

## **Determinazione della benzoilecgonina su siero e su sangue cadaverico. Studio di applicazione di tecnica immunoenzimatica (Emit® II Plus)**

**Marzia Bernini, Daniela Ruffini\*, Manuela Licata, Patrizia Verri, Francesco De Ferrari**

Dipartimento di Specialità Chirurgiche, Scienze Radiologiche e Medico Forensi, Cattedra di Medicina Legale, Università degli Studi di Brescia

Dipartimento Integrato Servizi diagnostici e di laboratorio e di Medicina legale, Cattedra di Medicina Legale, Università degli Studi di Modena e Reggio Emilia

### **ABSTRACT**

**Direct detection of Benzoyllecgonine in serum and post-mortem blood by Emit® II Plus Cocaine Metabolites immunoassay.** An EMIT® II PLUS Cocaine Metabolites Assay for urine testing was applied on VIVA-Twin™ Dade-Behring analyzer, for the detection of the cocaine metabolite Benzoyllecgonine in human serum and post-mortem blood. The aim of our study came from the need to realize a reliable screening method on serum and post-mortem blood, instead of using a RIA method, to determine cocaine and metabolites. In this work we realized a first calibration curve, entirely on serum, and then a second calibration curve on EMIT® Calibrator/Control Level 0,2,3, commercial reagents and, finally, we analyzed real samples on both of them, previously tested with RIA and confirmed with GC/MS method. On that serum calibration curve, we analyzed post-mortem blood samples too, previously deproteinized with acetone, and tested with GC/MS method. The results of the modified EMIT immunoassay system presented here were good on both the series examined, with a valid correspondence (absence of false negative), but we found a certain difficulty in identify an advisable cut-off. The method in any case seems to be useful for screening of cocaine in serum and post-mortem blood samples, in alternative to RIA method.

### **INTRODUZIONE**

La determinazione delle sostanze stupefacenti nei liquidi biologici rappresenta un grande impegno da parte dei Laboratori di Tossicologia Forense, a causa in primo luogo della varietà delle sostanze da ricercare, ed in secondo luogo della diversità delle matrici biologiche attualmente utilizzabili a tale scopo. L'avanzamento tecnologico della strumentazione normalmente presente in questi Laboratori consente di applicare metodologie nate per compiere analisi dedicate, quali tecniche radioimmunologiche (RIA), su altri supporti biologici, premettendo a ciò eventuali modifiche di metodo sia per quanto riguarda la parte preparativa dell'analisi, sia per quanto riguarda la tecnica strumentale. Fanno parte di queste applicazioni anche tecniche immunoenzimatiche, tra le quali il sistema EMIT® è forse il più diffuso, non solo nei laboratori degli Istituti di Medicina Legale ma anche in quelli di ASL e strutture private.

La necessità di utilizzare strumenti affidabili e nello stesso tempo versatili per applicazioni che seguano la diffusione delle sostanze d'abuso, quale si riscontra in tutte le strutture di ricerca di tale settore, trova del resto largo supporto in analoghi studi condotti presso istituti forensi e di ricerca medica canadesi, statunitensi e nord-europei (1-8), in cui si rilevano analoghe esigenze analitiche ed interpretative.

E' questo il caso anche della particolare applicazione da noi studiata presso la sede di Brescia, riguardante l'analisi di screening su siero per la ricerca di sostanze stupefacenti, condotta come primo passo analitico per la determinazione di tali sostanze nel vivente nei casi previsti dalla legge, e successivamente per la determinazione della causa di morte su sangue cadaverico.

Analogamente, presso la sede di Modena, e per le stesse finalità, si è condotto uno studio sulla ricerca di stupefacenti su sangue cadaverico utilizzando su tale matrice il metodo EMIT, opportunamente modificato, affiancato all'analisi di screening realizzata con metodo estrattivo e dosaggio in GC/MS.

