



43° CONGRESSO NAZIONALE SIMLA VERONA

SIMLA: PER UNA NUOVA
COSCIENZA E CONOSCENZA
NELLA MODERNA MEDICINA LEGALE
E NELLA SCIENZA FORENSE
18-20 SETTEMBRE 2018
VERONA, PALAZZO DELLA VENEZIA

STABILITÀ DI SOSTANZE PSICOTROPE E DELL'ABUSO IN SANGUE CADAVERICO CONSERVATO MEDIANTE TECNICA DRIED BLOOD SPOT (DBS)

Matteo Moretti,
Francesca Freni, Jessica Quaiotti, Claudia Vignali, Angelo Groppi,
Antonio M. M. Osculati, Luca Morini



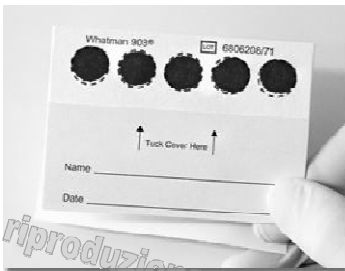
UNIVERSITÀ DI PAVIA

DIPARTIMENTO DI SANITÀ PUBBLICA, MEDICINA SPERIMENTALE E FORENSE

SEZIONE DI MEDICINA LEGALE E SCIENZE FORENSI «A. FORNARI»

Dipartimento di Sanità Pubblica, Medicina Sperimentale e Forense, Università di Pavia





INTRODUZIONE

La tecnica **Dried Blood Spot (DBS)** permette di campionare sangue **(anche cadaverico!)** in maniera semplice e pratica.

Vantaggi:

- Semplicità di conservazione
- Sufficienti pochi millilitri di sangue

Limitazioni:

