

Revue générale

Préparation d'échantillons pour analyses en immunochimie

Sample preparation for immunoassay analysis in toxicology

Bertrand Brunet*, Yves Papet, Patrick Mura

Centre Hospitalier Universitaire, Service de toxicologie et pharmacocinétique, BP 577, 86021 Poitiers Cedex, France

Résumé – Introduction : Malgré l'essor des techniques chromatographiques couplées à la spectrométrie de masse, l'immunoanalyse revêt toujours une importance capitale dans les laboratoires hospitaliers et de médecine légale. Nous nous attacherons ici à décrire quels pourraient être les protocoles à mettre en œuvre pour utiliser ces tests immunochimiques sur des matrices non conventionnelles (sang total laqué, cheveux...) et sur les préparations nécessaires pour analyser ces échantillons. **Méthodes :** Différentes techniques immunochimiques avec leur aptitude à accepter des matrices dites alternatives seront évoquées. Une application utilisant une défécation du sang total avec de l'acétone est proposée. Quatre paramètres importants en toxicologie (paracétamol, phénobarbital, digoxine et valproate de sodium) ont été testés sur plasma et sur sang total avec cette technique. Les corrélations entre les résultats obtenus sont présentées. Un point particulier est fait sur la préparation d'échantillons en vue de l'analyse de matrices alternatives (cheveux, humeur vitrée, salive...) avec des méthodes immunochimiques. **Résultats :** La procédure présentée ici pour l'analyse du paracétamol, du phénobarbital, de la digoxine et du valproate de sodium dans le sang total par méthode CEDIA donne de bons résultats avec des corrélations satisfaisantes entre les valeurs obtenues sur plasma le jour du prélèvement et les valeurs obtenues sur sang total quelques semaines après. **Conclusion :** Les avantages des tests immunochimiques sont bien connus ; ils peuvent être automatisables, permettent une grande cadence et un résultat rapide. Leur utilisation en toxicologie médico-légale reste compliquée par la nature des échantillons disponibles. S'ils peuvent être utiles dans un but de screening, une confirmation par méthode chromatographique reste indispensable.

Mots clés : Immunoanalyse, matrices alternatives, préparation d'échantillons

Abstract – Introduction: Despite the breakthrough of chromatographic techniques coupled to mass spectrometry, immunoanalysis is still a key component of the various techniques used in clinical or forensic toxicology. This article describes different procedures to use immunoassays on unconventional biological matrices such as clotted blood or hair specimens. A focus is made on sample preparation needed to analyse such matrices. **Methods:** Various immunoassay techniques and their ability to accept unconventional matrices are discussed. An application using protein precipitation with acetone is proposed for the analysis of four relevant compounds in toxicology: valproic acid, acetaminophen, digoxin and phenobarbital. Correlations between results obtained on plasma and whole blood after several weeks of storage are presented. A focus is made on sample preparation for hair specimens, vitreous humor and saliva before analysis with immunoassay tests. **Results:** The procedure presented for the analysis of valproic acid, acetaminophen, digoxin and phenobarbital with CEDIA reagents gives satisfactory results in whole blood. Good correlations are obtained between whole blood and plasma for the same samples. **Conclusion:** Advantages of immunoassay testing are well known, it is a high capacity, rapidity and possibility of automation. The use of immunoassays in forensic toxicology is complicated by the nature and the quality of the samples available. These immunochemical methods can serve as screening techniques but confirmation of positive results is always recommended.

Key words: Immunoanalysis, alternative matrices, sample preparation

Reçu le 17 février 2010, accepté après modifications le 2 avril 2010

Publication en ligne le 26 mai 2010

1 Introduction

Les techniques chromatographiques en phase liquide ou gazeuse couplées à la spectrométrie de masse sont utilisées

en routine dans la plupart des laboratoires de toxicologie hospitaliers ou médico-légaux. Si ces techniques spécifiques et sensibles sont devenues indispensables, l'immunoanalyse tient toujours une place importante dans l'éventail des techniques analytiques dont dispose le toxicologue. Les avantages de l'immunoanalyse ont été largement décrits [1]. La possibilité

