Toxichem Krimtech 2026;93(1):86

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

Speichel, Kapillarblut/-plasma, Urin – welche Matrix für welchen Zweck?

Stefan Lierheimer, Jasna Neumann, Michael Böttcher

MVZ Medizinische Labore Dessau Kassel GmbH, Dessau-Roßlau;
michael.boettcher@laborpraxis-dessau.de

In suchtmedizinischen Settings erfolgt ein Screening auf missbrauchsrelevante Drogen und Medikamente überwiegend aus Urinproben. Die alternativen Körperflüssigkeiten Speichel (eigentlich besser: „Oral fluid“ bzw. „Mundhöhlenflüssigkeit“) und Blut (Serum, Plasma, antikoaguliertes Vollblut) bzw. Kapillarvollblut und auch Kapillarplasma sind allerdings „auf dem Vormarsch“. Im Workshop haben wir uns mit den Vor- und Nachteilen der jeweiligen Matrix in Bezug auf das Nachweisbarkeitsfenster, die Stabilität der Analyte und die Gebrauchstauglichkeit relevanter Entnahmesysteme auseinandergesetzt. Im Einzelnen wurden folgende Punkte angesprochen:

1. Urin

Urin ist nicht invasiv und leicht auch durch nicht medizinisches Personal in hinreichender Menge zu gewinnen. Um eine Probenmanipulation (Verdünnung, Abgabe „Freundurin“ etc.) zu verhindern, muss die Probe unter Aufsicht gewonnen werden. Eine Markergabe an den Patienten/Klienten vor der Probennahme gewährleistet nur die korrekte Zuordnung der Probe und verhindert keine Probenmanipulation. Für gängige Verfälschungsmethoden, die den Immunoassay angreifen (z. B. Detergentien, Glutaraldehyd) oder den Zielanalyten (z. B. Oxidantien wie Chromate oder Nitrite) gibt es Schnelltest-basierte Nachweisverfahren. Die Validität dieser Verfahren wird unseres Wissens von den meisten Laboren, z. B. im Rahmen eines Akkreditierungsprozesses, nicht überprüft. Für den Nachweis enzymatischer Angriffe auf den Analyten wie z. B. auf THC-COOH (Papain, Peroxidasen) oder Ethylglucuronid (EtG; Glucuronidasen, Abb.1) sind uns keine Schnellteste oder einfache Nachweisverfahren bekannt.

Das Nachweisbarkeitsfenster im Urin ist prinzipiell am längsten im Vergleich zu Blut und Speichel, verlangt jedoch die Berücksichtigung der Diurese (Kreatinin) und des Urin pH-Wertes (Rückresorption) insbesondere bei der Beurteilung von Verläufen. Darüber hinaus müssen ggf. mehrere Metabolite berücksichtigt werden. Der Nachweis von Metaboliten gestattet in vielen Fällen den Beweis der Körperpassage der nachgewiesenen Substanzen und macht die Urinanalytik weniger anfällig für falsch positive Ergebnisse durch akzidentielle Kontaminationen.

Die Methodenentwicklung für die Urinanalytik kann sich schwierig gestalten, wenn die entsprechenden Metabolite bzw. deren Glucuronide nicht zur Verfügung stehen. Chromatographische aber ggf. auch immunchemische Analysen (Benzodiazepine) bedürfen einer Glucuronidspaltung im Rahmen der Probenaufarbeitung, die in die Validierung einbezogen werden muss. Der Urin-pH-Wert kann sehr unterschiedlich sein (pH-Wert 4,5 - 8,5). Viele Analyte sind pH-abhängig instabil (z. B. Zopiclon, viele Neue psychoaktive Stoffe (NPS)) was in der Regel bei der Probennahme und der Aufbewahrung der Proben keine Berücksichtigung findet. Die am Markt befindlichen Entnahmesysteme sind IVDs der Kategorie A und unseres Wissens ohne labordiagnostischen Bestimmungszweck, so dass strenggenommen dem Labor die Validation

der Becher und Monovetten obliegt. Aus Sicht des Labors kann der mögliche Einsatz von Immunoassays für Urinproben als Vorteil betrachtet werden (Kosten, Geschwindigkeit), jedoch wird hierdurch das Nachweisbarkeitsfenster deutlich kürzer und das Analytspektrum kleiner.