### **MATERIALI E METODI**

#### **Campioni di siero e sangue**

Per lo studio di calibrazione sono stati utilizzati campioni di sangue, prelevati a donatori selezionati non assuntori di cocaina, sottoposti a semplice centrifugazione a 2500 rpm per l'ottenimento del siero. Agli stessi sieri sono state aggiunte quantità note di benzoilecgonina ai vari livelli considerati. Come controllo sono stati utilizzati 11 campioni di siero, provenienti da sangue pervenuto al Servizio di Medicina Legale degli Spedali Civili di Brescia

per essere sottoposto a controllo della presenza di stupefacenti da parte delle Forze dell'Ordine, in ottemperanza agli artt. 186 e 187 del Nuovo Codice della Strada; tali campioni erano stati screenati con metodo RIA e sottoposti ad analisi di conferma qualitativa con metodo gas-cromatografico GC/MS.

Per quanto riguarda il sangue cadaverico, sono stati selezionati 29 casi autoptici pervenuti all'osservazione presso l'Istituto di Medicina Legale di Modena. I campioni sono stati testati inizialmente con metodo gas-cromatografico GC/MS e successivamente, previa deproteinizzazione con acetone, con metodo immunochimico. In particolare, al fine di valutare l'effetto matrice o di altri xenobiotici presenti, sono stati analizzati campioni provenienti da soggetti a diverso grado di conservazione (iniziale putrefazione, avanzata putrefazione) nonché campioni di soggetti risultati positivi ad alcool etilico o ad altre sostanze.

### Reattivi e metodi di conferma

Per lo screening immunoenzimatico è stato utilizzato nei due casi il sistema EMIT® II PLUS Cocaine Metabolites Assay fornito da Syva Co. Dade Behring Inc. (Cupertino, CA, USA) su strumento VIVA-Twin™ Dade-Behring, utilizzando come controlli il kit EMIT® Calibrator/Control Level 0,2,3. Il siero utilizzato per le curve di calibrazione, per controllo e per l'analisi sui campioni reali, è stato ottenuto da 1 ml di sangue intero, sottoposto a centrifugazione a 2500 rpm ed immissione diretta nel sistema Emit, senza altri trattamenti; la conservazione dei sieri durante lo studio è stata effettuata in frigorifero a +4°C per tutta la durata dell'esperienza.

Per quanto riguarda lo screening RIA sugli 11 campioni di vivente è stato utilizzato il kit COAT-A-COUNT Cocaine Metabolite fornito da DPC (Los Angeles, CA; USA); il metodo di conferma per i positivi, modificato da Varian (Certify Methods Manual – pag 22 – Varian, Harbor City, CA, USA), prevede estrazione di 1 ml di sangue intero con tecnica SPE su colonnine Varian Bond Elut Certify® da 300 mg ed analisi GC/MS su HP 6890 Series e MSD 5972, secondo il metodo analitico già in uso presso la sede di Brescia (9).

Per quanto riguarda lo studio effettuato presso la sede di Modena, 1 ml di sangue cadaverico è stato sottoposto a deproteinizzazione con 3 ml di acetone, seguito da vortex e separato per centrifugazione a 2500 rpm; l'acetone, poi recuperato, è stato mandato a secco sotto corrente d'azoto e ripreso con 0,5 ml di miscela Tampone fosfato 0,1 M pH 6-7: metanolo (1:1). Il metodo di analisi GC-MS ha previsto sia un'indagine generica finalizzata alla ricerca di xenobiotici di interesse tossicologico forense sia un'indagine mirata alla determinazione di cocaina e benzoilecgonina. Per quest'ultima determinazione 1 ml di sangue intero è stato estratto con

tecnica SPE su colonnine Varian Bond Elut Certify® da 300 mg ed analisi GC/MS con gascromatografo Varian® 3400 e Saturn 2000 secondo il protocollo analitico utilizzato routinariamente presso la sede di Modena e caratterizzato, per entrambe le sostanze, da un limite di rilevanza di 10 ng/ml.