* Correspondance : Bertrand Brunet, Tél. 05 49 44 41 14,
Fax 05 49 44 49 55, bertrand.brunet@chu-poitiers.fr

d'automatisation, une grande cadence et des résultats rapides sont les atouts de ces techniques largement utilisées en toxicologie clinique pour leur aptitude à répondre à l'urgence. La sensibilité de ces tests immunochimiques doit être adaptée à la substance à doser et la spécificité doit être maximale pour limiter le risque de résultats faussement positifs. Les tests commerciaux utilisables en toxicologie clinique ou en médecine légale sont validés par les fournisseurs et font l'objet d'un marquage CE (Communauté Européenne) garantissant leur performance sur une ou plusieurs matrices données (urine, plasma, sang total...).

L'immunochimie est un ensemble de techniques diverses qui regroupe des méthodes basées sur la réaction entre un antigène et un anticorps. Différentes techniques ont été développées depuis les années 1970 : RIA (*radio immuno assay*), EMIT (*enzyme multiplied immunoassay technique*), EIA (*enzyme immuno assay*), ELISA (*enzyme linked immuno sorbent assay*), FPIA (*fluorescence polarization immuno assay*), CEDIA (*cloned enzyme donor immuno assay*), immunochromatographie... Ces techniques basées sur le même principe se classent en deux catégories suivant la présence ou non d'une étape de séparation ou de lavage permettant d'éliminer des substances potentiellement interférentes. Il existe donc des techniques en phase homogène sans étape de séparation (EMIT, CEDIA, FPIA) ou en phase hétérogène avec étape de séparation (RIA, ELISA, EIA) [2]. Cette distinction sera importante sur la capacité de ces tests à accepter différentes matrices ainsi que sur leur niveau de sensibilité.

En effet, le toxicologue peut souhaiter utiliser parfois des tests immunochimiques de manière étendue, c'est-à-dire sur une matrice non initialement prévue pour ce test. C'est le cas des laboratoires de médecine légale qui ne disposent pas systématiquement d'urine ou de plasma. Souvent le sang prélevé après autopsie est de mauvaise qualité, laqué, coagulé et impossible à centrifuger pour obtenir du plasma. Dans un but de screening pour obtenir des indications rapides, il est possible d'utiliser des tests immunochimiques sur des matrices non conventionnelles.

Cet article expose les différentes procédures décrites dans la littérature pour la préparation d'échantillons avant leur analyse en immunochimie. Dans une première partie différentes techniques pour l'analyse du sang total sur des tests en phase homogène sont évoquées avec pour l'une d'elle, une application sur quatre paramètres importants en toxicologie (paracétamol, phénobarbital, digoxine et valproate de sodium). Dans une seconde partie, l'utilisation de tests immunochimiques pour l'analyse de matrices alternatives comme les cheveux, la salive, l'humeur vitrée ou les tissus est abordée.

2 Préparation d'échantillons pour analyse du sang total en immunochimie

Dans de nombreux laboratoires de toxicologie ayant la double compétence en clinique hospitalière et en médecine légale, les automates d'analyses en immunochimie sont des outils indispensables de par leur rapidité et leur flexibilité. Ils permettent le dosage de nombreux médicaments dans le sérum

et la recherche de diverses drogues dans l'urine. Cependant dans de nombreux cas, notamment en médecine légale, seul le sang total (de qualité variable selon les circonstances et le délai post-mortem) est disponible. Selon le principe du test immunochimique, l'analyse du sang total sera possible avec ou sans préparation.

En effet tous les tests immunochimiques en phase hétérogène sont assez flexibles quant à la nature de l'échantillon utilisé. Ceci est dû à la conception même du test qui comprend une phase de séparation entre la substance à doser qui est liée aux anticorps immobilisés sur le test et les substances interférentes non liées [2]. Cette étape peut être un lavage dans le cas des tests ELISA ou microplate EIA (mEIA), une chromatographie dans le cas des immunotests à flux latéral ou encore une centrifugation pour les tests RIA. Les étapes de lavage sont très efficaces et permettent aux tests ELISA et mEIA d'accepter diverses matrices et notamment du sang total sans pré-traitement particulier. Toutefois ces tests sont plus coûteux que les tests en phase homogène et leur automatisation n'est intéressante que lorsque l'on effectue de grandes séries.

