

آشکارسازی تقلب‌های منجر به پاسخهای منفی کاذب در آزمایش تشخیص اعتیاد

دکتر مهدی هدایتی*، دکتر احمد رضا تاجیک**، اختر کاظمی**، مریم السادات دانشپور*

* مرکز تحقیقات چاقی، پژوهشکده علوم غدد درون ریز و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
** مرکز تحقیقات علوم آزمایشگاهی ۶۶۰ ارتش جمهوری اسلامی ایران

چکیده

سابقه و هدف: مصرف کنندگان مواد مخدر همواره در تلاش برای پنهان نمودن اعتیاد خود هستند. هدف این تحقیق، ارائه راهکاری مناسب جهت آشکارسازی تقلب‌های منجر به کسب نتایج منفی کاذب در آزمایش اعتیاد و یا آزمایش تشخیص مورفین در ادرار است. **روش بررسی:** در این مطالعه از دو روش تست سریع ایمونوکروماتوگرافی جهت غربالگری اولیه حضور مورفین در نمونه ادرار و روش کروماتوگرافی لایه نازک جهت تایید پاسخهای مثبت استفاده شد. از نمونه‌های ادرار ارجاع شده به آزمایشگاه مرکز تحقیقات ۶۶۰ ارتش جمهوری اسلامی برای این مطالعه استفاده شد. کلرید سدیم، سرکه، آب‌لیمو، نیتريت، پراکسید هیدروژن، سفید کننده به عنوان تغییر دهنده های رایج و موثر بر اسیدیته و یا قدرت یونی ادرار و تداخل در تست مورفین مورد بررسی قرار گرفتند. **یافته‌ها:** اجرای آزمایشات به صورت دوتایی، با و بدون افزایش میزان آستانه مورفین (۳۰۰ نانوگرم در میلی‌لیتر) در حضور و غیاب موارد مداخله‌گر سبب آشکارسازی تمام موارد منفی کاذب با تداخل کننده‌های مختلف شد. **نتیجه‌گیری:** روش اجرای دوتایی آزمایش ادرار مورفین، با و بدون افزایش میزان آستانه مورفین به نمونه‌ها، قادر به کشف نمونه‌های منفی کاذب بوده و از ارائه نتایج منفی کاذب آزمایش به معتادان مداخله‌گر جلوگیری می‌کند. **واژگان کلیدی:** آزمایش ادرار، مورفین، منفی کاذب، تقلب.

مقدمه

مداخله‌گر و جایجایی نمونه استفاده می‌نمایند. در جایجایی نمونه، ادرار فرد معتاد با افراد فرد سالم و یا ادرارهای مصنوعی جایجا می‌شود. مصرف حجم زیاد مایعات و یا استفاده از داروهای مدر، با رقیق سازی نمونه ادرار، غلظت ماده مخدر و یا متابولیت‌های مورد جستجو را تا زیر آستانه تشخیص کاهش داده و سبب نتایج منفی کاذب می‌شوند (۱). استفاده از مواد مداخله‌گر، غالباً به افزودن مستقیم مواد شیمیایی خانگی و یا قابل دسترس به ادرار جهت تقلب در نتیجه آزمایش اطلاق می‌گردد. مواد مداخله‌گر ترکیباتی هستند که در ادرار طبیعی وجود ندارند و یا ترکیبات ادرار با غلظتی بالاتر از مقدار طبیعی هستند. افزایش مواد شیمیایی قوی، سبب تخریب دارو و متابولیت‌های آن شده و به اجزای واکنش

معضلات فردی و اجتماعی ناشی از اعتیاد به مواد مخدر سبب درخواست آزمایش عدم اعتیاد در مواردی مانند ازدواج و استخدام شده است. متأسفانه هم‌زمان با پیشرفت روش‌های آزمایشگاهی کشف اعتیاد، روش‌های پنهان نمودن اعتیاد، یا به عبارتی ایجاد نتایج منفی کاذب به طرق مختلف فیزیکی و شیمیایی نیز گسترش یافته است.