- Difficoltà interpretative

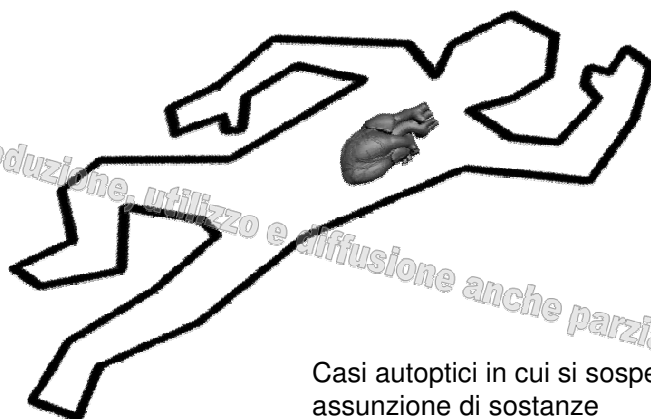


OBIETTIVI DELLO STUDIO

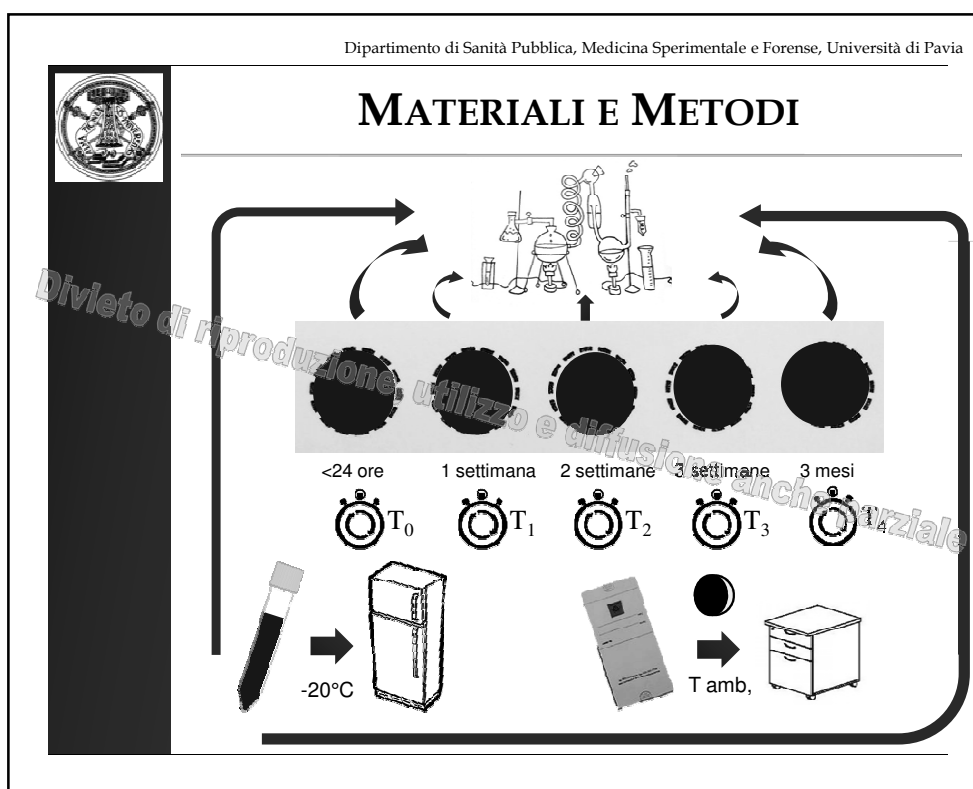
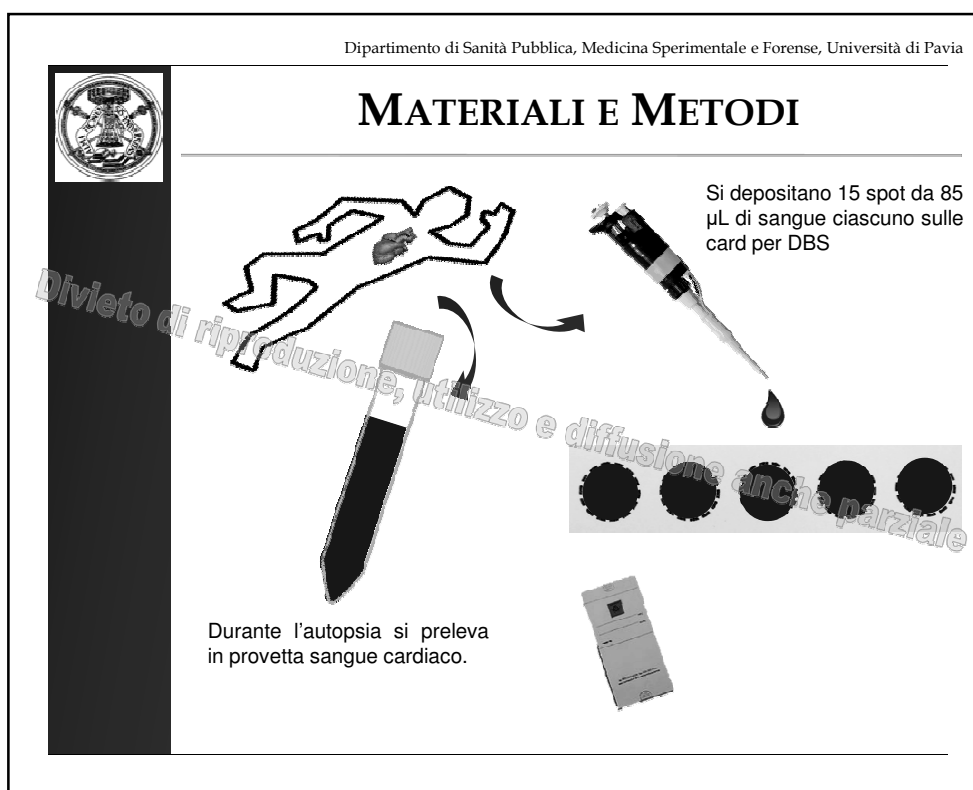
- Sviluppare una metodica per l'identificazione e la quantificazione di varie sostanze psicotrope e d'abuso in sangue cadaverico conservato su DBS.
- Confrontare DBS **vs** campioni «convenzionali»
- Valutare, nell'arco di 3 mesi, la stabilità delle sostanze nei DBS.



