

Małgorzata Kurzejamska-Parafiniuk<sup>1</sup>, Stefania Giedrys-Kalemba<sup>2</sup>, Zygmunt Sagan<sup>1</sup>,  
Stanisław Wolski<sup>1</sup>

## Flora bakteryjna w próbkach krwi rutynowo pobranych do badań na zawartość etanolu podczas autopsji

Bacterial flora in blood samples collected during an autopsy for routine testing of ethanol concentration

<sup>1</sup> Z Zakładu Toksykologii Klinicznej i Sądowej Katedry Medycyny Sądowej Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie  
Kierownik: prof. dr hab. n. med. K. Borowiak

<sup>2</sup> Z Katedry i Zakładu Mikrobiologii i Immunologii Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie  
Kierownik: prof. dr hab. n. med. S. Giedrys-Kalemba

Próbki krwi, pobrane w czasie sekcji zwłok do rutynowych oznaczeń zawartości etanolu, zabezpieczone fluorkiem sodu poddano badaniu mikrobiologicznemu, na które składała się ocena mikroskopowa, posiewy na podłoża różnicująco-namnażające, a następnie identyfikacja wyhodowanych szczepów. Stwierdzono, iż dodawany konserwant nie hamował całkowicie wzrostu bakterii. Z badanych próbek krwi najczęściej izolowano bakterie Gram-ujemne, wśród których najczęściej występowała *E. coli*.

Blood samples collected during autopsy for routine ethanol testing, preserved with sodium fluoride were subjected to the following microbiological tests: microscopic evaluation, cultures on differentiating proliferating media and identification of isolated strains. It was found that sodium fluoride did not entirely inhibit bacterial growth. The majority of the isolated bacteria were Gram-negative rods, with *E. coli* as the most frequent strains.

Słowa kluczowe:

alkohol pośmiertny (endogenny);  
fluorek sodu; bakterie we krwi post mortem

Key words:

postmortem (endogenic) alcohol;  
sodium fluoride; bacteria in  
postmortem blood

### WSTĘP

Zagadnienie alkoholu pośmiertnego (endogenego), to jest alkoholu wytwarzającego się w zwłokach (alkohol endogeny *in corpore*) lub w materiale biologicznym w czasie jego przechowywania (tzw. alkohol endogeny *in vitro*) [1], jest przedmiotem badań od kilkadziesiąt lat [2]. Liczne badania wykazały, iż alkohol endogeny powstaje w wyniku przemian metabolicznych drobnoustrojów [3, 4, 5, 6, 7, 8, 9], których to inwazja następuje po śmierci. Mogą one pochodzić ze zwłok, ale mogą też przenikać ze środowiska [10, 11]. Zależy to w dużej mierze od przyczyny zgonu, rodzaju śmierci, stanu jelit i żołądka, kwasowości środowiska, miejsca znalezienia zwłok, temperatury otoczenia a także warunków przechowywania materiału po pobraniu [12, 13, 14]. W celu stabilizacji poziomu alkoholu we krwi, odpowiadającego momentowi jej pobrania ze zwłok i zatrzymania procesów gnilno-rozkładowych, w wyniku których może powstać alkohol endogeny *in vitro*, dodaje się do próbki fluorku sodu [4].

### CEL PRACY

Celem pracy było sprawdzenie, czy we krwi pobranej na rutynowe oznaczenie zawartości etanolu, mimo zabezpieczenia fluorkiem sodu, są obecne

drobnoustroje oraz określenie gatunku wyizolowanych szczepów.

## MATERIAŁ I METODY

Materiał do badań stanowiło 50 próbek krwi, pobranych w czasie sekcji zwłok z żyły udowej na rutynowe oznaczenie zawartości etanolu. Sekcje wykonane były w okresie od 2 do 7 dni od momentu zgonu. Krew pobierano podczas sekcji równoległe do dwóch szklanych probówek o pojemności 5 ml (BD Vacutainer REF 367764) zawierających fluorek sodu z heparyną w ilości 20 mg [15]. Probówki z krwią jak najszybciej umieszczano w nadzorowanej lodówce i transportowano do laboratorium. Jedna służyła do oznaczenia zawartości etanolu, druga do przeprowadzenia badania mikrobiologicznego.

