



Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

«LA TOSSICOLOGIA AZIENDALE: IL RUOLO DEL
LABORATORIO CHIMICO NEL CASO DI SOSPETTO
AVVELENAMENTO DOLOSO DI ANIMALI»

Dr Claudia Focardi
Direzione Operativa Chimica
Laboratorio di Tossicologia

Roma, 25 novembre 2021





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

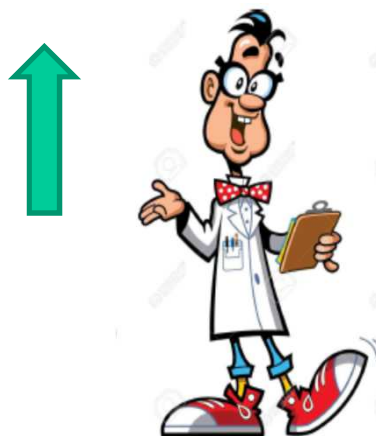
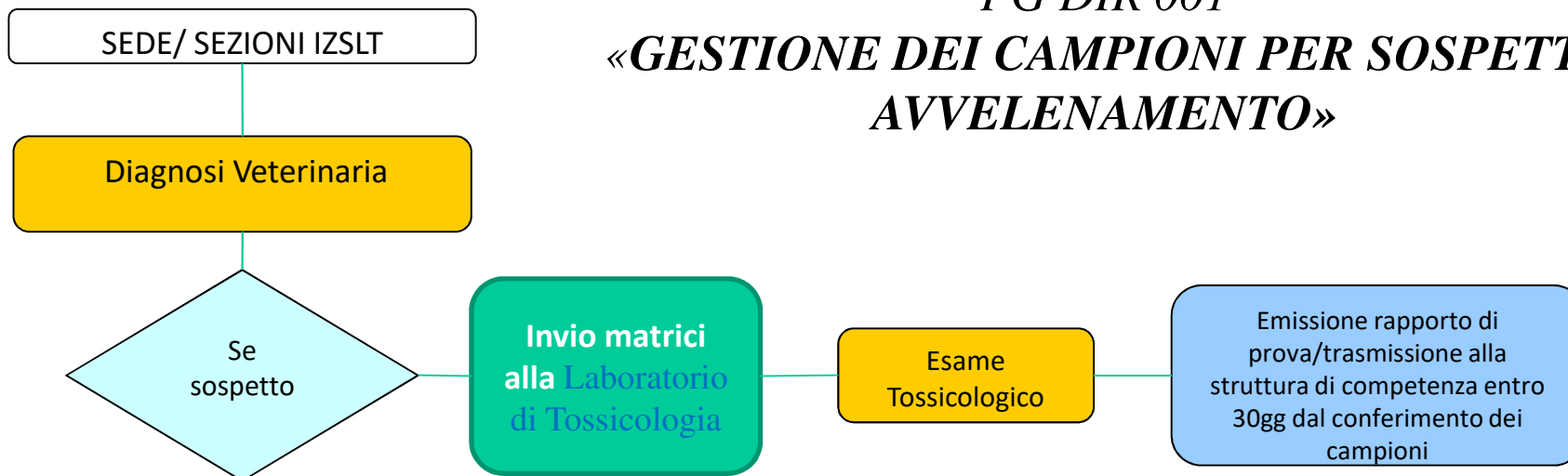
.. di cosa parliamo oggi....

- Conferimento al laboratorio
- Matrici: cosa come dove..
- Requisiti: Linee Guida
- Metodi analitici:
 - Tecniche analitiche
 - Screening
 - Conferma
- Risultati ottenuti
- Implementazioni
- Criticità
- Conclusioni



PG DIR 001

«**GESTIONE DEI CAMPIONI PER SOSPETTO AVVELENAMENTO**»