MATERIALI E METODI

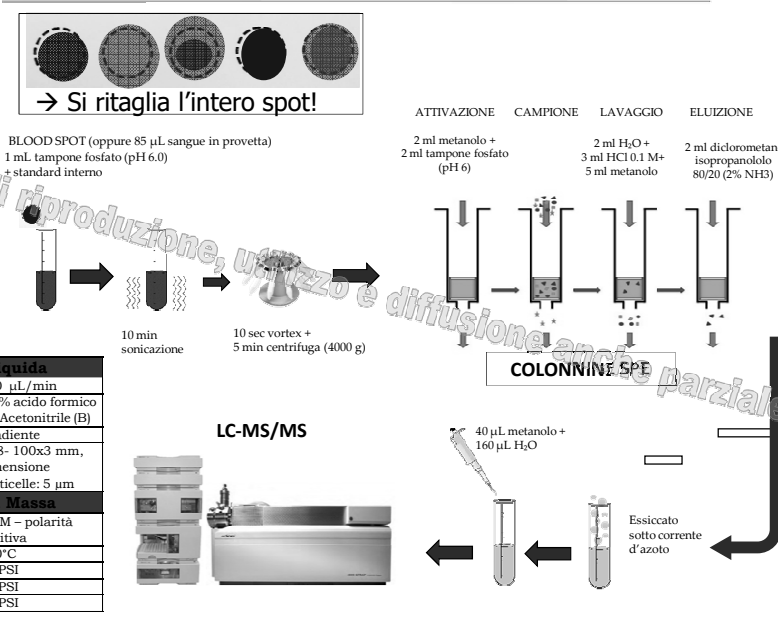


Casi autoptici in cui si sospetta assunzione di sostanze psicotrope o dell'abuso.



Dipartimento di Sanità Pubblica, Medicina Sperimentale e Forense, Università di Pavia

MATERIALI E METODI



→ Si ritaglia l'intero spot!

BLOOD SPOT (oppure 85 µL sangue in provetta)
1 mL tampone fosfato (pH 6.0)
+ standard interno

10 min sonicazione

10 sec vortex +
5 min centrifuga (4000 g)

ATTIVAZIONE: 2 ml metanolo + 2 ml tampone fosfato (pH 6)

CAMPIONE

LAVAGGIO: 2 ml H₂O + 3 ml HCl 0.1 M + 5 ml metanolo

ELUIZIONE: 2 ml diclorometano isopropanolo 80/20 (2% NH₃)

COLONNINE SPE

40 µL metanolo + 160 µL H₂O

Essiccato sotto corrente d'azoto

LC-MS/MS

C	liquida
F	0 µL/min
F	1% acido formico
T	Acetonitrile (B)
T	gradiente
C	18-100x3 mm,
	ensione
	rticelle: 5 µm
S	di Massa
M	RM - polarità
o	sitiva
T	0°C
o	PSI
G	PSI
G	PSI

Dipartimento di Sanità Pubblica, Medicina Sperimentale e Forense, Università di Pavia

RISULTATI

In 19 mesi: > 60 casi
42 positivi per una o più sostanze.

