

Bericht zum GTFCh-Workshop vom 1. – 2. Oktober 2015 in Köln

Torsten Arndt

Bioscientia Institut für Medizinische Diagnostik GmbH,
Konrad-Adenauer-Straße 17, 55218 Ingelheim; torsten.arndt@bioscientia.de



Der der forensisch-toxikologischen Fort- und Weiterbildung dienende Workshop der GTFCh wurde im Jahr 2015 vom Institut für Rechtsmedizin der Universität zu Köln ausgerichtet.

Die „Institution Rechtsmedizin“ wurde in Köln im Jahr 1935 als Gerichtsärztliche Abteilung beim Gesundheitsamt der Stadt Köln begründet. Lange davor gab es jedoch schon gerichtsmedizinische Aktivitäten an der Universität zu Köln. Nach der Zerstörung der Institutsgebäude im 2. Weltkrieg und Interimslösungen wurde ein neuer Institutskomplex im Jahr 1970 eingeweiht und im Jahr 2008 grundlegend saniert (1).

Eingang zum IRM Köln. Foto: T. Arndt, Ingelheim.

Die Räume des Instituts sind dementsprechend hell und modern eingerichtet. Trotzdem stellte die Unterbringung von 102 Workshop-Teilnehmern aus 71 Einrichtungen, 19 Ausstellern und 12 Referenten das Organisationsteam um Dr. Justus Beike, Dr. Katja Mercer-Chalmers-Bender und Dr. Martin Jübner vor nicht unbedeutende Platzprobleme. Kleinere Räume, aber auch Labors mussten für Präsentationen vor 12 Zuhörern vorbereitet und elektronische Zugangsschranken passierbar gemacht werden, ohne die Zugangsbeschränkungen als solche aufzugeben. Die Organisatoren haben dies in hervorragender Weise gelöst, u. a. durch die Zuweisung einer Begleitperson zu jeder Gruppe, die ganz nebenbei auch die Einhaltung der Zeitpläne erfolgreich überwachte.

Der Workshop war erneut in 8 Stationen unterteilt. Analytische und diagnostisch/gutachterliche Themen waren ausgewogen vertreten und wurden durchweg interessant und unterhaltsam präsentiert. Sie regten zur Diskussion vor Ort und zur Nachbereitung „zu Hause“ an. Hierbei ist sicher das Abstraktheft zum Workshop hilfreich (2).

Station 1, betreut von Andreas Thomas (Zentrum für Präventive Dopingforschung am Institut für Biochemie der Deutschen Sporthochschule Köln), befasste sich mit „Strategien zur Isolierung und Analytik dopingrelevanter Peptidhormone“, d. h. dem Nachweis leistungssteigernder Peptide und Proteine. Diese in der Dopinganalytik immer bedeutender werdenden Substanzen unterteilt man gewöhnlich in 3 Gruppen: kleine Peptide mit 4-20 Aminosäuren, d. h. einer Molmasse von ca. 0,4-2 kDa, mittelgroße Peptide mit 20-100 Aminosäuren und Proteine mit >100 Aminosäuren. Diese Einteilung hat durchaus praktische Relevanz: Kleine Peptide und aufgrund ihrer mehrfachen Ladung ($m/z!$) auch mittelgroße Peptide sind (ohne zusätzliche Verdaureaktionen) faktisch mit jedem leistungsfähigen Massenspektrometer, insbesondere den derzeit in der Dopinganalytik präferierten LC-MS/MS-Systemen, nachweisbar, die