مصرف کنندگان مواد مخدر برای گریز از نتایج مثبت آزمایش ادرار از سه روش کلی رقیق سازی نمونه ادرار، افزایش مواد

شناسگر نیز آسیب می‌زند و لذا نتایج منفی کاذب به بار می‌آورد (۲).

معتادان طیف وسیعی از ترکیبات شیمیایی خانگی و در دسترس برای انحراف نتایج آزمایش استفاده می‌کنند. صابون، نمک طعام، سفید کننده‌های مایع و جامد، پاک کننده‌های دندان مصنوعی رایج‌ترین این مداخله‌گرها هستند. البته گزارشاتی مبنی بر خوردن حجم زیادی سرکه، آبلیمو و حتی آب باطری برای اختلال در نتیجه آزمایش مواد مخدر گزارش شده است (۳). استفاده از سنجش گراویتی ادرار با رفرکتومتر، تقلب افزایش نمک به ادرار و نیز رقیق سازی آنرا آشکار می‌نماید. به علاوه غلظت کمتر از حد طبیعی اجزا و ترکیبات ادرار مانند کراتینین موید رقیق سازی نمونه خواهد بود (۴). البته امروزه افراد مذکور با مراجعه به اینترنت و سایت‌های تخصصی از مواد پنهان کننده تخصصی جهت اختفای حقیقت و انحراف نتیجه آزمایش استفاده می‌کنند. مواد غذایی مختلف و ویتامین‌ها باعث تغییر رنگ ادرار می‌شوند، ولی نمی‌توانند کاملاً سبب ایجاد نتایج منفی کاذب در آزمایش تشخیص اعتیاد گردند و اغلب این رنگ‌ها در روش‌هایی مانند کروماتوگرافی جدا می‌شوند (۵). گروهی از مواد مداخله‌گر، خاصیت اکسیدکنندگی دارند و باعث تغییر ساختمان دارو و متابولیت‌های آن می‌شوند. البته گاهی محصول این تغییرات شیمیایی هنوز توسط روش‌های حاوی آنتی‌بادی شناسایی می‌شوند. نیتريت‌ها نیز از مواد رایج برای تداخل در آزمایش اعتیاد محسوب می‌شوند، اما از آنجایی که برای واکنش نیازمند زمان هستند، در نمونه‌های تازه تاثیر زیادی ندارند، البته چنانچه از زمان اخذ تا انجام آزمایش چند ساعت بگذرد موثر واقع می‌شوند. در ضمن محیط اسیدی به کارایی این تداخل کمک زیادی می‌کند و ادرارهای خنثی و یا قلیایی نسبت به اثر نیتريت‌ها مقاوم‌ترند (۶). تنظیم اسیدیته خنثی برای ادرار بعد از اخذ، سبب کاهش تداخل نیتريت می‌گردد. نیتريت یک جزء طبیعی ادرار به میزان کم (۵۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) می‌باشد که اگر به عنوان مداخله‌گر استفاده شود تا چند هزار میکروگرم در میلی‌لیتر افزایش می‌یابد (۱). نمک‌های کرومات، در تداخل مشابه نیتريت عمل می‌کنند و خاصیت اکسیدکنندگی دارند. پراکسید هیدروژن و آنزیم‌های اکسیداز هم از عوامل مداخله‌گری هستند که به فاکتورهای پنهان معروف هستند، چرا که در ابتدا این عوامل مداخله‌گر به راحتی تشخیص داده نمی‌شدند (۷). گلوترآلدئید به دلیل واکنش با آنتی‌بادی‌ها و آنزیم‌ها و قفل نمودن آنها در روش‌های تشخیص دارویی مانند الیزا بطور جدی تداخل