- antipsicotici (n=19),
- antidepressivi (n=16),
- **cocaina e/o principali metaboliti (n=54)**
- narcotici (n=8).
- **benzodiazepine (n=14)**
- altro (n=12),

I metodi sono stati completamente validati secondo linee guida internazionali. Rispettano i criteri di accettabilità:

- Sensibilità
- Specificità
- Accuratezza
- Precisione
- Linearità
- Recupero
- Effetto Matrice
- Carry over



RESEARCH ARTICLE

Drug Testing and Analysis

A liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for the determination of cocaine and metabolites in blood and in dried blood spots collected from postmortem samples and evaluation of the stability over a 3-month period

Matteo Moretti | Silvia Damiana Visonà | Francesca Freni | Ilaria Tomaciello |
Claudia Vignali | Angelo Groppi | Luca Tajana | Antonio Marco Maria Osculati |

Luca Morini

Department of Public Health, Experimental and Forensic Medicine, University of Pavia, Via Forlanini 12, 27100 Pavia, Italy
Correspondence: Matteo Morini, Department of Public Health, Experimental and Forensic Medicine, University of Pavia, Via Forlanini 12, 27100 - Pavia, Italy.
Email: matteo.moretti01@universitadipavia.it

Abstract

The aims of this study were (1) to identify and quantify cocaine (COC), benzoylecgonine (BE), ecgonine methyl ester (EME), and cocaethylene (CE) in DBS; (2) to compare dried blood spots (DBSs) analytical results with the routine blood analysis; (3) to monitor analytes stability on DBS within a 3-month period. Eighty-five μ L of blood from postmortem cases were put on a card for DBS analysis and kept in the dark, at room temperature. Samples were extracted through solid-phase extraction (SPE) cartridges and injected in the liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC–MS/MS) system. The analytical procedure is simple, sensitive, and specific. Limits of detection (LODs) and quantification (LOQs) were calculated at 1.0 and 5.0 ng/mL (g) for COC and CE, and at 0.5 and 2 ng/mL for EME and BE, respectively. Validation parameters fulfilled all the acceptance criteria. Fifty-five postmortem cases were evaluated. Eighteen cases were positive for COC (44–2455 ng/mL) and BE (228–4700 ng/mL), 12 for EME (92–1500 ng/mL), and 11 cases for CE (11–273 ng/mL). Stability was evaluated on 8 cases collected in the period January 2017–January 2018. For each case, 5 DBSs were collected at T0. Four DBSs were analyzed within the 4 following weeks and 1 sample was analyzed after 3 months. The concentrations on DBSs, stored at room temperature, always matched the ones obtained on blood samples kept at -20°C ($<20\%$ variation, both at T0 and after 3 months). BE and COC concentrations remained stable after a 3-month storage, EME concentrations slightly increased after 3 weeks in the 2 analyzed samples, while CE provided a less homogeneous stability depending on the sample.

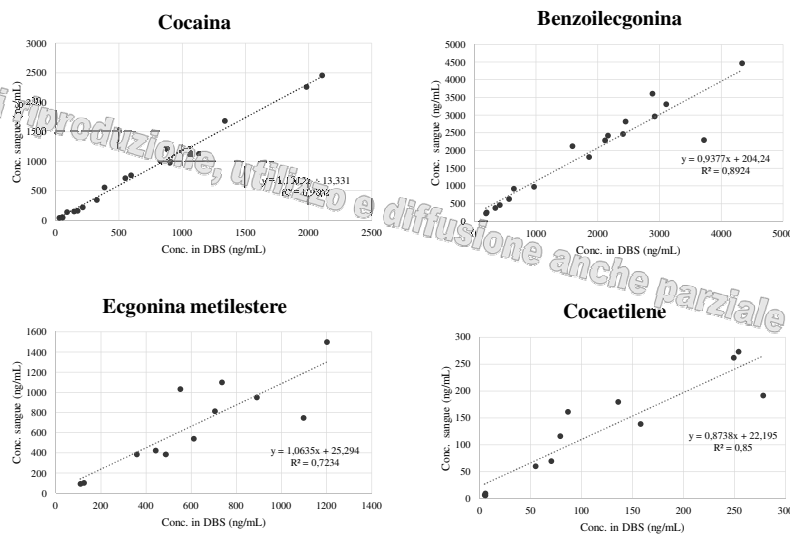
KEYWORDS

Benzoylecgonine, cocaine, dried blood spot, postmortem, stability

Drug Test Anal. 2018 May 4.