### Procedura di analisi EMIT

Inizialmente sono state apportate modifiche ai parametri del test Cocaine Metabolites assay, utilizzato per le urine, riguardanti i volumi di R1 (portato a 175 mL), di R3 (portato a 75 mL) e del Volume di campione (portato a 20 mL). Sono state realizzate due curve di calibrazione: la prima, su siero, è stata ottenuta con aggiunta ai sieri negativi di aliquote di una soluzione di Benzoilecgonina 10 g/L, fino ad ottenere i punti di curva pari a 0, 150, 300, 450 e 900 mg/L; per il controllo del dosaggio su questa curva sono stati allestiti sieri negativi con aggiunta di Benzoilecgonina fino alla concentrazione di 0, 50, 100, 150, 300, 450 e 900 mg/L, testati 3 volte. I risultati analitici di questo controllo sono illustrati in Tabella 1, comprendente sia i valori misurati sia l'errore dei valori attesi.

La seconda curva di calibrazione, allestita successivamente per verificare la possibilità di dosaggio di concentrazioni inferiori alle precedenti, è stata ottenuta per diluizione con soluzione salina sterile dei calibratori Emit, e presenta punti di misura pari a 0, 15, 30, 75, 150 e 300 µg/L. Su questa curva sono stati testate 10 ripetizioni delle concentrazioni pari a 0, 10, 20, 25, 30, 50, 75, 100 e 150 µg/L, ottenute per aggiunta a sieri negativi di Benzoilecgonina fino ai livelli indicati. I risultati di questo controllo sono illustrati in Tabella 2, comprendente invece l'errore dei valori attesi e la deviazione standard.

Dei campioni di siero, a causa della scarsità del materiale recuperato, 10 sono stati analizzati con la prima curva di calibrazione; dopo l'allestimento della seconda curva, sono stati riesaminati 6 campioni, oltre all'11°, pervenuto successivamente. In Tabella 3 sono indicati i dosaggi complessivi degli 11 campioni, testati sia in RIA sia in Emit.

Per quanto riguarda la sede di Modena, 29 campioni di sangue cadaverico sono stati testati su una curva di calibrazione a cinque punti (0, 35, 80, 150, 200 µg/L) ottenuti per diluizione con acqua bidistillata dei calibratori EMIT® LEVEL 0,2,5. I parametri metodologici del test cocaine metabolites assay che sono stati modificati sono: volume R<sub>1</sub> (175 µl), volume R<sub>3</sub> (75 µl), volume campione (30 µl), ritardo minimo (24-132 sec.). La curva di calibrazione è stata ottenuta con 3 ripetizioni e metodo Logit 4par (NLLS). Per il controllo del dosaggio su questa curva sono stati allestiti campioni di sangue cadaverico negativi con aggiunta di benzoilecgonina (standard a 10 g/L) fino alla concentrazione di 0, 30, 50, 80, 150, 200

**Tabella 1**

1° curva di calibrazione su siero – risultati su 3 ripetizioni

Punti di curva in mg/L	0	50	100	150	300	450	900
1° risp.	0	63	110	159	342	516	999
2° risp.	0	68	105	151	22	453	829
3° risp.	0	48	110	158	278	433	950
Errore medio	0	11	8,3	6	24	28	73
Errore relativo percentuale	0	22	8,3	4	8	6	8

**Tabella 2**

2° curva di calibrazione su siero - valori medi su 10 ripetizioni

Punti di curva in µg/L	10	20	25	30	50	75	100	150
Valori medi su 10 ripetizioni	14,16	17,8	18,9	23,46	59,8	68,8	112,18	157,46
Errore medio	1,77	2,5	6,1	6,5	9,8	6,2	12,1	7,8
Errore relativo percentuale	17,7	12,5	24,4	21,8	19,6	8,2	12,1	5,2
Deviazione standard	1,4	2,2	1,9	2,1	2,1	2,8	2,4	3,6