Les tests en phase homogène ne comportent pas d'étape de lavage et sont donc beaucoup plus sensibles à la nature de l'échantillon utilisé. Ils sont en général destinés à une matrice bien définie : sérum pour les médicaments, urine pour la recherche de drogues ou certaines classes de médicaments. Le taux de protéines, la turbidité du sérum, ou encore les résidus d'hémoglobine peuvent perturber les tests et entraîner l'apparition de messages d'erreur [3]. Pour être utilisables sur d'autres matrices que celle prévue à l'origine, les procédures de ces tests vont donc devoir être adaptées. Une étape de préparation du sang total (extraction, dilution, précipitation) va devoir être pratiquée pour rendre l'échantillon utilisable. Une calibration sur la nouvelle matrice ainsi qu'une modification des seuils de sensibilité doit aussi être envisagée. En effet le seuil de détection des drogues dans l'urine n'est pas compatible avec les concentrations recherchées dans le sang.

De nombreuses procédures sont disponibles dans la littérature pour la préparation du sang total : précipitation par le méthanol [4,5], l'acétone [6-8], l'acide trichloroacétique [9], le diméthylformamide [10] ou encore le sulfate de zinc [11]. Une extraction liquide-liquide reste évidemment possible même si le temps d'extraction limite l'intérêt de l'utilisation de l'immunochimie par la suite. Un mélange de chloroforme et d'éthanol [12] ou encore du chlorobutane seul [13] peuvent être utilisés pour l'extraction. Globalement n'importe quelle technique d'extraction liquide-liquide ou SPE utilisée avant une méthode chromatographique peut être employée à condition de reprendre l'extrait final par un tampon adapté ou du sérum physiologique. Certains auteurs préconisent aussi une simple dilution de l'échantillon de sang total dans le sérum physiologique [14].

Iwersen-Bergmann et Schmoltdt, en 1999, ont testé le passage des échantillons de sérum et de sang total sur un automate Hitachi 911 avec des réactifs CEDIA® DAU destinés à l'urine [15]. Ils ont comparé des calibrations faites avec les réactifs urinaires puis avec des calibrateurs reconstitués dans le sérum et le sérum hémolysé. Ils n'ont pas constaté de différence significative en termes de signal sur les trois différentes méthodes de calibration. Après des essais sur des

échantillons réels, ils concluent que cette méthode sans pré-traitement est possible pour le dosage des drogues (amphétamine, benzoylecgonine, morphine et THC-COOH) et pour certains médicaments (méthadone et benzodiazépines) dans le sang. Les auteurs signalent cependant que sans aucune adaptation des seuils analytiques de la technique immunochimique, le dosage des amphétamines n'est pas assez sensible (seuil à 500 ng/mL). Les autres seuils utilisés (15 ng/mL pour le THC-COOH et 100 ng/mL pour les autres analytes) ne sembleraient d'ailleurs pas satisfaisants actuellement. Il faut ajouter que les auteurs rapportent aussi d'inévitables problèmes de pipetage de l'automate lorsque l'échantillon est trop visqueux.

