

Untersuchung von mikrobiologischen Einflüssen auf die Stabilität von Dopingkontrollproben

Detlef Thieme¹ (Projektleiter), Dirk Ganghofner³, Joachim Grosse²,
Claudia Rautenberg² & Lars Wassil³

¹ L.-M.-Universität München, Institut für Rechtsmedizin

² Institut für Dopinganalytik und Sportbiochemie, Kreischau

³ Amplex Diagnostics, München

1 Untersuchung von aktiven Urinproben mit mikrobiologischer Bildung von 19-Norsteroiden

Im Jahr 2005 wurden im Rahmen der Routine-Dopingkontrollen insgesamt 27 Urine selektiert, die Anzeichen einer Demethylierung von Androsteron zu Norandrosteron zeigten (Grosse et al., 2005; WADA, 2005). In einer Projektstudie wurden 14 dieser auffälligen Proben einer mikrobiologischen Untersuchung unterzogen, um mögliche Ursachen dieser Aktivität einzugrenzen:

- ◇ Eine Kontamination der betreffenden Urinproben mit Bakterienkulturen konnte durch deren Isolierung und Anzucht in zehn von vierzehn untersuchten Proben nachgewiesen werden.
- ◇ Mit PCR wurden die Stämme *Enterococcus faecalis* und *Enterococcus spec.* identifiziert.
- ◇ Die B-Proben waren bis zur Untersuchung versiegelt. Die Mehrheit der B-Proben wies keine bakterielle Belastung auf, weshalb auf eine laborinterne Bakterienkontamination geschlossen wurde, die nicht als Ursache der metabolischen Urinaktivität in Betracht kommt.
- ◇ Zur Bestätigung dieser Annahme wurde abschließend eine simulierte Kontamination von sterilgefiltertem Urin (blank) mit isolierten Bakterien hergestellt. Diese Proben zeigten nach Inkubation mit den isolierten Bakterienstämmen nicht die betreffende Aktivität einer 19-Demethylierung.

Die Bildung von Norandrosteron aus Androsteron (bzw. Noretiocholanolon aus Etiocholanolon) in Urinproben ist offenbar durch enzymatische Aktivitäten bedingt, die ansonsten keinen erkennbaren Einfluss auf das endogene Steroidprofil ausüben (siehe Tab. 1). Beim Vergleich der Steroidkonzentrationen von A- und B-Proben ergaben sich keine signifikanten Unterschiede. Auch eine durch die genannten Anflugkeime im Labor verursachte mikrobielle Kontamination erwies sich als unschädlich für die im Rahmen der Dopinganalytik durchgeführte Untersuchung des Steroidprofils.

Tab. 1: Vergleich der Steroidprofile korrespondierender A- und B-Proben mikrobiologisch aktiver Dopingkontrollproben

| lfd. Nr. | Probe | Labornr. | Andro ng/ml | Etio ng/ml | Andro/Etio ng/ml | Testo ng/ml | Epitesto ng/ml | T/E |
|----------|-------|----------|----------------|---------------|---------------------|----------------|-------------------|-----|
| 1 | A | 50295 | 2451 | 1916 | 1,3 | 14 | 7 | 2 |
| | B | 50295 | 1783 | 1434 | 1,2 | 11 | 5 | 2 |
| 2 | A | 50559 | 2291 | 2022 | 1,1 | 25 | 15 | 1,6 |
| | B | 50559 | 6606 | 6087 | 1,1 | 89 | 41 | 2,1 |
| 3 | A | 50659 | 3852 | 4229 | 0,9 | 13 | 25 | 0,5 |
| | B | 50659 | 5428 | 5859 | 0,9 | 19 | 29 | 0,6 |
| 4 | A | 51041 | 11342 | 7561 | 1,5 | 111 | 77 | 1,4 |
| | B | 51041 | 6625 | 4631 | 1,4 | 99 | 70 | 1,4 |
| 5 | A | 51564 | 1637 | 2317 | 0,7 | 22 | 22 | 1 |
| | B | 51564 | 1606 | 2329 | 0,7 | 23 | 23 | 1 |
| 6 | A | 51881 | 5996 | 4673 | 1,3 | 39 | 59 | 0,7 |
| | B | 51881 | 6005 | 4769 | 1,3 | 39 | 58 | 0,7 |
| 7 | A | 51941 | 4270 | 5372 | 0,8 | 22 | 13 | 1,6 |
| | B | 51941 | 6220 | 5614 | 1,1 | 22 | 13 | 1,6 |
| 8 | A | 52017 | 5164 | 3902 | 1,3 | 45 | 37 | 1,2 |
| | B | 52017 | 4859 | 3712 | 1,3 | 43 | 35 | 1,3 |
| 9 | A | 51942 | 5391 | 11394 | 0,5 | 34 | 29 | 1,2 |
| | B | 51942 | 6110 | 9200 | 0,6 | 34 | 29 | 1,2 |
| 10 | A | 51920 | 4336 | 3337 | 1,3 | 30 | 48 | 0,6 |
| | B | 51920 | 2606 | 2008 | 1,3 | 18 | 28 | 0,6 |