**Tabella 3**

Confronto tra valori RIA e valori Emit nel siero

n° protocollo	Valore RIA	Valore Emit 1° curva	Valore Emit 2° curva
	µg/L	µg/L	µg/L
28/05	NEG	64,2	54,7
40/05	1,6	96,5	-
47/05	0,12	162,7	-
65/05	NEG	0	0
108/05	NEG	0	0
175/05	0,3	140	-
189/05	0,17	30,4	0
194/05	NEG	0	0
21/06	NEG	0	0
22/06	NEG	0	0
72/06	2,1	-	150

µg/L testati 3 volte. La motivazione che ci ha indotti all'utilizzazione di una sola curva di calibrazione si riconduce sostanzialmente alla individuazione di uno screening utile ad orientare la successiva determinazione GC-MS (indispensabile ai fini medico legali) focalizzando l'attenzione più sullo studio dell'effetto matrice e di altri xenobiotici rispetto alla corrispondenza dei dosaggi.

I risultati ottenuti sono negativi per 14 campioni, come confermato dall'analisi GC/MS, a fronte di 10 campioni risultati positivi sia allo screening sia all'analisi di conferma e 5 campioni, negativi in GC-MS, risultati misurabili in EMIT. La Tabella 4 evidenzia i risultati ottenuti e per la determinazione della cocaina e contestualmente riferisce le altre risultanze chimico-analitiche.

**Tabella 4***Confronto tra dosaggio GC/MS e dosaggio Emit su sangue cadaverico*

n° autopsia	Determinazione coca/BEC Valore GC/MS µg/L	Determinazione coca/BEC Valore Emit µg/L	Risultato Altri xenobiotici (GC-MS(µg/L) etanolo)	Stato di conservazione del cadavere
101/04	Negativo	0	Morfina (910)	Buono
105/04	BE 640 COCA < 10	OVFL	EtOH 1,2 g/L THCAC	Buono
112/05	BE 870 COCA 12100	OVFL	EtOH 0,15g/L Negativo	Buono
118/04	BE 1150 COCA <10	OVFL	Morfina (220)	Buono
123/05	Negativo	0	Morfina (370)	Buono
128/05	Negativo	0	Morfina (340)	Buono
135/05	Negativo	0	BDZ Morfina (630)	Buono
139/05	BE 450 COCA <0,01	OVFL	EtOH 1,45 g/L THCAC	Buono
157/05	Negativo	65,4	Negativo	Buono
159/05	Negativo	32,1	EtOH 2,8g/L Negativo	Avanzata putrefazione
162/05	Negativo	154,4	EtOH 0,7g/L Negativo	Iniziale putrefazione
176/05	Negativo	0	EtOH 2,1g/L Morfina (145)	Buono
182/05	Negativo	0	BDZ Morfina (380)	Buono
183/05	Negativo	0	EtOH 0,72 g/L Morfina (680)	Buono
194/04	negativo	37,3	Clonazepam (97) Morfina (280)	Buono
217/05	BE 14300 COCA 7900	OVFL	EtOH 1,3g/L Negativo	Buono
233/05	Negativo	0	Morfina (380)	Buono
242/05	BE 552 COCA50	OVFL	Negativo	Buono
31/05	Negativo	0	EtOH 1,57 g/L Morfina (290)	Buono
38/04	BE tracce	45,5	EtOH 0,88 g/L Morfina (460)	Buono
39/05	BE 270 COCA < 0,01	OVFL	EtOH 0,45g/L Negativo	Carbonizzazione Parziale
44/04	BE 670 COCA 1380	OVFL	Negativo	Buono
44/05	Negativo	0	Negativo	Buono
5/04	BE 730 COCA90	OVFL	Morfina (210)	Buono
6/05	Negativo	107,7	BDZ THCAC Morfina (730)	Iniziale putrefazione
64/05	Negativo	0	Carbamazepina (3200) Fenobarbitale (3900)	Buono
88/04	Negativo	0	Negativo EtOH 0,82g/L Codeina (6630)	Buono
94/05	Negativo	0	Tramadolo, mirtazepina, zolpidem Negativo	Buono
99/04	Negativo	0	Morfina (290) Citalopram	Buono

