

Article original

Utilisation en routine des tests ELISA One-Step™ (International Diagnostic Systems Corp.) pour le dépistage des xénobiotiques dans les cheveux : bilan de 2 ans d'activité

ELISA One-Step™ (International Diagnostic Systems Corp.) for the detection of xenobiotics in human hair: appraisal after 2 years of activity

Vincent Cirimele*, Ariane Mandel, Marion Villain, Pascal Kintz

Laboratoire ChemTox, 3 rue Grüninger, 67400 Illkirch, France

Résumé – Les techniques de dépistage (EMIT, CEDIA, FPIA, etc.) dédiées aux matrices biologiques classiques, urine, sérum, plasma, sont très largement utilisées dans les laboratoires médicaux (LABM) et hospitaliers pour leur simplicité et rapidité d'exécution et pour leur faible coût analytique. Malheureusement, elles s'avèrent inadaptées sur des échantillons dits « difficiles », comme le sang total hémolysé ou laqué, le lavage gastrique, les fluides biologiques *post mortem* (sang putréfié, liquide biliaire) malgré les traitements préalables apportés comme la dilution, la déprotéinisation ou la purification de l'échantillon. De plus, ces techniques ne peuvent en aucun cas répondre aux demandes de dépistage des xénobiotiques dans les matrices dites alternatives comme les phanères ou les ongles, de par leurs faibles performances en terme de sensibilité et de spécificité. Récemment, l'apparition des nouveaux tests ELISA One-Step™ d'International Diagnostic Systems Corp. (IDS, Cleveland) sur le marché français a permis d'apporter une solution en terme de dépistage de xénobiotiques dans les matrices non conventionnelles (salive, cheveux). Cette technique utilisée en routine au laboratoire ChemTox pour la détection des xénobiotiques dans les cheveux fait appel à une décontamination des phanères, suivie d'un broyage fin de l'échantillon à analyser et de son incubation dans du méthanol. Après évaporation du solvant et reconstitution dans un tampon adapté, le test est conduit selon les recommandations du fabricant (comme pour le sang ou les urines). La réalisation de près de 6500 tests sur cheveux au cours de ces deux dernières années a permis de dresser un bilan plus que positif de l'utilisation au quotidien des tests ELISA One-Step™ d'IDS Corp. dans un laboratoire de toxicologie. L'intérêt en terme de gain de temps, de productivité et d'économie est très favorable.

Mots clés : Stupéfiants, médicaments, ELISA, cheveux, GC/MS

Abstract – Screening techniques (EMIT, CEDIA, FPIA, etc.) dedicated to classical biological specimens like urine, serum, plasma are widely used in clinical laboratories because they are simple, fast to perform and cheap. Unfortunately, they cannot be used with other specimens like hemolysed whole blood, gastric content or *post mortem* fluids (putrified blood, bile) even if the specimens have been diluted or purified by deproteinisation or extraction. Furthermore, these techniques can't be used for the screening in alternative matrices such as hair or nails, due to a lack of sensitivity and specificity. Recently, the new One-Step™ ELISA test from International Diagnostic Systems Corp. (IDS, Cleveland) has come up on the French market and allows to screen for xenobiotics in uncommon specimens like saliva and hair. This technique, daily used by ChemTox to screen xenobiotics in hair, requires hair decontamination, followed by a thin grinding of the specimen and its incubation in methanol. After evaporation of the solvent, appropriate buffer is added to the dry extract and the ELISA is performed following IDS procedure (same as for blood and urine). Over the past two years, ChemTox has performed about 6500 ELISA tests on hair and the results are more than positive, as far as for saving time and money.

