

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **043722**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.06.16

(51) Int. Cl. **G01N 33/53** (2006.01)

(21) Номер заявки
202291661

(22) Дата подачи заявки
2022.06.24

**(54) СПОСОБ КОМПЛЕКСНОЙ ДИАГНОСТИКИ ЗАБОЛЕВАНИЙ ОРГАНОВ ЖКТ
(ЖЕЛУДКА, КИШЕЧНИКА, ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ)**

(43) **2023.06.15**

(96) **2022000047 (RU) 2022.06.24**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ОБЩЕСТВО С ОГРАНИЧЕННОЙ
ОТВЕТСТВЕННОСТЬЮ "АГРОС-
ИНТЕРНЕЙШНЛ" (RU)**

(72) Изобретатель:
**Коновалов Станислав Александрович
(RU)**

(74) Представитель:
Насонова К.В. (RU)

(56) ЛИВЗАН М.А. и др.
Фекальные лабораторные тесты в комплексной диагностике заболеваний кишечника. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ И КЛИНИЧЕСКАЯ ГАСТРОЭНТЕРОЛОГИЯ, 2015, выпуск 115, № 3, с. 34-38, весь документ, особенно реферат и разделы материалы/методы исследования и результаты исследования/их обсуждение

LANAS A. et al. Simultaneous testing of fecal hemoglobin and calprotectin predicts the detection of significant colorectal disease in the work-up of symptomatic primary-care patients: the advantage study. UEG WEEK 2020 POSTER PRESENTATIONS. UNITED EUROPEAN GASTROENTEROLOGY JOURNAL, 2020, Vol 8 (8S), p. 144-887, doi:10.1177/2050640620927345, с. 530, реферат

TURVILL J. et al. Diagnostic accuracy of one or two faecal haemoglobin and calprotectin measurements in patients with suspected colorectal cancer. SCANDINAVIAN JOURNAL OF GASTROENTEROLOGY, 2019, Vol. 53, №. 12, p. 1526-1534, doi:10.1080/00365521.2018.1539761, весь документ, особенно реферат и разделы методы и результат

MOWAT C. et al. Faecal haemoglobin and faecal calprotectin as indicators of bowel disease in patients presenting to primary care with bowel symptoms. GUT, 2015, Vol 65, №. 9, p. 1463-1469 doi:10.1136/gutjnl-2015-309579, весь документ, особенно реферат и разделы дизайн и результаты

HÖGBERG C. et al. Diagnosing colorectal cancer and inflammatory bowel disease in primary care: The usefulness of tests for faecal haemoglobin, faecal calprotectin, anaemia and iron deficiency. A prospective study. SCANDINAVIAN JOURNAL OF GASTROENTEROLOGY, 2016, Vol 52, №. 1, p. 69-75 doi:10.1080/00365521.2016.1228120, весь документ, особенно реферат и разделы материалы/методы и результаты

КНЯЗЕВ О.В. и др. Значение фекального кальпротектина в мониторинге активности воспалительных заболеваний кишечника. ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЙ АРХИВ, 2019, №4, с. 53-61 весь документ, особенно реферат и разделы материалы/методы и результаты/обсуждения
RU-C1-2517069

(57) Изобретение относится к области медицины и диагностики *in vitro*, в частности к выявлению предракowych состояний (включая полипы, аутоиммунные и воспалительные заболевания кишечника (ВЗК), гастриты, язвы желудка или двенадцатиперстной кишки и другие) и злокачественных новообразований желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) на ранней стадии. Предложен способ диагностики *in vitro* онкологических заболеваний органов ЖКТ, а также заболеваний ЖКТ, предшествующих онкологическим заболеваниям, заключающийся в том, что одновременно проводят иммунохимический количественный анализ одного образца кала пациента на несколько маркеров: фекальный гемоглобин, трансферрин, кальпротектин, панкреатическую эластазу, и качественный анализ на *Helicobacter pylori*.

B1**043722****043722 B1**

Область техники

Изобретение относится к области медицины и диагностики *in vitro*, в частности к выявлению предраковых состояний (включая полипы, аутоиммунные и воспалительные заболевания кишечника (ВЗК), гастриты, язвы желудка или двенадцатиперстной кишки и другие) и злокачественных новообразований желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) на ранней стадии.