**RISULTATI**

Tra gli 11 campioni di siero, testati con le due curve di calibrazione, sono risultati negativi (con valore di 0

µg/L e quindi sovrapponibile) 5 campioni risultati negativi sia con metodo RIA sia con metodo EMIT; 3 campioni risultati positivi al RIA sono risultati misurabili in EMIT;

dei rimanenti, 2 campioni, riportanti concentrazioni inferiori al cut-off di 0,3 µg/L in RIA e quindi considerati normalmente negativi, hanno dato valori misurabili in Emit; solo 1 campione, risultato negativo in RIA (0 µg/L), ha dato un valore misurabile in Emit (Vedi Tab. 3).

Diversamente, per quanto riguarda il sangue cadaverico, i 29 campioni sono stati testati dopo trattamento di deproteinizzazione, ed analisi su ripresa del residuo in tampone. A parte 14 campioni risultati negativi sia in GC/MS che in EMIT, dei 10 campioni con risultato positivo si nota un dosaggio EMIT fuori curva (overflow) per 9 campioni, il più basso dei quali ha presentato in GC/MS dosaggio di 270 µg/L. In cinque campioni, invece, negativi in GC/MS (<0,01 µg/L) l'analisi EMIT ha dato un risultato misurabile (Vedi Tab. 4). La disamina dei 5 casi ha rivelato che in 3 si trattava di campioni alterati da fenomeni putrefattivi.

Seppur limitato ai pochi casi finora approntati è ipotizzabile che il metodo di deproteinizzazione non consenta, nei casi caratterizzati da putrefazione, di evitare l'interferenza prodotta dalla matrice; al tempo stesso si ritiene utile segnalare l'ininfluenza nella determinazione della benzoilecgonina di altri xenobiotici (e loro metabolici) presenti anche in elevate concentrazioni.

### DISCUSSIONE

L'esigenza della realizzazione presentata in questo studio è sorta in particolare nella sede di Brescia a causa dell'eliminazione dell'analisi di screening per oppiacei e metaboliti della cocaina, fino ad oggi realizzata con metodo RIA su matrici biologiche provenienti da vivente e da cadavere, e comprendenti quindi sangue ed urine nel primo caso, e sangue delle cavità centrali, urine, bile, omogenati di tessuto nel secondo. La necessità quindi di riconoscere preventivamente (e possibilmente anche in modo semi-quantitativo) la presenza di stupefacenti in tali matrici ci ha indotto a sviluppare un'analisi che preveda l'utilizzo del metodo EMIT, già largamente in uso su matrice urinaria, direttamente su siero. Per problemi legati alla scarsa disponibilità di campioni reali da sottoporre all'analisi anche su altre classi di sostanze, si è scelto di considerare soltanto la ricerca della cocaina, tramite la presenza di benzoilecgonina.

Per l'attuazione di tale indagine è stata rivista la letteratura di merito, nella quale sono emersi numerosi studi, iniziati già nella seconda metà degli anni '80, e continuamente aggiornati per le inevitabili difficoltà incontrate dai vari Autori nel trattare matrici complesse come siero e/o sangue cadaverico, allo scopo di ottenere con pochi passaggi preanalitici (deproteinizzazione, centrifugazione, estrazione – realizzati in svariati modi -) matrici facilmente utilizzabili con kit di reattivi commerciali, e secondo protocolli di analisi prefissati, in grado di rilevare le sostanze d'abuso più diffuse (1-8).

In particolare in tali studi è affrontata la deproteinizzazione alternativamente con metanolo (1,2,4,5), dimetilformamide (3) od acetone (2,8) per quanto riguarda il sangue intero: nel nostro caso è stata adottata la deproteinizzazione con acetone per quanto riguarda il sangue cadaverico.