Key words: Drugs of abuse, pharmaceuticals, ELISA, hair, GC/MS

Reçu le 28 novembre 2008, accepté après modifications le 4 mars 2009

Publication en ligne le 16 avril 2009

* Correspondance : Dr. Vincent Cirimele, Tél. 03 90 400 540, Fax. 03 90 400 541, vcirimele@labochemtox.com

1 Introduction

L'analyse des cheveux complète utilement les analyses plus classiques de sang et d'urine en élargissant la fenêtre de détection d'éventuelles expositions aux xénobiotiques. En effet, contrairement au sang où la durée de détection d'un xénobiotique s'exprime en heures ou aux urines où elle s'exprime au maximum en jours, elle est dans les cheveux de plusieurs mois voire de plusieurs années en fonction de la longueur de la mèche de cheveux analysée. Les cheveux en croissance qui incorporent ainsi les substances présentes dans le sang et la sueur peuvent représenter le calendrier rétrospectif de la consommation d'un xénobiotique. En effet les cheveux poussant d'un centimètre par mois, leur analyse centimètre par centimètre, de la racine (consommation la plus récente) vers la pointe (consommation la plus ancienne) permet de suivre l'évolution (diminution, augmentation, prise unique) de la consommation mois après mois [1]. En plus, en raison de la facilité du recueil du prélèvement, de son caractère absolument non invasif et sans danger, les applications débordent du champ purement judiciaire et s'imposent dans un nombre croissant de disciplines (toxicologie clinique, médecine du travail, dopage...). L'analyse des cheveux est donc une méthode d'investigation complémentaire à celles réalisées sur le sang ou les urines.

Depuis 1986 et l'Executive Order du Président américain Reagan, la lutte contre la toxicomanie s'est intensifiée, tant dans le monde du travail que dans le monde du sport et sur la route. En France, malheureusement, la prise de conscience collective des ravages des stupéfiants n'est que très récente. Pour les autorités, il devient nécessaire de pallier le plus rapidement possible à cette hausse. Aussi, il est impératif de trouver de nouveaux moyens de dépistage des substances illicites ou contrôlées, à des concentrations de plus en plus faibles, afin de réaliser des contrôles de grande envergure.

Suite à deux études préliminaires sur l'applicabilité des tests ELISA au dépistage de la buprénorphine [2] et des stupéfiants [3] dans les cheveux, ces mêmes auteurs présentent un bilan de 2 années d'utilisation du test One-Step™ ELISA d'International Diagnostic System Corporation pour le dépistage de produits illicites ou contrôlés dans les cheveux.

2 Matériels et méthodes

2.1 Échantillons

Près de 6500 tests ont été effectués avec le kit One-Step™ ELISA d'International Diagnostic System Corporation pour le dépistage de produits illicites (opiacés, cocaïne, amphétamine, métamphétamine, cannabis) ou de produits contrôlés (méthadone essentiellement). Chaque test correspond soit à l'analyse d'une mèche soit à des segments. Les contrôles étaient préparés à partir de prélèvements témoin négatifs prélevés sur le personnel du laboratoire.

2.2 Dépistage immuno-enzymatique

Les kits ELISA *One-Step*™ utilisés pour le dépistage des stupéfiants (kit Cannabis, kit opiacés, kit cocaïne, kit métamphétamine, kit amphétamine et kit méthadone) ont été obtenus

auprès de International Diagnostic Systems Corp. Le lavage des puits est effectué par un laveur automatique de microplaques PW 40 et la lecture est réalisée au moyen d'un spectrophotomètre PR 3100. Tous deux ont été achetés chez Bio-Rad (Marnes-la-Coquette, France).

Le test ELISA One-Step d'IDS est un dosage immunologique en phase solide conçu pour détecter la présence de stupéfiants dans les fluides biologiques (urine, sang, sueur), mais le protocole adopté pour les cheveux est celui précédemment publié [3] avec quelques modifications.

Chaque échantillon de cheveux est tout d'abord décontaminé par 2 bains successifs de dichlorométhane (2 mL, 2 minutes) puis découpés en petits segments de 1 mm de longueur. Après homogénéisation, 50 mg d'échantillon sont incubés dans 1 mL de méthanol, 16 h à 40 °C ou 2 h au bain ultra-sons. Une fraction de méthanol suffisante au dépistage (20 µL par test) est prélevée après centrifugation (15 minutes/3000 rpm) et évaporée à sec. Le résidu est repris le mélange « diluant échantillons et standards » fourni dans le kit et 20 µL sont déposés dans un puits dont le fond est recouvert d'anticorps à forte affinité pour le stupéfiant ciblé. Les étapes suivantes suivent les recommandations du fabricant. Après addition du conjugué enzymatique et incubation (30 minutes à température ambiante), les puits sont lavés 3 fois pour éliminer toute substance non liée avant l'étape finale de révélation par le substrat. L'intensité de coloration, mesurée avec un lecteur de microplaques à 650 nm, est inversement proportionnelle à la quantité de stupéfiants présente dans l'échantillon.