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana M. Aleandri

SOSTANZA TOSSICA	SINTOMATOLOGIA	LESIONI ANATOMO-PATOLOGICHE	MATRICI DA PRELEVARE
Stricnina Tossico di origine vegetale Rodenticida	Di tipo nervoso. Ipereccitabilità, contrazioni muscolari, trisma mandibolare, contrattura del diaframma, arresto cardiaco.	Poche le lesioni macroscopiche. Petecchie emorragiche in sede gastrica e pancreatica, pancreatite.	Contenuto gastrico, vomito Fegato Esche
Fosforo di zinco Pesticida rodenticida	Gastroenterite-emorragica, ittero, vomito, coliche, feci fosforescenti di odore agliaceo. Oliguria, anuria, delirio, coma.	Azione irritante sulle mucose, degenerazione grassa del fegato e rene, edema polmonare quando inalato.	Contenuto gastrico, vomito Fegato, rene Esche
Organo Fosforici Carbammati Pesticidi insetticidi	Bradycardia, tremori muscolari, deambulazione rigida, eccitabilità, paralisi muscolare, dispnea, miosi, lacrimazione, scialorrea.	Non si apprezzano lesioni macroscopiche. Raramente edema polmonare.	Contenuto gastrico, vomito Sangue Esche
Metaldeide Pesticida molluschicida	Di tipo nervoso: convulsioni, tachicardia, tachipnea, morte per paralisi respiratoria. Coliche con vomito caseoso.	Gastroenterite-emorragica, steatosi epatica, odore di formalina all'apertura dello stomaco. Colore verde azzurro del contenuto gastro-intestinale.	Contenuto gastrico, vomito Esche
Anticoagulanti Rodenticidi	Allungamento del tempo di coagulazione. Diatesi emorragica.	Emorragie in tutti gli organi e tessuti (particolarmente a livello del sottocute e della muscolatura scheletrica).	Contenuto gastrico Fegato, rene Sangue Esche

MATRICI

Cosa-Dove-Come

L.39/2001

Arsenico Pesticida inorganico	<u>Avvelenamento acuto:</u> dolore addominale, vomito, diarrea con sangue, sete intensa, tachicardia. <u>Avvelenamento cronico:</u> dimagrimento, lesioni cutanee e delle mucose, alopecia.	<u>Avvelenamento acuto:</u> gastroenterite necrotico-emorragica, degenerazione renale ed epatica, petecchie emorragiche cardiache. <u>Avvelenamento cronico:</u> ipercheratosi, anemia aplastica, cirrosi, nefrite.	Contenuto gastrico, vomito Fegato, rene Esche
Cloralosio Narcotico rodenticida	Di tipo nervoso: ipereccitabilità, atteggiamento aggressivo, convulsioni, ipotermia, miosi, grave depressione respiratoria.	Non sono apprezzabili lesioni. Talvolta edema polmonare.	Contenuto gastrico, vomito Fegato, rene Sangue Esche
Crimidina Rodenticida	Di tipo nervoso: convulsioni tonico-cloniche, opistotono, movimenti di masticazione con scialorrea, ipertermia.	Non si apprezzano lesioni macroscopiche.	Contenuto gastrico, vomito Fegato Esche
Cianuri Tossici minerali	Andamento iperacuto: convulsioni, dispnea, midriasi, scialorrea.	Non si apprezzano lesioni. Sangue rosso lacca. Odore di mandorle amare nel contenuto dello stomaco (non costante).	Sangue Contenuto gastrico Esche







Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

MATRICI

Cosa-Dove-Come




Requisiti richiesti

- Certezza dei risultati
- Affidabilità dei risultati
- Trasparenza dei risultati
- Uniformità dei risultati

Per dimostrare la presenza di questi requisiti sono necessarie:

- la documentazione puntuale di ogni fase analitica
- la tracciabilità di ogni fase analitica





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana M. Aleandri

REQUISITI

LINEE GUIDA

- Elliot P.S., et al "The United Kingdom and Ireland association of forensic toxicologist: forensic toxicology guidelines (2018)" Science & Justice, 58 (2018) 335-345: **Guida UKIAFT.**
- Bertold E., et al "Linee guida per le strutture dotate di laboratori per gli accertamenti di sostanze d'abuso con finalità tossicologico-forensi e medico legali su campioni biologici prelevati da vivente" Gruppo Tossicologi Forensi Italiani rev.5 del 29 maggio 2017.: **Guida GTFI.**

EN ISO IEC 17025 "*Requisiti generali per la competenza dei laboratori di prova e di taratura*"

Decisione SANCO 657/2002 "*relativa al rendimento dei metodi analitici e all'interpretazione dei risultati*"

- Gwaltney-Brant S.M., "**Veterinary Forensic Toxicology**" Veterinary Pathology (2016) vol 53 (5), pg 1067-1077.