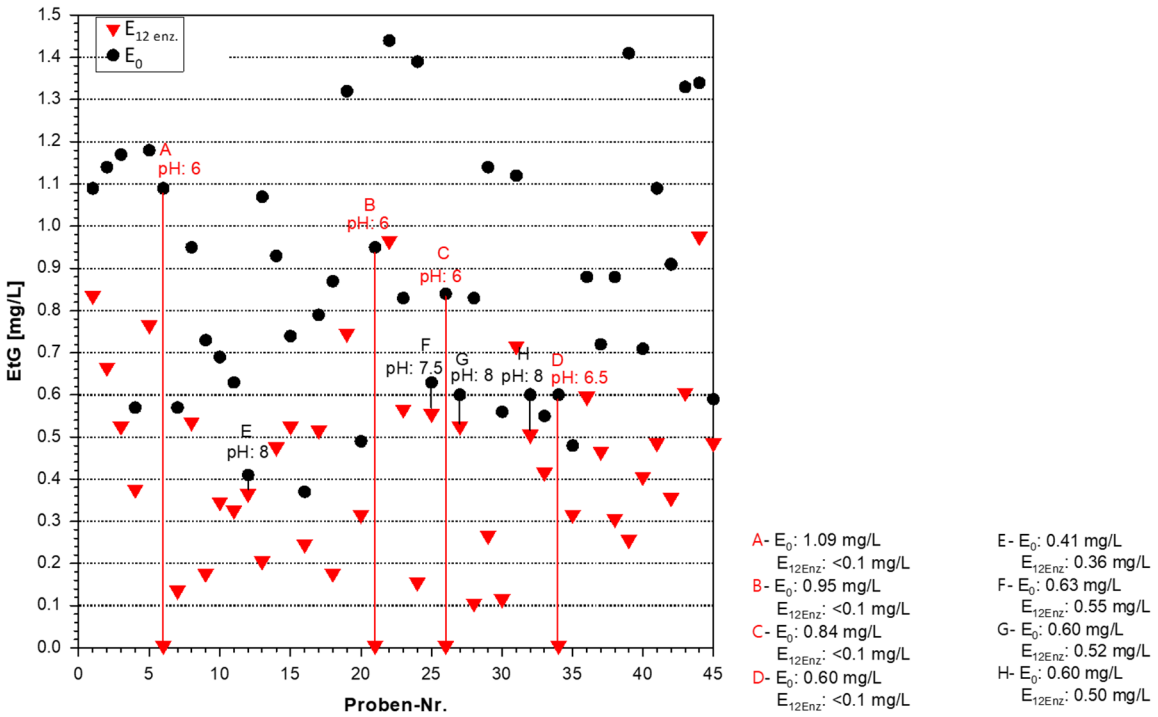


Abb. 1. Abnahme der Ethylglucuronid-Konzentration in 45 EtG positiven zufälligen Urinproben aus der Routine. 1 mL Urin wurde jeweils mit 10 µL ß-Glucuronidase aus E. coli (pH-Optimum: 6,0 - 6,5) versetzt und für 12 h bei Raumtemperatur inkubiert, dann erneute Messung von EtG ($E_{12\ enz.}$). Bei Proben mit pH-Wert im pH-Optimum der Glucuronidase (A - D) konnte die EtG-Konzentration unter die Bestimmungsgrenze gedrückt werden (Cut-off 0,100 mg/L). Bei alkalischen Proben (E-H) war der Hydrolyse Effekt gering.

2. Blut

Blut hat gegenüber Urin als Probenmatrix zur Analyse von Drogen und Alkoholbiomarkern einige nennenswerte Vorteile, zum Beispiel: fehlende Möglichkeit zur Manipulation der Probe durch den Probanden und eine vorhersehbare Zusammensetzung der Matrix. Weiterhin sind die Zielanalyte überwiegend die Muttersubstanzen. Dies ist wichtig bei der Analyse von NPS, deren Metabolite z. T. nicht bekannt oder als zertifiziertes Referenzmaterial nicht verfügbar sind. Darüber hinaus erlaubt Blut Verlaufskontrollen für Substanzen mit langen Halbwertszeiten (z. B. Benzodiazepine oder Cannabinoide). In Verbindung mit den Metaboliten ist gegebenenfalls eine Abgrenzung von einer „Altlast“ zu einem Neukonsum möglich. Zudem ist Blut die einzige Matrix, welche die Kombination eines Drogenscreenings mit einem oder mehreren validen Alkoholbiomarkern (Phosphatidylethanol (PEth), EtG, Aktivität der ɣ-Glutamyltransferase im Serum (ɣ-GT), Kohlenhydrat-defizientes Transferrin (CDT)) erlaubt. Abhängig davon, ob Vollblut, Serum, Plasma oder Kapillarvollblut entnommen wird, sind unterschiedliche Kombinationen möglich.