Le meilleur compromis entre rapidité de préparation et qualité de l'échantillon semble être obtenu après défécation ou précipitation. Les publications utilisant cette technique de préparation sont les plus nombreuses. L'acétone semble être utilisée le plus fréquemment, le surnageant obtenu est moins coloré avec moins de particules en suspension par rapport aux précipitations par le méthanol [16]. Les auteurs de cette dernière publication rapportent une technique simple de défécation à l'acétone adaptée d'un article de Lillsunde et coll. [17]. Un millilitre de sang total est placé dans un tube à hémolyse. Tout en vortexant le tube pendant une minute, 3 mL d'acétone sont ajoutés. L'ensemble est centrifugé à 4000 tr/min pendant 5 min. Le surnageant est récupéré puis évaporé pendant approximativement 15 min, temps nécessaire pour évaporer uniquement l'acétone contenu dans le surnageant. Le reste de surnageant est centrifugé de nouveau à 9000 tr/min pendant 3 min. Le surnageant obtenu est alors analysable en immunochimie. Dans cette publication les auteurs utilisent cette procédure pour doser les opiacés, les amphétamines et les cannabinoïdes dans le sang total par technique EMIT. Les seuils de positivité de la méthode ont été abaissés en augmentant la prise d'échantillon par l'automate. Les seuils obtenus sont de 60 ng/mL pour les amphétamines, 50 ng/mL pour les opiacés et 10 ng/mL pour les cannabinoïdes. 50 à 100 échantillons réels ont été analysés par cette technique, les auteurs rapportent une sensibilité de 100 ; 85,7 ; 97,6 % et une spécificité de 83,3 ; 93,3 et 51,0 % respectivement pour les opiacés, les cannabinoïdes et les amphétamines. Comme pour la plupart des tests immunochimiques sur le marché, les amphétamines présentent la plus faible spécificité. Cependant l'important pour ce genre de test servant uniquement dans un but de screening est avant tout de minimiser les faux négatifs, les auteurs estiment que cette technique relativement rapide est utilisable en routine dans un laboratoire de toxicologie.

Dans un article de 2003, Kroener et coll. comparent les performances de 4 tests immunochimiques pour le dosage de 6 classes de drogues ou médicaments (opiacés, cocaïne, amphétamines, cannabis, méthadone et benzodiazépines) dans le sang total [18]. Deux tests en phase homogène (FPIA : Adx ; CEDIA : Hitachi 911) et deux tests en phase hétérogène mEIA (Mashan MTP et Pyxis 24) sont évalués. Le pré-traitement pour l'analyse en FPIA est une simple défécation de 1 mL de sang par 1 mL d'acétone puis centrifugation et analyse directe du surnageant. La procédure avant analyse par réactif CEDIA est similaire à celle décrite précédemment par Hino et coll. Pour les deux tests en phase hétérogène le sang total est utilisé directement sans pré-traitement selon les recommandations des

fournisseurs. Après analyse de plus de 80 échantillons réels, les seuils de positivité respectifs des tests ont été revus. Pour les deux tests en phase homogène les seuils ont été abaissés pour améliorer la sensibilité, et pour les tests en phase hétérogène les seuils ont été légèrement augmentés pour diminuer le nombre de faux positifs. Les résultats obtenus montrent peu de différence entre les deux types de tests (homogène ou hétérogène), la sensibilité étant d'environ 90 % pour les tests FPIA et CEDIA et de 95 % pour les tests en mEIA. La spécificité est de 80 % environ pour les quatre tests. Les auteurs concluent en indiquant que la différence de sensibilité n'est pas primordiale compte tenu des différences de prix de revient (les tests mEIA étant beaucoup plus coûteux).

Ces différentes publications portent sur l'analyse des drogues dans le sang à l'aide de réactifs initialement destinés à l'urine. Il est donc nécessaire d'adapter les seuils de positivité aux concentrations retrouvées dans le sang, voire de faire de nouvelles calibrations avec la matrice issue du sang total. Une validation de la nouvelle application est indispensable si elle doit être utilisée en routine dans un but de screening avant confirmation.

Dans le but d'évaluer cette procédure de défécation à l'acétone, il nous a semblé utile de tester la différence entre les dosages effectués en routine sur du plasma puis sur les mêmes prélèvements des dosages sur sang total après défécation. Pour cela quatre paramètres utiles en pharmacologie ou toxicologie ont été choisis : le paracétamol, le phénobarbital, l'acide valproïque et la digoxine. Les dosages de patients hospitalisés ont été réalisés une première fois le jour même du prélèvement sur du plasma avec des réactifs CEDIA® (Microgenics). Puis 3 à 5 semaines plus tard (les tubes ayant été conservés à 4 °C), un nouveau dosage est effectué sur sang total après défécation selon la procédure décrite par Hino et coll. Après évaporation de l'acétone le surnageant est complété avec du sérum physiologique pour obtenir un volume final de 1 mL et ainsi permettre une comparaison des quantifications. Le surnageant est réanalysé avec des réactifs CEDIA® sur un automate CD x 90 (ThermoFisher). 10 à 12 échantillons par paramètre ont été testés permettant d'étudier la corrélation entre les résultats obtenus sur plasma et sur sang total après prise en compte du facteur de distribution entre le plasma et le sang total pour chaque analyte (rapport plasma/sang total respectivement de 1,0 ; 0,93 ; 1,8 et 0,93 pour le paracétamol, le phénobarbital, l'acide valproïque et la digoxine). Des échantillons négatifs n'ont pas montré d'interférence avec les différents dosages. Les résultats obtenus sont présentés dans la figure 1.

