GTFCh-Workshop – 30. / 31. Januar 2025 – Institut für Rechtsmedizin Bern (Schweiz)

# Phosphatidylethanol in DBS (Kapillarblut / Venenblut), Microsampling-Systeme, Ringversuche PEth-NET

**Matthias Bantle**

Institut für Rechtsmedizin, Universität Bern, Forensische Toxikologie und Chemie, Bern

Phosphatidylethanol (PEth) ist ein direkter Alkoholbiomarker, welcher in den vergangenen Jahren zunehmend im klinischen und forensischen Umfeld verwendet wird. Bis heute sind mindestens 48 Homologe bekannt, wobei PEth 16:0/18:1 (Abb. 1) und PEth 16:0/18:2 die zwei häufigsten Moleküle sind. [1] Mit einer Halbwertszeit von 7,8 beziehungsweise 6,4 Tagen ergibt sich ein Nachweisfenster von 1 - 2 Tagen bei geringem oder einmaligem Konsum, bis zu mehreren Wochen bei regelmässigem/exzessiven Konsum. [2] Da PEth in den Erythrozyten bei Vorhandensein von EtOH gebildet und dort akkumuliert wird, kann der Marker sowohl in Vollblut als auch in Trockenblutflecken (Dried Blood Spots, DBS) nachgewiesen werden. [3] Seit 2022 besteht der an der Konferenz "PEth in Mind" (19.-20.05.2022, Basel) verabschiedete Konsensus hinsichtlich der Interpretation von PEth 16:0/18:1-Konzentrationen, welche den (durchschnittlichen) Alkoholkonsum im Monat vor der Probennahme widerspiegeln (Tab. 1). [4]

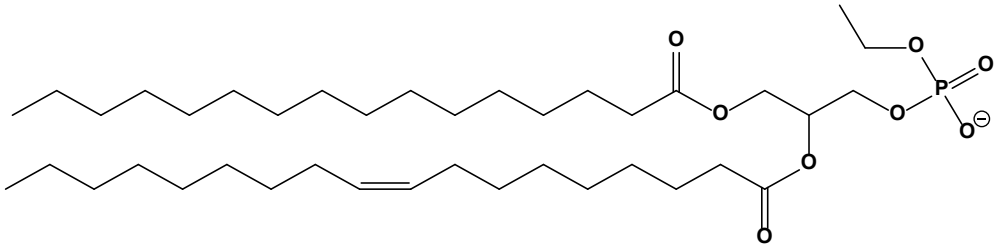

Abb. 1. PEth 16:0/18:1.

Am Institut für Rechtsmedizin der Universität Bern werden PEth 16:0/18:1 und PEth 16:0/18:2 seit 2022 für forensische als auch für klinische Fragestellungen eingesetzt. Venöses Blut (mit EDTA oder Lithium-Heparin als Antikoagulans) wird mit einem Probenvolumen von 20 µL auf DBS-Karten pipettiert (STERA, Basel, Schweiz). Kapillarblut wird mittels Greencheck® DBSV-Karten (Protzek, Lörrach, Deutschland) an der Fingerspitze entnommen. Die Analyse der Proben erfolgt mit einer validierten Methode: Die DBS-Proben werden ausgestanzt resp. die "Zähne" der DBSV-Karten an der Perforation abgetrennt und in je eine Kavität einer 96-Mikrotiterplatte (2 mL, Biotage, Uppsala, Schweden) platziert und mit 400 µL Extraktionslösung (MeOH mit PEth 16:0/18:1-$D_5$ und PEth 16:0/18:2-$D_5$ (Echelon, Salt Lake City, USA)) versetzt. Nach 30 min Inkubation bei Raumtemperatur werden je 300 µL des Extrakts mit einer Mehrkanalpipette in eine zweite Mikrotiterplatte transferiert. Die Proben können anschliessend mit LC-MS/MS analysiert werden. Hierfür wird ein UltiMate® 3000 HPLC (Dionex, Thermo Scientific Instruments, Reinach, Schweiz) gekoppelt an ein 5500 QTRAP (Sciex, Toronto, Kanada) mit negativer Ionisationsspannung (-4500 V) verwendet. Die chromatographische Trennung erfolgte mit einer Kinetex C18-Säule bei einer Flussrate von 0,4 mL/min und einer Ofentemperatur von 45 °C mit MeCN/$H_2O$ (3:7, v/v, 5mM $NH_4HCOO$) (mobile Phase A) und MeOH/MeCN (3:7, v/v) (mobile Phase B) in Gradientenelution. Im Jahr 2025 wurde die LC-Methode optimiert und mobile Phase B durch MeCN/MeOH/2-Propanol (1:1:1, v/v/v) ersetzt (Flussrate 0,46 mL/min, Ofentemperatur 50 °C).

