



Gesellschaft für Toxikologische und Forensische Chemie

Arbeitskreis
Qualitätssicherung

Anhang C zur Richtlinie der GTFCh zur Qualitätssicherung bei forensisch-toxikologischen Untersuchungen

Anforderungen an die Untersuchung von Haarproben

Autoren: *F. Mußhoff, Bonn; G. Skopp, Heidelberg, F. Pragst, Berlin; H. Sachs, München; D. Thieme, München,*
Mitglieder des AK Qualitätssicherung
Überarbeitung: L.D. Paul, München

Seite
1 von 8

Version
01

Änderungshinweise:

Keine – erste Fassung

Datum

01.06.2009

Seite

--

Inhaltsverzeichnis

Vorwort	2
1 Allgemeine Maßnahmen zur Qualitätssicherung	2
2 Anforderungen an Untersuchungsproben und deren Handhabung	2
2.1 Anforderungen an die Asservierung und den Probentransport	2
2.2 Probeneingang	3
2.3 Probenaufbewahrung	3
3 Anforderungen an Immunoassay-Bestimmungen	4
4 Beweisende, identifizierende bzw. Bestätigungsverfahren	4
4.1 Probenvorbereitung	4
4.1.2 Extraktion und Derivatisierung	5
5 Qualitätssicherungsaspekte bei quantitativen Bestimmungen	5
Validierung von Methoden zur Haaranalytik	5
- Linearität der Kalibration	5
- Wiederholpräzision und Laborpräzision	5
- Stabilität	5
5.2 Kontrollkarten für QC-Proben	6
5.4 Externe Qualitätskontrollen (Ringversuche)	6
6 Ergebnisbericht/Gutachten	6
Berücksichtigung der Haarlänge bei der Interpretation	6
Literatur	8
Inkrafttreten	8

Vorwort

Toxikologische Untersuchungen von Haarproben zum Nachweis und zur Bestimmung von Drogen, Medikamenten oder sonstigen körperfremden Stoffen werden insbesondere im Rahmen der Rechtspflege, zusätzlich aber auch bei klinischen Fragestellungen ausgeführt. Bei der Analyse von Haarproben und der Interpretation der Ergebnisse sind im Vergleich zur Analyse anderer biologischer Matrices viele Besonderheiten zu berücksichtigen, bedingt durch die Art (Feststoff) und Heterogenität der Matrix, Stabilität von Analyten und möglichen Einflüssen bei der Probenvorbereitung.

Grundsätzlich ist die Richtlinie der Fachgesellschaft (GTFCh) zur „Qualitätssicherung bei forensisch-toxikologischen Untersuchungen“ einzuhalten. Allgemeine Anforderungen an die Kompetenz von Prüf- und Kalibrierlaboratorien finden sich als Grundlage zur Akkreditierung in der jeweils gültigen Fassung der DIN-Norm EN ISO/IEC 17025.

In diesem Anhang werden bestimmte Anforderungen bezüglich der forensisch-toxikologischen Untersuchung von Haarproben konkretisiert.

Die Kapitelnummerierung bezieht sich auf die „Richtlinie der GTFCh zur Qualitätssicherung bei forensisch-toxikologischen Untersuchungen“. Die Angaben sind jeweils als Ergänzung zu den entsprechenden Abschnitten der Richtlinie zu sehen.

1 Allgemeine Maßnahmen zur Qualitätssicherung

Es ist darauf zu achten, dass Stoffproben und Haarproben zum Ausschluss einer Kontamination in voneinander getrennten Laborräumen untersucht werden. Die Proben müssen bei Raumtemperatur gelagert werden. Es müssen Geräte vorhanden sein, die eine eindeutige Identifizierung von Einzelstoffen und eine Bestimmung der Substanzkonzentration erlauben.

