

## Article original

# Évaluation du dépistage de quatre classes de stupéfiants et des benzodiazépines dans le sang total laqué par l'analyseur Evidence Investigator®

Stanislas Grassin Delyle, Bertille Mathieu, Emuri Abe, Jean-Claude Alvarez\*

Laboratoire de Pharmacologie – Toxicologie, Centre Hospitalier Universitaire Raymond Poincaré, AP-HP,  
104 boulevard Raymond Poincaré, 92380 Garches, France

**Résumé – Introduction :** L'objectif de ce travail a été d'évaluer la détection semi-quantitative de 4 classes de stupéfiants (opiacés, cocaïne, cannabinoïdes et amphétamines) et des benzodiazépines dans du sang total laqué par l'analyseur Evidence Investigator®. 128 échantillons contenant au moins une molécule de ces familles, dosée par une technique de chromatographie couplée à la spectrométrie de masse, ont été analysés. **Résultats et discussion :** La spécificité de cette méthode a été de 79,0 % pour les amphétamines, 98,1 % pour les cannabinoïdes, et 100 % pour les opiacés, la cocaïne, et les benzodiazépines. La sensibilité a été de 33,3 % pour les amphétamines, 78,4 % pour les benzodiazépines, 93,2 % pour les cannabinoïdes, 93,5 % pour les opiacés et 95,2 % pour la cocaïne. 3,9 % de faux négatifs ont été relevés toutes classes confondues, dus notamment à des analytes présents en faible concentration ou mal reconnus par les anticorps. Les 4,0 % de faux positifs ont été majoritairement observés durant la détection des amphétamines, probablement en raison de la présence d'amines biogènes, comme cela a déjà été rapporté dans la littérature. Une amélioration a pu être apportée à cette technique, en ajoutant un lavage supplémentaire pendant la préparation des échantillons (meilleure qualité de l'image obtenue après lecture par la caméra). Une optimisation des valeurs des seuils de positivité est envisageable pour réduire la proportion de faux négatifs durant la détection des benzodiazépines et des cannabinoïdes. **Conclusion :** Cette méthode d'immunoanalyse permet une détection satisfaisante des opiacés, de la cocaïne, des cannabinoïdes et des benzodiazépines, l'identification formelle et la quantification devant cependant être effectuées par des techniques de référence (spectrométrie de masse), notamment en médico-légal.

**Mots clés :** Stupéfiants, benzodiazépines, sang total, biopuce, immunoanalyse

**Abstract – Evaluation of screening for drugs of abuse and benzodiazepines in forensic blood samples using Evidence Investigator™ analyser. Introduction:** Semi-quantitative detection of 4 classes of drugs of abuse (opiates, cocaine, cannabinoids and amphetamines) and benzodiazepines in haemolysed whole blood by Evidence Investigator® analyser has been evaluated in this study. 128 forensic blood samples known to be positive for at least one of these classes by chromatography coupled to mass spectrometric detection were analysed. **Results and discussion:** Specificity was 79.0% for amphetamines, 98.1% for cannabinoids, and 100% for opiates, cocaine, and benzodiazepines. Sensitivity was 33.3% for amphetamines, 78.4% for benzodiazepines, 93.2% for cannabinoids, 93.5% for opiates and 95.2% for cocaine. 3.9% of false negatives were observed all classes taken together, due to low concentrations of analytes or due to a bad recognition of some analytes by antibodies. The 4.0% of false positive results were predominantly observed during amphetamines detection, probably due to presence of biogen amines, as it has previously been reported. An improvement of the technique has been carried out by adding a supplementary wash step during sample preparation. An optimisation of cutoff levels is possible to reduce false negative results during benzodiazepines and cannabinoids detection. **Conclusion:** This immunoanalytical method enables an efficient detection of opiates, cocaine, cannabinoids and benzodiazepines in forensic blood samples. However a further confirmation and quantification by mass spectrometry techniques remains necessary.