Les corrélations obtenues sont bonnes, une tendance à la sous-estimation étant cependant notée avec la technique de défécation plus spécialement pour le phénobarbital qui donne des résultats entre 70 et 75 % de ceux obtenus sur plasma. Une certaine instabilité de la molécule ou une variabilité dans la distribution entre plasma et sang total par rapport au coefficient théorique font partie des explications possibles à ce phénomène. Quoi qu'il en soit lors d'une analyse médico-légale, il est donc possible à partir de tests immunochimiques sur du sang total d'avoir une bonne indication sur la prise ou non d'un médicament voire sur la possibilité d'une intoxication. Ces tests restant plus ou moins semi-quantitatifs, une confirmation s'impose.

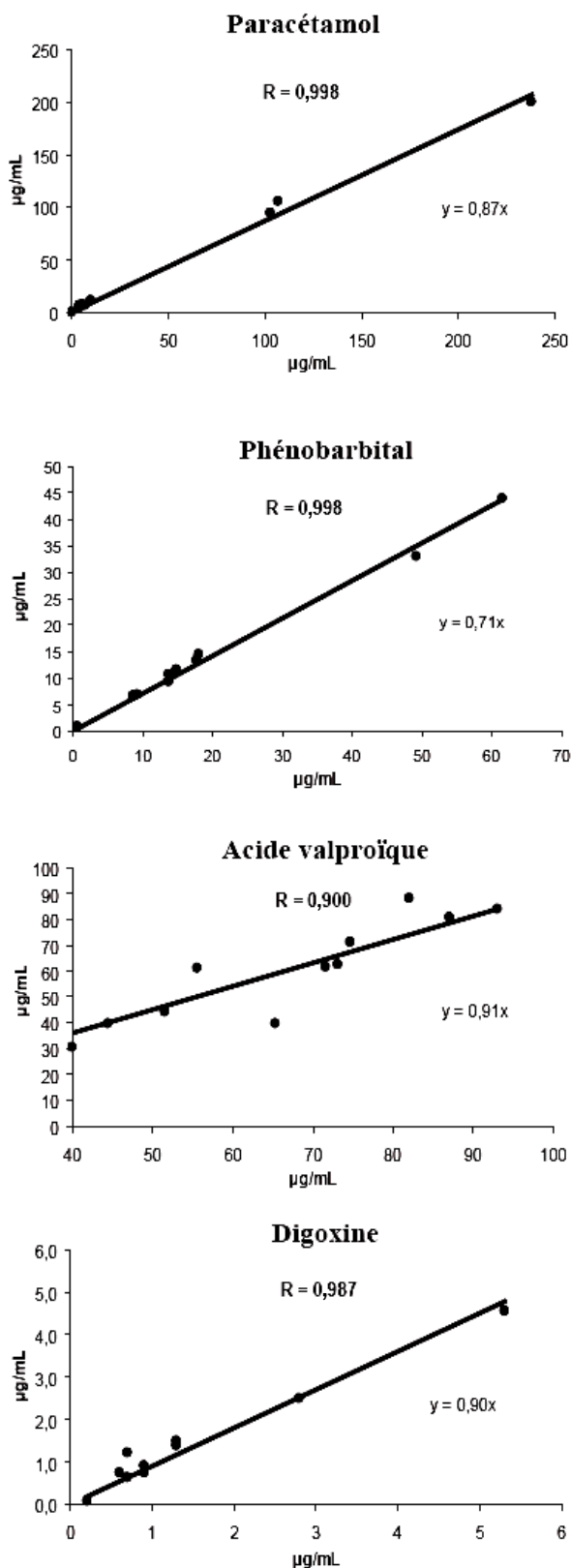


Fig. 1. Corrélations entre les dosages effectués sur plasma puis sur sang total avec les réactifs CEDIA®. En abscisse : résultats obtenus pour le plasma multipliés par la valeur du rapport de distribution sang total/plasma. En ordonnée : résultats pour le sang total obtenus après défécation à l'acétone.

3 Préparation d'échantillons pour analyse de matrices alternatives en immunochimie

Outre le sang total, les laboratoires de toxicologie médico-légale sont amenés à traiter de nombreuses autres matrices notamment lorsque le sang et l'urine ne sont pas disponibles. Dans un souci de rapidité et aussi d'une faible prise d'échantillon les tests immunochimiques peuvent être utilisés dans un but de screening sur d'autres matrices.

3.1 Les cheveux

Les cheveux sont devenus à l'heure actuelle une matrice incontournable dans différents domaines de la toxicologie (médico-légal, dopage, médecine du travail, restitution du permis de conduire). La préparation pour l'analyse des cheveux en immunochimie n'est pas différente de celle pour la spectrométrie de masse. En effet la préparation est une méthode classique en trois étapes : décontamination, broyage ou découpage puis incubation. La seule différence intervient au final pour la reconstitution de l'extrait. La préparation des échantillons de cheveux étant abordée ailleurs dans ce numéro spécial des annales de toxicologie analytique, nous nous attarderons uniquement sur les points particuliers des analyses en immunochimie. Deux points cruciaux sont à prendre en compte pour l'analyse de cheveux en immunochimie [19] :

- les anticorps doivent être dirigés contre les molécules mères ou les métabolites rencontrés dans les cheveux (cocaïne, 6-acétylmorphine...);