2 Anforderungen an Untersuchungsproben und deren Handhabung

2.1 Anforderungen an die Asservierung und den Probentransport

Die Probenabnahme für die Untersuchungen kann entweder durch das Laboratorium selbst oder durch andere qualifizierte Institutionen erfolgen. Bereits bei der Abnahme ist durch eine strikte räumliche Trennung von Stoffproben eine Kontamination auszuschließen. Da die Abnahme einer Haarprobe nicht-invasiv erfolgt, muss sie nicht von einem Arzt vorgenommen werden. Die Identität des Probanden ist sicherzustellen (Personalausweis, Lichtbildvergleich, Unterschrift, ggf. Fingerabdruck). Die Probe ist eindeutig und vollständig zu kennzeichnen.

Im eindeutig zu kennzeichnenden Untersuchungsauftrag sollen zusätzlich Datum der Probenahme, Abnahmestelle und die gewünschte Untersuchung mit Fragestellung und Vorgeschichte angegeben werden.

Haarproben sollten vom Hinterhauptshöcker in geeigneter Menge, in Form einer oder in der Regel mehrerer Haarsträhnen gewonnen werden, die direkt an der Kopfhaut abgeschnitten werden. So ist die Sicherstellung von Rückstellproben gewährleistet. Die verbleibende Restlänge ist zu dokumentieren. Die gewonnene Haarsträhne ist vor dem Abschneiden mit einem Faden zu fixieren, um ein Verschieben von Segmenten zu verhindern. Die wurzelnahe (proximale) Schnittstelle ist zu kennzeichnen. In speziellen, kritischen Fällen können wenige Haare durch Ausreißen entnommen werden, um eine spätere Zuordnung der Probe über eine DNA-Analyse zu erleichtern.

Ersatzweise oder alternativ können Körperhaare wie Achsel-, Scham-, Brust- oder Barthaare gewonnen werden. Bei der Asservierung von Körperhaaren empfiehlt sich, z.B. eine Rasur oder ein Kürzen vor der Probennahme durch eine lichtmikroskopische Betrachtung auszuschließen bzw. zu protokollieren. Körperhaare sind bei fehlenden Kopfharen ersatzweise zur Klärung der Drogeneinnahme geeignet, z.B. im Vorfeld der Medizinisch Psychologischen Untersuchung (MPU) sowie zur Überprüfung einer behaupteten, mehrmonatigen Abstinenz. Sie sind aber nicht geeignet zur zeitlichen Abschätzung eines Konsums, wie dies z.B. an Kopfharen unter Berücksichtigung des Wachstumszyklus möglich ist (s.o.). Abnahmestellen sind genau zu bezeichnen, ansonsten ist - soweit die Haarlänge dies erlaubt - in analoger Weise zu verfahren.

Für Versand und Lagerung muss eine geeignete Form gewählt werden (z.B. Alufolie als primäres Verpackungsmaterial in einem Briefumschlag).

2.2 Probeneingang

Vor Beginn der Untersuchung ist die Probe zu charakterisieren (Länge, Gewicht, Zustand, Farbe, Hinweise auf kosmetische Behandlung etc.).

Zu Beginn einer Untersuchung bestimmt der/die für die Analyse Verantwortliche die Untersuchungsstrategie. Entsprechend der Fragestellung wird dabei insbesondere eine Segmentierung des Haarstranges festgelegt und dokumentiert. Eine unsegmentierte Rückstellprobe sollte erhalten bleiben.

2.3 Probenaufbewahrung

Primär-, Sekundär- und Rückstellhaarproben müssen sachgerecht bei Raumtemperatur trocken und vor Licht geschützt transportiert und vor bzw. nach der Untersuchung gelagert werden. Eine Kühlung oder ein Einfrieren sollte vermieden werden, um das Material vor Feuchtigkeit zu

schützen. Feuchtigkeit und Kristallbildung können zu einer Zersetzung von Analyten und Matrix führen.