Предшествующий уровень

В настоящее время диагностике заболеваний ЖКТ (желудка, кишечника, поджелудочной железы) уделяется большое внимание. К основным заболеваниям ЖКТ относят гастриты, язвы, нарушения функций поджелудочной железы, колиты, воспалительные заболевания кишечника (ВЗК), предраковые состояния (полипы) и рак кишечника и желудка на разных стадиях. ВЗК имеет частоту в среднем 200 случаев на 100 тыс. населения, но по прогнозам наблюдается увеличение заболеваемости до 500 случаев на 100 тыс. населения. В последние годы также регистрируется много колитов различной этиологии (микроскопических, эозинофильных, лимфоцитарных, недифференцированных), наблюдается рост выявления рака толстой кишки у пациентов с язвенным колитом (ЯК), что может быть связано с более ранним началом ВЗК. Если в общей группе больных ЯК риск развития рака в 9 раз превышает популяционный показатель, то при тотальном поражении толстой кишки он выше в 13 раз, при левостороннем ЯК - в 5 раз.

При этом следует учитывать, что ВЗК могут приводить к развитию аутоиммунных заболеваний и различных видов рака кишечника. Важную проблему представляет выявление предраковых новообразований и рака кишечника на ранних стадиях (0-I) с целью повышения успеха лечения. Однако проблема заключается в том, что функциональные состояния синдром раздраженной кишки - СРК, ВЗК, некротирующий язвенный колит (НЯК), Болезнь Крона и различные виды рака могут иметь сходные симптомы, что требует формирования новых подходов к дифференциальной диагностике с использованием комплекса биомаркеров и предпочтением неинвазивного метода. Также требуется уточнение исследований в целях онкопрофилактики, раннего выявления и лечения заболеваний ЖКТ при реализации скрининговых программ, комплексного обследования Check-up. С этой целью проводится исследование кала на скрытую кровь иммунохимическим методом (на основе образования комплекса антиген-антитело) в качественном или количественном вариантах.

В условиях эпидемии COVID-19 были установлены новые данные, свидетельствующие о росте числа пациентов с коронавирусной инфекцией с резким возрастанием диспепсических симптомов, а также пациентов с постковидным синдромом, что объясняется как повреждающим действием вируса SARS-CoV-2 на слизистую ЖКТ, так и изменением состава кишечной микробиоты, в том числе на фоне терапии. Наиболее выраженные изменения отмечались у больных ВЗК и аутоиммунными заболеваниями, порой с неблагоприятными исходами.

Выявление человеческого гемоглобина в исследуемом кале является высокоспецифичным тестом для диагностики кровотечений из нижних отделов ЖКТ. Так как гемоглобин в кале является нестабильным анализом, при кровотечениях в тонком и верхних отделах толстого кишечника возможно получение "ложноотрицательных" результатов анализа. Эта проблема может быть решена обнаружением фекального трансферрина (белок крови) в кале, который является более стабильным соединением и попадает в кишечник только в случае заболеваний, которые сопровождаются кровотечениями из верхних отделов кишечника.

Для анализа используется образец кала. Как правило, проводится однодневное качественное иммунохимическое исследование на фекальный гемоглобин ручными методиками. По данной методике встречается много ложноотрицательных результатов, которые связаны с деградацией гемоглобина, а также с тем, что кровотечение может иметь нестабильный характер, особенно при запорах. В случае положительного результата по гемоглобину в кале при подозрении на злокачественные новообразования толстого кишечника по назначению врача-хирурга или врача-колопроктолога проводят колоноскопию. Данное исследование представляет собой достаточно травматичную процедуру осмотра отделов кишечника, проводимую, как правило, под общим наркозом и требующую дополнительной подготовки пациента. Положительные значения фекального гемоглобина встречаются в большом количестве у пациентов с воспалительными заболеваниями кишечника, но не имеющими полипов или рака кишечника. Таким образом, необходим способ лабораторного анализа, который бы позволял дифференцировать функциональные состояния (чаще - синдром раздраженного кишечника - СРК), ВЗК и другие заболевания ЖКТ от злокачественных новообразований кишечника. Таким биомаркером, свидетельствующем о наличии воспаления в слизистой оболочке кишечника, является кальпротектин.