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

REQUISITI

LINEE GUIDA

«Per assicurare la qualità dei servizi e degli accertamenti analitici condotti, vi è la necessità di mettere a punto un sistema di gestione della qualità che assicuri che tutti i processi avvengano in condizioni controllate»

Ricezione del campione

Catena di custodia

Sicurezza

Comunicazione dei risultati

Metodi analitici

- Scelta del metodo
- Validazione
- Controllo di qualità interno
- Valutazione esterna di qualità (VEQ)



LINEE GUIDA

Le Analisi Tossicologiche in ambito forense prevedono anche l'esame di plurime matrici biologiche, i cui rispettivi esiti, da soli o in combinazione tra loro, forniscono elementi utili per una corretta valutazione tossicologico/forense.

PERTANTO IL RESPONSABILE DEL LABORATORIO VALUTA, A SECONDA DELLE VARIE ESIGENZE E RICHIESTE, LA TIPOLOGIA DI MATRICE BIOLOGICA NECESSARIA E LA METODOLOGIA DA ADOTTARE. (cit. Linee Guida GTFI, par. 5.2)

Es. materiale non sufficiente per eseguire tutte le prove



TECNICHE ANALITICHE

Colorimetrico,
Spettrofotometria, (UV VIS)

Cromatografia ionica,
Spettroscopia Atomica (AAS – ICP-MS)
Cromatografia liquida (HPLC- DAD HPLC FLD)
Cromatografia gassosa (GC- EDC GC –NPD, GC FID)

Le tecniche cromatografiche accoppiate con le
spettrometria di massa sono definite in tossicologia

«Gold Standard»

screening

conferma



Rivelatore di Massa

Lo spettrometro di massa separa gli ioni in base al loro rapporto massa su carica. E' una tecnica «finger print»: le frammentazioni di un composto sono univoche ed in uno spettro si cercano i segnali principali tipici di quel composto che appunto ne costituiscono la sua impronta digitale

Cromatografia/Massa

Gli spettrometri di massa interfacciati a sistemi cromatografici combinano 2 separazioni ortogonali:

- la porzione cromatografica separa le molecole in base alle sue caratteristiche, quali ad es la polarità, fornendo indicazioni sul TEMPO DI RITENZIONE (Tr);
- La parte di spettrometria di massa differenzia i composti in base al loro rapporto m/z fornendo indicazioni sulla STRUTTURA del composto

La combinazione Tempo di ritenzione- m/z rende l'analisi con un alto grado di selettività.



Nel laboratorio su campioni biologici e sulle esche vengono eseguiti test di **screening e/o analisi di conferma;**

METODI DI SCREENING → Sensibili, meno selettivi

METODI DI CONFERMA → Sensibili, Selettivi

SELETTIVITA':

descrive l'abilità del metodo di *differenziare un analita dagli altri componenti chimici del campione.*

SENSIBILITA':

descrive l'abilità del metodo di *rilevare bassi livelli di analita.*

Una tecnica analitica con un alto grado di selettività è meno incline a rilevare falsi positivi.



Caratteristiche dei METODI DI SCREENING

I metodi di screening vengono utilizzati per la necessità di analizzare un elevato numero di campioni in tempi brevi ed a costi contenuti;

Producono un risultato di **probabile** (“presumptive”) positività del campione rispetto all’analita

Il risultato di una Analisi di screening non può essere espresso in termini quantitativi ma unicamente sotto forma di presenza o di assenza di un analita o classe di sostanze nel campione.