- la sensibilité du test doit être adaptée aux concentrations généralement rencontrées dans les cheveux.

Ces caractéristiques font que seuls les tests en phase hétérogène sont à l'heure actuelle suffisamment sensibles. Les analyses de cheveux sont faites essentiellement par techniques ELISA ou mEIA, voire plus rarement par RIA.

3.2 La salive

L'intérêt de la salive en tant que matrice alternative est grandissant depuis la mise en service des tests immunochimiques pour le dépistage des stupéfiants dans le cadre de la conduite automobile. La plupart des tests actuellement sur le marché sont des immunotests à flux latéral (immunochromatographie). Le traitement de l'échantillon dans ce cadre est minimisé, il s'agit le plus souvent d'une simple dilution dans un tampon permettant d'extraire les composés du collecteur utilisé pour récupérer la salive [20]. Ces tampons, dont la composition est difficile à obtenir auprès des fournisseurs, ont un rôle prépondérant pour la récupération des analytes et notamment du $\Delta 9$ -THC, composé très lipophile et difficile à extraire du collecteur. Enfin comme pour les cheveux les anticorps doivent être dirigés contre les molécules présentes dans la salive et non contre les métabolites urinaires comme ce fut le cas pour de nombreux tests salivaires avec le $\Delta 9$ -THC-COOH. La sensibilité du test doit là aussi être adaptée aux concentrations généralement rencontrées dans la salive et une fois encore cela pose le problème du $\Delta 9$ -THC, très peu excrété dans la salive, pour lequel les seuils des tests immunochromatographiques actuels sont pour la plupart insuffisants.

3.3 L'humeur vitrée

L'humeur vitrée peut être un prélèvement utile en toxicologie médico-légale. Plusieurs publications traitent de son utilisation pour un screening de différentes drogues. Lin et coll. en 1997 ont étudié le dosage des opiacés dans l'humeur vitrée par technique FPIA [21]. Chronister et coll. en 2001 et 2008 ont étudié le dosage des opiacés et de la cocaïne dans l'humeur vitrée par technique CEDIA® [22, 23]. Enfin Fucci et coll. en 2006 ont testé la possibilité d'utiliser l'humeur vitrée sur des immunotests à flux latéral [24]. Pour tous ces articles les auteurs ne préconisent aucune préparation d'échantillon autre qu'une centrifugation. La sensibilité des tests doit être adaptée, il convient de prendre en compte que les xénobiotiques ne se distribuent pas tous dans l'humeur vitrée, notamment ceux qui sont les plus liés aux protéines plasmatiques.