**Key words:** Drugs of abuse, whole blood, biochip, immunoanalysis

Reçu le 22 novembre 2007, accepté après modifications le 18 février 2008  
Publication en ligne le 6 juin 2008

\* Correspondance : Jean-Claude Alvarez, Tél. + 33 1 47 10 79 20, Fax. + 33 1 47 10 79 23, [jean-claude.alvarez@rpc.aphp.fr](mailto:jean-claude.alvarez@rpc.aphp.fr)

## 1 Introduction

Parmi les substances les plus fréquemment recherchées en toxicologie figurent les stupéfiants (notamment opiacés, canabinoïdes, cocaïne, amphétamines ainsi que leurs métabolites) et les benzodiazépines. Ces analyses sont effectuées couramment en routine, dans un contexte médico-légal, pour les recherches de cause de décès, les accidents de la circulation routière, dans les cas de soumission chimique, mais également dans un contexte clinique. Différentes matrices peuvent être disponibles : le sang, les urines, le liquide gastrique et les cheveux sont les plus couramment employées. Il faut cependant noter que dans le cas des prélèvements effectués en *post-mortem*, les échantillons sanguins peuvent être laqués, rendant difficile les détections par immunoanalyse en raison de nombreuses interférences analytiques. La Société Française de Toxicologie Analytique a établi des consensus sur les techniques à employer pour l'identification et le dosage des stupéfiants cités précédemment. Pour ces examens, la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG-MS) a été définie comme technique de référence. En ce qui concerne l'identification et la quantification des benzodiazépines, la chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse (CL-MS/MS) figure parmi les techniques les plus performantes.

Préalablement à ces méthodes de chromatographie, plus longues en raison des étapes de traitement de l'échantillon et d'analyse des résultats, des techniques immunochimiques qualitatives ou semi-quantitatives peuvent être employées pour la détection de toutes ces substances. Elles sont caractérisées par un seuil de positivité (cutoff) pour chaque molécule ou classe de molécule. Dans la pratique, les seuils utilisés sont ceux qui ont été déterminés et reportés dans les directives du gouvernement fédéral américain par la Substance Abuse and Mental Health Services Administration (SAMHSA) [1]. Se pose cependant la question de la spécificité et de la sensibilité de ces techniques dans les différentes matrices, de nombreuses interférences dues à des substances endogènes ou exogènes pouvant en effet être observées [2–4]. Plusieurs kits permettant la détection de ces substances ont déjà été expérimentés et commercialisés, mais permettent généralement la détection d'une seule classe de molécule à la fois. Certains auteurs ont aussi adapté les techniques destinées à la détection des stupéfiants dans les urines afin de pouvoir les utiliser sur sang total, avec ou sans prétraitement des échantillons [5–12]. L'objectif de cette étude a été d'évaluer les résultats obtenus avec le kit proposé par Randox® pour le dépistage des stupéfiants et des benzodiazépines dans le sang total avec l'analyseur Evidence Investigator®. Une double détermination a donc été effectuée pour chaque échantillon, par la technique chromatographique de référence, et avec l'analyseur semi-automatique. Ce kit permet également la détection de la méthadone, des barbituriques et de la phencyclidine, mais l'évaluation de la détection de ces analytes n'a pas été réalisée dans ce travail.

## 2 Matériels et méthodes

### 2.1 Échantillons sanguins

Dans un premier temps, la technique de référence (chromatographie couplée à la spectrométrie de masse) a été employée

sur un grand nombre de prélèvements de sang total issus du travail de routine du laboratoire. Dans un deuxième temps, tous les échantillons positifs pour au moins l'un des composants recherchés ont été étudiés par technique immunologique sur l'analyseur. Au total, 128 échantillons de sang total provenant de patients vivants ou décédés ont donc été analysés avec chacune des deux techniques. Durant la période entre les deux analyses, les prélèvements ont été congelés et conservés à  $-20^{\circ}\text{C}$ . En cas de discordance entre les deux résultats, les échantillons ont été à nouveau analysés avec la technique de référence, pour écarter tout biais entraîné par une éventuelle dégradation *in vitro* des molécules.

### 2.2 Techniques de référence : chromatographie couplée à la spectrométrie de masse

Les opiacés et leurs métabolites (morphine, codéine, pholcodine, codéthyline, 6-acétylmorphine; formes libres et totales), la cocaïne et ses métabolites (benzoylecgonine, ecgonine méthylester, cocaéthylène, anhydroecgonine méthylester), le  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol (THC) et ses métabolites principaux (acide 11-nor- $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol-9-carboxylique (THC-COOH), 11-hydroxy-tetrahydrocannabinol), les amphétamines licites et illicites (amphétamine, métamphétamine, MDMA, MDA, MDEA, MBDB, BDB, PMA, phenylpropanolamine, éphédrine, pseudoéphédrine, méthylphénidate) ont été identifiés et quantifiés par chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (détecteur de type DSQ, ThermoFisher, Les Ulis, France), selon des techniques décrites précédemment [13–15], la quantification étant réalisée grâce aux étalons internes deutérés correspondants. Toutes les benzodiazépines commercialisées en France à ce jour, ainsi que leurs principaux métabolites (soit 26 molécules) et les apparentés aux benzodiazépines (zolpidem, zopiclone) ont été détectés et quantifiés par chromatographie liquide couplée à un spectromètre de masse de type trappe d'ions (chaîne chromatographique Surveyor et détecteur Deca XP Plus, ThermoFisher, Les Ulis, France), selon une technique validée au laboratoire.