Согласно предложенному изобретению, при исследовании одного образца кала на анализаторе одновременно иммунохимическим методом определяют количества трех биомаркеров: фекального кальпротектина, фекального гемоглобина и фекального трансферрина. Анализ количественных результатов позволяет по уровню биомаркеров выделить не только пациентов с наличием воспалительных заболеваний кишечника, полипов, рака кишечника (стадии 0-IV) и иной патологии, но и определить степень (глубину) поражения слизистой кишечника.

Кроме того, при наличии соответствующих симптомов, по данной методике дополнительно возможно проведение одновременного исследования одного образца кала на 5 маркеров, включающих ко-

личественное определение панкреатической эластазы в кале и качественное выявление *Helicobacter pylori*.

В этом случае возможно определение не только скрытой крови в кале, что позволяет диагностировать наличие полипов и рака кишечника, но и диагностировать воспалительные заболевания кишечника, диагностировать нарушения экзокринной функции поджелудочной железы (панкреатическая эластаза) и риска развития гастрита, язвенной болезни желудка или двенадцатиперстной кишки (*Helicobacter pylori*).

Возможно проведение однодневного или двухдневного исследования на гемоглобин и трансферрин, и целесообразно одновременное проведение исследования на кальпротектин. Установлено, что при двухдневном варианте количество положительных результатов исследования на гемоглобин возрастает на 15%.

До 49% положительных результатов на фекальный гемоглобин или фекальный трансферрин определяются во втором образце кала (после повторной дефекации), в связи с этим двухдневное исследование позволяет не пропустить положительных пациентов.

Количественное определение биомаркеров в кале, в том числе трансферрина в качестве дополнительного маркера скрининга на рак кишечника, увеличивают частоту выявления онкозаболевания на 15-18%. Фекальный трансферрин позволяет выявлять дополнительно до 30% рака, формирующихся, как правило, в восходящей части кишечника, которые невозможно определить с помощью традиционных лабораторных исследований на гемоглобин. Согласно статистическим данным, около 58,4% рака (в среднем по России за 2020 год, по данным из "Состояние онкологической помощи населению России в 2020 году", под редакцией А.Д. Каприна и др.) в настоящее время формируется в зоне ободочной кишки. Эти новообразования можно выявить только по фекальному трансферрину. Также данный маркер полезен для корректировки ложноотрицательных результатов по гемоглобину (36,3%) (журнал *Diagnosis* 2015; 2(1): 53-59). Таким образом, одновременное определение двух маркеров гемоглобина и трансферрина в кале значительно повышает точность исследования. Кроме того, количественное определение данных маркеров позволяет неинвазивно оценить вероятность, стадию и локализацию поражения во всех отделах кишечника. 49% положительных результатов определяются во второй день исследования на фекальный гемоглобин или фекальный трансферрин.

С помощью этого метода возможно определить рак кишечника на ранней стадии. Точность метода составляет 96% у пациентов с раком и 88% у пациентов с предраковыми состояниями. При этом, метод исследования кала на трансферрин и фекальный гемоглобин не позволяет диагностировать воспалительные заболевания кишечника с достаточной точностью.

Проблема заключается в том, что воспалительные заболевания кишечника могут приводить к раку, и при анализе дают положительный результат на скрытую кровь. Таким образом, при лабораторной диагностике на фекальный гемоглобин и трансферрин сложно правильно дифференцировать заболевание: является ли оно воспалительным или раковым.

Для исключения/выявления воспаления, распространенности глубины поражения слизистой воспалительного процесса необходимо определение маркера воспаления кальпротектина.