RISULTATI –CORRELAZIONE SANGUE vs DBS

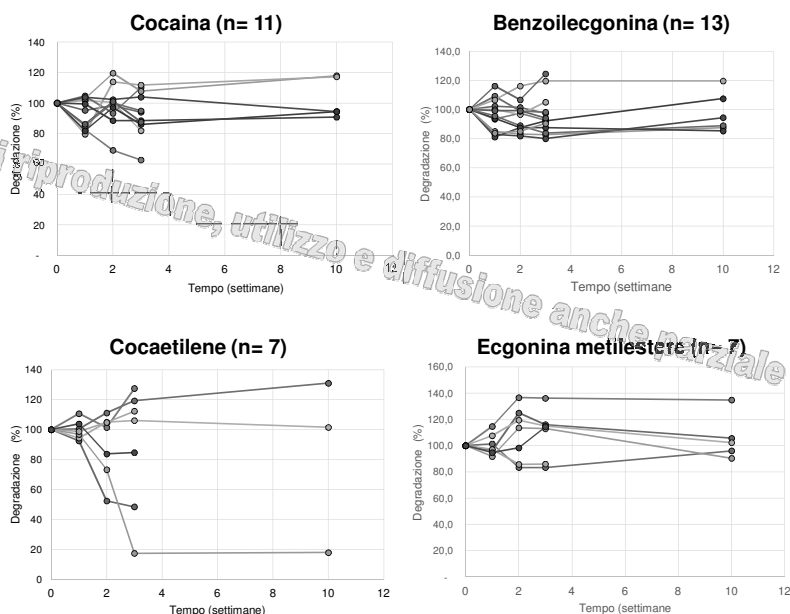
Correlabili!

Coefficiente di Spearman $r^2 = 0.98$

Dipartimento di Sanità Pubblica, Medicina Sperimentale e Forense, Università di Pavia



RISULTATI - STABILITÀ DEI DBS



Dipartimento di Sanità Pubblica, Medicina Sperimentale e Forense, Università di Pavia



RISULTATI - BENZODIAZEPINE

- 60 casi autoptici valutati
- 14 casi positivi per una o più benzodiazepine
- 10 diverse benzodiazepine identificate e quantificate

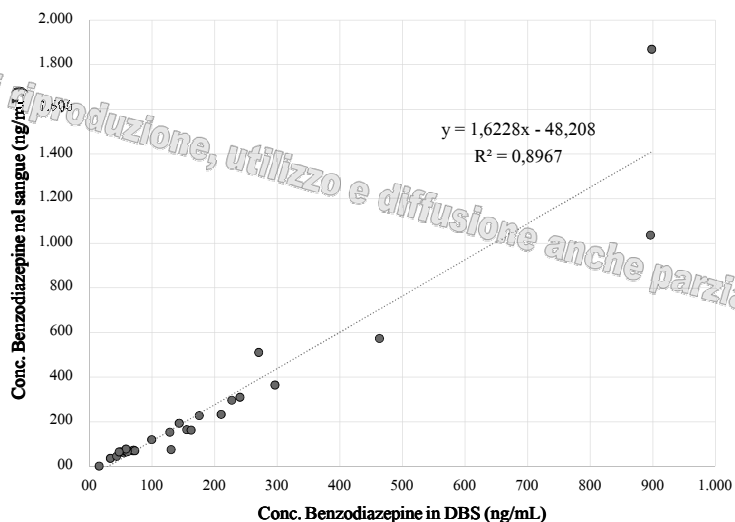
Sostanze	N° casi positivi
DIAZEPAM	6
DESMETHYLDIAZEPAM	6
7-NH2-CLONAZEPAM	5
KETAZOLAM	3
ALPRAZOLAM	2
CHLORDESMETHYLDIAZEPAM	1
DESALKYLFLURAZEPAM	1
FLURAZEPAM	1
MEDAZAPAM	1
MIDAZOLAM	1