mehrere zehntausend Dalton schweren Proteine dagegen nicht. Da Peptidhormone bereits in geringsten Konzentrationen endokrinologische Wirkungen auslösen, z. B. die Ausschüttung von Wachstumshormon-Releasing-Hormon im Hypothalamus, bedarf es zu deren Nachweis im Blut im pg/mL-Konzentrationsbereich effektiver Aufreinigungsverfahren. Für Peptide mit Molmassen <2 kDa erfolgt dies gewöhnlich mit Festphasenextraktionen an Anion- und Kationaustauscher-Mischphasen, für mittelgroße 2-10 kDa Peptide mit Festphasenextraktion und Immunaффinitätsreaktionen, z. B. mit den aus der Klinischen Chemie bekannten Magnetic Beads. Dies sind antikörperbeladene, paramagnetische Partikel, die den Analyten, z. B. das Insulin, binden. Der Überstand wird abgesaugt, der Analyt aus seiner Antikörper-Bindung freigesetzt und die resultierende sehr reine Probe in ein LC-MS/MS-System überführt. In der MS/MS-Detektion ist zu beachten, dass Peptide und Proteine aufgrund ihrer Mehrfachladungen Fragmente bilden können, deren m/z-Wert z. B. doppelt so groß ist wie der des Precursors. Über den analytischen Aspekt hinaus sind die aus der Klinischen Chemie und Pathobiochemie bekannten Zusammenhänge und Rückkopplungseffekte zwischen hypothalamischen Releasing-Hormonen, hypophysären Stimulating-Hormonen, den hormon-produzierenden Organen und den Hormonzielorganen immer wieder faszinierend. Hier hat die Natur Regelkreise geschaffen, die von existenzieller Bedeutung für den Organismus sind und deren Manipulation mit dem nicht kurativen Ziel der Leistungssteigerung sprachlos machen.

Auf **Station 2** referierten Dr. Michael Riedel (Justizvollzugsanstalt Köln) und Dr. Carsten Bartling (MVZ Labor Dr. Quade und Kollegen) über die „Logistik der Opioid-Substitutionsüberwachung – Besonderheiten in der JVA, Einsatz eines Markers“. Da Drogen- und Alkoholabhängige im Justizvollzug nicht spontan ausheilen, sind Drogensubstitution und deren Kontrolle JVA-Alltag. Sichtkontrollierte Urinabgaben stören die Abläufe erheblich, weil die Gefangenen oft zum gegebenen Zeitpunkt „nicht können“ oder nicht können wollen. Der damit verbundene Personalaufwand ist kaum mehr zu leisten und führt dazu, dass Urin unkontrolliert gewonnen und ggf. manipuliert wird. Blut- und Speichelentnahmen scheiden aufgrund der derzeitigen Gesetzeslage als Alternative aus - es wird eine den Körper nicht beeinflussende Probenahme gefordert. Einen Ausweg sehen die Referenten im Einsatz von Markersubstanzen, die dem Delinquenten ca. $\frac{1}{2}$ -1h vor Urinabgabe per os verabreicht werden. Zum Einsatz kommen Gemische aus Polyethylenglycolen, die weder unter das Lebensmittel- noch unter das Arzneimittelgesetz fallen und auch nicht dem Medizinproduktegesetz unterliegen. Diese werden nicht verstoffwechselt und erscheinen im Urin in dem originalen Konzentrationsverhältnis, das mit HPLC erfasst werden kann. Dem Markergemisch ist außerdem Saccharose zugesetzt, die im Körper vollständig zu Glucose und Fructose gespalten wird und deshalb üblicherweise nicht im Urin erscheint. Kann mit Hilfe eines Enzymassays im Urin Saccharose nachgewiesen werden, ist dies als Nachweis einer Manipulation des Urins z. B. durch Hineinspucken der Markerlösung in einen Fremdurin zu werten. In der JVA Köln konnte durch Einsatz dieses als RUMA[®]-Marker vertriebenen Testbestecks die Nachweisrate für Drogenmissbrauch deutlich erhöht werden. Noch vorhandene Probleme von LC-MS/MS-Ionensuppression durch hohe Polyethylenglycol-Konzentrationen sollen durch geringere Markerkonzentrationen gelöst werden. Es bleibt zu prüfen, ob bei fehlender Sichtkontrolle ein Urin nicht doch so manipuliert werden kann, dass er zwar den Kreatinin- und Sample-Check passiert, aber dennoch so präpariert ist, dass falsch-negative Drogennachweise resultieren. Speichelanalytik könnte dies umgehen.