Pour l'ensemble de ces techniques, un ion a été utilisé pour la quantification de chaque molécule, et deux ions comme ions de confirmation.

### 2.3 Immunoanalyse sur l'Evidence Investigator®

#### 2.3.1 Principe de la technique

L'Evidence Investigator® (Randox®, Montpellier, France) utilise un support solide de type « biopuce » (biochip), permettant l'analyse en multiplex et en simultané de 9 échantillons. Dans le kit utilisé pour cette étude (*Drugs of abuse blood quantitative assay panel*, Randox®), 10 anticorps ont été déposés sous forme de « spot » à la surface de la biopuce (tableau I). Le principe général de la méthode est un *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay* (ELISA) par compétition, la détection se faisant par chimioluminescence grâce à une caméra de type

**Tableau I.** Anticorps présents sur la biopuce et valeurs des seuils de positivité (*cutoff*).

Analyte	Anticorps	Cutoff (ng/mL)
Amphetamine	d-Amphetamine	25
Metamphetamine	(+) Metamphetamine	50
Barbituriques	Phenobarbital	50
Benzodiazepines 1	Oxazepam	50
Benzodiazepines 2	Lorazepam	50
Cannabinoïdes	THC-COOH	10
Cocaïne	Benzoylécgonine	50
Methadone	Methadone	25
Opiacés	Morphine	25
Phencyclidine	Phencyclidine	5

CCD (charge-coupled device) [16]. Pour chaque classe de molécule, le fabricant a indiqué les pourcentages de réactivité croisée des analytes de la même famille avec l'anticorps correspondant (tableaux II et III), ainsi que les résultats des tests d'interférences entre chaque classe.

Pour une classe donnée (amphétamines, opiacés, cannabinoïdes, cocaïne ou benzodiazépines), le fabricant indique qu'aucune interférence n'a été observée avec les principaux représentants des autres classes à des concentrations comprises entre 100 et 500  $\mu\text{g/mL}$  (excepté pour le 11-nor- $\Delta^9$ -THC-COOH testé à la concentration de 10  $\mu\text{g/mL}$ ).

### 2.3.2 Préparation des échantillons

Les échantillons sont dilués au quart dans le diluant du kit (tampon phosphate pH 7,2 + conservateurs), puis 60  $\mu\text{L}$  sont déposés dans le puits contenant la biopuce avec 120  $\mu\text{L}$  de diluant. Après addition de 120  $\mu\text{L}$  de conjugué (analytes marqués à la peroxydase) et incubation 30 minutes à 33 °C sur un agitateur programmable (330 rpm), les puits sont lavés 5 fois rapidement puis 5 fois 2 minutes. 250  $\mu\text{L}$  de révélateur (luminol + peroxyde v/v) sont ajoutés à chaque puits pendant 2 minutes, puis le portoir contenant les biopuces est inséré dans l'Evidence Investigator® pour effectuer la lecture du signal.

Avec chaque lot de biopuce, une courbe de calibration de neuf points a été réalisée, et 2 niveaux de contrôles de qualité ont été passés avec chaque série d'échantillons.

## 2.4 Interprétation des résultats

Chaque valeur donnée par l'automate a été relevée et interprétée par rapport au seuil de positivité, et le résultat a été converti en « dépistage positif » ou « dépistage négatif ». De même avec les techniques chromatographiques : dès lors que le résultat était supérieur à la limite de détection de la molécule, le dépistage a été considéré comme positif et la quantification a été réalisée. Dans un deuxième temps, une analyse des valeurs des seuils de positivité de la technique d'immunanalyse a été conduite afin de déterminer si elles pouvaient être optimisées pour augmenter les performances de la méthode.

