert?“*

nen von alkoholkranken Patienten und inwieweit es Sinn macht, den Cut-off generell einheitlich festzulegen.^[7]

Die EtG-Bestimmung im Urin eignet sich als Parameter, der eine Abstinenzbehauptung bestätigen oder widerlegen



19. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Suchtmedizin
05.- 07. November 2010 in Berlin, Ludwig Erhard Haus
Wir freuen uns über Ihren Besuch an unserem Ausstellungsstand!



mittels massenspektrometrischer Verfahren möglich.

Die dargestellten Untersuchungen liefern Beispiele dafür, wie bereits im Organismus, in der Urinprobe nach deren Gewinnung oder im Analyseverfahren selbst EtG-Werte gemessen werden können, die unabhängig von vorangehendem Alkoholgenuss erhöht sind. Anzunehmen ist, dass in wissenschaftlichen Untersuchungen noch weitere Faktoren gefunden werden, die sich auf das Testergebnis auswirken. Ausgehend von der Studie von Helander et al. sollte untersucht werden, ob artifizielle Enzymaktivitäten nicht nur durch bakterielle Enzymaktivitäten entstehen können, sondern ob auch körpereigene Enzymsysteme, die am Ethanolabbau beteiligt sind, selbst Störfaktoren unterliegen

Glucuronyltransferase in diesem Zusammenhang haben. Über den chronischen Alkoholabusus weiß man, dass sich im Laufe der Zeit der Ethanolmetabolismus verändert. Steht beim Nicht- oder Gelegenheitstrinker der Abbau über die Alkohol- und Aldehyddehydrogenase im Vordergrund, spielt beim chronischen Konsum ein weiterer hepatozytärer Abbauweg eine immer größere Rolle: Das MEOS (microsomal ethanol oxidizing system) ist ein Cytochrom - P450 abhängiges Enzym, CYP2E1, das im Endoplasmatischen Retikulum lokalisiert ist und neben NADPH + H⁺ noch zusätzlich molekularen Sauerstoff für den Ethanolmetabolismus benötigt. Bei gelegentlichem Alkoholkonsum kommt MEOS erst zum Einsatz, wenn die tägliche Alkoholaufnahme 50g überschreitet. MEOS hat jedoch im Gegensatz zu

kann. Derzeit gilt üblicherweise ein Cut-off Wert von 0,5 mg/L. Das Ergebnis muss für forensische Zwecke mit einem massenspektrometrischen Verfahren bestätigt werden. Ein positives Ergebnis sollte im Hinblick auf oben erörterte mögliche Störfaktoren stets kritisch und im Kontext mit weiteren Parametern betrachtet werden. Aus dem einmalig bestimmten EtG-Wert kann weder auf den Trinkzeitpunkt noch auf die Menge und Art des aufgenommenen Alkohols geschlossen werden. Es wird jedoch diskutiert, mittels eines kinetischen Modells aus mehrmaligen EtG-Bestimmungen den Trinkzeitpunkt sowie die maximale Blutalkoholkonzentration zu bestimmen; dies wäre eine vielversprechende Möglichkeit, im Rahmen von Begutachtungen etwa die Frage eines Nachtrunkes zu klären.^[8]

LITERATUR

1. **Wurst FM., Wiesbeck GA., Metzger JW., Weinmann W.**, On sensitivity, specificity, and the influence of various parameters on ethyl glucuronide levels in urine—results from the WHO/ISBRA study, *Alcohol, Clin Exp Res.* 2004 Aug;28(8):1220-8
2. **Arndt T., Gierden B., Güssregen B., Werle A., Grüner J.**, False-positive ethyl glucuronide immunoassay screening associated with chloral hydrate medication as confirmed by LC-MS/MS and self-medication, *Forensic Science International* 10.1016/j.forsciint.2008.10.022 Volume 184, Issue 1, Pages e27-e29 (30 January 2009);
3. **Helander A., Olsson I. and Dahl H.**, Department of Clinical Neuroscience, Karolinska Institute and Karolinska University Hospital, Stockholm, Sweden, Postcollection Synthesis of Ethyl Glucuronide by Bacteria in Urine May Cause False Identification of Alcohol Consumption, *Clinical Chemistry.* 2007;53:1855-1857;
4. **Thierauf A., Serr A., Halter C., Al-Ahmad A., Weinmann W.**, Konservierungsstoffe zur Hemmung des bakteriellen Abbaus von Ethylglucuronid in Urinproben, *Forensic Sci Int.* 2008 Nov 20;182(1-3):41-5. Epub 2008 Nov 4;
5. **Wurst FM., Dresen S., Allen JP., Wiesbeck G., Graf M., Weinmann W.**, Ethyl sulphate: a direct ethanol metabolite reflecting recent alcohol consumption, *Addiction* 2006 Feb;101(2):204-11;
6. **Böttcher M., Beck O., and Helander A.**, Evaluation of a new immunoassay for urinary ethyl glucuronide testing, *Alcohol and Alcoholism* 2008 43(1):46-48;
7. **Biesalski H.-K., Fürst P., Kasper H., Kluthe R., Pöler W., Puchstein C., Stähelin H.B.**, Ernährungsmedizin – nach dem Curriculum Ernährungsmedizin der Bundesärztekammer, 3. Auflage, 2004, Georg Thieme Verlag ISBN-3-13-100293-X
8. **Drönner P.**, Die Glucuronidierung des Ethanols beim Menschen - Experimente, Berechnungen und rechtsmedizinischen Anwendungen, Internetpublikation unter <http://www.ub.uni-heidelberg.de/79>
9. **Arndt, T.**, Urin-Kreatininkonzentration: Kenngröße zur Prüfung auf Probenwertbarkeit? Kritische Überlegung aus ca. 25000 Urin-Kreatininbestimmungen in einem klinisch-chemischen Labor T+K (2007) 74(2):94

►► Fortsetzung von Seite 1: **Drogenschnelltests mit integrierter Kreatininbestimmung**

Urin, dessen Kreatininkonzentration <200 mg/L beträgt, ist nach allgemein gültiger Definition „verdünnt“, und eine analytische Verwertung der Urinprobe ist nicht sinnvoll.

Um die Drogenanalytik mittels Schnelltests zu verbessern, bieten wir Ihnen

neben den Standarddrogentests ab September unseren **Mehrfachdrogentest „Professional“** mit integrierter semi-quantitativer Kreatinin-, pH- und Oxidantien-Bestimmung an. In drei übereinander liegenden Testfeldern kommt es durch chemische Reaktion zu einem Farbwechsel, der durch einen Vergleich mit der Farbenskala visuell ausgewertet

wird. Das Testprinzip basiert auf der lateral flow Technik, der Ablauf der Drogentestdurchführung ändert sich somit nicht.

Die semi-quantitative Untersuchung des Urins auf Kreatinin, pH und Oxidantien kann nach EBM (32030) abgerechnet werden und ist somit kostenneutral.



*Fordern Sie ein kostenfreies Produktmuster bei uns an!

LFM-Diagnostika oHG

HRA 6468 Amtsgericht Würzburg
Geschäftsführer: Martina Fels, Franz Lukas
Spessartstraße 9, D-97082 Würzburg

Zertifizierter Hersteller
von Drogenschnelltests



Telefon: + 49 (0) 931 – 4 60 74 27
Freefax: + 49 (0) 800 – 27 11 333
www.lfm-diagnostika.de
info@lfm-diagnostika.de