METODI DI SCREENING

Test di screening colorimetrici e spettrofotometrici;

VANTAGGI { Rapidi
A basso costo

SVANTAGGI { Poco Applicabili



METODI DI SCREENING

colorimetrici

Metaldeide

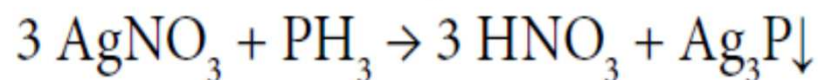
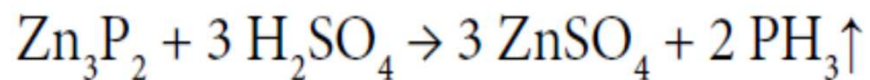
Spot Tests in Organic Analysis F. Feigl, V. Anger Seven
Ed.(2001) p. 422



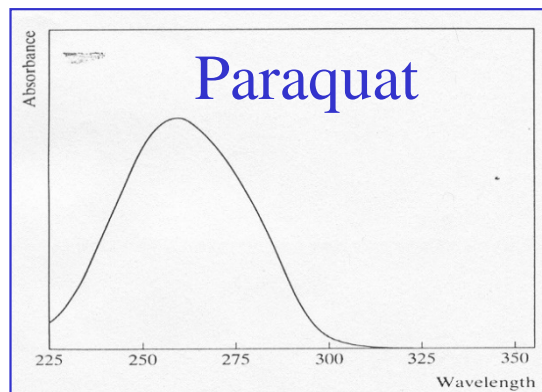
Fosfuri

Test del Nitrato di Argento su carta

Interferenza
dovuta ai
solfati

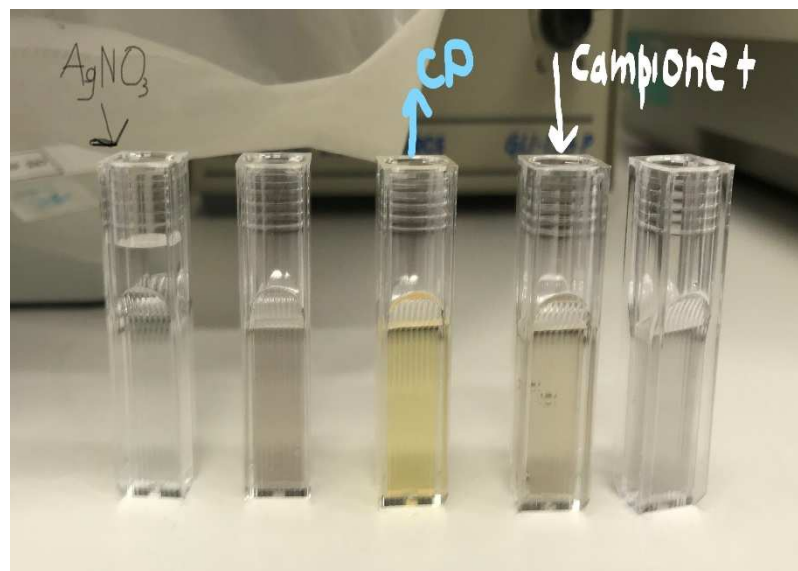


METODI DI SCREENING



Spettrofotometrici

Fosfuri



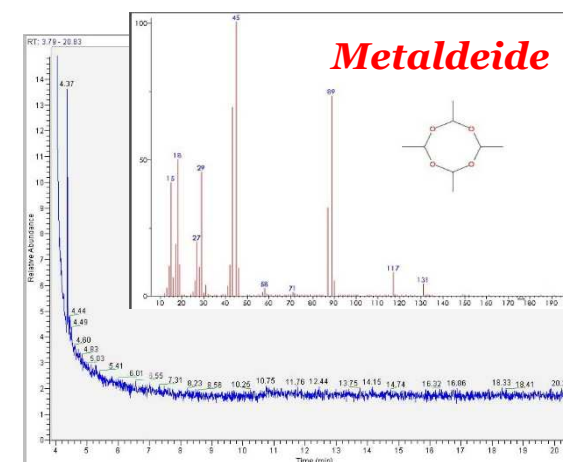
Test di screening Cromatografia/Massa

L'identificazione dei singoli picchi cromatografici comparando la frammentazione di massa ottenuta rispetto, a quelle disponibili su due librerie, NIST e Wiley contenenti migliaia di composti , che sono a corredo del software.