Deux critères d'évaluation ont été calculés pour chaque classe de molécules : la sensibilité (représentant le pourcentage de vrais positifs), définie comme le rapport exprimé en pourcentage du nombre de dépistages positifs à la fois en chromatographie et avec l'automate sur le nombre total de dépistages positifs en chromatographie, et la spécificité (représentant le pourcentage de vrais négatifs), définie comme le rapport exprimé en pourcentage du nombre de dépistages négatifs à la fois en chromatographie et avec l'automate sur le nombre total de dépistages négatifs en chromatographie.

## 3 Résultats

Sur les 128 échantillons analysés en chromatographie / spectrométrie de masse, 31 ont été positifs en opiacés, 21 en cocaïne ou dérivés, 74 en THC-COOH, 9 en amphétamines, et 51 en benzodiazépines. L'Evidence Investigator® a permis au sein de ces échantillons la détection de 29 positifs en opiacés, 20 en cocaïne ou dérivés, 69 en THC-COOH, 3 en amphétamines et 40 en benzodiazépines (tableau IV). On notera la présence simultanée de benzodiazépines et / ou de plusieurs familles de stupéfiants dans 27 prélèvements.

Au total, 51 résultats discordants (sur un total de 640 résultats, soit 7,9 %) ont été observés avec la détection par l'Evidence Investigator® par rapport aux méthodes chromatographiques : 25 faux négatifs et 26 faux positifs. Les faux négatifs (2 pour les opiacés, 1 pour la benzoylécgonine, 5 pour le THC-COOH, 6 pour les amphétamines et 11 pour les benzodiazépines) s'expliquent tous par une valeur du signal mesuré par l'automate inférieure au cutoff fixé pour la méthode en raison de faibles concentrations d'analyte, ou par la présence de molécules n'étant peu ou pas reconnues par les anticorps du kit (éphédrine, pseudoéphédrine, MDMA, bromazepam et tétrazepam notamment). Les amphétamines licites (éphédrine et pseudoéphédrine) représentent cinq cas sur six de faux négatifs dans la détection des amphétamines et n'entraînent donc pas de réaction positive. Pour les benzodiazépines, les signaux correspondants aux faux négatifs sur l'Evidence Investigator® ont été compris entre 0 et 39,9 ng/mL tandis que tous les vrais négatifs n'ont pas dépassé 5,7 ng/mL. En ce qui concerne la détection des cannabinoïdes, les 5 faux négatifs ont donné un signal compris entre 4 et 9,4 ng/mL pour un cutoff à 10 ng/mL, alors que tous les signaux correspondants aux vrais négatifs se sont avérés inférieurs à 6,6 ng/mL.

Les faux positifs ont quant à eux essentiellement été observés avec la technique de détection des amphétamines (25 cas sur 26). Parmi ces 25 faux positifs, 22 prélèvements étaient issus de patients décédés, tous positifs avec l'anticorps dirigé contre l'amphétamine. Les valeurs observées se sont étendues de 192 ng/mL à plus de 636 ng/mL (dernier point de la gamme de calibration), dont 15 prélèvements sur 22 supérieurs à ce dernier point. Onze de ces 22 prélèvements ont été positifs avec l'anticorps dirigé contre la métamphétamine, les valeurs s'étendant dans ce cas de 52 à 1568 ng/mL. Trois prélèvements étaient issus de patients vivants (signaux obtenus supérieurs au seuil de positivité (50 ng/mL) uniquement avec l'anticorps dirigé contre la métamphétamine, à des concentrations de 54, 79 et 94 ng/mL). Le dernier faux positif a concerné les cannabinoïdes (valeur du signal = 10,04 ng/mL pour un seuil de