3 Anforderungen an Immunoassay-Bestimmungen

Bei immunchemischen Vortests ist darauf zu achten, dass es durch die Probenvorbereitung nicht zu einer Denaturierung der zu verwendenden Antikörper kommt. Kalibratoren und Kontrollen sollten mit Leerhaar hergestellt werden. Bei einigen Substanzklassen kann für einen Vortest die Hydrolyseempfindlichkeit von Analyten ausgenutzt werden, um durch eine entsprechende Probenbehandlung die für Haaranalysen notwendige Sensitivität zu erlangen. Man analysiert dann sog. „Äquivalente“ bezogen auf das Hydrolyseprodukt.

Bei einer Verwendung immunchemischer Verfahren für einen Vorbefund muss die jeweilige Analytkonzentration im Bereich der zu erreichenden Nachweisgrenze des chromatographischen Verfahrens (siehe Anhang A) immer ein positives immunchemisches Ergebnis für die jeweilige Substanzklasse anzeigen, was durch geeignete Maßnahmen zu belegen ist (siehe Anhang B).

4 Beweisende, identifizierende bzw. Bestätigungsverfahren

Die Bestimmung körperfremder Substanzen im Haar gliedert sich in verschiedene, methodische Schritte auf: Dekontamination, Aufschluss/Extraktion, Aufreinigung und analytische(s) Verfahren.

Auch für Haaranalysen kommen in der Regel zur beweissicheren Analyse nur eine GC- oder eine HPLC-Methode in Verbindung mit einem massenspezifischen Detektor bzw. Tandem-MS-System in Betracht.

4.1 Probenvorbereitung

Haarproben müssen vor der eigentlichen Analyse bzw. Probenaufbereitung auf Kontamination überprüft werden oder es muss zumindest die Möglichkeit geschaffen werden, diese Kontamination nachträglich auszuschließen oder zu bestätigen. Ein Konsens bzgl. optimaler Dekontaminationsverfahren existiert derzeit nicht. Bei Durchführung verschiedener Waschschriffe ist abzuwägen zwischen ausreichender Dekontamination und beginnender Extraktion der Analyten aus der Haarprobe. Eine Überprüfung kann durch Analyse der Waschlösungen erfolgen. Da die Behandlung mit Lösungsmitteln im Rahmen einer Dekontamination auch Einflüsse auf die Haarmatrix und somit auf die spätere Extraktionseffizienz haben kann, muss sie generell bei der Interpretation von Analysenbefunden berücksichtigt werden, insbesondere wenn quantitative Ergebnisse miteinander verglichen werden sollen.

Eine mögliche Segmentierung muss sich an der Fragestellung orientieren. Für routinemäßige Untersuchungen wird die Analyse von 3 cm-Abschnitten empfohlen.

4.1.2 Extraktion und Derivatisierung

Haaraufschluss bzw. Extraktion und Aufreinigung können selbständig vom Labor gewählt werden. Bei der Interpretation ist aber darauf zu achten, dass unterschiedliche Ergebnisse für verschiedene Verfahren zu erwarten sind. Direkte Vergleiche quantitativer Messergebnisse mit unterschiedlichen Methoden sind daher problematisch. Beim Haaraufschluss bzw. bei der Extraktion von Analyten aus der Matrix sind die spezifischen Stoffeigenschaften zu beachten. Die Hydrolyse relevanter Analyten sowie der verwendeten internen Standards ist weitestgehend auszuschließen.

5 Qualitätssicherungsaspekte bei quantitativen Bestimmungen

Die Art (Feststoff) und Heterogenität von Haarproben erfordert spezielle Empfehlungen zur Qualitätssicherung bei forensisch-toxikologischen Haaruntersuchungen.

Validierung von Methoden zur Haaranalytik

Vorgaben der GTFCh bezüglich der zu erreichenden Nachweisgrenzen für Missbrauchsdrogen und deren Metaboliten in Haaren nach forensischen Erfordernissen, bestimmt mittels beweisenden chromatographischen Methoden, finden sich in Anhang A der „Richtlinie der GTFCh zur Qualitätssicherung bei forensisch-toxikologischen Untersuchungen“.