Dipartimento di Sanità Pubblica, Medicina Sperimentale e Forense, Università di Pavia



RISULTATI –CORRELAZIONE SANGUE vs DBS

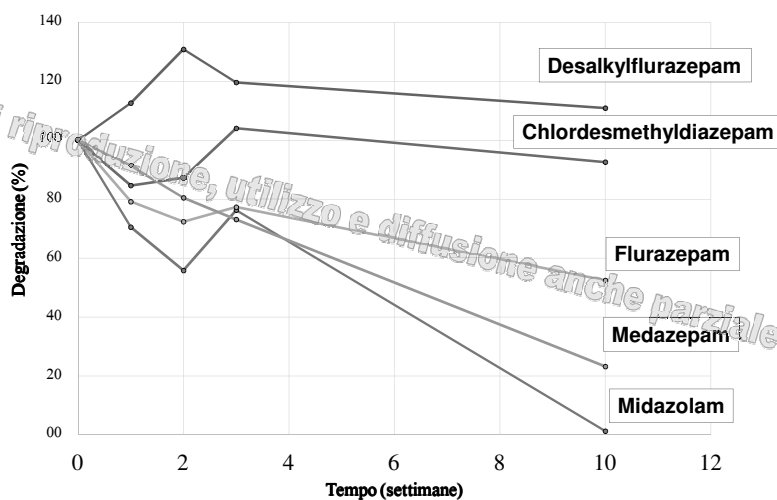
Correlabili!