**Tableau II.** Réactions croisées avec les anticorps des différentes classes de stupéfiants (données fabricant).

Famille	Molécule	Pourcentage de réaction croisées avec l'anticorps				
		Amphé- tamine	Metamphé- tamine	Benzoyl- ecgonine	Morphine	Ac. 11-nor- $\Delta^9$ -THC-9- carboxylique
AMPHÉTAMINES	d-Amphétamine	100	0.7			
	(+) Metamphétamine	< 0.2	100			
	dl-Amphétamine	55	0.4			
	MDA	544	0.5			
	MDMA	0.4	36			
	MDEA	< 0.2	6.1			
	BDB	189	< 11			
	MBDB	120	89			
	Fenflurmine	< 0.2	19			
	Phentermine	32	< 0.2			
COCAÏNE	Benzoylécgonine			100		
	Cocaïne			6.4		
	Cocaéthylène			4.1		
	Ecgonine			< 0.06		
	Ecgonine Méthylester			< 3.0		
OPIACÉS	Morphine				100	
	6-MAM				1500	
	Codéine				115	
	Morphine-3-Glucuronide				67	
	Hydromorphone				27	
	Hydrocodone				17	
	Dihydrocodéine				13	
CANNABINOÏDES	Acide 11-nor- $\Delta^9$ -THC-9- carboxylique					100
	Acide 11-nor- $\Delta^8$ -THC-9- carboxylique					49
	11-hydroxy- $\Delta^9$ -THC					3
	11-hydroxy- $\Delta^8$ -THC					< 5
	Cannabinol					< 0.5
	Cannabidiol					< 0.5

positivité à 10,0 ng/mL), et aucun n'a été détecté avec les techniques des opiacés, de la cocaïne, ou des benzodiazépines (tableau V).

La spécificité de la détection par l'Evidence Investigator® s'est avérée excellente pour les opiacés, la cocaïne, les cannabinoïdes et les benzodiazépines (100 % ; 100 %, 98,1 % et 100 % respectivement), et est demeurée convenable pour les amphétamines (79,0 %). Il en est de même pour la sensibilité, excellente pour les opiacés, la cocaïne et les cannabinoïdes (93,5 %, 95,2 % et 93,2 %), correcte pour les benzodiazépines (78,4 %) ; mais en revanche très insuffisante pour les amphétamines (33,3 %) (tableau IV).

## 4 Discussion

La détection de l'ensemble de ces classes de psychotropes sur une matrice très complexe, à savoir le sang total laqué, a donné des résultats satisfaisants, excepté pour les amphétamines. Le mode opératoire et l'interprétation des données sont simples, mais quelques modifications du protocole de traitement de l'échantillon ou de l'interprétation des résultats ont cependant permis une optimisation de la technique. En effet, en suivant à la lettre les recommandations du fabricant (seulement 4 lavages), des images « blanches » correspondant à un bruit de fond excessif et rendant inexploitable les résultats

**Tableau III.** Réactions croisées avec les anticorps des benzodiazépines (données fabriquant).

Molécule	Pourcentage de réactions croisées avec l'anticorps	
	Benzodiazépines 1	Benzodiazépines 2
Oxazepam	100	2
Lorazepam	6.7	100
7-Aminoclonazepam	0.3	5.5
7-Aminonitrazepam	3.4	0.1
$\alpha$ -OH-Alprazolam	952.4	< 0.1
2-OH-Ethylflurazepam	25.6	0.2
4-OH-Nordiazepam	4.2	< 0.1
Alprazolam	1818.2	< 0.1
Bromazepam	47.7	3.7
Chlordiazepoxide	99.5	< 0.1
Clobazam	416.7	< 0.1
Clonazepam	8.4	68.7
Desalkylflunitrazepam	29.5	29.9
Diazepam	512.8	< 0.1
Estazolam	1538.5	< 0.1
Flunitrazepam	119.8	< 0.1
Flurazepam	181.8	< 0.1
Lormetazepam	47.5	< 0.1
Lorazepam glucuronide	< 0.1	23.9
Midazolam	227.3	< 0.1
Nitrazepam	241	1.2
Nordiazepam	250	2
Oxazepam glucuronide	7.3	2.9
Prazepam	277.8	< 0.1
Temazepam	444.4	< 0.1
Temazepam glucuronide	3.0	< 0.1
Triazolam	37.5	0.5

étaient parfois obtenues (figure 1A). L'ajout au protocole d'un lavage supplémentaire, soit 5 lavages au total, a permis de remédier à ce problème et d'obtenir des images interprétables (figure 1B).