### Oznaczanie etanolu metodą chromatografii gazowej

Do oznaczenia etanolu pobierano dwie odrębne próbki krwi o objętości 0,2 ml, dodając do każdej próbki krwi 0,2 ml roztworu tert-butanolu (2-metylo-2-propanol) o stężeniu 2,0 g/L (2‰). Materiał był umieszczany w naczynkach chromatograficznych zamykanych membraną z gumy silikonowej i aluminiowym kapslem, a następnie był analizowany metodą kapilarnej chromatografii gazowej z wykorzystaniem techniki analizy fazy nadpowierzchniowej (head space analysis) [16]. Z badanymi próbkami krwi były jednocześnie analizowane wzorce kalibracyjne alkoholu etylowego oraz próbki kontrolne, w tym jedna ujemna. Metoda była zwalidowana zgodnie z wytycznymi Międzynarodowej Organizacji Standaryzacyjnej [17].

### Aparatura i warunki analizy

Chromatograf gazowy Clarus 500 z autosamplerem TurboMatrix-40 firmy Perkin-Elmer, model dwukanałowy wyposażony w dwie kolumny kapilarne różniące się polarnością (Elite BCA1 oraz Elite BCA2 firmy Perkin-Elmer, detektor płomieniowo-jonizacyjny (FID), temp. kolumny 40°C, temp. dozownika 140°C, temp. detektora 250°C, gaz nośny: hel pod ciśnieniem 75 kPa, split 3:1.

### Odczynniki

- standard wewnętrzny 2 g/L roztworu tert-butanolu

- roztwory wodne alkoholu etylowego o stężeniach w zakresie 0,02-5,0 mg/L firmy MERCK
- gazy: hel, powietrze, wodór o czystości minimum 99,9%.

### Badanie mikrobiologiczne

Z każdej próbki krwi wykonywano preparat barwiony metodą Grama oraz posiew na podłoża w kierunku drobnoustrojów tlenowych: agar z krwią (nie-selektywne podłoże wzbogacone), agar MacConkeya (podłoże wybiórczo-różnicujące pałeczki Gram-ujemne), agar Chapmana (podłoże wybiórczo-różnicujące gronkowce) oraz w kierunku bakterii beztlenowych: agar Schaedlera. Podłoża w kierunku bakterii tlenowych inkubowano najpierw w temp. 35°C przez 24 h w cieplarni, a przez kolejną dobę w temp. pokojowej. Podłoża w kierunku bakterii beztlenowych, bezpośrednio po posiewie wkładano do anaerostatu z systemem GasPack, następnie inkubowano w cieplarni, w temp. 35°C przez 5 dni. Identyfikację wyrosłych na podłożach drobnoustrojów przeprowadzano zgodnie z rutynowymi procedurami, m.in. na podstawie wyglądu kolonii, oceny preparatu z hodowli barwionego metodą Grama oraz badania biochemicznego obejmującego proste testy identyfikacyjne i zestawy biochemiczne typu Api [18, 19]. Wszystkie podłoża zastosowane do posiewów, zestawy GasPack oraz testy identyfikacyjne pochodziły z firmy bioMerieux Polska, badania wykonano w Katedrze i Zakładzie Mikrobiologii i Immunologii PUM.

## WYNIKI

Dodatnie wyniki badania mikrobiologicznego uzyskano w 38 z 50 zbadanych próbek krwi, co stanowi 76%. W pozostałych 12 próbkach nie stwierdzono w posiewie drobnoustrojów, aczkolwiek w każdej badanej próbce krwi w preparacie bezpośrednim barwionym metodą Grama widoczne były najczęściej różne formy morfologiczne bakterii (ziarniaki, pałeczki, laseczki), w różnej ilości, od pojedynczych komórek do licznych. W nielicznych próbkach obserwowano pojedyncze komórki drożdżaków w formie blastospor. Najwięcej dodatnich posiewów (20) stwierdzono w próbkach krwi o najniższej zawartości etanolu (0,00-0,5 g/L), natomiast wszystkie próbki ze stężeniem etanolu przekraczającym 3,0 g/L (7) były ujemne. Nie wykaza-

no wyraźnych zależności pomiędzy dodatnim/ujemnym wynikiem badania mikrobiologicznego oraz stężeniem alkoholu w próbce z czasem pobrania

próbki krwi od momentu zgonu, który wyniósł średnio 4,2 (3,9-4,6) dni. Wyniki przedstawiono w tabeli I.