3.4 Tissus et autres fluides biologiques

Peu de données sont disponibles dans la littérature sur l'analyse de bile, de contenu gastrique ou de tissus à l'aide de tests immunochimiques. Une publication de Slightom en 1978 traite de l'utilisation de l'immunoanalyse sur des échantillons de bile et de tissus [12]. En 1997, Moore et coll. présentent l'utilisation de tests ELISA pour le screening de neuf classes de substances (amphétamines, métamphétamines, barbituriques, benzodiazépines, cocaïne, LSD, opiacés, cannabinoïdes et PCP) sur du sang post-mortem ou des tissus [25]. Malheureusement la préparation des échantillons de tissus, de bile ou de fluides de décomposition n'est pas décrite dans cet article. Globalement, comme pour les cheveux, la préparation de ce type d'échantillon n'est pas différente de ce qui est fait avant une technique chromatographique : dilution de la bile ou du contenu gastrique, homogénéisation des tissus avant extraction liquide-liquide ou par SPE. La reprise de l'extrait sec se fait par un tampon approprié pour le test immunochimique choisi.

4 Conclusion

La variété des tests immunochimiques, leur rapidité et leur grande cadence en font des outils indispensables à un laboratoire de toxicologie. Mais leur utilité en toxicologie notamment médico-légale est limitée par la nature des échantillons qui peuvent être analysés avec ce type de technique. Les tests en phase hétérogène du type ELISA sont plus flexibles sur ce point et peuvent être utilisés sur une gamme de prélèvements plus large. De nombreuses procédures sont disponibles dans la littérature pour élargir la gamme des prélèvements accessibles pour les automates utilisant une technique en phase homogène. En routine de telles procédures peuvent être appliquées mais elles demandent un travail de validation du test immunochimique sur la nouvelle matrice. Par ailleurs elles ne doivent servir que de technique de screening et tous les résultats positifs devront être confirmés par une méthode chromatographique plus spécifique.

Conflit d'intérêt. Les auteurs déclarent ne pas avoir de conflit d'intérêt.