Les faux résultats positifs observés durant la détection des amphétamines semblent être liés aux amines de putréfaction (analogues structuraux des amphétamines, ex. : putrescine, cadavérine) provenant de la décomposition des cadavres ou apparaissant *in vitro*, puisque 22 des 25 prélèvements faux positifs provenaient de patients décédés. Aucune corrélation n'a cependant pu être établie entre le stade de putréfaction (estimation qualitative effectuée par le médecin légiste au moment de l'autopsie) et les résultats de la détection des amphétamines. Le même type d'interférence pourrait être suspecté dans les 3 prélèvements faux positifs de patients vivants, puisque les amines biogènes (dopamine, adrénaline, histamine...) interfèrent également avec la détection des amphétamines. Ces in-

terférences sont cohérentes avec ce qui a précédemment été rapporté dans la littérature concernant la détection de cette classe de psychotropes [6, 7, 17]. En ce qui concerne le faux positif observé dans la détection des cannabinoïdes, de la benzoyllecgonine à la concentration de 648 ng/mL a également été retrouvée. Cependant, d'après le fabriquant, la benzoyllecgonine n'interfère pas avec la détection des cannabinoïdes jusqu'à une concentration de 100  $\mu$ g/mL. Une recherche d'éventuelles substances interférentes a donc été effectuée par screening (chromatographie liquide avec détection par barrette de diodes et CG-MS), mais n'a pas permis de mettre en évidence la présence d'autres composés exogènes pouvant être incriminés.

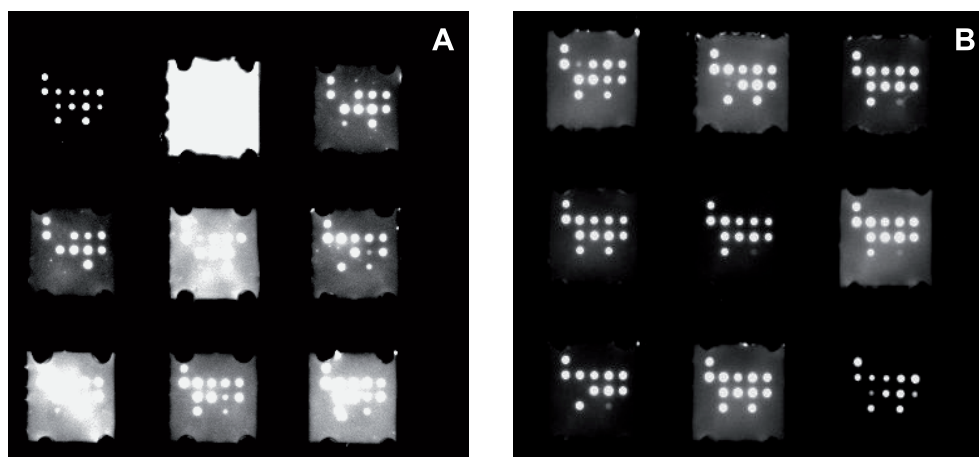
Deux prélèvements dont l'analyse chromatographique avait révélé la présence de zolpidem et de zopiclone ont été analysés sur l'Evidence Investigator<sup>®</sup>. Conformément à ce qui était attendu, la détection spécifique des benzodiazépines a été négative, puisque ces anticorps ne présentent aucune réactivité croisée avec les apparentés aux benzodiazépines.

Les spécificités et sensibilités retrouvées dans cette étude pour les opiacés, la cocaïne et les cannabinoïdes semblent meilleures que les précédentes données de la littérature rapportant l'adaptation des tests de dépistage urinaire Abbott<sup>®</sup> ADx, Microgenics<sup>®</sup> CEDIA DAU, MAHSAN<sup>®</sup> MTP, Biorad<sup>®</sup> PYXIS 24, EMIT et Triage 8 pour utilisation avec le sang total [11, 18]. La détection des benzodiazépines sur l'Evidence Investigator<sup>®</sup> est sensiblement équivalente à celle obtenue avec les 4 kits Abbott<sup>®</sup> ADx, Microgenics<sup>®</sup> CEDIA DAU, MAHSAN<sup>®</sup> MTP, Biorad<sup>®</sup> PYXIS 24, alors que les amphétamines semblent mieux détectées par ces 4 mêmes kits [18].