Nachteile ergeben sich aus der Art der Probennahme, da diese immer invasiv ist. Die Substanzkonzentrationen sind im Mittel deutlich geringer als im Urin. Somit sind empfindliche Messmethoden für die Analytik notwendig. Zudem kann die Stabilität einiger Analyte im Blut durch den schwach basischen pH-Wert und Enzyme wie z. B. Esterasen beeinträchtigt sein.

Kapillarblut stellt auf Grund des geringen Probenvolumens eine Herausforderung für die Analytik dar. Für die Probennahme ist nicht zwingend medizinisches Personal notwendig, wird jedoch zumeist von diesem durchgeführt. Trotzdem ist eine gute Schulung des abnehmenden Personals notwendig, da speziell bei der Abnahme von Kapillarblut zur Drogenanalytik viele Fehler bei der Probennahme möglich sind. Hierbei ist insbesondere auf die Gefahr der Kontamination der Kapillarblutprobe durch „ubiquitär" vorkommende Substanzen im Abnahmebereich wie z. B. Substitute oder Kokain hinzuweisen. Der Gefahr klinisch falsch positiver Befunde kann entgegengewirkt werden, indem die Körperpassage beweisende Metabolite inkludiert werden. Beispiele dafür sind: Glucuronide wie Buprenorphin-Glucuronid und Norbuprenorphin-Glucuronid beim Nachweis eines Buprenorphinkonsums, Morphin-Glucuronide bei Morphinkonsum oder auch 3- u./o. 4-Hydroxy-Benzoylecgonin bei Kokainkonsum.

Weiterhin ist bei der Analyse von Kapillarblut die Wahl des Entnahmesystems zu beachten. Es muss hierbei sichergestellt werden, dass das verwendete Kapillarblutentnahmesystem ein akkurates Probenvolumen (VAMS = volumetrically accurate microsampling) bereitstellt, insbesondere wenn die Angabe von Konzentrationen (z. B. PEth) verlangt wird. Bei klinischen Proben müssen nach aktueller Gesetzgebung Kapillarblutentnahmesysteme verwendet werden, bei denen es sich um zugelassene IVDs handelt. Die relevantesten, aktuell auf dem Markt verfügbaren Kapillarblutentnahmesysteme sind unserer Ansicht nach das Mitra®-System und das Capitainer®-System. Bei beiden Systemen handelt es sich um Trockenblutproben.

Auf analytischer Seite muss hier bei der Methodenentwicklung der Wiederfindung der Analyte besondere Aufmerksamkeit geschenkt werden, da diese mitunter unvollständig sein kann. Beim Mitra®-System sollte zusätzlich beachtet werden, dass jede Charge ein anderes Volumen aufnehmen kann (wird im Beipackzettel angegeben). Dieses Volumen kann um bis zu 10 % vom Nominalvolumen abweichen. Das dritte von uns vorgestellte Kapillarblutentnahmesystem mit IVD-Zertifizierung ist unser selbstentwickeltes Entnahmesystem, das GK-20, bei dem die Blutprobe in eine Flüssigkeit überführt wird. Das GK-20 hat im Gegensatz zu den anderen vorgestellten Kapillarblutentnahmesystemen die Analyse von Drogen, Medikamenten und Alkoholbiomarkern in der Zweckbestimmung, wohingegen das Capitainer®- und das Mitra®-System lediglich die Aufnahme und Aufbewahrung einer spezifischen Menge Blut in ihrer Zweckbestimmung angeben. Das Mitra®-System schließt auch andere nicht definierte biologische Flüssigkeiten „für analytische und diagnostische Untersuchungen" ein (www.neoteryx.com/volumetrically-accurate-micro-sampling-vams-collection-devices).