Références

1. Labat L, Deveaux M. Immunoanalyse et toxicologie. *Ann Toxicol Anal.* 2009; 21(1): 1-2.
2. Hand C, Baldwin D. Immunoassays. In : Moffat C (coordinateur) *Clarke's analysis of drugs and poisons*, third edition. London : Pharmaceutical press 2004: 301-312.
3. Slightom EL, McCurdy HH. Enzyme immunoassay: novel approaches to tissue and fluid analysis. In : Baselt RC (coordinateur) *Advances in analytical toxicology*, vol 1. Foster city : Biomedical publications 1984: 9-40.
4. Peel HW, Perrigo BJ. Detection of cannabinoids in blood using EMIT. *J Anal Toxicol.* 1981; 5(4): 165-167.
5. Asselin WM, Leslie JM, McKinley B. Direct detection of drugs of abuse in whole hemolyzed blood using the EMIT d.a.u. urine assays. *J Anal Toxicol.* 1988; 12(4): 207-215.
6. Lewellen LJ, McCurdy HH. A novel procedure for the analysis of drugs in whole blood by homogeneous enzyme immunoassay (EMIT). *J Anal Toxicol.* 1988; 12(5): 260-264.
7. Bogusz M, Aderjan R, Schmitt G, Nadler E, Neureither B. The determination of drugs of abuse in whole blood by means of FPIA and EMIT-dau immunoassays – a comparative study. *Forensic Sci Int.* 1990, 48(1): 27-37.
8. Cagle JC, McCurdy HH, Pan YM, Ayton KJ, Wall WH, Solomons ET. Evaluation of the CEDIA DAU assays and the AxSym system for the analysis of cannabinoids in whole blood. *J Anal Toxicol.* 1997; 21(3): 213-217.
9. McCord CE, McCutcheon JR. Preliminary evaluation of the Abbott TDx for benzoylcegonine and opiate screening in whole blood. *J Anal Toxicol.* 1988; 12(5): 295-297.
10. Klinger RA, Blum LM, Rieders F. Direct automated EMIT d.a.u. analysis of N,N-dimethylformamide-modified serum, plasma, and postmortem blood for amphetamines, barbiturates, methadone, methaqualone, phencyclidine, and propoxyphene. *J Anal Toxicol.* 1990; 14(5): 288-291.
11. Simonick TF, Watts VW. Preliminary evaluation of the Abbott TDx for screening of D-methamphetamine in whole blood specimens. *J Anal Toxicol.* 1992; 16(2): 115-118.
12. Slightom EL. The analysis of drugs in blood, bile, and tissue with an indirect homogeneous enzyme immunoassay. *J Forensic Sci.* 1978; 23(2): 292-303.
13. Huang W, Moody DE. Immunoassay detection of benzodiazepines and benzodiazepine metabolites in blood. *J Anal Toxicol.* 1995; 19(6): 333-342.
14. Lee CW, Lee HM. Evaluation of the Abbott TDx analyzer. *J Anal Toxicol.* 1989; 13(1): 50-56.
15. Iwersen-Bergmann S, Schmoltdt A. Direct semiquantitative screening of drugs of abuse in serum and whole blood by means of CEDIA DAU urine immunoassays. *J Anal Toxicol.* 1999; 23(4): 247-256.
16. Hino Y, Ojanperä I, Rasanen I, Vuori E. Performance of immunoassays in screening for opiates, cannabinoids and amphetamines in post-mortem blood. *Forensic Sci Int.* 2003; 131(2-3): 148-155.
17. Lillsunde P, Michelson L, Forsstrom T, Korte T, Schultz E, Ariniemi K, Portman M, Sihvonen ML, Seppala T. Comprehensive drug screening in blood for detecting abused drugs or drugs potentially hazardous for traffic safety. *Forensic Sci Int.* 1996; 77(3): 191-210.
18. Kroener L, Musshoff F, Madea B. Evaluation of immunochemical drug screenings of whole blood samples. A retrospective optimization of cutoff levels after confirmation-analysis on GC-MS and HPLC-DAD. *J Anal Toxicol.* 2003; 27(4): 205-212.

19. Spiehler V. Hair analysis by immunological methods from the beginning to 2000. *Forensic Sci Int.* 2000; 107(1-3): 249-259.
20. Langel K, Engblom C, Pehrsson A, Gunnar T, Ariniemi K, Lillsunde P. Drug testing in oral fluid-evaluation of sample collection devices. *J Anal Toxicol.* 2008; 32(6): 393-401.
21. Lin DL, Chen CY, Shaw KP, Havier R, Lin RL. Distribution of codeine, morphine, and 6-acetylmorphine in vitreous humor. *J Anal Toxicol.* 1997; 21(4): 258-261.
22. Chronister CW, Walrath JC, Goldberger BA. Rapid detection of benzoylecgonine in vitreous humor by enzyme immunoassay. *J Anal Toxicol.* 2001; 25(7): 621-624.
23. Chronister CW, Gund AL, Goldberger BA. Rapid detection of opioids in vitreous humor by enzyme immunoassay. *J Anal Toxicol.* 2008; 32(8): 601-604.
24. Fucci N, De Giovanni N, De Giorgio F, Liddi R, Chiarotti M. An evaluation of the Cozart RapiScan system as an on-site screening tool for drugs of abuse in a non-conventional biological matrix: vitreous humor. *Forensic Sci Int.* 2006; 156(2-3): 102-105.
25. Moore KA, Werner C, Zannelli RM, Levine B, Smith ML. Screening postmortem blood and tissues for nine classes of drugs of abuse using automated microplate immunoassay. *Forensic Sci Int.* 1999; 106(2): 93-102.