Le deuxième objectif de ce travail était d'évaluer si les valeurs des seuils de positivité pouvaient être optimisées. Pour la détection des opiacés et de la cocaïne, aucun ajustement n'a paru nécessaire ni envisageable puisque sensibilité et spécificité sont dors et déjà supérieures à 93 %. De même, aucune modification du seuil de positivité des amphétamines ne semble pouvoir être possible : l'intérêt aurait en effet été de diminuer la proportion de faux positifs, mais toutes les valeurs de signal observées avec les faux résultats positifs dans les prélèvements de patients décédés sont très élevées, largement supérieures au seuil ainsi qu'aux valeurs des vrais positifs. En revanche, dans la détection des benzodiazépines et des cannabinoïdes, un ajustement du seuil de positivité pourrait être bénéfique. En fixant ce seuil à 10 ng/mL plutôt qu'à 50 ng/mL pour les benzodiazépines, nous aurions observé dans cette étude uniquement 3 résultats détectés négatifs à tort par l'Evidence Investigator<sup>®</sup> au lieu de 11, sans entraîner de résultat faussement positifs. Avec ces critères, la sensibilité de la méthode passerait de 78,4 % à 94,1 %. De la même manière, en fixant le seuil de positivité des cannabinoïdes à 8 ng/mL, le nombre de faux négatifs passerait de 5 à 2 sans changer le nombre de faux positifs. En effet, tous les résultats des prélèvements réellement négatifs dans cette étude se sont avérés inférieurs à 6,6 ng/mL, alors que les faux négatifs (quantification du THC-COOH par chromatographie : 2 à 8 ng/mL) ont donné des résultats compris entre 4 et 9,4 ng/mL. Avec un seuil à 8 ng/mL, la sensibilité augmenterait à 97,3 % versus 93,2 % avec un seuil à 10 ng/mL.

**Tableau IV.** Comparaison des résultats obtenus par la méthode de référence et par l'Evidence Investigator®. Les nombres d'échantillons positifs et négatifs sont exprimés en valeurs absolues et en pourcentage au sein de la famille d'analytes. La sensibilité et la spécificité de la technique d'immunoanalyse sont également indiquées.

		Evidence Investigator®				
		+	-	Sensibilité	Spécificité	
Chromatographi couplée à la spectrométrie de masse	Opiacé	+	29 (22 %)	2 (2 %)	93,5 %	100 %
		-	0 (0 %)	97 (76 %)		
	Cocaïne	+	20 (16 %)	1 (1 %)	95,2 %	100 %
		-	0 (0 %)	107 (83 %)		
	Cannabinoïdes	+	69 (53 %)	5 (4 %)	93,2 %	98,1 %
		-	1 (1 %)	53 (41 %)		
	Amphétamines	+	3 (2 %)	6 (5 %)	33,3 %	79,0 %
		-	25 (20 %)	94 (73 %)		
	Benzodiazépines	+	40 (31 %)	11 (9 %)	78,4 %	100 %
		-	0 (0 %)	77 (60 %)		



**Fig. 1.** Exemples d'images obtenues par la caméra CCD après lecture d'un portoir de 9 biopuces. En A, le résultat obtenu après traitement des échantillons selon les recommandations du fabricant (4 lavages). On note la présence d'images « blanches » pour certaines biopuces, correspondant à une saturation du signal. En B, le résultat obtenu après l'ajout d'un lavage supplémentaire.

Ces propositions de modification du seuil de positivité mériteraient cependant d'être confirmées sur un plus grand nombre d'échantillons.

### 5 Conclusion

La technique de dépistage semi-automatique des 4 classes de stupéfiants et des benzodiazépines par l'analyseur Evidence Investigator® permet une analyse semi-quantitative sur sang total laqué performante pour les opiacés, la cocaïne, les cannabinoïdes et les benzodiazépines. Cependant, de la même manière que pour les techniques précédemment décrites, les résultats obtenus pour les amphétamines laissent à désirer, de

nombreux faux positifs ayant été détectés dans les prélèvements de patients décédés. Il faut cependant souligner que le sang total laqué est une des matrices les plus complexes, et que les performances de cette méthode de détection seraient certainement meilleures pour les applications en toxicologie hospitalière sur des matrices plasmatiques. Le traitement des échantillons est simple et la durée de l'ensemble des opérations permet de rendre des résultats dans un délai de quelques heures. Un des principaux avantages de cette technique est aussi la détection simultanée de plusieurs classes de stupéfiants ou de médicaments à partir d'un faible volume d'échantillon (min. 15 µL). En revanche, ce test n'a qu'une valeur d'orientation et une confirmation par chromatographie couplée à la