LINEE GUIDA:

Definiscono i criteri minimi per l'identificazione e l'assegnazione di uno spettro ad un determinato analita basati su :

- **tempo di ritenzione**
- **Interpretazione dello spettro di massa, ovvero**
 - ioni diagnostici**
 - identificazione ioni interferenti (es “column bleed”)**
 - identificazione ioni dovuti alla matrice.**





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

Validazione metodo di screening

LINEE GUIDA

Limite Decisionale (Cut Off)

Limite di concentrazione definito, in maniera convenzionale, per stabilire la negatività ovvero la sospetta positività di un campione.

Per i metodi colorimetrici si determina la più bassa concentrazione rilevabile e poi si determina la presenza per confronto

Per i metodi GC/LC MS si determina il limite di rivelabilità (LOD) e il limite di quantificazione (LOQ) che vien preso come valore di cut-off.





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

Validazione metodo di screening

LINEE GUIDA

L'esito negativo è generalmente accettato come valido, pertanto in sede di validazione del metodo deve essere accertata la capacità del metodo nel non produrre falsi negativi;

Qualunque **esito positivo** allo screening comporta un'analisi di **conferma** e quindi il metodo deve essere in grado di minimizzare le false positività.



METODI DI CONFERMA

Il metodo di conferma deve essere in grado di produrre un risultato analitico il più possibile indipendente da quello dell'Analisi di screening;

Producono un risultato di **certo** positività o negatività del campione rispetto all'analita

Il risultato di una Analisi di conferma di tipo qualitativo deve essere espresso esclusivamente sotto forma di positività (presenza) o di negatività (assenza).

«**Nell'ambito della tossicologia forense, l'impiego della spettrometria di massa in combinazione con una tecnica di separazione di tipo cromatografico per Analisi di conferma ha trovato il consenso generale della comunità scientifica internazionale e nazionale.**»





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

Validazione metodo di conferma

LINEE GUIDA

- specificità
- stabilità dell'analita
- criteri minimi di identificazione
- linearità
- criteri di quantificazione
- valutazione dell'effetto matrice
- assenza di carry-over



- accuratezza e precisione
- limite di rivelabilità (LOD)
- limite di quantificazione (LOQ)
- applicabilità della diluizione
- incertezza di misura
- robustezza





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana M. Aleandri

Campioni Pervenuti presso la Sezione di Firenze in ambito Tossicologico nel periodo 2018-2021

Lazio e Toscana

ANNO	Numero di Campioni	Numero di Analisi effettuate	Campioni Positivi	Percentuale di Positività
2005	345	1316	184	14,0
2006	819	2981	624	20,9
2007	896	3530	815	23,1
2008	959	3700	679	18,4
2009	961	3411	576	16,9
2010	1049	3495	699	20,0
2011	1123	3367	513	15,2
2012	838	4251	630	14,8
2013	923	4579	442	9,7
2014	821	5160	211	4,1