L'applicazione di un'analisi di screening direttamente su siero presenta innegabili vantaggi rispetto al sangue intero: a fronte di trattamenti di deproteinizzazione e/o estrazione necessari per l'utilizzo del sangue con metodo EMIT a causa dell'alto livello di assorbanza della matrice (1), l'ottenimento del materiale d'indagine è realizzabile per semplice centrifugazione; inoltre tali trattamenti non evitano eventuali perdite di analiti cross-reattivi o di coniugati solubili (3). In letteratura il siero è stato invece utilizzato previo trattamento con solvente (3) o tal quale (7).

Nel nostro studio tale matrice è stata ottenuta per semplice centrifugazione ed analizzata senza trattamenti o diluizioni, allo scopo di realizzare un modo davvero rapido analisi di screening: l'esigenza cui ottemperare è quella di avere, nei tempi più ristretti possibile, un risultato affidabile sulla presenza/assenza di una sostanza, per procedere poi in modo mirato ad analisi di conferma più complesse. Allo stesso tempo, dove il siero non è più ottenibile, lo stesso metodo deve risultare attendibile per evitare di attuare come prima istanza quelle stesse analisi, indubie ma decisamente più complesse ed onerose, necessarie alla conferma del dato positivo.

Lo studio qui condotto indica su siero una buona rappresentatività del valore di 150 µg/L come concentrazione con la migliore precisione analitica: le ripetizioni effettuate sia con la curva di calibrazione su siero (più alta) sia quelle effettuate sulla curva più bassa (su calibratori) mostrano un errore medio ed errore relativo più basso proprio a tale punto. Una buona risposta è stata ottenuta anche per la concentrazione di 75 µg/L, rendendo così eventualmente adottabile tale valore come futuro cut-off analitico.

Il confronto con i metodi alternativi di screening/conferma mostrano buona corrispondenza dei dosaggi comunque ottenuti: in ambedue le casistiche è stato rilevato un errore di circa 10% sulla reale presenza di benzoilecgonina (1 campione su 11 per il siero, 5 su 29 per il sangue cadaverico ridotti a 3 su 29 nell'ipotesi di cut off a 75 µg/L).

Da notare in questo primo approccio sperimentale è la concordanza, nelle due casistiche, del dato errato: sia su siero che su sangue cadaverico sono risultati leggibili con dosaggio EMIT campioni che hanno mostrato indice negativo con le altre tecniche: in ognuno dei tre casi la lettura in EMIT è risultata inferiore a 75 µg/L, corroborando quindi la possibile individuazione del cut-off, anche se il numero di campioni esaminato è sicuramente troppo limitato per trarre conclusioni.

I campioni di siero positivi hanno mostrato concentrazioni sempre inferiori al dosaggio RIA: aldilà di ogni altra considerazione non si può escludere che l'effetto-matrice del siero abbia interferito con le letture in assorbanza del metodo Emit, più di quanto non succeda per gli estratti ottenuti da sangue cadaverico. Viceversa, il dosaggio "overflow" ottenuto in Emit nella maggior parte dei campioni cadaverici positivi indica che forse è necessario mantenere alti livelli dei punti di calibrazione, per rendere più lineare la risposta su tale matrice.

D'altronde, dalla disamina della letteratura si evidenzia anche la diversa valutazione del livello di cut-off da adottare. Negli studi in cui è stato adottato un cut-off di riferimento si riscontra, per le sostanze più studiate: cut-off pari a 150 ng/ml per benzoilecgonina (BE), 75 ng/ml per oppiacei (OPP), 25 ng/ml per amfetaminici (AMP), 40 ng/ml per cannabinoidi (THC) (1); cut-off pari a 150 ng/ml per BE, 50 ng/ml per OPP, 20 ng/ml per THC (3); cut-off pari a 350 ng/ml per OPP, 250 ng/ml per AMP, 80 ng/ml per THC (4); cut-off pari a 50 ng/ml per BE (7); cut-off pari a 50 ng/ml per OPP, 60 ng/ml per AMP, 10 ng/ml per THC (8). La diversità riscontrata è in parte legata a differenti metodi immunochimici di indagine, che variano dal RIA a varie versioni EMIT, in parte all'adozione dei cut-off già stabiliti per la stessa analisi su urine.