Описание изобретения

Настоящее изобретение относится к способу дифференциальной диагностики синдрома раздраженной кишки, воспалительных заболеваний кишечника, предраковых состояний и рака при исследовании одного образца кала от пациента, заключающемся в том, что одновременно проводится иммунохимический анализ с определением количества фекального гемоглобина, трансферрина и кальпротектина. При превышении пороговых значений показателей (фекальный гемоглобин - 100 нг/мл; фекальный трансферрин - 50 нг/мл; кальпротектин - 50 мкг/г) в зависимости от ранжирования делается лабораторное заключение о возможной патологии (наличие воспалительного процесса). При язвенном колите и болезни Крона количество кальпротектина может превышать пороговое значение в 10-15 раз; при синдроме раздраженной кишки оба показателя будут в пределах пороговых значений. Воспалительные заболевания могут иметь различную этиологию, в т.ч. могут быть вызваны бактерией *Helicobacter pylori*.

Также, способ согласно изобретению включает проведение дополнительного анализа в образце на содержание *Helicobacter pylori* и панкреатической эластазы, при выявлении *Helicobacter pylori* делают вывод наличия воспалительного заболевания, вызванного *Helicobacter pylori*, и панкреатической эластазы - менее 200 мкг/г кала о нарушениях экзокринной функции поджелудочной железы.

При этом анализы на фекальный гемоглобин, трансферрин и кальпротектин, содержание *Helicobacter pylori* и панкреатической эластазы проводят одновременно из одного образца кала. Способ согласно изобретению является способом предварительной, безынструментальной диагностики онкологических заболеваний органов желудочно-кишечного тракта ЖКТ, предраковых состояний (полипы, гастриты, язвы желудка или двенадцатиперстной кишки и другие) и воспалительных заболеваний кишечника (ВЗК).

Подробное описание изобретения

Настоящее изобретение относится к способу дифференциальной диагностики функциональных состояний (СРК) и органических поражений кишечника, включая колиты различной этиологии, воспалительные заболевания кишечника (ЯК, Болезнь Крона и другие аутоиммунные заболевания с вовлечением

кишечника), предраковых состояний и злокачественных новообразований ЖКТ у пациента, и заключается в том, что при проведении количественного иммунохимического анализа одного образца кала пациента на три фекальных биомаркера (гемоглобин, трансферрин и кальпротектин) можно делать лабораторное заключение о наличии (степени выраженности) либо отсутствии воспалительных процессов в кишечнике. Пороговыми значениями являются: фекальный гемоглобин - 100 нг/мл фекальный трансферрин - 50 нг/мл фекальный кальпротектин - 50 мкг/г.

Способ согласно изобретению заключается в том, что проводят одновременное иммунохимическое количественное определение кальпротектина, гемоглобина и трансферрина в одном образце кала для дифференциальной диагностики функциональных (СРК) и предраковых состояний, аутоиммунных и воспалительных заболеваний кишечника (ВЗК), злокачественных новообразований. Техническим результатом изобретения является повышенная точность диагностики заболеваний кишечника, снижение времени на диагностику и более точную постановку диагноза, безболезненность и безопасность процедуры как для пациента, так и для сотрудников лаборатории.

При этом, воспалительные заболевания кишечника включают язвенный колит, болезнь Крона, энтероколит, а раковые состояния кишечника включают предраковые состояния и рак кишечника на ранних стадиях. Воспалительные заболевания могут иметь различную этиологию, в т.ч. могут быть вызваны бактерией *Helicobacter pylori*.

Также, способ согласно изобретению включает проведение дополнительного анализа в образце на содержание *Helicobacter pylori* и панкреатической эластазы, и при выявлении *Helicobacter pylori* делают вывод наличия воспалительного заболевания, вызванного *Helicobacter pylori*, и панкреатической эластазы - менее 200 мкг/г кала о нарушениях экзокринной функции поджелудочной железы.