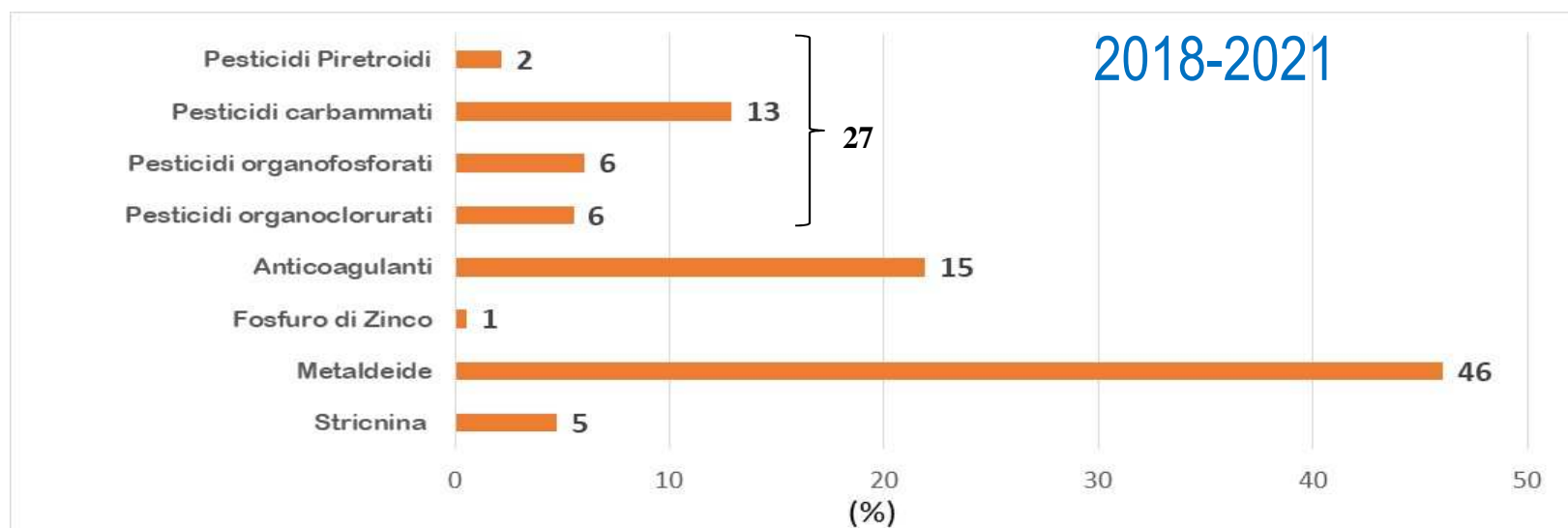
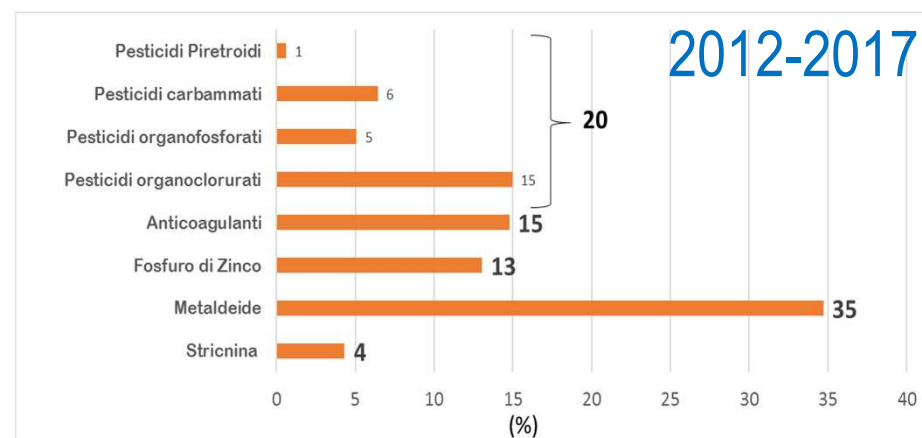
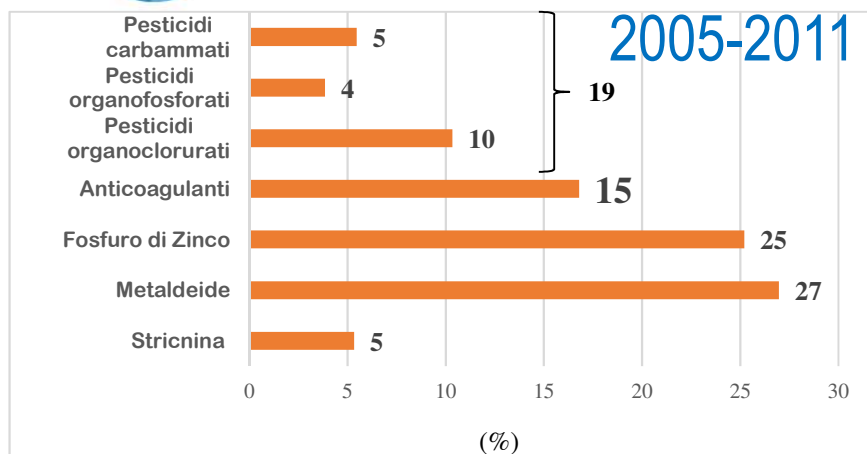
ANNO	Numero di Registrazioni	Numero di campioni (Animali /Esche)	Numero di Analisi	Numero di campioni Positivi	Percentuale di Positività
2018	716	802	1474	331	41,3
2019	722	792	1996	259	32,7
2020	590	623	1750	196	31,5
2021 sett	427	446	1094	132	29,6
Totale	2455	2663	6314	918	33,8