Selon les recommandations d'IDS, le test ELISA One-Step n'est valide que si les puits contenant le contrôle négatif se sont colorés en jaune vif (absorbance > 1,5). Tout échantillon est suspecté positif si la valeur de son absorbance est inférieure ou égale à celle d'un contrôle positif (fixé au seuil de positivité, c'est-à-dire 0,5 ng/mg pour la cocaïne ; 0,2 ng/mg pour la morphine, l'amphétamine et le THC), et un échantillon est présumé négatif si sa valeur d'absorbance est supérieure à ce même seuil.

2.3 Confirmation des stupéfiants par GC-MS

La fraction méthanolique de l'échantillon, testée précédemment en ELISA, est utilisée comme point de départ pour la confirmation. Après une phase d'évaporation du solvant, les protocoles de dosage des stupéfiants [3-6] dans les cheveux peuvent être appliqués en débutant directement à partir des étapes de purification par extraction liquide-liquide.

Les analyses sont réalisées sur un chromatographe en phase gazeuse Agilent 6890N Network GC System couplé à un spectromètre de masse quadripolaire Agilent 5973 *inert* à ionisation par impact électronique (70 eV). Ces techniques sont validées selon le référentiel ISO NF 17025.

2.4 Confirmation de la méthadone par HPLC-MSMS

Cinquante µL de la fraction méthanolique ayant servi au dépistage sont directement injectés en HPLC-MSMS sans étape préalable de purification.

Tableau I. Résultats comparés pour le dépistage *versus* GC/MS avec calcul de la sensibilité et de la spécificité du kit ELISA pour le cannabis.

		GC/MS	
		Positif	Négatif
ELISA	Positif	380	132
	Négatif	16	616

Sensibilité : 96,0 %
Spécificité : 82,4 %

Tableau II. Résultats comparés pour le dépistage *versus* GC/MS avec calcul de la sensibilité et de la spécificité du kit ELISA pour la cocaïne.

		GC/MS	
		Positif	Négatif
ELISA	Positif	312	20
	Négatif	4	928

Sensibilité : 98,7 %
Spécificité : 97,9 %

Tableau III. Résultats comparés pour le dépistage *versus* GC/MS avec calcul de la sensibilité et de la spécificité du kit ELISA pour les opiacés.

		GC/MS	
		Positif	Négatif
ELISA	Positif	152	60
	Négatif	8	852

Sensibilité : 97,4 %
Spécificité : 97,7 %

Le système Waters utilisé est composé d'une chaîne Alliance 2695 et d'un détecteur Quattro Micro équipé d'une sonde *Electrospray* fonctionnant en mode positif.

2.5 Validation du test ELISA en terme de sensibilité et de spécificité

Les échantillons ont été testés en ELISA pour être ensuite confirmés par technique chromatographique (GC-MS ou HPLC-MSMS). Ainsi, les vrais positifs (VP), les vrais négatifs (VN), les faux positifs (FP) et les faux négatifs (FN) (tableaux I à VI) ont pu être définis pour déterminer les paramètres suivants :

$$\text{Sensibilité} = (VP \times 100) / (VP + FN)$$

$$\text{Spécificité} = (VN \times 100) / (VN + FP)$$

Les seuils de positivité utilisés sont ceux retenus par la SoHT [7] (THC : 0,1 ng/mg, amphétamines et opiacés : 0,2 ng/mg, cocaïne : 0,5 ng/mg, benzoylecgonine et cocaéthylène : 0,05 ng/mg). Pour la méthadone, le seuil était fixé à 0,2 ng/mg.

3 Résultats

Pour les 6376 tests réalisés sur cheveux réels, les tableaux I à VI résument pour chaque stupéfiant la concordance des ré-

Tableau IV. Résultats comparés pour le dépistage *versus* GC/MS avec calcul de la sensibilité et de la spécificité du kit ELISA amphétamine.