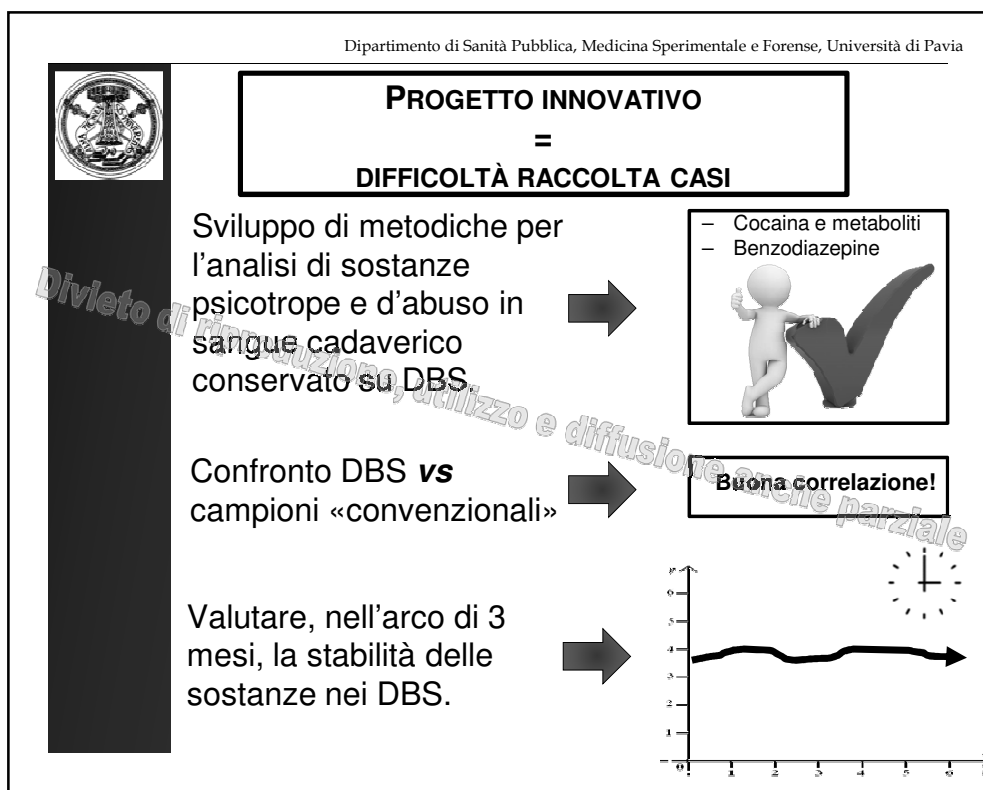
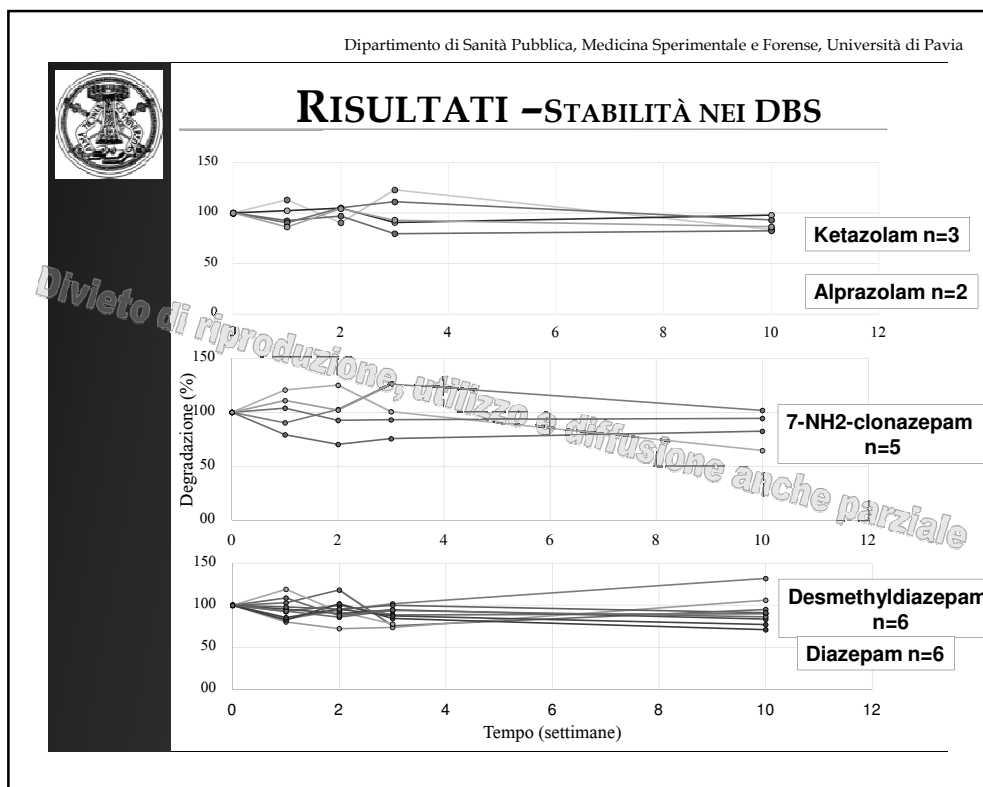
Spearman's $r^2 = 0,91$

Dipartimento di Sanità Pubblica, Medicina Sperimentale e Forense, Università di Pavia



RISULTATI –STABILITÀ DEI DBS



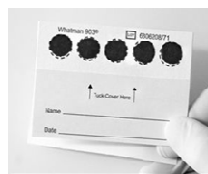




CONCLUSIONI

Tecnica DBS:

- risultati analitici riproducibili sotto il profilo quali-quantitativo, stabili nel tempo
- valida alternativa di raccolta e conservazione del sangue cadaverico



**GRAZIE PER
L'ATTENZIONE**

Il progetto è finanziato dal Blue-Sky Research Grant dell'Università di Pavia.