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

DISTRIBUZIONE DELLE POSITIVITÀ





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana M. Aleandri

DISTRIBUZIONE DELLE POSITIVITÀ

ANNO	ESCHE	Esche Positive	% Esche Positive
2018	345	161	46,7
2019	284	133	46,8
2020	271	109	40,2
2021 sett	206	67	32,5

Analita	Richiesta	Positivi	% Positività
Metaldeide	121	87	71,9
Anticoagulanti	68	35	51,5
Pesticidi	198	38	19,2
Stricnina	115	3	2,6
Fosfuri	57	2	3,5

ANNO	Animali	Animali Positivi	% Animali Positivi
2018	457	159	34,8
2019	433	155	35,8
2020	352	106	30,1
2021 sett	240	66	27,5

Analita	Richiesta	Positivi	% Positività
Metaldeide	140	70	50,0
Anticoagulanti	127	26	20,5
Pesticidi	271	46	17,0
Stricnina	102	6	5,9
Fosfuri	105	0	0,0





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

DISTRIBUZIONE DELLE POSITIVITÀ

«ESCHE» → Sostanze colorate

«Animali» → Matrice

159 Positivi:
133 Contenuto gastrico
26 Fegato

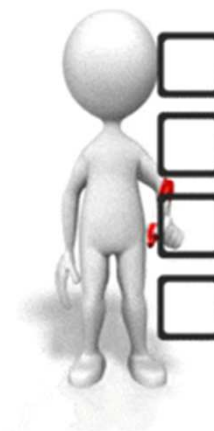
Contenuto gastrico

Fegato, Rene

Metaboliti

Sostanze ad azione rapida





Una sola estrazione



Una sola corsa cromatografica (GC MS)

Panel di pesticidi

(es Endosulfan, Carbofuran, Metiocarb, Metomyl) + Miscellanea
(Metaldeide, Stricnina Crimidina embutramide)

+ ????

Applicato a matrici diverse

Semiquantitativa (\geq Limite di decisione DL)

	DL (mg/Kg)
Stricnina	1
Crimidina	1
Mix Tox	5
Endosulfan Solfato	5
Metaldeide	10





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

SOSTANZE TOSSICHE E VELENI



ANALITA	Tr	IONE TARGET (m/z)	IONI DI IDENTIFICAZIONE (m/z)
Methamidophos	5.15	94	95,141,64
Aldicarb	10.10	86	41,85,144
Methomyl	10.28	105	58,88,59
Propoxur	10.95	110	152,111,81
Phorate	12.07	75	121,260,231
Dimetoate	12.51	87	93,125,143
Carbofuran	12.75	164	149,131,122
3-Hydroxycarbofuran	14.73	137	180,147,161
Carbaril	14.77	144	115,166
Metiocarb	15.35	168	153,109
Primingfos metile	15.45	290	276,305,233
Clorpirifos etile	15.88	197	199,314
Isofenphos	16.89	213	121,255,185
Alfa-Endosulfan	17.43	241	237,195,239
Beta-Endosulfan	18.76	195	237,241,207
Endosulfan solfato	19.75	272	274,387
Permetrine	23.23/23.39	183	165,163
Deltametrina	26.32	181	253,251,255
Metaldeide			
Stricnina			
Crimidina			