Mit „Speichel als alternative Matrix für die Drogenanalytik“ in der Substitutionsmedizin befassten sich Dr. Michael Böttcher und Stefan Lierheimer (MVZ Labor Dessau) auf **Station 7**. Auch Substitutionspatienten sind geneigt, Drogenbeikonsument durch Manipulation des Urins oder Abgabe eines Fremdurins zu kaschieren. Dem kann letztlich nur durch kurzfristig angelegte und sichtkontrollierte Urinabgaben begegnet werden. Allerdings findet diese zuneh-

mend weniger Akzeptanz bei Patienten und Pflegepersonal. Deshalb bleibt letztlich unklar, ob eine Sichtkontrolle adäquat ausgeführt und damit Manipulationen verhindert wurden. Böttcher und Kollegen haben seit Jahren positive Erfahrungen bei der Verwendung von Speichel als alternative Matrix für Drogentests gesammelt. Speichel ist mit dem vorgestellten Entnahmesystem von Greiner einfach, hygienisch und die Privatsphäre nicht verletzend zu gewinnen. Das Entnahmebesteck enthält eine gepufferte und mit einem Lebensmittelfarbstoff gelb eingefärbte Lösung, die in den Mundraum aufgenommen, dort 2 min behalten und anschließend in einen Becher ausgespuckt wird. Die Authentizitätsprüfung erfolgt über eine Amylase- und Cortisolbestimmung, das Speichelvolumen wird über die Abnahme der Farbintensität anhand einer entsprechenden Kalibrationsfunktion berechnet. Die Drogenanalytik erfolgt mit UPLC-MS/MS mit einer Laufzeit von 6 min und Entscheidungsgrenzen zwischen 0,1 bis 1,0 ng/mL. Das derzeit 58 Substanzen umfassende Spektrum wurde mit den Substitutionsärzten abgesprochen. Höhere Analytkonzentrationen im Speichel im Vergleich zu Urin und damit verlängerte Nachweiszeiten führten für die meisten Substanzgruppen zu einer deutlich verbesserten Nachweisrate. Dies und die Tatsache, dass im Speichel Drogen hauptsächlich als Muttersubstanzen vorliegen (und nicht als Metabolite, für die keine Reinsubstanzen verfügbar sind), macht Speichel zu einer interessanten Probenmatrix.



Im Hörsaal des Instituts für Rechtsmedizin Köln. Foto: G. Deußing, Köln.

Station 3 „Drogen und Delinquenz“ wurde von Dr. Friedrich Krull (Facharzt für Psychiatrie, Köln) gestaltet. Er referierte anhand zweier Fälle aus seiner Praxis als psychiatrischer Gutachter über Probleme, die aus einer Überbewertung der Wirkung psychotroper Substanzen ohne ausreichende forensisch-psychiatrische Analyse resultieren können. So sollte gutachterlich immer wieder die Frage gestellt und durch persönliche Untersuchung des Angeklagten exploriert werden, ob der Drogenkonsum eine psychosomatische Symptomatik induziert hat oder eine ohnehin vorliegende Psychose tatrelevant wurde.