می‌کند (۲). صابون‌ها و دترژانت‌ها با تشکیل میسل‌هایی که داروهای هیدروفوب را در خود پنهان می‌کنند و در ضمن سبب تغییر ساختار فضایی آنتی‌بادی‌ها و آنزیم‌ها می‌گردند، باعث تداخل و کسب نتایج منفی کاذب خواهند شد (۸). همواره روش‌های تقلب جدید توسط مصرف کنندگان مواد مخدر برای پوششش دادن حضور مورفین در ادرار استفاده می‌شوند. از آنجایی که بررسی تک تک موارد تقلب منطقی به نظر نمی‌رسد، هدف از این تحقیق ارائه راهکاری برای کشف تقلب در آزمایش ادرار مورفین می‌باشد که مستقل از ماده تداخل کننده شناخته شده و یا ناشناخته باشد. منطبق این کار کسب نتیجه منفی کاذب با اضافه نمودن مورفین در حد آستانه (۳۰۰ نانوگرم در میلی‌لیتر) به نمونه ادرار حاوی ماده تداخل کننده می‌باشد، به این معنی که نمونه ادرار با نتیجه منفی، چنانچه با افزودن مورفین در حد آستانه، مثبت شود، نتیجه منفی واقعی بوده است؛ اما اگر نتیجه با افزایش میزان آستانه مورفین منفی باقی بماند نشانه حضور تداخل کننده در نمونه ادرار است و نتیجه منفی کاذب گزارش نخواهد شد.

مواد و روشها

جهت غربالگری حضور مورفین در ادرار، از نوارهای تست سریع مورفین ادراری (رپید تست آکون [Acon]، سان دیگو، آمریکا و نیز رپید تست دیمما [Dimma]، آلمان) بر اساس ایمنووکروماتوگرافی (Immunochromatography) استفاده شد. لازم به ذکر است حساسیت روش‌های مورد استفاده ۳۰۰ نانوگرم در میلی‌لیتر بود. برای تایید نتایج مثبت در آزمایش تشخیص مورفین ادرار از روش کروماتوگرافی لایه نازک (شرکت سم فن آور، تهران، ایران thin-layer chromatography [TLC]) با حساسیت ۱۰۰۰ نانوگرم در میلی‌لیتر استفاده شد. فاز جامد سیلیکاتی، فاز متحرک کلروفرم، اتانل و آمونیاک بود و رنگ آمیزی با کلروپلاتینات انجام پذیرفت.

در مورد استاندارد مورفین، مورفین مورد نیاز جهت اجرای دوتایی (Double) نمونه‌های منفی در حضور و غیاب مورفین، از شرکت دارو پخش تهیه شد.

جهت بررسی مواد افزودنی مسبب نتایج منفی کاذب، مواد شیمیایی خانگی شامل نمک، جوش شیرین، صابون، سرکه، آبلیمو، نیتريت، سفیدکننده، صابون مایع و آب اکسیژنه از مواد در دسترس در مغازه‌ها، سوپرمارکت‌ها و داروخانه‌ها استفاده شد. غلظت مواد تداخل کننده شامل ۵۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر نمک طعام، ۳ درصد آب اکسیژنه، ۱۲ میلی‌لیتر در

لیتر صابون مایع، ۱۲ میلی لیتر در لیتر مایع سفید کننده، ۸۵ میلی لیتر در لیتر سرکه، ۵۰۰ میلی لیتر در لیتر نیتريت، ۱۰۰ میلی لیتر در لیتر آب لیمو و ۵۰ میلی لیتر در لیتر جوش شیرین بود.

ابتدا یک Pool از ادارار افراد داوطلب سالم با نتیجه منفی تست مورفین تهیه شد. منفی بودن نتیجه مورفین با روش ریپید تست تشخیص و با روش کروماتوگرافی لایه نازک تایید شد. نمونه ادارار به دو قسمت مساوی تقسیم شد. به هر دو قسمت، حد آستانه مورفین یعنی ۳۰۰ نانوگرم در میلی لیتر مورفین افزوده شد. به یک قسمت مواد تداخل کننده مختلف افزوده شد و قسمت دیگر به عنوان شاهد، همان حجم نرمال سالین اضافه گردید. وزن مخصوص و اسیدیتة نمونه های مذکور اندازه گیری شد. در انتها به کلیه نمونه های مذکور ۳۰۰ نانوگرم در میلی لیتر مورفین سولفات افزوده و سپس از لحاظ حضور مورفین در حضور و غیاب مواد تداخل کننده بررسی شدند. هر آزمایش چهار بار تکرار شد.