Im Hinblick auf die IVDR sind auch die Abnahmeröhrchen für venöse Blutproben einer genaueren Betrachtung zu unterziehen, insbesondere bei selbstentwickelten Methoden. Die IVDR sieht im Anhang I Kapitel 2 unter Punkt 9 vor, dass sicherzustellen ist, dass die Analyseleistung nicht durch Interferenzen beeinträchtigt wird und fordert die *„Bestimmung geeigneter Kriterien für die Probennahme und die Behandlung und Kontrolle der bekannten relevanten endogenen und exogenen Interferenzen…"*. Im Anhang I Kapitel 2 Punkt 10 heißt es, dass *„die Produkte so ausgelegt und hergestellt"* werden sollen, *„dass die in Kapitel 1 genannten Merkmale und Leistungsanforderungen gewährleistet sind."* Der Punkt wird insofern genauer spezifiziert, dass auf mögliche Beeinträchtigungen der Analyseleistung des Produktes wegen physikalischer oder chemischer Unverträglichkeiten der verwendeten Materialien mit den Proben zu achten ist. Strenggenommen bedeutet dies, dass sämtliche vorkommenden Probennahmegefäße auf Interferenzen in der Analytik der jeweiligen Methode zu untersuchen und zu validieren sind. Erste IVD-Kit Hersteller führen dies in ihren Arbeitsanweisungen mittlerweile auch auf.

Eine Lösung für den anfallenden Validationsaufwand stellt hier der Wechsel von Serum zu Plasma als Analysematrix dar, da die Zugabe von Antikoagulanzien in der ISO-Norm 6710:2017 geregelt ist und man die Validation so auf in der entsprechenden Norm gelistete Röhrchentypen beschränken kann.