Nel nostro caso, in ambedue le prove, la risposta EMIT rispetto alla concentrazione di 150 mg/L ha dato sempre conferma positiva, mentre sotto i 75 mg/L i metodi alternativi non sempre confermano la presenza di benzoilecgonina.

Nello studio qui presentato si può quindi concludere che sono stati ottenuti risultati incoraggianti nell'adozione di una curva di calibrazione, sia quella realizzata su siero con valori maggiori, sia quella realizzata con i calibratori originale su punti più bassi, comunque inferiore alle concentrazioni riservate alla matrice urinaria. Dai risultati preliminari ottenuti risulta però che la curva costruita con calibratori risponde con maggiore precisione ai dosaggi, meglio discriminando sia il livello di 150 mg/L sia quello di 75 mg/L.

L'utilità di tale studio risulta tutta però nella reale possibilità di sottoporre a screening rapido campioni di sangue, sia esso cadaverico, e quindi sottoposto a pochi passaggi preliminari, sia esso proveniente da vivente, e quindi facilmente riducibile alla matrice sierica, con probabile minore perdita di analiti e maggiore rapidità di analisi.

## RINGRAZIAMENTI

Si ringrazia il Dott. Claudio Colombo di Dade-Behring Italia e tutto il Personale Tecnico del Servizio di Medicina Legale di Brescia (Sig.ra Michela Alberti, Sig.ra Cristina Imperadori, Sig.ra Luciana Palazzo, Sig.ra Lucia Salvi, Sig. Lorenzo Sanna), per la fattiva collaborazione nella realizzazione di questo studio.

## BIBLIOGRAFIA

1. Asselin WM, Leslie JM, and McKinley B. Direct detection of drugs of abuse in whole hemolyzed blood using the EMIT d.a.u. urine assays. *JAT* 1988; 12:207-215.
2. Lewellen LJ, and McCurdy HH. A novel procedure for the analysis of drugs in whole blood by homogeneous enzyme immunoassay (EMIT®). *JAT* 1988; 12:260-264.
3. Blum LM, Klinger RA, and Rieders F. Direct automated EMIT® d.a.u. analysis of N,N-Dimethylformamide-modified serum, plasma, and postmortem blood for benzodiazepines, benzoylecgonine, cannabinoids, and opiates. *JAT* 1989; 13:285-291.
4. Gjerde H, Christophersen AS, Skuterud B, Klemetsen K, and Mørland J. Screening for drugs in forensic blood samples using EMIT® urine assays. *For Sci Int* 1990; 44:179-185.
5. Asselin WM, and Leslie JM. Modification of Emit assay reagents for improved sensitivity and cost effectiveness in the analysis of hemolyzed whole blood.. *JAT* 1992; 16: 381-388.
6. Huang W, Moody DE, Andrenyak DM, and Rollins DE. Immunoassay detection of nordiazepam, triazolam, lorazepam, and alprazolam in blood. *JAT* 1993; 17: 365-369.
7. Poklis A, Jortani S, Edinboro LE, and Saady JJ. Direct determination of benzoylecgonine in serum by EMIT® d.a.u. Cocaine Metabolite immunoassay. *JAT* 1994; 18: 419-422.
8. Hino Y, Ojanperä I, Rasanen I, Vuori E. Performance of immunoassays in screening for opiates, cannabinoids and amphetamines in post-mortem blood. *For Sci Int* 2003; 131: 148-155.
9. Bernini M, Ricossa MC. Il controllo delle sostanze d'abuso nei conducenti di veicoli: esperienza dell'Istituto di Medicina Legale di Brescia. *Jura Medica* 2002; XV:171-180.