Tabela I. Wyniki badań mikrobiologicznych 50 próbek krwi sekcyjnej w zależności od zawartego w nich stężenia etanolu.

Table I. Results of microbiological studies in 50 postmortem blood samples depending on blood ethanol concentration.

Próbki krwi Blood samples	Zakres stężenia etanolu w próbce (g/L) Concentration range of ethanol found in the samples (g/L)					Razem Total
	0,00-0,50	0,50-0,99	1,00-1,99	2,00-2,99	> 3,00	
Posiewy dodatnie / Positive cultures	15	9	4	10	0	38 (76,0%)
Posiewy ujemne / Negative cultures	2	0	1	2	7	12 (24,0%)
Razem / Total	17	9	5	12	7	50 (100%)
Średni czas pobrania od zgonu Mean interval between sample collection and death	4,3	4,6	4,1	3,9	4,2	4,2

Z dodatnich próbek krwi zwykle izolowano mieszaną florę bakteryjną, od 2 do 5 szczepów z jednej, co w większości pokrywało się z oceną preparatu bezpośredniego. Z żadnej nie wyhodowano grzybów. Ogółem wyizolowano 84 szczepy bakterii. Najczęściej były to pałeczki Gram-ujemne (71,4%), rzadziej ziarenkowce Gram-dodatnie (20,2%). Większość wyhodowanych pałeczek Gram-ujemnych należała do rodziny *Enterobacteriaceae* (46 z 60 szczepów). Wśród nich najczęściej izolowano *Escherichia coli* (20,2% wszystkich izolatów), *Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter freundii* i *Proteus* spp. (po 9,5%). Za pomocą dostępnych testów nie udało się zidentyfikować 12 (14,3%) szczepów pałeczek Gram-ujemnych. Wśród ziarenkowców Gram-dodatnich najczęściej izolowano *Enterococcus faecalis* (14,3%) i *Staphylococcus epidermidis* (5,9%). Z pojedynczych próbek izolowano tlenowe laseczki z rodzaju *Bacillus* (2 szczepy), tlenowe maczugowce *Corynebacterium pseudodiphtheriae* (3) i w 2 próbkach bakterie beztlenowe z rodzaju *Peptostreptococcus*. Najwięcej bakterii, szczególnie pałeczek Gram-ujemnych, stwierdzono w próbkach krwi o najniższych zawartościach etanolu od 0,00-0,5 g/L – 29 szczepów, w próbkach o stężeniu etanolu od

0,5-1,0 g/L – 27 szczepów. Szczegółowe wyniki badań mikrobiologicznych próbek krwi w zależności od zawartego w nich etanolu przedstawiono w tabeli II.

## OMÓWIENIE WYNIKÓW

Wiele drobnoustrojów kolonizujących organizm człowieka za życia oraz ulegających translokacji ze środowiska do zwłok po śmierci może tworzyć alkohol endogeny w krwi sekcyjnej, a także w trakcie przechowywania próbki krwi do badań na rutynowe oznaczenie zawartości etanolu. Należy do nich ok. 60 gatunków bakterii, ok. 20 gatunków drożdżaków i ok. 25 gatunków pleśni [1, 2, 5]. W celu zahamowania wzrostu mikroorganizmów do krwi sekcyjnej dodawany jest fluorek sodu, szeroko stosowany jako środek bakteriobójczy i dezynfekcyjny. W konsekwencji ma on zabezpieczyć krew przed dalszą fermentacją rozkładową i wytworzeniem alkoholu endogenego [4, 15].

W badaniach własnych oceniano obecność drobnoustrojów w 50 próbkach krwi, pobranych na rutynowe oznaczenie zawartości etanolu do próbek z dodatkiem fluorku sodu. We wszystkich próbkach

Tabela II. Gatunki bakterii izolowane z próbek krwi sekcyjnej w zależności od zawartego w nich stężenia etanolu.