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

STATO DELL'ARTE

Campo di attività	Analita	Matrice	Metodo
RODENTICIDI ANTICOAGULANTI	Idrossicoumarinici: Bromadiolone, Brodifacoum, Coumatetralil, Coumaclor, Coumafuryl, Difenacoum, Flocoumafen, Warfarin Indandionici: Clorfacinone, Difacinone, Pindone, Valone Idrossibenzothiopyranone: Difethialone	Esche Fegato	HPLC FLD/DAD
RODENTICIDI	Metaldeide	Esche Contenuto gastrico, lavanda gastrica, fegato/rene	Colorimetrica GC MS
	Paraquat	Esche, Rene	UV VIS
	Stricnina Crimidina	Esche Contenuto gastrico, lavanda gastrica, fegato/rene	GC MS
	Fosfuri	Esche Contenuto gastrico	Colorimetrico UV VIS





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana M. Aleandri

STATO DELL'ARTE

Campo di attività	Analita	Matrice	Metodo
<u>PESTICIDI</u>	Organolorurati Organofosforati Carbammati Piretroidi	Esche gastrico, gastrica, fegato/rene	Contenuto lavanda GC MS
METALLI	Tutte le specie animali	Esche gastrico, gastrica, fegato/rene, prodotti dell'apicoltura	Contenuto lavanda Api, ICP MS
PESTICIDI (API)	Organolorurati Organofosforati Carbammati Piretroidi	Api	GC MS
PESTICIDI (prodotti dell'apicoltura)	Organolorurati Organofosforati Carbammati Piretroidi	Miele polline cera	GC MS



Nuovi Sviluppi

- **TOSSINE VEGETALI (progetto di Ricerca)**

- Valutazione della consistenza del fenomeno.
- Sviluppo e validazione di un metodo analitico di screening in grado di indentificare un maggior numero possibile di principi attivi sullo stesso campione; sviluppo e validazione di metodi mono residuo di conferma.
- In aiuto agli allevatori verranno identificate le condizioni attraverso cui avviene un avvelenamento e sviluppate di conseguenza strategie per minimizzare e ridurre tali eventi.

- **Ampliamento Panel Analitico**

es (LC MSMS → Brometalina,
Difethialone
Cloralosio etc)



CRITICITA'

- Quantità di campione
- Confezionamento Campioni
- Completezza informazioni





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

LINEE GUIDA

..»La **quantità minima** di campione biologico dovrebbe essere tale da permettere la possibilità di effettuare il prelievo di una porzione per la prima analisi e di un controcampione per l'analisi di conferma. Deve essere tenuto inoltre in considerazione l'eventuale necessità di esaminare il campione più volte, anche in rapporto al numero di analiti richiesti, alla finalità dell'esame qualitativa e/o quantitativa o comunque alla necessità di ripetere l'analisi.»

MATRICE BIOLOGICA	SCREENING (grammi)	CONFERMA (grammi)	QUANTITÀ MINIMA (grammi)
Fegato	10	10	20
Rene	10	10	20
Tessuto adiposo	10	10	20
Polmone	5	5	10
Sangue	10	10	20
Urine	25	25	50
Contenuto gastrico	Tutto quello disponibile		
API	5-7	7	10
ESCHE	5	5	10





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

LINEE GUIDA

« Confezionamento campioni »

Utilizzo di un sistema a più involucri

- Primario
- Secondario

NO campioni dentro i guanti !!

Contenitori: Tenuta ermetica

Pulizia esterna

Corretta identificazione





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

CONCLUSIONI

Per una corretta identificazione occorre

- Più informazioni possibili.
- Test ad ampio spettro
- Conoscenza dei limiti dei propri screening.
- Uso di tecniche cromatografiche accoppiate alla spettrometria di massa

e...

Lavorare in team





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

Grazie per l'attenzione