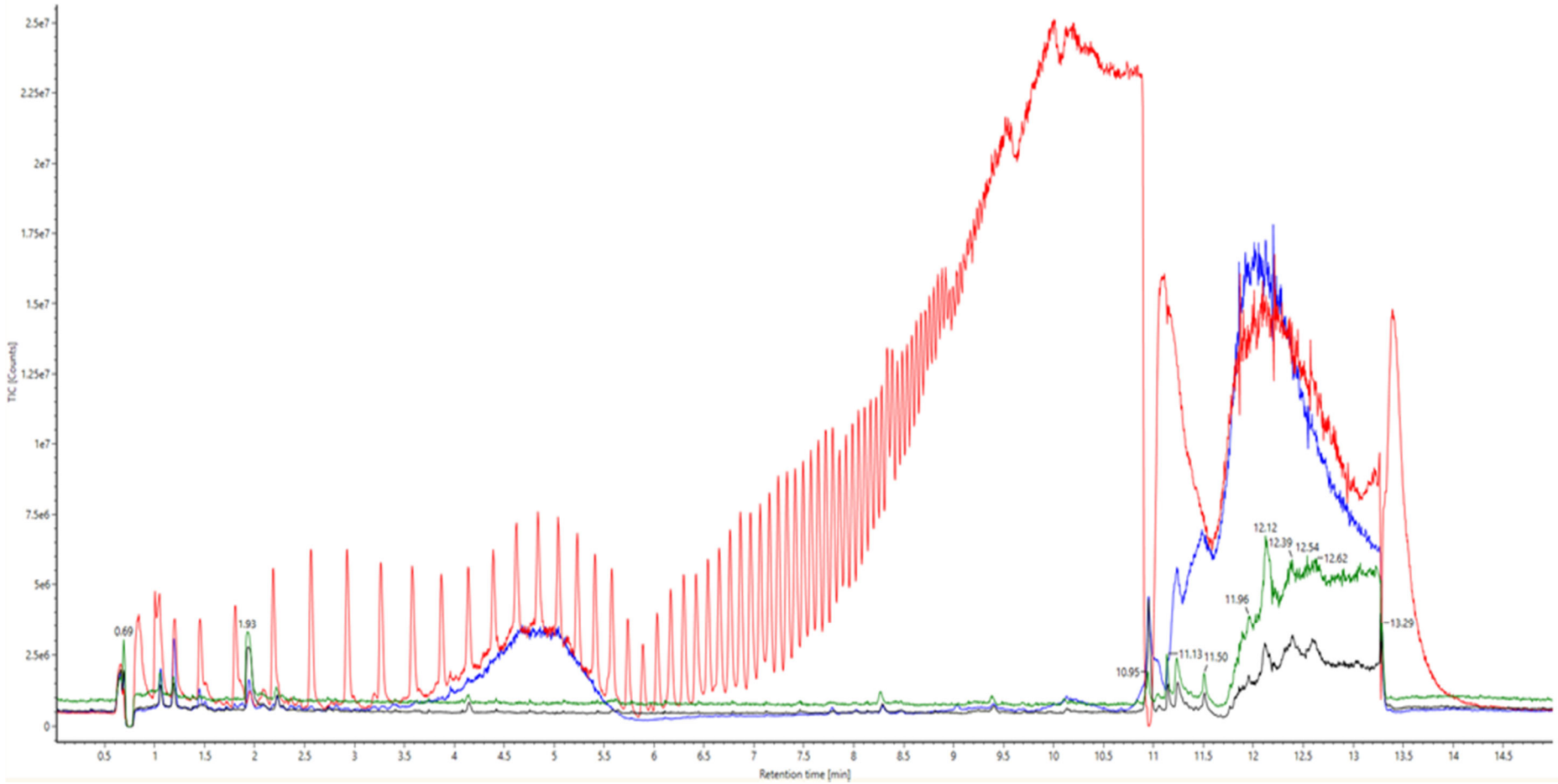


Abb. 2. Full Scan von „aufgearbeiteten PBS-Proben“ aus 2 Serumröhrchen und einem EDTA-Röhrchen auf Waters G2 XS-QTOF (Low Energy TIC).
X-Achse: Retentionszeit; Y-Achse: Intensität des Ionenstroms. schwarze Ionenspur: PBS (aus Glasgefäß) als Probe aufgearbeitet; rote Ionenspur: Serumröhrchen mit Trenngel, blaue Ionenspur: Serumröhrchen ohne Trenngel, grüne Ionenspur: EDTA-Röhrchen. Die unterschiedlichen Röhrchen wurden mit PBS bis zur Füllmarke befüllt und für 12 Stunden auf dem Rollmischer bei Raumtemperatur inkubiert. 50 µL PBS wurden abgenommen mit 500 µL Methanol versetzt und im Stickstoffstrom eingedampft. Der Rückstand wurde in 50 µL Mobiler Phase (0.1% FA) wieder aufgenommen. 10 µL wurden injiziert. Die chromatographische Trennung erfolgte mit einem steigenden Acetonitril Gradienten auf einer C18 Säule über 15 Minuten. PBS - Phosphate Buffered Saline.