Eine Validierung kann mit aufgestockten Haarproben in Form einer Basisvalidierung durchgeführt werden:

- Linearität der Kalibration

Im Grundsatz gilt Anhang B (Validierung) zur Richtlinie der GTFCh für forensisch-toxikologische Untersuchungen. Die Anzahl der Kalibratoren kann jedoch auf 4 und die der Wiederholbestimmungen pro Kalibrator auf 5 verringert werden.

- Wiederholpräzision und Laborpräzision

Im Grundsatz gilt Anhang B (Validierung) zur Richtlinie der GTFCh für forensisch-toxikologische Untersuchungen. Die Anzahl der Tage kann jedoch auf 5 verringert werden.

- Stabilität

Angaben über Stabilitäten und Lagerungsbedingungen sind notwendig. Das betrifft die Stabilität von Reagenzien, Standards und Proben. Aufgrund der Hydrolyseempfindlichkeit einiger speziell bei Haaranalysen zu prüfenden, charakteristischen Verbindungen muss unbedingt die Stabilität

der Analyten bzw. der verwendeten internen Standards bei der Probenvorbereitung überprüft werden.

5.2 Kontrollkarten für QC-Proben

Die laborinterne Qualitätskontrolle mit Kontrollproben ist bei der Haaranalytik erschwert. Der Einbau von Substanzen in die heterogene Matrix kann durch Aufstocken einer leeren Haarprobe nicht hinreichend modelliert werden. Umgekehrt stellt eine Festlegung von Extraktionsmethoden und Dekontaminationsverfahren nur eine willkürliche Konvention dar, die keinen Anspruch auf den „wahren Wert“ beanspruchen kann. Für die interne Qualitätskontrolle ist es daher ausreichend, bei jeder Analysensequenz mit aufgestockten Proben aufzuzeigen, dass in einer Leerhaarprobe keine falsch positiven Ergebnisse erhalten werden und die Substanzen im Bereich der Bestimmungsgrenze trotz mitextrahierter Matrixbestandteile in einem festgelegten Retentionszeitfenster zu detektieren sind sowie die Massenfragmente in ihren Signalintensitäten in den festgelegten Bereichen übereinstimmen. Für die Einbeziehung der Extraktionsmethode in die Kontrolle ist darüber hinaus zu empfehlen, authentische Proben, die die zu prüfenden Analyten enthalten (z.B. Haarpool aus Resten positiver Analysenproben) in jeder Messserie mit zu untersuchen. Die Ergebnisse sind wie bei anderen Analyseverfahren auf Kontrollkarten zu dokumentieren.

5.4 Externe Qualitätskontrollen (Ringversuche)

Die externe Qualitätskontrolle bei Haarproben muss auch authentische Haarproben umfassen. Aufgrund der dargelegten Besonderheiten bei Haaranalysen erscheinen zur Überprüfung eines Einzellabors neben Ringversuchen regelmäßige Interlaborvergleiche am sinnvollsten, bei denen die Reproduzierbarkeit objektiviert und die Abweichung eines Labors vom Mittelwert aller Laboratorien bzw. von den Referenzlaboratorien festgestellt werden kann.

6 Ergebnisbericht/Gutachten

Berücksichtigung der Haarlänge bei der Interpretation

Bei forensisch-toxikologischen Untersuchungen von Haarproben geht es in der Mehrzahl der Fälle um den Nachweis oder Ausschluss eines Konsums illegaler Betäubungsmitteln, wobei es einheitlicher Verfahren bei der Interpretation der Befunde bedarf. In Anbetracht sonstiger Unsicherheiten ist es legitim, in der Regel von einem durchschnittlichen Wachstum des Kopfhaares von ca. 1 cm pro Monat auszugehen (ca. 0,5-1,5 cm pro Monat). Derart gestaltet kann in Abhängigkeit von der Fragestellung eine entsprechende Segmentierung vorgenommen werden. Auch die intradermale Wachstumsstrecke, die einen Zeitraum von 9-14 Tagen umfasst, ist von

untergeordneter Bedeutung. Grundsätzlich sollte eine Interpretation zurückhaltend erfolgen, gerade bzgl. des retrospektiven Zeitfensters. Zu beachten ist insbesondere, dass

- sich ca. 1-3% der Kopfhare in der katagenen (Übergang von der Wachstums- in die Ruhephase) und ca. 10-15% in der telogenen (kein Wachstum seit bis zu ca. 6 Monaten) Phase befinden,
- es zu einer Einlagerung aus Körperdepots bis zu wenigen Monaten nach Konsumende kommen und
- die Wachstumsrate inter- und intraindividuell deutlich variieren kann.