**Tableau V.** Analyse des résultats discordants.

	N ° Patient	Discordance	Chromatographie	Signal Evidence (ng/mL)	Interprétation
Opiacés	1	Faux négatif	Pholcodine 4 ng/mL	4	Valeur inférieure au cutoff (25)
	2	Faux négatif	Morphine 7 ng/mL	0,2	Valeur inférieure au cutoff (25) - CR = 100 %
Cocaïne	3	Faux négatif	Benzoylécgonine 20 ng/mL	27	Valeur inférieure au cutoff (50) - CR = 100 %
Cannabinoïdes	4 à 8	Faux négatifs	THC-COOH 1,9 à 8,0 ng/mL	4 à 9,4	Valeur inférieure au cutoff (10) - CR = 100 %
	9	Faux positif	Absence	10	Signal juste à la valeur du cutoff
Amphétamines	10 à 14	Faux négatifs	Ephédrine ou Pseudoéphédrine 8 à 330 ng/mL	0 à 5	CR Ephédrine et Pseudoéphédrine = 0 %
	15	Faux négatif	MDMA 92 ng/mL	44	Valeur inférieure au cutoff (50) - CR MDMA = 42,5 %
	16 à 18	Faux positifs	Absence	30 à 94	Amines biogènes chez patients vivants ?
	19 à 40	Faux positifs	Absence	> 192	Amines de putréfaction chez patients décédés ?
Benzodiazépines	41 à 48	Faux négatifs	Bromazepam 3 à 190 ng/mL	0 à 29	Valeur inférieure au cutoff (50) - CR Bromazepam = 22 %
	49	Faux négatif	Bromazepam 90 ng/mL + Nitrazepam 4 ng/mL	25	Valeur inférieure au cutoff (50) CR Bromazepam = 22 % - CR Nitrazepam = 241 %
	50	Faux négatif	7-aminoclonazepam 30 ng/mL	39,9	Valeur inférieure au cutoff (50) - CR 7-aminoclonazepam = 5 %
	51	Faux négatif	Tetrazepam 20 ng/mL	0	CR Tetrazepam = 0 %

CR = Cross Reactivity

spectrométrie de masse demeure indispensable pour une identification formelle et une quantification précise.

## Références

- Mandatory Guidelines for Federal Workplace Drug Testing Programs, Federal Register. 2004. Consulté sur le site <http://www.workplace.samhsa.gov/DrugTesting> le 27 septembre 2007.
- Baden LR, Horowitz G, Jacoby H, Eliopoulos GM. Quinolones and false-positive urine screening for opiates by immunoassay technology. *JAMA*. 2001; 286(24): 3115-3119.
- Melanson SE, Lee-Lewandrowski E, Griggs DA, Long WH, Flood JG. Reduced interference by phenothiazines in amphetamine drug of abuse immunoassays. *Arch Pathol Lab Med*. 2006; 130(12): 1834-1838.
- Dasgupta A, Wells A, Datta P. False-positive serum tricyclic antidepressant concentrations using fluorescence polarization immunoassay due to the presence of hydroxyzine and cetirizine. *Ther Drug Monit*. 2007; 29(1): 134-139.
- Iwersen-Bergmann S, Schmoldt 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.
- Gjerde H, Christophersen AS, Skuterud B, Klemetsen K, Morland J. Screening for drugs in forensic blood samples using EMIT urine assays. *Forensic Sci Int*. 1990; 44(2-3): 179-185.
- 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.
- 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.
- 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.
- Asselin WM, Leslie JM. Modification of Emit assay reagents for improved sensitivity and cost effectiveness in the analysis of hemolyzed whole blood. *J Anal Toxicol*. 1992; 16(6): 381-388.
- Hino Y, Ojanpera 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.
- 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.
- Gaillard Y, Pépin G, Marquet P, Kintz P, Deveaux M, Mura P. Identification et dosage de la benzoylécgonine, cocaïne, méthylécgonine-ester, codéine, morphine et 6-acétylmorphine dans le sang total. *Toxicorama*. 1996; 8(2): 17-22.
- Kintz P, Cirimele V, Pépin G, Marquet P, Deveaux M, Mura P. Identification et dosage des cannabinoides dans le sang total. *Toxicorama*. 1996; 8(2): 29-33.
- Marquet P, Lachâtre G, Kintz P, Pépin G, Deveaux M, Mura P. Identification et dosage des principales drogues amphétaminiques dans le sang total par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG-SM). *Toxicorama*. 1996; 8(2): 23-28.
- Fitzgerald SP, Lamont JV, McConnell RI, Benchikh el O. Development of a high-throughput automated analyzer using biochip array technology. *Clin Chem*. 2005; 51(7): 1165-1176.
- Eichorst J. beta-Phenethylamine causes false positive amphetamines in post mortem specimens when tested by SYVA EMIT. *Forensic Sci Int*. 1991; 50(1): 139-40.
- 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.