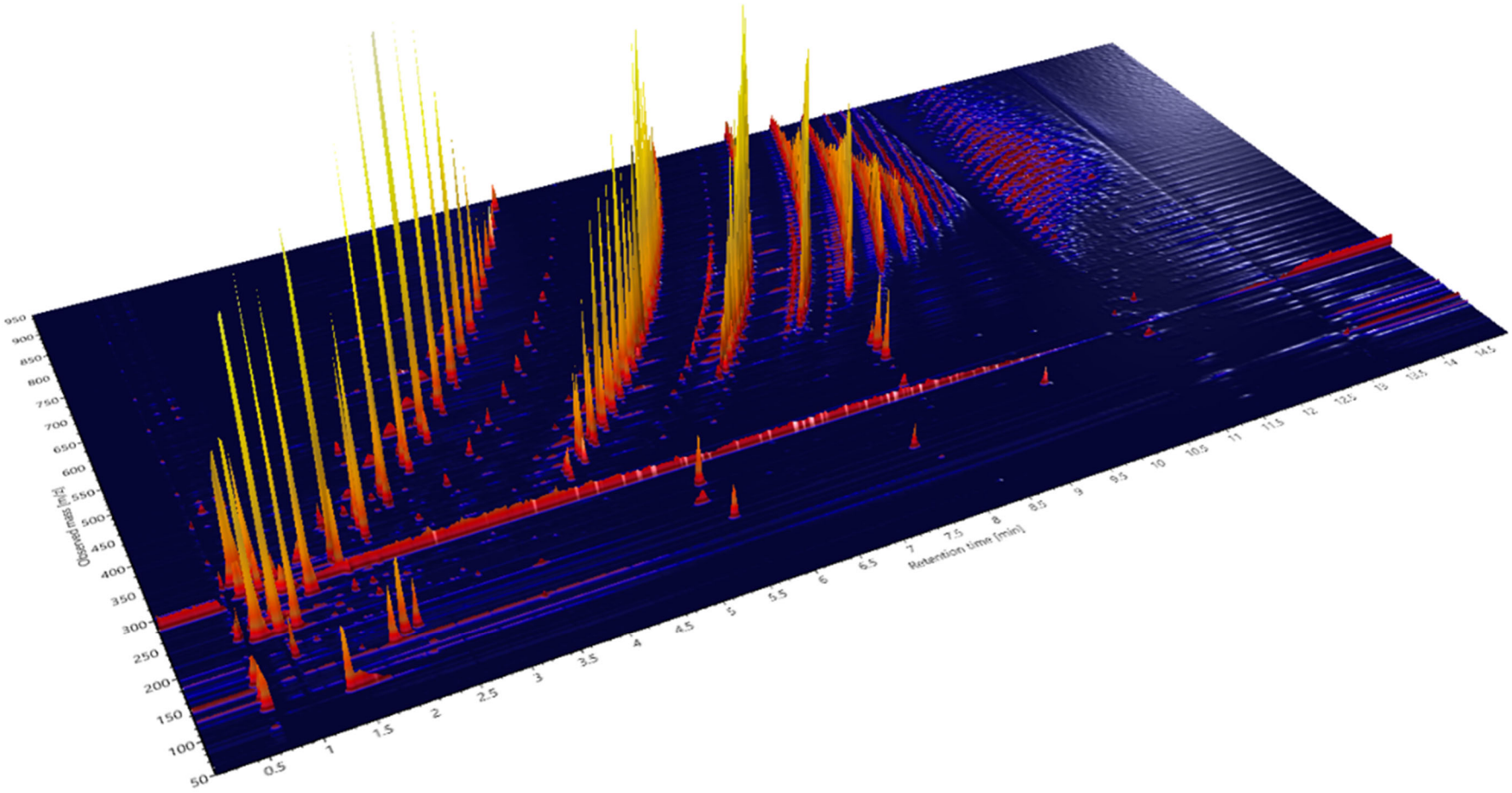


Abb. 3. 3D-Chromatogramm einer „aufgearbeiteten PBS-Probe“ aus einem handelsüblichen Serumröhrchen mit Trenngelzusatz auf Waters G2 XS-QTOF (Low Energy TIC). X-Achse: Retentionszeit; Y-Achse: Molekulargewicht; Helligkeit stellt die Intensität dar, Farbverlauf von blau zu gelb (gelb = höchste Intensität).

In der ISO 6710:2017 werden Reinheit und Menge der Additive geregelt. Ein Additiv ist ein Zusatzstoff, der die Herstellung der gewünschten Probe erleichtern soll. Viele Zusätze in Serumröhrchen, wie Benetzungsmittel, Gerinnungsaktivatoren und insbesondere Trenngele werden nicht durch diese Norm abgedeckt. Serumröhrchen enthalten viele Zusatzstoffe, die zu Phänomenen wie Ionensuppression aber auch zu Interferenzen in der Analytik (Isobare, „Cross Talk“) führen können. Wir haben mit unserem LC-QTOF-MS System ein Serumröhrchen mit Trenngelzusatz, ein Serumröhrchen ohne Trenngelzusatz und ein EDTA-Vollblutröhrchen (Abb. 2) verglichen. Als „Probe“ diente „Phosphate Buffered Saline“ (PBS). Insbesondere im 3D-Chromatogramm wird deutlich, dass im Serumgelröhrchen die Probe kontaminiert wird (Abb. 3). Darüber hinaus ist bekannt, dass viele Arzneistoffe und ggf. auch Drogen an die Trenngele absorbieren, was zu falsch niedrigen Blutkonzentrationen führen kann. Wir haben deshalb unsere Einsender so weit wie möglich auf EDTA-Plasma umgestellt.