یافته ها

نتایج حضور میزان آستانه مورفین با دو روش نوار ریپید تستهای دیمای آلمان و آکون آمریکا در نمونه های اداراری که منفی بودن مورفین آنها تایید شده بود، در جدول ۱ آورده شده است.

جدول ۱- نتیجه بررسی مورفین در نمونه های ادارار دارای میزان آستانه مورفین در حضور و غیاب تداخل کننده

	در غیاب تداخل کننده		در حضور تداخل کننده	
	آکون آلمان*	دیمای آمریکا*	آکون آلمان	دیمای آمریکا
نمک طعام (۵۰ mg/ml)	+	+	-	-
آب اکسیژنه (۳٪)	+	+	-	-
صابون مایع (۱۲ mL/L)	+	+	-	-
مایع سفید کننده (۱۲ mL/L)	+	+	-	-
سرکه (۸۵ mL/L)	+	+	-	-
نیتريت (۵۰۰ mL/L)	+	+	+	+
آب لیمو (۱۰۰ mL/L)	+	+	+	+
جوش شیرین (۵۰ mg/L)	+	+	-	-

* شرکت و کشور سازنده

همان طور که مشاهده می شود، افزایش ۳۰۰ نانوگرم در میلی لیتر مورفین سبب مثبت شدن تست سریع مورفین با هر دو نوع ریپید تست شد. این نتایج پس از افزودن مواد تداخل

کننده مختلف (بجز آب لیمو و نیتريت) منفی شد. به عبارتی تداخل کننده های آب اکسیژنه، نمک طعام، صابون مایع، سفید کننده، سرکه و پودر بیکینگ با غلظت های قید شده سبب کسب نتایج منفی کاذب گردید. پس از افزودن مواد تداخل کننده، اسیدیتة و وزن مخصوص نمونه ها در مقایسه با نمونه ادارار شاهد همان آزمایش، مورد سنجش قرار گرفت. مواد تداخل کننده نمک طعام، نیتريت و جوش شیرین سبب افزایش وزن مخصوص شدند. سرکه و آب لیمو سبب کاهش اسیدیتة ادارار شدند. مایع سفید کننده و جوش شیرین سبب افزایش اسیدیتة گردیدند (جدول ۲).

جدول ۲- نتیجه بررسی اسیدیتة و وزن مخصوص نمونه های اداراری پس از افزودن مواد تداخل کننده

تغییر در وزن مخصوص		تغییر در اسیدیتة	
نمک طعام (۵۰ mg/ml)	افزایش	بدون تغییر	بدون تغییر
آب اکسیژنه (۳٪)	بدون تغییر	بدون تغییر	بدون تغییر
صابون مایع (۱۲ mL/L)	بدون تغییر	بدون تغییر	بدون تغییر
مایع سفید کننده (۱۲ mL/L)	بدون تغییر	افزایش	افزایش
سرکه (۸۵ mL/L)	بدون تغییر	کاهش	کاهش
نیتريت (۵۰۰ mL/L)	افزایش	بدون تغییر	بدون تغییر
آب لیمو (۱۰۰ mL/L)	بدون تغییر	کاهش	کاهش
جوش شیرین (۵۰ mg/L)	افزایش	افزایش	افزایش

بحث

یکی از معضلات جنایی، adulteration یا دست کاری نمونه ادارار برای تغییر نتیجه آزمایش می باشد. سه روش اصلی برای این منظور، جابجایی نمونه، رقیق سازی و افزودن مواد تداخل کننده است. مواد تداخل کننده موادی هستند که سبب کسب نتایج منفی کاذب می گردند، یا در انجام آزمایش تشخیصی تداخل ایجاد می کنند و یا باعث تخریب ماده مخدر مورد جستجو می گردند (۹). رقیق سازی باعث کاهش غلظت ماده مخدر مورد جستجو به کمتر از آستانه تشخیص تست می گردد. رایج ترین روش های کشف دست کاری نمونه، سنجش کراتینین، اسیدیتة، وزن مخصوص، و حضور گلوترآلدهید، نیتريت و مواد اکسید کننده (کلروکرومات پیریدینیوم) هستند (۱۰). از آنجایی که غلظت داروهای دفع شده در ادارار اهمیت دارد، رقیق سازی ادارار می تواند به کسب نتایج منفی کاذب بیانجامد. کراتینین کمتر از ۲۰ میلی گرم در دسی لیتر و وزن مخصوص کمتر از ۱/۰۰۳ نشان رقیق شدن ادارار می باشد، اما کراتینین کمتر از ۵ میلی گرم در دسی لیتر و

