

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202390613** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2023.11.15

(22) Дата подачи заявки
2023.03.15

(51) Int. Cl. *G01N 33/497* (2006.01)
G01N 33/60 (2006.01)
G01N 33/62 (2006.01)
C12Q 1/16 (2006.01)
C12Q 1/58 (2006.01)

(54) **СПОСОБ НЕИНВАЗИВНОЙ ДИАГНОСТИКИ ИНФЕКЦИИ HELICOBACTER PYLORI С ПОМОЩЬЮ ¹³С-УРЕАЗНОГО ДЫХАТЕЛЬНОГО ТЕСТА**

(31) 2022112251

(32) 2022.05.05

(33) RU

(71) Заявитель:

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ
ГОСУДАРСТВЕННОЕ
БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО
ОБРАЗОВАНИЯ "СЕВЕРО-
ЗАПАДНЫЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ
ИМ. И.И. МЕЧНИКОВА"
МИНИСТЕРСТВА
ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ (RU)**

(72) Изобретатель:

**Бакулина Наталья Валерьевна,
Сайганов Сергей Анатольевич,
Бакулин Игорь Геннадьевич (RU)**

(74) Представитель:

Кашина Н.И. (RU)

(57) Изобретение относится к медицине, в частности к гастроэнтерологии, и может быть использовано для неинвазивной диагностики инфекции *Helicobacter pylori* в желудке человека. Способ неинвазивной диагностики инфекции *Helicobacter pylori*, в ходе которого осуществляют забор базовой пробы воздуха, после чего производят прием 25 мг карбамида, меченного 99% обогащенным углеродом ¹³C и добавленного к 150 мл воды, дополнительно содержащей 2 г лимонной кислоты, затем осуществляют заборы тестовых проб воздуха через 10, 20 и 30 мин после приема карбамида. Наличие *Helicobacter pylori* определяют при превышении концентрации ¹³C углерода по меньшей мере одной из тестовых проб на 2,5% и более по сравнению с базовой пробой. Технический результат состоит в повышении чувствительности и специфичности, снижении длительности диагностики инфекции *Helicobacter pylori*.

A1

202390613

202390613

A1

Способ неинвазивной диагностики инфекции *Helicobacter pylori*
с помощью ^{13}C -уреазного дыхательного теста

Изобретение относится к медицине, в частности к гастроэнтерологии и может быть использовано для неинвазивной диагностики инфекции *Helicobacter pylori* в желудке человека.

Helicobacter pylori представляет собой грамотрицательную бактерию, которая преодолевает защитный слой слизи и колонизирует слизистую оболочку. Инфекция *Helicobacter pylori* по статистике присутствует более, чем у 50% населения мира (Hooi JKY et al. Global Prevalence of *Helicobacter pylori* Infection: Systematic Review and Meta-Analysis. *Gastroenterology*. 2017;153:420–429. doi: 10.1053/j.gastro.2017.04.022., Bakulina N., Bakulin I., Pchishina T. Epidemiological study on *Helicobacter pylori* infection among patients with dyspepsia in Saint-Petersburg (Russia) *Helicobacter*. 2018;23(Suppl. 1):e12525. P.58. P04.02 DOI: 10.1111/hel.12525). Данная инфекция обычно передается в детском возрасте и длительное время присутствует без симптомов. Однако в результате длительного инфицирования, *Helicobacter pylori* может привести к повреждению слизистой оболочки желудка с развитием хронического гастрита, язвенной болезни, аденокарциномы и MALT-лимфомы желудка, внежелудочным проявлениям хеликобактериоза (Muhammad J.S. et. al. Gastric pathophysiological ins and outs of *helicobacter pylori*: A review. *J. Pak. Med. Assoc.* 2013;63:1528–1533.). С учетом отсутствия симптомов в течение длительного периода, особенно важной задачей, стоящей перед медициной, является разработка простых, доступных, но при этом точных методов диагностики с целью внедрения в масштабные скрининговые обследования. Основными техническими требованиями к таким способам являются неинвазивность, а также высокая чувствительность и специфичность.