3. Speichel

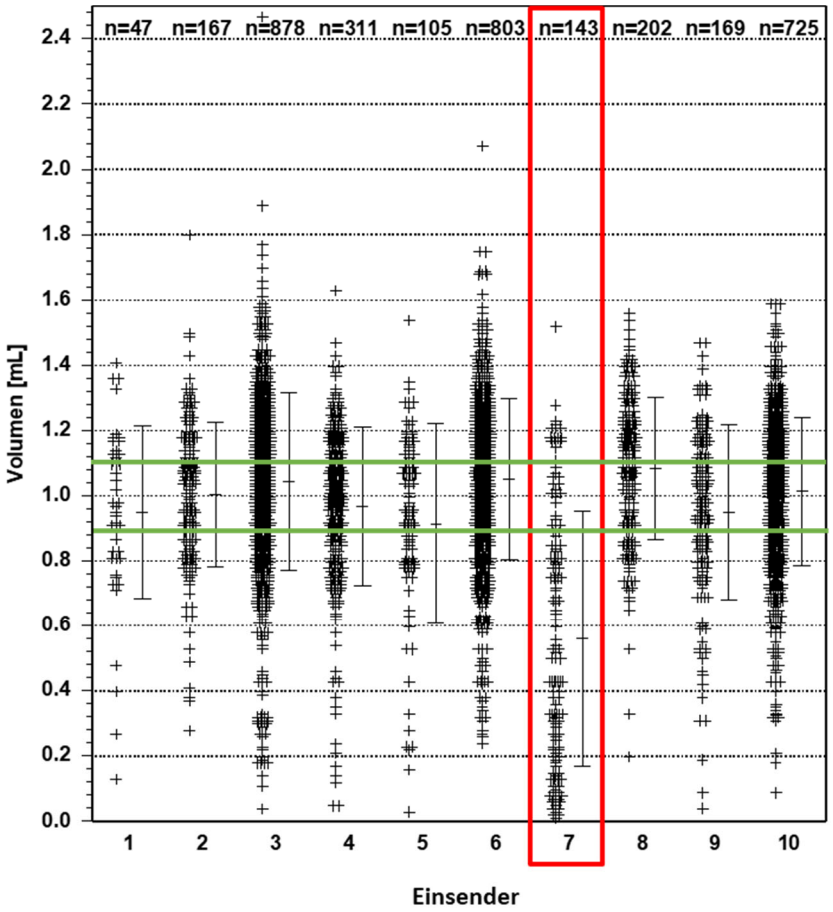
Die Probenmatrix Speichel gewinnt in den letzten Jahren zunehmend an Bedeutung zum Nachweis eines Drogenkonsums. Die Entnahme ist nicht invasiv, leicht zu beaufsichtigen und an keine Räumlichkeiten gebunden. Wichtig ist hier die Standardisierung der Probenentnahme mit einem praktikablen Entnahmesystem, für welches auch belegt ist, dass der Drogennachweis möglich ist. Analytische Probleme wie „orale Kontamination“, falsches Speichelvolumen durch Xerostomie oder Manipulationsversuche, sollten vermindert bzw. ausgeschlossen sein. Der Mensch bildet bis zu 1,5 Liter Speichel täglich mit einem pH-Wert von 5,8 - 6,4. Der pH-Wert kann sich bei Stimulation des Speichelflusses auf bis zu 7,8 erhöhen. Dies hat aufgrund der unterschiedlichen pKs-Werte der nachzuweisenden Substanzen teilweise einen erheblichen Einfluss auf deren Nachweisbarkeit. Ein weiterer wichtiger Einflussfaktor ist die Plasmaproteinbindung. Ist diese sehr hoch, kann wenig freier Analyt aus dem Blut in den Speichel übergehen. Diese Faktoren wiederum beeinflussen die Speichel/Plasma-Ratio. Je höher diese liegt, desto besser ist die Nachweisbarkeit im Speichel.