2 Umwandlung von Testosteron durch Bakterien

Bereits in früheren Studien wurde eine endogene Bildung 1,2-dehydrierter Steroide beschrieben. So wurden z. B. bei der Analyse von Routineproben Spuren von Boldenon und dessen Biotransformationsprodukten nachgewiesen (Schänzer et al., 1995). Mikrobiologische Aktivitäten scheinen die Ursache solcher Bildungsreaktionen zu sein und sollten bei der Bewertung von Dopingkontrollproben berücksichtigt werden. Steroide sind bekannte Substrate für einige Mikroorganismen (Kaufmann et al., 1992), die in Anwesenheit von 3-Ketosteroiden verschiedene Dehydrogenasen freisetzen und zu Dehydrierungsreaktionen am Substrat führen. Durchgeführte kinetische Experimente mit Testosteron als Substrat und *Rhodococcus eryth.* bzw. *Comamonas test.* als zugesetzte Mikroorganismen bestätigen dies (Abb. 1).

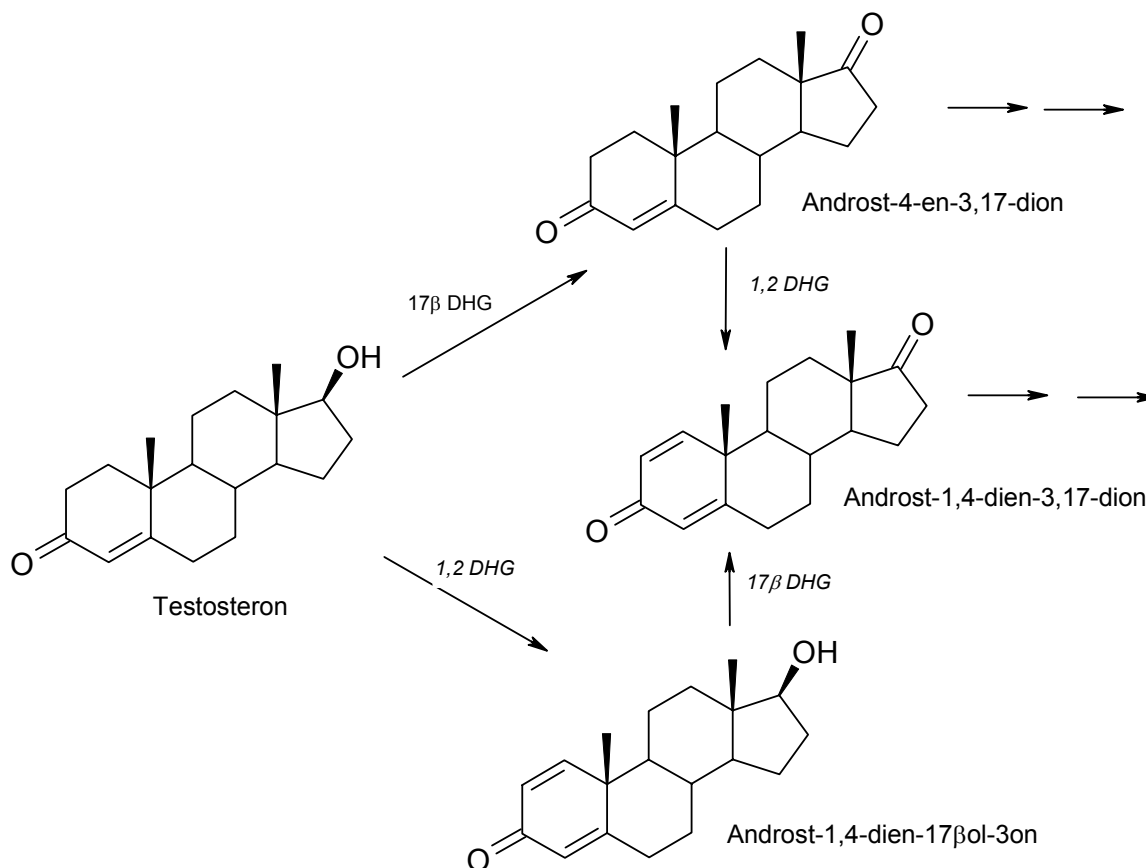


Abb. 1: Durch Bakterien der Stämme *Rhodococcus eryth.* und *Comamonas test.* verursachte Dehydrierung von Steroiden

- ◇ Testosteron als Substrat wird durch Dehydrogenasen der *Rhodococcus eryth.* innerhalb von sechs Stunden bei Inkubationstemperaturen von 37°C vollständig umgewandelt.
- ◇ Die initiale Reaktion scheint die Dehydrogenierung der in 17-Position befindlichen 17β-Hydroxygruppe zu sein, die eine Bildung von Androst-4-en-3,17-dion zur Folge hat.
- ◇ Anschließend wird Androst-4-en-3,17-dion durch 1,2-Dehydrogenase zu Androst-1,4-dien-3,17-dion (Boldion) umgewandelt.
- ◇ Der Anteil des 1,2-Dehydrogenaseproduktes von Testosteron – das Androst-1,4-dien-17β-ol-3-on (Boldenon) – entsteht untergeordnet.