Известен способ обнаружения *Helicobacter pylori* с помощью дыхательного теста с ^{13}C -мочевинной (Method and kit for detecting *Helicobacter pylori*: патент US6171811, Соединенные Штаты Америки, заявка US10199299, заявл. 20.07.1999, опубл. 09.01.2001), включающий введение пациенту водного раствора лимонной кислоты с рН от 2 до 2,5, отбор пробы воздуха с целью определения исходного содержания ^{13}C углерода через 10 минут после введения лимонной кислоты; введение пациенту подходящего количества ^{13}C -мочевины; отбор пробы воздуха с целью определения содержания ^{13}C углерода через 30 минут после введения ^{13}C -мочевины; анализ разницы в содержании ^{13}C углерода между первой и второй пробами.

Недостатками данного способа являются относительно низкая чувствительность, обусловленная выполнением только одной пробы воздуха через 30 минут после принятия ¹³C-мочевины. Также к недостаткам данного способа можно отнести получение лимонной кислоты из фруктового сока, что может часто приводить к аллергическим реакциям у пациентов.

Известен (Способ диагностики *H. pylori* у пациентов с патологией желудочно-кишечного тракта: патент RU165352, Российская Федерация, заявка RU2016126220, заявл. 29.06.2016, опубл. 10.10.2016), в ходе которого у пациента собирают пробу выдыхаемого воздуха для определения базального уровня ¹³C-углерода. После этого в 150 мл дистиллированной воды комнатной температуры сначала растворяют 2,0 г лимонной кислоты, а затем 50 мг ¹³C-мочевины (карбамида). Спустя 30 минут после приема реактива повторно собирают образцы выдыхаемого воздуха.

Затем в полученных пробах воздуха на инфракрасном спектрометре определяют удельный вес ¹³CO₂ от общего количества углекислого газа и рассчитывают значение показателя прироста концентрации в пробе воздуха относительно базовой пробы - delta over baseline (DOB), который определяют по формуле $DOB = \Delta s - \Delta o$, где Δo - показатель до приема растворителя реактива, Δs - после приема, Δ - соотношение концентрации ¹³CO₂/¹²CO₂ в сравнении с эталонной пробой воздуха, хранящейся в приборе. Значения DOB равное или выше 3,5% свидетельствует о наличии инфекции *H. pylori*.

Недостатками вышеописанного технического решения являются относительно низкая чувствительность и специфичность. Это обусловлено проведением одного забора воздуха через 30 минут, что не учитывает разницу в метаболизме у пациентов, степень инфицированности микроорганизмами и другие аспекты, влияющие на более высокую скорость метаболизма карбамида.

Также известен способ проведения дыхательного теста для диагностики *Helicobacter pylori* (Способ выявления патогенных микроорганизмов на основе дыхательного теста: заявка CA2677559, Канада, заявл. 14.12.2007, опубл. 26.06.2008), в ходе которого осуществляют прием 50 мг ¹³C-мочевины вместе с 200 мл воды и проводят дыхательные тесты: сразу после приема препарата, а также через 10, 20 и 30 минут. Аналогичный способ описан в статье G. Campuzano-Maya (G. Campuzano-Maya. An optimized ¹³C-urea breath test for the diagnosis of *H. pylori* infection. World J Gastroenterol. 2007 Nov 7; 13(41): 5454–5464.).

К недостаткам таких технических решений можно отнести высокую дозу препарата – 50 мг, что повышает нагрузку на организм и снижает доступность проведения тестов.

Наиболее близким к заявляемому изобретению является способ неинвазивной диагностики инфекции *Helicobacter pylori* (Способ неинвазивной диагностики хеликобактерной инфекции: патент RU2229714, Российская Федерация, заявка RU2001133784, заявл. 18.12.2001, опубл. 27.05.2004), в ходе которого осуществляют забор базовой пробы воздуха, затем производят прием карбамида, после чего проводят заборы тестовых проб воздуха через 10, 15, 20, 25, 30, 40 и 60 мин после приема карбамида. Далее определяют наличие *Helicobacter pylori* при условии, если в одной из тестовых проб концентрация ^{13}C углерода выше по сравнению с базовой пробой.

К недостаткам данного способа можно отнести его длительность и относительно низкую специфичность, использование низкопроцентного обогащения изотопа, что в пересчете на 99% обогащение ^{13}C -изотопом составляет лишь 10 мг.

Длительность диагностики в данном способе обусловлена большим количеством заборов проб воздуха после приема карбамида, а относительно низкая специфичность – отсутствием адекватного порога для отнесения здоровых пациентов к таковым по результатам теста.