میزان نیتريت تشخیص داد و یا با آزمایشات اختصاصی حضور مواد خاصی مانند گلوترآلدهید، انواع اکسیدکننده‌های شیمیایی مانند کلرکرومات پیریدینیوم و یا آنزیمی را کشف کرد. اما پشت سر متقلبان حرکت کردن و بررسی هر آنچه آنان به عنوان تقلب بکار می‌برند منطقی نیست. چرا که در جنگ علم علیه علم، همواره تداخل کننده‌های جدید و پیچیده‌ای به بازار می‌آیند که در ابتدا ناشناخته بوده و سپس کشفشان نیاز وقت و هزینه دارد. لذا پیگیری راهکارهای کشف تقلب که مستقل از ماده تداخل کننده و روش تقلب باشد، منطقی به نظر می‌رسد. نتایج این تحقیق نشان داد که استراتژی افزودن میزان آستانه ماده غیرمجاز به نمونه‌های منفی می‌تواند واقعی بودن و یا کاذب بودن نتیجه منفی را مشخص کند. از محدودیت‌های این شیوه این است که نمونه‌های منفی برای تایید استفاده می‌شوند و تعداد نمونه‌های منفی همواره از نمونه‌های مثبت بیشتر است و باید آزمایش بصورت دوتایی انجام شود؛ لذا هزینه انجام آزمایش غربالگری افزایش خواهد یافت. البته می‌توان حداقل در خصوص نمونه‌های منفی مشکوک از این راهکار بهره برد.

از این مطالعه نتیجه‌گیری می‌شود که چنانچه از مواد تداخل کننده برای پوشاندن داروی غیرمجاز یا متابولیت‌های آن در نمونه مورد بررسی استفاده شود، افزودن میزان آستانه از داروی غیرمجاز به نمونه‌های منفی، راهکار مناسبی برای پی بردن به وجود مواد تداخل کننده می‌باشد. در این روش برای کشف تقلب عمدی یا سهوی نیازی به آگاهی از نوع ماده تداخل کننده نیست. کسب نتایج منفی پس از افزودن میزان آستانه از داروی غیر مجاز، حاکی از حضور ترکیب یا ترکیبات تداخل کننده می‌باشد.

وزن مخصوص کمتر از ۱/۰۰۱ به عنوان نمونه غیرادراری در نظر گرفته می‌شود (۳). افزودن آب با سنجش کراتینین و وزن مخصوص، افزودن آمونیاک با اسیدیته و بوی نمونه، افزودن سفید کننده با بوی نمونه و افزودن صابون با کف کردن پایدار نمونه‌ها قابل کشف است. اما افزودن نیتريت، کلروکرومات و پراکسیداز عمدتا در شناسایی حشیش تداخل می‌کنند و برای کشف آنها از روش‌های تشخیصی خاص استفاده می‌شود (۱۱). در این مطالعه از نمک، جوش شیرین، صابون، سرکه، آلبیمو، نیتريت، سفیدکننده، صابون مایع و آب‌اکسیژنه به عنوان تداخل کننده‌های رایج استفاده شد. در مطالعه ما، حداقل میزان تداخل کننده‌های مذکور با گزارش سایر محققین همخوانی داشت (۱۴-۱۲). در این تحقیق نیتريت نتیجه منفی کاذب ایجاد نکرد که با نتایج تحقیقی که تداخل نیتريت را در متابولیت‌های حشیش موثر می‌دانند، سازگار بود (۵). عدم تداخل آلبیمو نیز با سایر گزارشات مطابقت داشت (۱۵). امروزه سطح پیشرفته‌تری از این مواد تداخل کننده تحت عنوان مواد دزدکی (Stealth) مطرح می‌باشند که در مطالعات بعدی مورد بررسی قرار خواهند گرفت. متأسفانه سایت‌های اینترنتی حرفه‌ای و پیشرفته‌ای برای ارائه مواد تداخل کننده وجود دارند که این‌گونه مواد را به فروش می‌رسانند و یا اطلاعات لازم را در اختیار مصرف‌کنندگان مواد مخدر قرار می‌دهند. اغلب این مواد را بجای افزودن به ادرار، مورد مصرف قرار میدهند تا متابولیزم دارو را تغییر دهند. لذا به عبارتی جنگی علمی میان مصرف‌کنندگان و آشکارکنندگان وجود دارد (۱۶). در پایان می‌توان گفت، هر چند استفاده از مواد تداخل کننده شناخته شده را می‌توان با آزمایش پارامترهایی از ادرار مانند درجه حرارت، وزن مخصوص، میزان کراتینین و