Zur Quantifizierung wird eine MRM-Methode mit je einem Quantifier- und Qualifier-Übergang pro Molekül verwendet. Der Kalibrationsbereich für beide PEth-Homologe liegt zwischen 7,5 und 1500 ng/mL, LOQ bei 10 ng/mL und LOD bei 5 ng/mL.

Zwischen September 2022 und November 2024 wurden 2189 Proben analysiert, wovon 55 % auf Fahreignungsbegutachtungen und Abstinenzkontrollen entfallen, 14 % auf klinische Proben aus der Transplantationsmedizin des Inselspitals Bern, 28 % auf Drittlabore (Auftragsanalysen) und 3 % aus Forschungsprojekten mit externen Partnern. Über 60 % der Proben wurden mit < 20 ng/mL quantifiziert und daher gemäss dem "2022 consensus of Basel" als vereinbar mit Abstinenz oder geringem Alkoholkonsum gewertet, während auf die beiden weiteren Klassifizierungen 22 % respektive 15 % entfielen (Tab. 1).

Tab. 1. PEth 16:0/18:1-Grenzwertkonzentrationen in Vollblut mit den entsprechenden Interpretationen aus dem "2022 consensus of Basel", welche den Alkoholkonsum im Monat vor Probennahme widerspiegeln, und den jeweiligen Anteilen der am IRM Bern gemessenen Fallproben im Zeitraum zwischen September 2022 und November 2024. Übersetzt aus dem Englischen. [4]

| PEth 16:0/18:1 Grenzwertkonzentration | Interpretation | Anteil der Fallproben |
|---|---|---|
| < 20 ng/mL | Vereinbar mit Abstinenz oder geringem Alkoholkonsum | 62,4 % |
| ≥ 20 ng/mL aber < 200 ng/mL | Alkoholkonsum | 22,1 % |
| ≥ 200 ng/mL | Starker Hinweis auf chronisch exzessiven Alkoholkonsum | 15,5 % |

Aus dem klinischen Bereich wurden mehrere Proben von Patienten im zeitlichen Verlauf analysiert (Abb. 2). Dabei ist zu beachten, dass insbesondere bei hohen Initialkonzentrationen längere Zeiträume notwendig sind, um eine PEth 16:0/18:1-Konzentration < 20 ng/mL zu erreichen (vergleiche Patienten Nr. 5 und 14).