Технической проблемой является необходимость разработки простого в реализации, доступного и эффективного неинвазивного теста для определения *Helicobacter pylori*.

Технический результат состоит в повышении чувствительности, специфичности и снижении длительности диагностики инфекции *Helicobacter pylori*.

Технический результат достигается тем, что в способе неинвазивной диагностики инфекции *Helicobacter pylori*, в ходе которого осуществляют забор базовой пробы воздуха, после чего производят прием карбамида, меченного 99% обогащенным углеродом ^{13}C и добавленного к воде, дополнительно содержащей 2 г лимонной кислоты, затем осуществляют заборы тестовых проб воздуха, после чего определяют наличие *Helicobacter pylori* на основе разницы между базовой и тестовой пробой, согласно изобретению принимают карбамид в дозировке 25 мг, при этом его добавляют к 150 мл воды, а заборы тестовых проб воздуха осуществляют три раза – через 10, 20 и 30 минут после приема карбамида, при этом наличие *Helicobacter pylori* определяют при превышении концентрации ^{13}C углерода по меньшей мере одной из тестовых проб на 2,5‰ и более по сравнению с базовой пробой.

Предложенная методика проведения дыхательного теста обеспечивает максимально точную диагностику *Helicobacter pylori*. При проведении экспериментальных исследований выявлено, что 4-х точечный тест является оптимальным. Его чувствительность и специфичность выше, чем у 2-х точечного теста. Также выявлено, что большее количество проб повышает точность диагностики и при этом длительность исследования не

увеличивается. В результате вышеупомянутых исследований выявлено, что у пациентов, инфицированных *Helicobacter pylori* может быть обнаружен вариант активного метаболизма экзогенной мочевины (карбамида) в течение первых 10-20 минут с последующим снижением уровня в выдыхаемом воздухе к 30 минуте. Так у пациента тест был положительный на 20 минуте исследования, но уже через 10 минут – на 30 минуте исследования, опустился к норме. В этом случае тест был оценен, как положительный, что корреспондировалось с гистологическим исследованием гастробиоптата. При проведении двухточечной пробы, тест трактовался, как отрицательный, что привело бы к ложному заключению об отсутствии хеликобактерной инфекции, негативно повлияло на прогноз в отношении течения гастрита, не снизило риск рака желудка. У другого пациента тест был положительный на 10 минуте – вторая точка исследования и показатель вернулся к норме к 30 минуте – четвертой точке исследования. В данном случае, при проведении двухточечного стандартного теста – на нулевой и 30 минуте, пациенту ошибочно было бы диагностировано отсутствие инфекции, что повлекло бы повышение риска осложнений болезни вследствие несвоевременного лечения. Кроме того, проведенные исследования показали, что оптимальным пороговым значением для постановки диагноза является превышение концентрации ^{13}C углерода в по меньшей мере одной из тестовых проб на 2,5‰ и более. При этом использование карбамида с 99% обогащением позволяет использовать 25 мг карбамида, что достаточно для эффективной диагностики. Использование именно 2 г лимонной кислоты на 150 мл воды обеспечивает достаточное снижение pH в желудке (кислая среда). Таким образом, предложенная методика обеспечивает максимальную точность и снижает риски получения ложноотрицательного результата.

Заявляемый способ осуществляют следующим образом.

Обследование пациента проводят натощак. В первую очередь осуществляют отбор базовой пробы, для чего пациент после 10 секундной задержки дыхания выдыхает в специальную герметичную емкость. Предпочтительно в качестве такой емкости пакеты с колпачками (также возможно использование пробирок). При использовании для отбора проб пакетов пациент заполняет пакет выдыхаемым воздухом до тугого наполнения, после чего пакет закрывают колпачком. Затем готовят раствор для перорального приема. Для этого к 150 мл воды добавляют 2 г лимонной кислоты и 25 мг карбамида, меченного 99% обогащенным углеродом ^{13}C , раствор перемешивают до получения однородной смеси. Пациент выпивает полученный раствор, после чего осуществляют забор тестовых проб через 10, 20 и 30 минут после приема карбамида по вышеописанной методике. Результаты отобранных проб анализируют на инфракрасном газовом анализаторе семейства IRIS или

аналогичном приборе. Предпочтительно для анализа используют прибор на основе IRIS технологии (Kibion®). Наличие *Helicobacter pylori* у пациента определяют при превышении концентрации ¹³C углерода по меньшей мере одной из тестовых проб на 2,5‰ и более по сравнению с базовой пробой.