		GC/MS	
		Positif	Négatif
ELISA	Positif	136	152
	Négatif	0	880

Sensibilité : 100 %
Spécificité : 85,7 %

Tableau V. Résultats comparés pour le dépistage *versus* GC/MS avec calcul de la sensibilité et de la spécificité du kit ELISA métamphétamine.

		GC/MS	
		Positif	Négatif
ELISA	Positif	28	12
	Négatif	0	960

Sensibilité : 100 %
Spécificité : 99,2 %

Tableau VI. Résultats comparés pour le dépistage *versus* GC/MS avec calcul de la sensibilité et de la spécificité du kit ELISA méthadone.

		GC/MS	
		Positif	Négatif
ELISA	Positif	144	20
	Négatif	0	564

Sensibilité : 100 %
Spécificité : 96,6 %

sultats obtenus par technique ELISA avec ceux de la méthode de confirmation, avec calcul de la sensibilité et de la spécificité selon les formules précédentes.

Il n'a été observé aucun dépistage faussement négatif pour les kits amphétamine, métamphétamine et méthadone (sensibilité de 100 %). Par contre, 4 dépistages faussement négatifs ont été mis à jours pour le kit cocaïne (1264 tests), 8 pour le kit opiacés (1072 tests) et 16 pour le kit cannabis (1144 tests). Pour ces kits, les sensibilités étaient tout de même comprises entre 96,0 et 98,7 %. Pour ces échantillons dépistés négatifs par ELISA, les concentrations pour la cocaïne variaient de 0,57 à 2,93 ng/mg, de 0,63 à 0,96 ng/mg pour la codéine et de 0,27 à 0,87 ng/mg pour le THC. Ces concentrations sont bien au-delà des seuils fixés et les dépistages rendus négatifs ne peuvent s'expliquer par un manque de sensibilité du test.

Aux valeurs seuils choisies, les spécificités s'avèrent satisfaisantes pour les 6 kits éprouvés avec des valeurs comprises entre 82,4 (kit cannabis) et 99,2 % (kit métamphétamine).

4 Discussion – conclusion

Tout au long de ces deux années d'activité, la technique ELISA employée a permis de répondre de façon satisfaisante à un volume important de demandes de dépistage de produits illicites dans les cheveux. Le procédé est simple, rapide (<2 heures) et fiable, et ne nécessite qu'une unique et très

faible prise d'essai (1 mg par test). Au final, le dépistage par technique ELISA permet de réduire le nombre d'échantillons à confirmer par une technique chromatographique. Par conséquent, les temps et coûts d'analyse sont réduits et le nombre d'échantillons traités dans la journée augmenté. Ces tests sont tout à fait indiqués dans le cadre de dépistage de population où l'on s'attend à de nombreux négatifs.

Références

1. Analytical and Practical Aspects of Drug Testing in hair. Kintz P Ed. Boca Raton : CRC, Forensic Science Series, 2007.
2. Cirimele V, Etienne S, Villain V, Ludes B, Kintz P. Evaluation of the One-StepTM ELISA kit for the detection of buprenorphine in urine, blood, and hair specimens. *Forensic Sci Int.* 2004; 143: 153–156.
3. Pujol ML, Cirimele V, Tritsch PJ, Villain M, Kintz P. Evaluation of the IDS One-StepTM ELISA kit for the detection of illicit drugs in hair. *Forensic Sci Int.* 2007; 170: 182–192.
4. Kintz P, Mangin P. Simultaneous determination of opiates, cocaine and major metabolites of cocaine in human hair by gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS). *Forensic Sci Int.* 1995; 73: 93–100.
5. Cirimele V, Sachs H, Kintz P, Mangin P. Testing human hair for cannabis. III. Rapid screening procedure for the simultaneous identification of Δ^9 -tetrahydrocannabinol, cannabinol, and cannabidiol. *J Anal Toxicol.* 1996; 20: 13–16.
6. Kintz P, Tracqui A, Cirimele V, Mangin P. Simultaneous determination of amphetamines, methamphetamine, 3,4-methylenedioxyamphetamine and 3,4-methylenedioxymethamphetamine in human hair by GC/MS. *J Chromatogr.* 1995; 20: 162–166.
7. Recommendations for hair testing in forensic cases http://www.sohr.org/pdf/Consensus_on_Hair_Analysis.pdf Site Internet consulté le 26/11/2008.