Station 4 mit Sören Melsa (Facharzt für Chirurgie, Deutsche Stiftung Organtransplantation (DSO) Region Nordrhein-Westfalen) zum Thema „Ablauf einer Organspende – Stellenwert

einer chemisch-toxikologischen Untersuchung im Rahmen der Hirntoddiagnostik“ war für viele sicher nicht nur eine interessante Zusammenfassung der Abläufe um die Organspende, sondern auch Anlass, sich erneut mit dieser für Spender und Empfänger existentiellen Frage zu befassen. Die aktuelle Fortschreibung der Richtlinie zur Feststellung des Todes und die Regeln zur Feststellung des endgültigen, nicht behebbaren Ausfalls der Gesamtfunktion des Großhirns, des Kleinhirns und des Hirnstamms sind komplex (3) und können hier nicht im Detail vorgestellt werden. Die Hirntoddiagnostik ist dreischrittig mit Klärung der Voraussetzungen, Feststellung der klinischen Symptome der Hirnstammreflexie und dem Irreversibilitätsnachweis. Hierzu sind verschiedene klinische und apparative Verfahren anzuwenden, wobei zu den Voraussetzungen der Ausschluss einer Intoxikation und/oder der Wirkung potenziell sedierender Medikamente gehört. Allerdings ist nicht in jedem Organspendeprozess eine toxikologische Untersuchung erforderlich, wenn andere Untersuchungstechniken und Erfahrungswerte den Hirntod eindeutig belegen. Die Koordinierungsstelle für Organspende ist die DSO. Ihr obliegt die Unterstützung der Mitarbeiter vor Ort in den Krankenhäusern sowie die Zusammenarbeit mit Eurotransplant u. a. auch bei Organentnahme und -transport. Hierbei muss geltendes Landesrecht beachtet werden, was die Zusammenarbeit mit Eurotransplant nicht vereinfacht und weshalb z. B. Frankreich und Großbritannien nicht zum Eurotransplant-Verband gehören. Die DSO bietet darüber hinaus Hilfe in administrativen und juristischen Fragen sowie bei der Betreuung der Angehörigen an.



Die Organisatoren des GTFCh-Workshops 2015: Dr. Martin Jübner, Dr. Justus Beike, Helga Buth, Bianca Titz, Michael Witte, Monika Sifferath und Dr. Katja Mercer-Chalmers-Bender. Foto: G. Deußing, Köln.

Auf **Station 5** zeigten Sabrina Lehmann (Institut für Rechtsmedizin Köln) und Rolf Eichelberg (SIM Scientific Instruments Manufacturer) am arbeitenden LC-MS/MS-System eine „Anwendung der ITSP-Festphasenextraktion zum Nachweis neuer psychoaktiver Substanzen“. Die Herausforderungen mit dem Aufkommen immer neuer psychoaktiver Substanzen wurden in diesem Mitteilungsblatt kürzlich ausführlich diskutiert (4). Lehmann und Kollegen entwickelten gemeinsam mit der Firma SIM eine automatisierte Probenvorbereitung, die, basierend auf On-line-Festphasenextraktion und anschließender LC-MS/MS, den Nachweis von maximal 77 Substanzen aus 7 Substanzgruppen aus 150 µL Urin oder Serum innerhalb von ca. 9 min ermöglicht. Diese kurze Zykluszeit wird durch Verschachtelung von Probenvorbereitung und Analyse erreicht, so dass während der Analyse einer Probe sich schon mehrere

Proben in unterschiedlichen Phasen der automatisierten Probenvorbereitung befinden. Die Methode wurde nach den GTFCh-Kriterien validiert. Die Nachweisgrenzen nach DIN 32645 lagen für ca. 50% der Analyte bei $\leq 0,5 \mu\text{g/L}$ und für alle Analyte im einstelligen $\mu\text{g/L}$ -Konzentrationsbereich.