Table II. Bacteria species isolated from postmortem blood samples depending on blood ethanol concentration.

Bakterie Bacteria	Liczba szczepów (%) Number of strains (%)	Zakres stężeń etanolu zawartego w próbkach (g/L) Concentration range of ethanol found in the samples (g/L)				
		0,00-0,50	0,50-0,99	1,00-1,99	2,00-2,99	> 3,00
<b>Pałeczki Gram-ujemne</b> Gram-negative rods	60 (71,4)	23	19	7	10	
<i>Escherichia coli</i>	17 (20,2)	6	6	1	3	-
<i>Citrobacter freundii</i>	8 (9,5)	3	2	1	2	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	8 (9,5)	2	3	-	3	-
<i>Proteus</i> spp.	8 (9,5)	7	1	-	-	-
<i>Hafnia alvei</i>	4 (4,8)	1	1	1	1	-
<i>Pasteurella aerogenes</i>	2 (2,4)	2	-	-	-	-
<i>Serratia liquefaciens</i>	1 (1,2)	1	-	-	-	-
<b>Niezidentyfikowane / Unidentified</b>	12 (14,3)	1	6	4	1	-
<b>Ziarenkowce Gram-dodatnie</b> Gram-positive cocci	17 (20,2)	3	6	3	5	
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	5 (5,9)	-	3	1	1	-
<i>Staphylococcus aerogenes</i>	1 (1,2)	1	-	-	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	10 (14,3)	2	3	1	4	-
<i>Streptococcus pyogenes A</i>	1 (1,2)	-	-	1	-	-
<b>Inne / Others</b>	7 (8,4)	3	1	3		
<i>Bacillus</i> spp.	2 (2,4)	-	1	1	-	-
<i>Corynebacterium pseudodiphtheriae</i>	3 (3,6)	2	-	1	-	-
<i>Peptostreptococcus</i> spp.	2 (2,4)	1	-	1	-	-
<b>Razem / Total</b>	84 (100)	29	27	11	17	-

w preparacie bezpośrednim barwionym metodą Grama obserwowano pojedyncze lub liczne formy morfologiczne różnych mikroorganizmów, zaś dodatnie wyniki posiewu w kierunku bakterii tlenowych i beztlenowych stwierdzono w 76%, częściej w próbkach krwi o niższych zawartościach etanolu. Wszystkie próbki ze stężeniem etanolu powyżej 3,0 g/L były mikrobiologicznie ujemne. Nie wykazano jednak wyraźnych zależności pomiędzy do-

datnim/ujemnym wynikiem badania mikrobiologicznego oraz stężeniem alkoholu w próbce z czasem pobrania próbki krwi od momentu zgonu, który średnio wynosił 4,2 dni.

Większość drobnoustrojów wyizolowanych z próbek krwi stanowiły bakterie tlenowe (97,6%), wśród których największy odsetek stanowiły pałeczki Gram-ujemne (71,4%). Najliczniej występowały *E. coli* (20,2%) oraz *Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter*

*freundii* i *Proteus* spp. (po 9,5%). Bakterie te, należące do rodziny *Enterobacteriaceae*, wchodzi w skład flory fizjologicznej przewodu pokarmowego człowieka, a tym samym, jako pierwsze ulegają translokacji po całym organizmie po śmierci [19]. Obecność ich w próbkach krwi sekcyjnej jest więc głównie pochodzenia endogennego, rzadziej egzogenego. Z kolei pałeczki Gram-ujemne, których nie udało się zidentyfikować w badaniach własnych (14,3%) oraz *Pasteurella aerogenes* wskazują na obecność w krwi także bakterii egzogennych, pochodzących ze środowiska.