Mit den gegenwärtig verfügbaren kommerziellen Speichelentnahmesystemen können innerhalb von wenigen Minuten 0,2 mL bis zu 1,5 mL Speichel gewonnen werden. Häufig wird die Speichelprobe zur Stabilisierung der Analyte und um eine homogene Lösung zu erhalten für mehrere Stunden in einem Puffer inkubiert. Wir haben uns für das Quantisal™-Entnahmesystem von Abbott entschieden. Zum einen, da vor allem zum Nachweis und zur Stabilität von Drogen und Medikamenten bereits sehr viel Literatur vorhanden ist. Zum anderen, weil es sich um ein Medizinprodukt, mit dem Bestimmungszweck eine Speichelprobe zum Nachweis von Drogen zu gewinnen, handelt. Die Entnahme erfolgt über ein Sammelpad das ca. 1 mL Speichel aufnehmen kann. Ein kleines Fenster am Ende des Sammlers zeigt durch Blaufärbung, dass der Sammelprozess abgeschlossen ist. Dieses Pad mit Halter wird nach der Probennahme in ein Röhrchen mit stabilisierendem Puffer gegeben und versendet. Beim Eintreffen im Labor wird die Probe zuerst optisch bewertet. Dabei ist wichtig, dass die Probe „vollständig“ ist. Es sind zu prüfen: der ungefähre Füllstand des Probenröhrchens, die Präsenz von Sammler mit Sammelpad, sichtbare „Zusätze“ wie Essensreste und die Färbung der Probe.

Im nächsten Schritt wird das Speichelvolumen durch Wägung der gesamten Probe bestimmt, da aus unserer Erfahrung die Grundannahme des Herstellers, dass 1 mL Speichel +/- 10 % gesammelt wird, leider nicht immer gilt. Häufig wird die Sammelzeit nicht eingehalten oder der bereits im Pad gesammelte Speichel wird vom Probanden zurückgesaugt. Im Rahmen des Workshops konnten Teilnehmer diesen Manipulationsversuch selbst praktisch durchführen. Dabei konnte maximal bis zu 40 % des Speichelvolumens von einem Milliliter vom Sammelpad zurückgesaugt werden. Ein weiterer wichtiger Punkt für reduzierte Speichelvolumina bezieht

sich auf Patienten in Psychopharmakotherapie oder Substitution. Medikationen können hier zu Xerostomie führen, was mitunter Sammelzeiten von weit über 15 Minuten erforderlich machen würde. Um die Probensammlung adäquat zu gestalten, empfehlen wir den Sammelprozess nach 10 Minuten zu beenden, auch wenn die vorgesehene Speichelmenge noch nicht vom Sammelpad aufgenommen wurde. Die Lösung des Herstellers wäre in diesem Fall den Sammelprozess abzubrechen und mit einem neuen Entnahmesystem von vorne zu beginnen. Dies ist jedoch weder aus wirtschaftlichen noch aus Zeitgründen praktikabel. Durch die Wägung der Proben kann dieses verminderte Volumen über einen entsprechenden Verdünnungsfaktor berücksichtigt werden, so dass die Konzentrationen der nachgewiesenen Substanzen trotzdem auf den Speichel bezogen werden können. Für die anzuwendenden Cut-off-Konzentrationen ist der durch die höhere Verdünnung resultierende Empfindlichkeitsverlust zu berücksichtigen.

Zur „Matrixprüfung“, ob es sich denn wirklich um Speichel und keine andere Flüssigkeit handelt, wird zusätzlich Cortisol und gegebenenfalls alpha-Amylase mitbestimmt. Wir beobachten „Manipulationen“, die eigentlich bei korrekter Anwendung des Entnahmesystems durch Fachpersonal nicht möglich sein sollten. Dazu gehört das Fehlen von einzelnen Bestandteilen des Entnahmesystems wie Sammelpad, Halter oder Teile der Speichel-/Pufferlösung, vermindertes Probenvolumen aufgrund zu kurzer Sammelzeiten oder Zurücksaugen der Proben und erhöhte Speichelvolumina durch zufügen anderer Flüssigkeiten wie Wasser oder Seife (Abb. 4).



Einsender	Speichelvolumen	
	Mean	Median
1	0.95	0.97
2	1.00	1.04
3	1.04	1.08
4	0.97	1.00
5	0.91	0.96
6	1.05	1.08
7	0.56	0.52
8	1.09	1.10
9	0.95	0.99
10	1.01	1.04

Abb. 4. Vergleich der durch Wägung ermittelten Speichelprobenvolumina von Proben verschiedener Einsender.

Abschließend kann man sagen, dass die Matrix Speichel zum Nachweis von Drogen unkompliziert und einfach zu handhaben ist, der kontinuierliche Schulungsbedarf beim Einsender ist aber unabdingbar.