Um Automatisierung ging es auch auf **Station 6**, wo Tobias Kieliba (Institut für Rechtsmedizin Köln) und Dr. Oliver Lerch (Gerstel, Mülheim an der Ruhr) eine „Automatisierte Bestimmung von Cannabinoiden mittels GC-MS/MS-Routineanalytik von Blutserum & Nachweis von THC-COOH sowie THC, CBN und CBD in Haaren“ präsentierten. Ausgehend von ihren positiven Erfahrungen mit der auf dem Workshop 2011 in Kiel vorgestellten und seit dem in der Routine etablierten, automatisierten Analyse der Cannabinoide in Serum, wurde gezeigt, dass diese Kopplung aus On-line-Probenvorbereitung und GC-MS/MS-Detektion auch auf die Haaranalytik adaptiert werden kann. So ist es möglich, eine aufwändige Probenvorbereitung mit Extraktions-, Abdampf- und Derivatisierungsschritten für mehrere Proben so zu verschachteln, dass Wartezeiten zwischen Ende der Analyse einer Probe und Injektion der nächsten faktisch entfallen. Vor dem Hintergrund der in vielen Einrichtungen beklagten Personalverknappung und der damit einhergehenden Arbeitsverdichtung wird Automatisierung auch in der (forensischen) Toxikologie an Bedeutung gewinnen. Die Stationen 5 und 6 sind sicher für viele eine Anregung, die Abläufe im eigenen Labor auf Automatisierbarkeit zu überprüfen.

Diese wird nur in enger Zusammenarbeit mit den Herstellern und Vertreibern von Reagenzien, Hilfsmitteln, analytischen Geräten und Computerprogrammen gelingen. Auch deshalb ist ein enger Austausch zwischen den Kolleginnen und Kollegen aus Industrie, Forschung und Routine wichtig. **Station 8** bot dazu in bewährter Form eine exzellente Plattform. Die sog. Industrieausstellung war in den Gängen zu und vor den Büro- und Laborräumen untergebracht. Die Aussteller ACQ Science, Agilent Technologies, Bruker, BWTEK, Gerstel, Gilson, IVA-Analysentechnik, Lipomed, Macherey-Nagel, Mahsan Diagnostika, nal von minden, Perkin Elmer, Recipe, Restek, RUMA Marker-System, Shimadzu, Sigma-Aldrich, SIM Scientific Instrument Manufacturer, Thermo Scientific und Waters präsentierten Bewährtes und Neues. Sie trugen damit und durch vielfältige Fachgespräche, aber nicht zuletzt auch durch ihr finanzielles Engagement ganz erheblich zum Erfolg des Workshops in Köln bei. Auch der Ausflug auf einem Rheinschiff am Abend des 1. Oktobers wäre ohne die großzügige Unterstützung der Sponsoren in dieser Form nicht möglich gewesen. An dieser Stelle sei ihnen im Namen der Teilnehmer, der Organisatoren und des Vorstandes der GTFCh noch einmal herzlich gedankt.

Der Workshop endete mit einem kurzen Treffen aller Beteiligten im Hörsaal des Instituts für Rechtsmedizin Köln und dem Dank an das Organisationsteam, die Referenten und die Aussteller durch Herrn Dr. Justus Beike und 2 Vertreter des GTFCh-Vorstandes.

Auch an dieser Stelle noch einmal ein herzliches Danke an alle Beteiligten am GTFCh-Workshop 2015.

Literatur

1. www.rechtsmedizin-koeln.de (Instituts Geschichte)
2. Institut für Rechtsmedizin der Universität zu Köln. Workshop der GTFCh 2015. Broschüre zum Workshop, Eigenverlag, 2015.
3. Bundesärztekammer. Richtlinie gemäß §16 Abs. 1 S. 1 Nr. 1 TPG für die Regeln zur Feststellung des Todes nach §3 Abs. 1 S. 1 Nr. 2 TPG und die Verfahrensregeln zur Feststellung des endgültigen, nicht behebbaren Ausfalls der Gesamtfunktion des Großhirns, des Kleinhirns und des Hirnstamms nach § 3 Abs. 2 Nr. 2 TPG. Vierte Fortschreibung. Deutsches Ärzteblatt 30. März 2015 1-31 oder www.bundesaerztekammer.de.
4. Proceedings of the XIX. GTFCh-Symposium. New Psychoactive Substances - A Challenge for Modern Toxicology. Toxichem Krimtech 2015;82(Special Issue):140-306.