Заявляемое изобретение поясняется примерами.

Пример 1.

Пациент А в возрасте 63 лет, страдающий аутоиммунным атрофическим гастритом, обследуется на *Helicobacter pylori*. В рамках диагностики было принято решение использовать заявляемый способ, в качестве контрольных методов использовали стандартные методики диагностики *Helicobacter pylori* (на основании выявления иммуноглобулинов класса G в крови против *H. pylori* и морфологическую оценку инфицированности *H. pylori*).

Пациенту был проведен дыхательный тест в соответствии с заявляемым способом.

Результаты теста:

- 1 тест базовая проба – 0 - нулевая базовая точка отсчета;
- 2 тест (через 10 минут) - +1,5‰;
- 3 тест (через 20 минут) - + 1 ‰;
- 4 тест (через 30 минут) - нулевая базовая точка отсчета.

Так как ни одна из тестовых проб не показала превышение на 2,5‰ и более по сравнению с базовой пробой, был сделан вывод об отсутствии *Helicobacter pylori* у пациента. Результаты диагностики с помощью стандартной методики подтвердили правильность поставленного диагноза.

Пример 2.

Пациент Д в возрасте 46 лет, страдающий язвенной болезнью двенадцатиперстной кишки обратился для оценки *Helicobacter pylori* - статуса. В рамках диагностики было принято решение использовать заявляемый способ, в качестве контрольного метода использовали стандартную методику диагностики *Helicobacter pylori* (двойной контроль: уреазный тест с гастробиоптатом и морфологическую оценку инфицированности *Helicobacter pylori*).

Пациенту был проведен дыхательный тест в соответствии с заявляемым способом.

Результаты теста:

- 1 тест базовая проба – 0 - нулевая базовая точка отсчета;
- 2 тест (через 10 минут) - +2,1‰;
- 3 тест (через 20 минут) - +2,5‰;
- 4 тест (через 30 минут) - +0,2‰.

Так как одна тестовая проба показала превышение на 2,5‰ и более по сравнению с базовой пробой, был сделан вывод об инфицированности *Helicobacter pylori* у пациента. Результаты диагностики с помощью стандартной методики подтвердили правильность поставленного диагноза.

Пример 3.

Пациент В в возрасте 45 лет обследован для контроля эффективности эрадикационной терапии против *Helicobacter pylori*. В рамках диагностики было принято решение использовать заявляемый способ, в качестве контрольного метода использовали стандартную методику диагностики *Helicobacter pylori* (двойной контроль: уреазный тест с гастробиоптатом и морфологическую оценку инфицированности *Helicobacter pylori*).

Пациенту был проведен дыхательный тест в соответствии с заявляемым способом. Результаты теста:

- 1 тест базовая проба – 0- нулевая базовая точка отсчета;
- 2 тест (через 10 минут) - +1,2‰;
- 3 тест (через 20 минут) - +0,5‰;
- 4 тест (через 30 минут) - 0,5‰.

Так как ни одна из тестовых проб не показала превышение на 2,5‰ и более по сравнению с базовой пробой, был сделан вывод об отсутствии *Helicobacter pylori* у пациента. Результаты диагностики с помощью стандартной методики подтвердили правильность поставленного диагноза – отсутствие инфекции *Helicobacter pylori*.

Пример 4.

Пациент Г в возрасте 28 лет, страдающий язвенной болезнью двенадцатиперстной кишки обратился для оценки *Helicobacter pylori* - статуса. В рамках диагностики было принято решение использовать заявляемый способ, в качестве контрольного метода использовали стандартную методику диагностики *Helicobacter pylori* (двойной контроль: уреазный тест с гастробиоптатом и морфологическую оценку инфицированности *Helicobacter pylori*).

Пациенту был проведен дыхательный тест в соответствии с заявляемым способом. Результаты теста:

- 1 тест базовая проба - 0- нулевая базовая точка отсчета;
- 2 тест (через 10 минут) - +18‰;
- 3 тест (через 20 минут) - +24‰;
- 4 тест (через 30 минут) - +1,2‰.