REFERENCES

1. Mikkelsen SL, Ash KO. Adulterants causing false negatives in illicit drug testing. *Clin Chem* 1988;34:2333-36.
2. George S, Braithwaite RA. The effect of glutaraldehyde adulteration of urine on Syva EMIT II drugs-of-abuse assays. *J Anal Toxicol* 1996;20:195-96.
3. Tsai SCJ, Elshohly MA, Dubrovsky T, Twarowska B, Towt J, Salamone SJ. Determination of five abused drugs in nitrite-adulterated urine by immunoassays and gas chromatography-mass spectrometry. *J Anal Toxicol* 1998;22:474-80.
4. Dasgupta A, Wahed A, Wells A. Rapid spot test for detecting the presence of adulterants in urine specimens submitted for drug testing. *Am J Clin Pathol* 2002;117:325-29.
5. Wu A. Integrity of urine specimens submitted for toxicological analysis: adulteration, mechanism of action and laboratory detection. *Forensic Sci Rev* 1998;10:47-65.
6. Urry F, Komaromy-Hiller G, Staley B, Crockett D, Kushnir M, Nelson G, et al. Nitrite adulteration of workplace drug testing specimens: sources and associated concentrations of nitrite and distinction between natural sources and adulteration. *J Anal Toxicol* 1998;22:89-95.
7. Warner A. Interference of household chemicals in immunoassay methods for drugs of abuse. *Clin Chem* 1989;35: 648-51.
8. Cody J. Specimen adulteration in drug analysis. *Forensic Sci Rev* 1990;2:63-75.

9. Paul BD, Jacobs A. Effects of oxidizing adulterants on detection of 11-nor-delta9-THC-9-carboxylic acid in urine. *J Anal Toxicol* 2002;26:460-43.
10. Doedens DJ, Forney RB. Confirmation of morphine on thin-layer plates by fluorometry. *J Chromatogr* 1974; 100:225-26.
11. King EJ. Performance of AdultsCheck 4 test stripes for the detection of adulteration at the point of collection of urine specimens used for drugs of abuse testing. *J Anal Toxicol* 1999;23:72.
12. Moyer TP. Marijuana testing-how good is it? *Mayo Clin Proc* 1987;62:413-17.
13. Schwartz RH. Laboratory detection of marijuana use. *J Am Med Assoc* 1985;254:788-90.
14. Duc VT. EMIT tests for drug of abuse: interference by liquid soap Preparations. *Clin Chem* 1985;31:658-59.
15. Wu A, Bristol B, Sexton K, Cassella-McLane G, Holtman V, Hill DW. Adulteration of urine by urine luck. *Clin Chem* 1999;45:1051-57.
16. Elsohly MA, Feng S, Kopycki WJ, Murphy TP, Jones AB, Davis A, et al. A procedure to overcome interferences caused by adulterant "Klear" in the GC-MS analysis of 11-nor-D9-THC-9-COOH. *J Anal Toxicol* 1997;20:240-42.