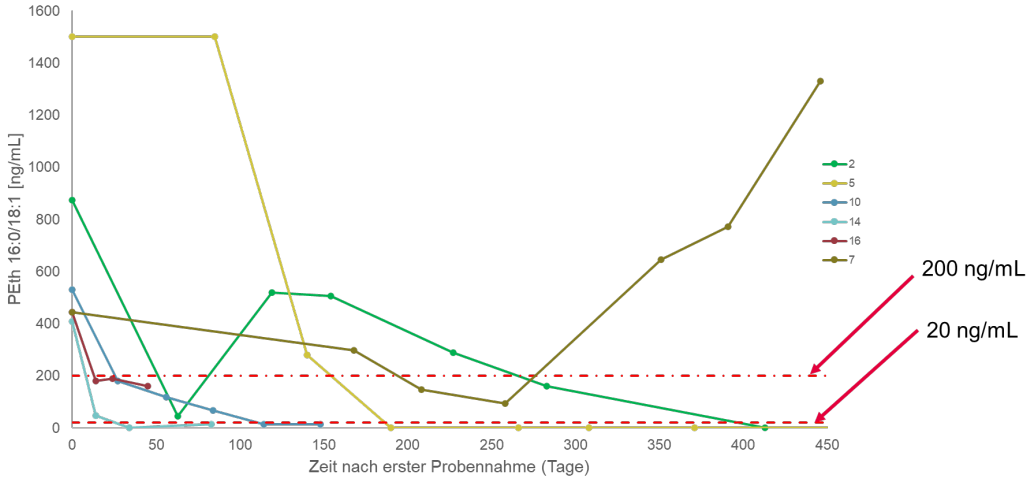


Abb. 2. Zeitlicher Verlauf von PEth 16:0/18:1-Konezntrationen ausgewählter klinischer Patienten. Werte > 1500 ng/mL werden als 1500 ng/mL dargstellt.

Auf Grundlage des "2022 consensus of Basel" werden von der PEthNET Society Interlaborvergleiche durchgeführt, um die Wirksamkeit des Konsensus' hinsichtlich Harmonisierung der Labore zu überprüfen. Aus Gründen der Probenstabilität und auch zur Vereinfachung des

Versandes wurde entschieden, nur Microsampling Systeme (DBS Karten, Capitainer®, Mitra VAMS® oder ähnliche, z. B. auch ein Glaskapillar-basiertes System des MVZ Dessau) zuzulassen. Im Gegensatz zu anderen PEth-Ringversuchen wurde festgelegt, dass möglichst frische, authentische Proben aus der forensischen und klinischen Fallarbeit genutzt werden sollen, um Bedingungen zu schaffen, welche sehr nahe an denen der Analyse von Realproben liegen.

In jeder Runde der Interlaborvergleiche wurden vier Proben, welche sowohl die Grenzwerte von 20 und 200 ng/mL als auch den üblichen Kalibrationsbereich von 15 - 500 ng/mL abdecken, aus der Fallroutine ausgewählt und gemäss den Angaben der teilnehmenden Labore volumetrisch auf die von den Teilnehmenden eingesandten Microsamling-Systeme aufgegeben.

Die statistische Auswertung und Interpretation erfolgten analog zu den von Arvecon/ GTFCH durchgeführten Ringversuchen. In den ersten drei Runden (aus den Jahren 2022 und 2023) bestimmten 73 % der teilnehmenden Labore je alle vier Proben konform (z-score ± 2,0) und mehr als 90 % quantifizierten mindestens eine Probe konform. Es wurde festgestellt, dass einerseits die Kalibrationsbereiche bei wenigen Laboren nicht ausreichend hoch waren, um Proben mit hohen Konzentrationen quantitativ analysieren zu können und andererseits für Konzentrationen von unter 20 ng/mL keine quantitativen Werte berichtet wurden. [5]

## Literatur


[1] Gnann H, Engelmann C, Skopp G et al. Identification of 48 homologues of phosphatidylethanol in blood by LC-ESI-MS/MS. Anal Bioanal Chem 2010;396(7):2415-2423.

[2] Stöth F, Weinmann W, Soravia LM et al. Evaluation of phosphatidylethanol elimination in alcohol use disorder patients undergoing withdrawal treatment. Alcohol Alcoholism 2023;58(3):266-273.

[3] Luginbühl M, van Uytfanghe K, Stöth F. Current evolutions, applications, and challenges of phosphatidylethanol analysis for clinical and forensic purposes. WIREs Forensic Science 2022;4(5):e1456.

[4] Luginbühl M, Wurst FM, Stöth F et al. Consensus for the use of the alcohol biomarker phosphatidylethanol (PEth) for the assessment of abstinence and alcohol consumption in clinical and forensic practice (2022 Consensus of Basel). Drug Testing Analysis 2022;14(10):1800-1802.

[5] Bantle M, Stöth F, Weinmann W et al. Interlaboratory comparison of phosphatidylethanol in dried blood spots using different sampling devices. Drug Testing Analyis 2024, DOI: 10.1002/dta.3784.