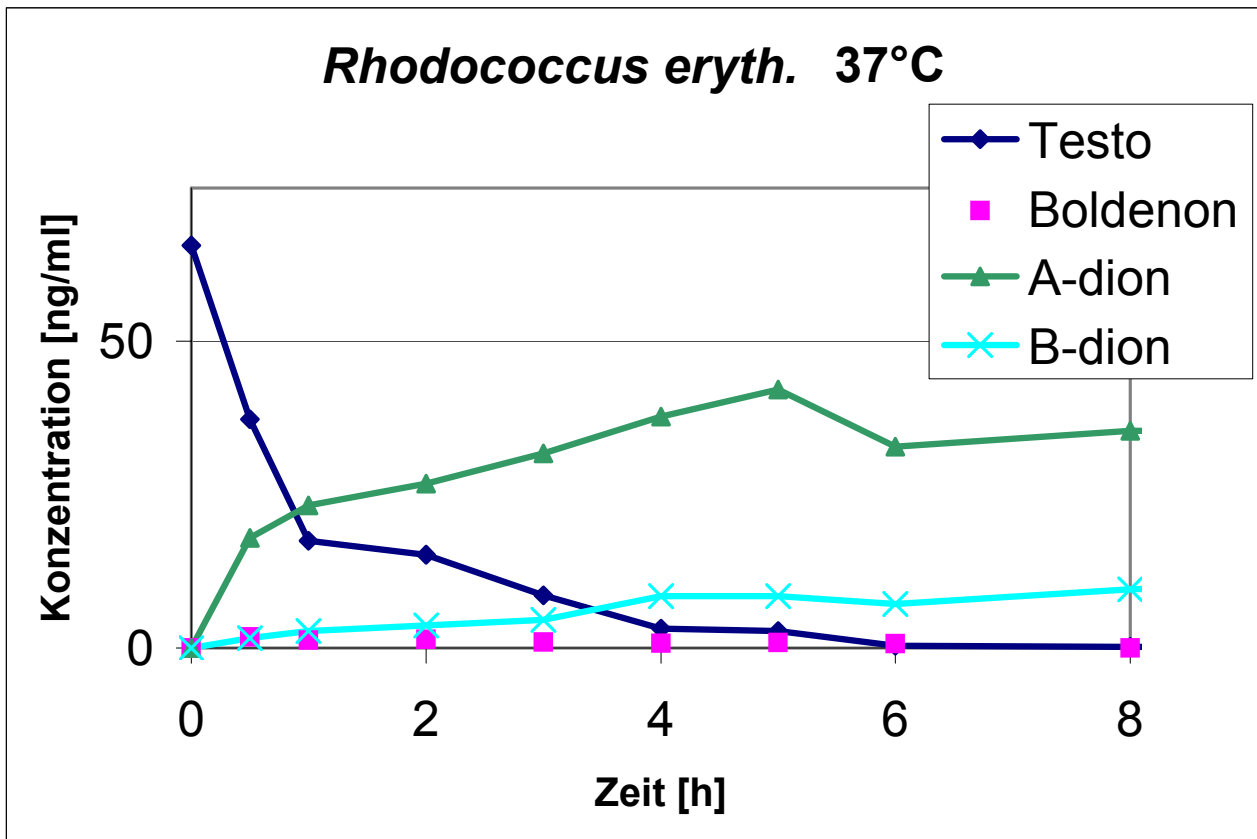


Abb.2: Zeitlicher Verlauf der Dehydrierung von Testosteron durch *Rhodococcus eryth.* unter Bildung von Boldenon, Androstendion (A-dion) und Boldion (B-dion)

3 Literaturverzeichnis

- Grosse, J., Anielski, P., Hemmersbach, P., Lund, H., Mueller, R. K., Rautenberg, C. & Thieme D. (2005). Formation of 19-norsteroids by in situ demethylation of endogenous steroids in stored urine samples, *Steroids*, 70, 499-506
- WADA (2005). Explanatory Technical Note: *Stability of 19-norandrosterone findings in urine*
- Schänzer, W., Geyer, H., Gotzmann, A., Horning, S., Mareck-Engelke, U., Nitschke, R., Nolteernsting, E. & Donike, M. (1995). Endogenous production and excretion of boldenone (17 β -hydroxyandrosta-1,4-dien-3-one). In *Recent advances in doping analysis* (2, S. 211). Köln: Sport und Buch Strauß.
- Kaufmann, G., Thole, H., Kraft, R. & Atrat, P. (1992). Steroid-1-dehydrogenase of *Rhodococcus erythropolis*, *J. Steroid Biochem Mol Biol.*, 43, 297-301.