Способ согласно изобретению заключается в том, что проводят одновременное количественное определение кальпротектина, гемоглобина и трансферрина в образце кала для раннего выявления патологий ЖКТ, а именно воспалительных заболеваний кишечника (ВЗК), геморрагических заболеваний кишечника и ранней диагностики колоректального рака с одновременной дифференциацией ВЗК, патологий ЖКТ, а именно воспалительных заболеваний кишечника (ВЗК), геморрагических заболеваний кишечника и ранней диагностики колоректального рака с одновременной дифференциацией ВЗК и более точной диагностики заболеваний в верхних отделах кишечника. Техническим результатом изобретения является повышенная точность диагностики воспалительных и раковых состояний кишечника, снижение времени на диагностику и постановку диагноза, безболезненность анализа для пациента, а также возможность дифференцированного анализа. С помощью данного метода анализа возможно установить присутствие у пациента воспалительного заболевания, в частности, язвенного колита, болезни Крона, энтероколита. Следует отметить, что фекальный гемоглобин и трансферрин измеряют в 2 образцах, сданных в 2 последовательных дня, показатели обозначены как "фекальный гемоглобин 1 день" (первый день)/ "фекальный трансферрин 1 день" (первый день) и "фекальный гемоглобин 2 день" (второй день)/ "фекальный трансферрин 2 день" (второй день). При этом, пациент собирает образец кала последовательно 2 дня, предоставляя образцы, полученные каждый определенный день, соответственно. Сбор двух образцов кала (2 дефекации) является приоритетным, что повышает частоту выявления злокачественных новообразований на 15%.

Количественные значения, указанные для маркеров "фекального гемоглобина", "трансферрина" и "кальпротектина", следует понимать как "равно и больше". Таким образом, если для маркера "фекальный гемоглобин" приведено значение "от 100 нг/мл", это значит, что значимым является содержание 100 нг/мл и выше, например, 110, 120, 130 нг/мл и так далее. То же самое действует в отношении трансферрина, и значимым является содержание трансферрина от 50 нг/мл, т.е. 50, 60, 70 нг/мл и т.д. Значимым для диагностики является содержание кальпротектина в образце от 50 мкг/г, т.е. 60, 100, 120 мкг/г и т.д.

Образец кала от пациента можно также дополнительно исследовать на содержание *Helicobacter pylori* и панкреатической эластазы. При выявлении *Helicobacter pylori* делают вывод наличия *Helicobacter pylori*, и панкреатической эластазы - менее 200 мкг/г кала о нарушениях экзокринной функции поджелудочной железы.

Все анализы кала на указанные показатели могут быть проведены традиционными или известными методами на каждый маркер, в частности, например, иммунохимическим методом (ИФА), для определения гемоглобина - методом иммунохроматографии.

Также способ согласно изобретению может быть реализован в автоматическом режиме с получением количественного результата, предпочтительно с применением автоматического анализатора.

Сбор образца стандартизован. Для проведения исследования пациенту необходимо собрать в микрочайник всего 10 мг образца, что возможно благодаря специальной конструкции контейнера. Контейнеры загружаются в анализатор оператором, исследование проводится в автоматическом режиме, что исключает ошибки связанные с наличием человеческого фактора при выполнении исследования вручную.

Далее, изобретение будет проиллюстрировано примерами, которые не ограничивают объем изобретения в какой-либо мере.

Примеры

Пример 1.

Одновременное количественное определение гемоглобина (Hb), трансферрина (Tf), кальпротектина (Ср), *Helicobacter pylori* и панкреатической эластазы.

Мужчина 47 лет, жалобы на тяжесть в животе после еды, слабость, астению, депрессию.

Пациент детально обследован, включая ЭГДС, ФКС, УЗИ брюшной полости, клинико-биохимические обследования, установлен диагноз синдрома раздраженного кишечника, обострение хронического гастрита. Проводимая терапия не дала клинически значимого эффекта. Выполнено исследование фекальных маркеров, выявлен положительный хеликобактер, повышение кальпротектина, впервые выявлен низкий уровень эластазы кала.

Результат представлены в таблице ниже.

	Hb	Tf	Hb	Tf	Ср	Hel. Pyl.	Панкр. Эл.
№	1 день	1 день	2 день	2 день	1 день	1 день	1 день
Пациент до терапии	34	49	54	32	254	+	75
Пациент после терапии	24	9	34	22	43	-	200

Таким образом, на основании данных обследования поставлен диагноз хронического недифференцированного колита, выявлена тяжелая экзокринная недостаточность поджелудочной железы, обострение хронического гастрита, ассоциированного с хеликобактерной инфекцией. Назначена заместительная ферментотерапия, проведена санация кишечника, первичная эрадикация хеликобактера - с улучшением самочувствия. Через 2 мес. выполнен контроль анализов, отмечается нормализация кальпротектина, полностью элиминирован хеликобактер, подобрана адекватная доза заместительной ферментотерапии.