Der Beitrag der katagenen und telogenen Haare ist bei kürzeren Haarproben weiterhin von der Art der vorangegangenen Kürzung der Haare (z.B. totale Rasur, so dass sich danach alle Haare im Anagenstadium befinden, oder regelmäßiger Rückschnitt auf die gleiche Länge) abhängig. Daher sollte bei der Interpretation nach Analyse eines z.B. 6 cm langen proximalen Haarsegmentes folgendes gelten:

Bei positivem Befund ist ein Umgang oder Konsum innerhalb der letzten ca. 6 Monate (bis maximal 12 Monate) anzunehmen.

Bei negativem Befund besteht kein Hinweis auf einen Drogenkonsum innerhalb der letzten ca. 6 Monate, wobei ein einmaliger oder sehr seltener Konsum nicht ausgeschlossen werden kann.

Für einige Betäubungsmittel wie z.B. 6-Monoacetylmorphin oder Cocain sowie für Benzodiazepine und Methadon wurden in Achsel- und Schamhaaren höhere Konzentrationen als in Kopfharen festgestellt. Dies wurde auf eine Aufnahme über Schweiß und Sebum und auf im Vergleich zu Kopfharen unterschiedliche Wachstumsphasen zurückgeführt. Bei Schamhaaren kann zusätzlich eine Aufnahme über drogenhaltigen Urin vermutet werden. Für Achselhaare wurde in der Literatur ein durchschnittliches Wachstum von 0,28-0,44 mm/Tag angegeben; für die Anagenphase wurde eine Zeitspanne von 44-72 Wochen, für die Telogenphase von 48-68 Wochen ermittelt. Das Wachstum der Schamhaare soll 0,20-0,39 mm/Tag betragen, die Dauer der Anagenphase 47-77 Wochen, die Dauer der Telogenphase 51-73 Wochen. Danach befinden sich ca. 40-60 % der Achsel- und Schamhaare in der Wachstumsphase, bei Kopfharen liegt der Anteil bei ca. 85-90%. Barthaare wachsen ca. 0,25-0,29 mm pro Tag, die aktive Wachstumsphase wird mit 2-11 Wochen angegeben, das Verhältnis anagener zu telogener Haare mit 55:45 bzw. 66:34. Eine Körperhaarprobe repräsentiert die Dauer des gesamten Wachstumszyklus, sofern sie natürliche Spitzen aufweist.

Literatur

- Robbins CR (2002) Chemical and physical behaviour of human hair. 4th Ed., Springer Verlag, New York, Berlin, Heidelberg
- Madea B, Mußhoff F (Hrsg) (2004) Haaranalytik – Technik und Interpretation in Medizin und Recht. Deutscher Ärzte-Verlag, Köln
- Skopp G (2008) Cannabinoide im Haar – Eine besondere Herausforderung. In: Bundesanstalt für Straßenwesen (Hrsg) Kongressbericht 2007 der Deutschen Gesellschaft für Verkehrsmedizin e.V. Wirtschaftsverlag NW, Bremerhaven, S. 145-151
- Kintz P (Hrsg) (2007) Analytical and practical aspects of drug testing in hair. Forensic Science Series. Taylor & Francis, Boca Raton, Florida

Inkrafttreten

Diese Anlage wurde gemäß Beschluss des Vorstandes der GTFCh vom 01.04.2009 verabschiedet und tritt mit der Publikation im Toxichem + Krimtech in Kraft.

Es gelten Übergangsfristen bis 31.03.2011.