Pałeczki z rodziny *Enterobacteriaceae*, należące do bakterii względnie beztlenowych, mogą oddychać zarówno w warunkach tlenowych jak i beztlenowych. W warunkach beztlenowych produktami metabolizmu są alkohol etylowy i kwas octowy. Gatunek *E. coli* może ze 100 moli glukozy wyprodukować 49,8 mola etanolu [5, 7]. Bakterie te należą do najczęściej izolowanych z kału od osób zdrowych, jak również najliczniej występowały w badanych próbkach krwi sekcyjnej z dodatkiem fluorku sodu. Należy więc sądzić, że *E. coli* wraz z innymi bakteriami Gram-ujemnymi może być szczególnie odpowiedzialna za powstawanie alkoholu endogennego w próbkach krwi sekcyjnej, rutynowo pobieranych do badań na obecność etanolu, w warunkach zastosowania fluorku sodu. Zdolność *E. coli* do produkcji etanolu wykorzystywana jest także w badaniach doświadczalnych zmierzających do opracowania prostego modelu matematycznego, który byłby w stanie w przybliżeniu określić ilość alkoholu endogennego wytwarzanego przez drobnoustroje w krwi w powiązaniu z innymi wytworzonymi/obecnymi alkoholami [21, 22].

Ziarenkowce Gram-dodatnie stanowiły 20,2%, wyizolowanych bakterii, w tym najczęściej był to *Enterococcus faecalis*, gatunek również powszechnie kolonizujący przewód pokarmowy człowieka i innych ssaków [19]. Gatunek ten wytwarza jednak niewielkie ilości etanolu [22].

## PIŚMIENICTWO

1. Pragłowski T., Nasiłowski W., Sybirska H.: Badania nad powstaniem alkoholu endogennego w zwłokach ludzkich. Arch. Med. Sąd. Kryminol. 1968, 18 (1): 61-65.

Źródłem etanolu endogennego mogą być również bakterie beztlenowe oraz grzyby. Jak wynika z badań Olszewskiej [14], odsetek w krwi sekcyjnej bakterii beztlenowych może wynosić 27%; nie stosowała ona jednak fluorku sodu. Wśród bakterii beztlenowych najczęściej wymienia się laseczki z rodzaju *Clostridium* [21, 22]. W badaniach własnych izolowano jedynie 2 (2,4%) szczepy beztlenowych paciorkowców z rodzaju *Peptostreptococcus*, nie stwierdzono natomiast żadnej kolonii drożdżaków i grzybów pleśniowych. Nie można wykluczyć, że niewielkie ilości grzybów w próbce krwi (widoczne były pojedyncze komórki drożdżaków w preparacie bezpośrednim) mogły zostać zahamowane poprzez dodanie fluorku sodu.

Pewne działanie hamujące wzrost bakterii może mieć także wysokie stężenie etanolu obecnego w próbkach krwi sekcyjnej. Wskazują na to nasze badania, gdzie wszystkie badane próbki krwi zawierające powyżej 3 g/L były mikrobiologicznie ujemne, aczkolwiek Olszewska [14] uważa, że alkohol etylowy obecny w próbce, nawet > 4 g/L nie hamuje rozwoju flory bakteryjnej.

## WNIOSKI

1. Fluorek sodowy, dodawany jako środek bakteriobójczy do próbek krwi sekcyjnej badanych na zawartość etanolu, nie hamuje całkowicie wzrostu bakterii, zwłaszcza w próbkach zawierających niższe stężenia etanolu.

2. Z badanych próbek krwi sekcyjnej zabezpieczonej fluorkiem sodu najczęściej izolowano bakterie Gram-ujemne, wśród których najliczniej występował gatunek *Escherichia coli*.

3. Wysokie stężenie etanolu powyżej 3,0 g/L obecnego w próbce krwi z dodatkiem fluorku sodu jest dodatkowym czynnikiem hamującym wzrost bakterii.

2. Osterhaus E., Johansmeier K.: Postmortale Entstehung von Alkoholen durch Faulnis. Dtsch. Z. Gesamt. Gerichtl. Med. 1996, 57: 281-284.