Пример 2.

Женщина 45 лет, жалоб на момент осмотра не предъявляла.

По данным обследования выявлены положительные фекальные маркеры на гемоглобин и трансферрин в оба дня, выявлен НР.

	Hb	Tf	Hb	Tf	Ср	Hel. Pyl.	Панкр. Эл.
№	1 день	1 день	2 день	2 день	1 день	1 день	1 день
Пациент до терапии	110	44	54	68	22	+	500
Пациент после терапии	43	15	10	23	25	-	500

Выполнена ЭГДС, выявлена «немая» язва желудка, осложненная желудочно-кишечным кровотечением, хронический гастрит, ассоциированный с НР. Проведена первичная эрадикация НР, противоязвенная терапия. При контроле анализов. Фекальные маркеры нормализовались, НР элиминирован.

Пример 3.

Мужчина 52 г., жалобы на тяжесть в животе, боли по ходу кишечника, расстройства стула. Детально обследован, включая фекальные маркеры, выявлено увеличение фекального гемоглобина, повышение кальпротектина, дефицит панкреатической эластазы.

	Hb	Tf	Hb	Tf	Ср	Hel. Pyl.	Панкр. Эл.
№	1 день	1 день	2 день	2 день	1 день	1 день	1 день
Пациент до терапии	108	72	150	34	243	-	50
Пациент после терапии	43	34	67	31	32	-	300

Выполнена ЭГДС, ФКС, УЗИ бр. пол. Выявлены полипы нисходящего отдела ободочной кишки, выполнена полипэктомия, по результатам гистологии: тубуловорсинчатые аденомы. По результатам дефицита панкреатической эластазы установлен диагноз хронического панкреатита с экскреторной недостаточностью. Проведена колонопротективная терапия, назначена адекватная доза заместительной ферментной терапии. Через месяц выполнены контрольные анализы, отмечается нормализация показателей, подобрана заместительная ферментотерапия.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ диагностики *in vitro* онкологических заболеваний кишечника, полипов кишечника и воспалительных заболеваний кишечника (ВЗК), заключающийся в том, что проводят иммунохимический количественный анализ одного образца кала пациента одновременно на фекальный гемоглобин (ФГ), фекальный трансферрин (ФТ) и фекальный кальпротектин (ФКП), панкреатическую эластазу, где пороговые значения показателей:

ФГ - 100 нг/мл,

ФТ - 50 нг/мл,

ФКП - 50 мкг/г,

панкреатическая эластаза - 200 мкг/г,

и качественный анализ на *Helicobacter pylori*,

1) при значениях ФГ и ФТ ниже пороговых и при значении ФКП выше порогового делают вывод о наличии ВЗК,

2) при значениях ФГ и ФТ выше пороговых и при значении ФКП ниже порогового делают вывод о наличии полипов, раковых заболеваний кишечника, не связанных с воспалением;

3) дополнительно, при выявлении *Helicobacter pylori* делают вывод о присутствии *Helicobacter pylori*,

4) при значениях панкреатической эластазы менее 200 мкг/г кала делают вывод о нарушении эндокринной функции поджелудочной железы.

2. Способ по п. 1, в котором воспалительные заболевания кишечника включают язвенный колит, болезнь Крона, энтероколит.

3. Способ по п. 1, в котором раковым заболеванием является рак кишечника на ранних стадиях.

4. Способ по пп. 1-3, в котором анализ на ФГ, ФТ и ФКП проводят одновременно из одного образца.

5. Способ по п. 1, в котором измерения ФГ и ФТ проводят в разных образцах, полученных в первый день анализов и во второй день анализа, следующий за первым днем анализа.

6. Способ по пп. 1-5, который проводят в автоматическом режиме, предпочтительно с применением автоматического анализатора.