Так как две тестовые пробы показала превышение на 2,5‰ и более по сравнению с базовой пробой, был сделан вывод об инфицированности *Helicobacter pylori* у пациента.

Результаты диагностики с помощью стандартной методики подтвердили правильность поставленного диагноза.

Формула изобретения

Способ неинвазивной диагностики инфекции *Helicobacter pylori*, в ходе которого осуществляют забор базовой пробы воздуха, после чего производят прием карбамида, меченного 99% обогащенным углеродом ^{13}C и добавленного к воде, дополнительно содержащей 2 г лимонной кислоты, затем осуществляют заборы тестовых проб воздуха три раза – через 10, 20 и 30 минут после приема карбамида, после чего определяют наличие *Helicobacter pylori* на основе разницы между базовой и тестовой пробой, отличающийся тем, что принимают карбамид в дозировке 25 мг, при этом его добавляют к 150 мл воды, при этом наличие *Helicobacter pylori* определяют при превышении концентрации ^{13}C углерода по меньшей мере одной из тестовых проб на 2,5‰ и более по сравнению с базовой пробой.

ОТЧЕТ О ПАТЕНТНОМ ПОИСКЕ

(статья 15(3) ЕАПК и правило 42 Патентной инструкции к ЕАПК)

Номер евразийской заявки:

202390613**А. КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ:**

G01N 33/497 (2006.01)
 G01N 33/60 (2006.01)
 G01N 33/62 (2006.01)
 C12Q 1/16 (2006.01)
 C12Q 1/58 (2006.01)

Согласно Международной патентной классификации (МПК)

Б. ОБЛАСТЬ ПОИСКА:

Просмотренная документация (система классификации и индексы МПК)
 G01N 33/48, 33/497, 33/50, 33/60, 33/62, C12Q 1/16, 1/58

Электронная база данных, использовавшаяся при поиске (название базы и, если возможно, используемые поисковые термины)
 Espacenet, EAPATIS, EPOQUE Net, Reaxys, Google

В. ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ

Категория*	Ссылки на документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №
A	RU 2229714 C2 (ОБЩЕСТВО С ОГРАНИЧЕННОЙ ОТВЕТСТВЕННОСТЬЮ "ТСД ИЗОТОПЫ") 27.05.2004	1
A	RU 2593008 C1 (ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ "УФИМСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ АВИАЦИОННЫЙ ТЕХНИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ") 27.07.2016	1
A	RU 2325845 C1 (ГОСУДАРСТВЕННОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ ВОРОНЕЖСКАЯ ГОСУДАРСТВЕННАЯ ТЕХНОЛОГИЧЕСКАЯ АКАДЕМИЯ) 10.06.2008	1
A	EP 3009838 A1 (AYGEN SITKE DR.) 20.04.2016	1
A	CN 1733931 A (AB ANALYSIS METHOD CO., LTD.) 15.02.2006	1
A	CN 110988319 A (WUXI SUNVOU MEDICAL ELECTRONICS CO LTD) 10.04.2020	1

 последующие документы указаны в продолжении

* Особые категории ссылочных документов:

«А» - документ, определяющий общий уровень техники

«D» - документ, приведенный в евразийской заявке

«E» - более ранний документ, но опубликованный на дату подачи евразийской заявки или после нее

«O» - документ, относящийся к устному раскрытию, экспонированию и т.д.

"P" - документ, опубликованный до даты подачи евразийской заявки, но после даты испрашиваемого приоритета"

«Т» - более поздний документ, опубликованный после даты приоритета и приведенный для понимания изобретения

«X» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий новизну или изобретательский уровень, взятый в отдельности

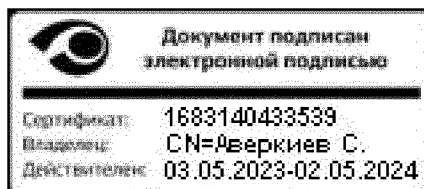
«Y» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий изобретательский уровень в сочетании с другими документами той же категории

«&» - документ, являющийся патентом-аналогом

«L» - документ, приведенный в других целях

Дата проведения патентного поиска: 15 сентября 2023 (15.09.2023)

Уполномоченное лицо:
 Начальник Управления экспертизы



С.Е. Аверкиев