3. Daves E. A., Foster S. M.: The formation on ethanol in *Escherichia coli*. Biochim. Biophys. Acta, 1956, 22: 253-259.

4. Jakliński A., Nasiłowski W., Markiewicz J.: Zarys sądowo-lekarskiej toksykologii alkoholu etylowego. PZWL., Warszawa 1979.
5. Kunicki-Goldfinger W. J. H.: Życie bakterii. PWN, Warszawa 1982.
6. Trojanowska M.: Wytwarzanie się alkoholu endogennego we krwi pobranej od osób żywych „zakazanej” krwią ze zwłok. *Acta. Pol. Pharm.* 1968, 25 (1): 81-89.
7. Wagner H. J.: Einfluss der Antibiotika und Sulfonamide auf die Leichenfäulnis. *Dtsch Z Gesamte Gerichtl Med.* 1960, 49: 714-720.
8. Ohta K., Alterthum F., Ingram L. D.: Effects of environmental conditions on xylose fermentation by recombinant *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 1990, 56 (2): 463-465.
9. Lawford H. C., Rousseau J. D.: Effects of pH and acetic on glucose and xylose metabolism by a genetically engineered ethanologenic *Escherichia coli*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 1993, 39-40: 301-322.
10. Levine B., Smith M. L., Smialek J. E., Caplan Y. H.: Interpretation of low postmortem concentration of ethanol. *J. Forensic Sci.* 1993, 38 (3): 663-667.
11. Podkowińska I., Giedrys-Kalemba S., Teodorczyk U., Kaczmarek A., Rylski M., Hałasa J.: The comparative investigation of bacterial flora present in the upper and lower respiratory tract. *Pneumon. Alergol. Pol.* 1994, 62 supl. 3: 250-254.
12. Bonnichsen R., Halstrøm F., Møller K. O., Theorell H.: Alcohol in postmortem specimens. *Acta Pharmacol. Toxicol.* 1954, 10: 101-112.
13. Trela F. M.: Badania nad rozmieszczeniem alkoholu etylowego w ustroju człowieka w aspekcie sądowo-lekarskim. *Arch. Med. Sąd. Kryminol.* 1985, 35 (4): 213-227.
14. Olszewska I.: Badania doświadczalne nad wpływem niektórych drobnoustrojów na poziom alkoholu etylowego we krwi zwłok. Praca doktorska. AM, Gdańsk 1970.
15. Karinen R., Oiestad E. L., Andresen W., Wethe G., Smith-Kielland A., Christophersen A.: Comparison of ethanol and drugs of abuse concentrations in whole blood stored in venoject glass and plastic and venosafe plastic evacuated tubes. *J. Anal. Toxicol.* 2010, 34: 420-428.
16. Zasady przeprowadzania pomiarów stężenia alkoholu oraz opiniowania w sprawach trzeźwości. Zalecenia opracowane przez Instytut Ekspertyz Sądowych zatwierdzone przez Zarząd Główny Polskiego Towarzystwa Medycyny Sądowej i Kryminologii w dniu 26 listopada 2004 r. *Prokuratura i Prawo.* 2005, 4: 117-124.
17. Ostaszewska I.: Oznaczanie zawartości alkoholu etylowego w płynach ustrojowych człowieka metodą chromatografii gazowej head-space-walidacja metody. *Problemy kryminalistyki.* 2009, 265: 33-44.
18. Kędzia W., Koniar H.: Diagnostyka mikrobiologiczna PZWL, Warszawa 1980.
19. Jawetz E., Melnick J., Adelberg E. A.: Przewód mikrobiologii lekarskiej. PZWL, Warszawa 1991.
20. Lawford H. C., Rousseau J. D.: Ethanol production by recombinant *Escherichia coli* carrying genes from *Zyomonas mobilis*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 1992, 28-29: 221-236.
21. Boumba V. A., Economou V., Kourkoumelis N., Gousia P., Papadopoulou Ch., Vougiouklakis T.: Microbiota ethanol production: Experimental study and multivariate evaluation. *Forensic Sci. Int.* 2012, 215: 189-198.
22. Boumba V. A., Kourkoumelis N., Gousia P., Economou V., Papadopoulou Ch., Vougiouklakis T.: Modeling microbial ethanol production by *E. coli* under aerobic/anaerobic conditions, Applicability to real postmortem cases and to postmortem blood derived microbial cultures. *Forensic Sci. Int.* 2013, 232: 191-198.

Adres do korespondencji:

Małgorzata Kurzejamska-Parafiniuk  
Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie  
Katedra Medycyny Sądowej  
Al. Powstańców Wlkp. 72  
70-111 Szczecin  
e-mail: stanislaw.wolski@pum.edu.pl