

12.2;15

Специализированный изотопный масс-спектрометр для неинвазивной диагностики инфекции *Helicobacter Pylori* у человека

© Н.М. Блашенков, Е.С. Шешеня, С.М. Соловьев, В.Д. Саченко,
Л.Н. Галль, И.В. Заруцкий, Н.Р. Галль

Физико-технический институт им. А.Ф. Иоффе РАН, Санкт-Петербург
Санкт-Петербургский государственный политехнический университет
Институт аналитического приборостроения РАН, Санкт-Петербург
ELMITEK GmbH, Germany
ООО „Технан“, Санкт-Петербург
ООО „МС-био“, Санкт-Петербург
E-mail: gall@ms.ioffe.ru

Поступило в Редакцию 18 ноября 2012 г.

Разработан и изготовлен специализированный изотопный масс-спектрометр, предназначенный для неинвазивной диагностики инфицированности человека *Helicobacter Pylori* с помощью изотопного дыхательного теста, включая расчет низкоабберационного масс-анализатора, изготовление и тестирование специализированной системы напуска и создание малогабаритного приемника ионов. Точность измерений изотопных соотношений для $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ составила $1.7^{0}/_{00}$, что соответствует требованиям для диагностического прибора. Предварительное медицинское тестирование показало пригодность масс-спектрометра для проведения диагностики. Масс-спектрометр пригоден для измерения изотопных соотношений других легких элементов: N, O, B (по ионам BF_2^+), Ar, Cl и S.

Инфицированность человека *Helicobacter Pylori*, за открытие которой присуждена Нобелевская премия по медицине 2004 года, является причиной развития гастритов и язвенной болезни человека, а ее надежная диагностика — важная медицинская проблема. Несмотря на существование ряда методов диагностики [1], изотопный дыхательный тест, рекомендованный ВОЗ, по-прежнему остается „золотым стандартом“; он единственный гарантирует практическое отсутствие как ложноположительных, так и ложноотрицательных результатов, особенно в условиях оценки эффективности эрадикационной терапии [2].

Кроме того, неинвазивная диагностика уменьшает риск ятрогенного распространения инфекции и повышает готовность пациентов проходить обследование.

Изотопный дыхательный тест состоит в приеме пациентом внутрь небольшого количества карбамида, меченного стабильным изотопом C^{13} . При наличии хеликобактерной инфекции карбамид разлагается в желудке, изотоп C^{13} всасывается, окисляется до CO_2 и выделяется легкими. По наличию избытка C^{13} в выдыхаемом человеком углекислом газе судят о наличии инфицированности и степени осеменения желудка.

Для реализации теста необходим прибор, позволяющий надежно измерять превышение изотопного соотношения C^{13} / C^{12} над стандартом в диапазоне $1-2 \text{ ‰}$. Такими приборами являются либо специализированные изотопные масс-спектрометры, либо оптические ИК-спектрометры; приборы обоих типов имеют свои преимущества и недостатки. В данной статье описывается специализированный изотопный масс-спектрометр ТЕХНАН МИ-150 „Хеликомасс“, предназначенный для реализации изотопного дыхательного теста. Масс-спектрометр разработан в содружестве специалистами ФТИ им. А.Ф. Иоффе РАН, ИАП РАН, ООО „Технан“ и ООО „МС-био“.

Для обеспечения выполнения масс-спектрометром его основной функции — реализации изотопного дыхательного теста, прибор ТЕХНАН МИ-150 „Хеликомасс“ обладает следующими аналитическими характеристиками:

Разрешающая способность	60
Диапазон масс	44, 45, 46
Изотопический порог чувствительности, не ниже	10^{-4}
Превышение концентрации C^{13} над фоновым значением, имеющее диагностическое значение	2 ‰
Значение среднеквадратичного отклонения (СКО) случайной составляющей относительной погрешности единичного определения изотопного отношения, не выше	1.7 ‰
Габариты прибора	$1000 \times 800 \times 400 \text{ mm}$
Вес прибора с постоянным магнитом	60 kg
Потребляемая мощность, с учетом управляющего компьютера	900 W
Питание от сети	AC 220 V

Сумма указанных аналитических характеристик полностью обеспечивает реализацию изотопного дыхательного теста по стандарту, рекомендованному ВОЗ. Дополнительными требованиями, вытекающими из специфики медицинского использования масс-спектрометра, являются достаточно высокая экспрессность проведения анализа и высокая надежность его узлов, исключающая использование сложных, трудно настраиваемых или потенциально ненадежных узлов: конструктивное исполнение и применяемые методики должны быть рассчитаны на использование персоналом, обладающим относительно невысокой технической квалификацией.

Масс-спектрометр ТЕХНАН МИ-150 является изотопным масс-спектрометром широкого назначения, обеспечивающим возможность измерения изотопного состава легких элементов (H, Li, B, C, N, O, S, Cl) [3]. Масс-спектрометр построен как однокаскадный статический магнитный прибор на постоянном диспергирующем магните радиусом 125 mm; как вариант возможно использование электромагнита. Используются низкоабберационный масс-анализатор, специально рассчитанный для данного прибора. Компоновка масс-спектрометра — напольный моноблок с возможностью отделения аналитической части от электронной. Для перехода от элемента к элементу используется сменная коллекторная система. Прибор изготовлен во фтороустойчивом исполнении, приняты меры для исключения водородного обмена с элементами его конструкции. Электроника имеет блочную структуру, позволяющую ее легко изменять и наращивать, а также распределенный интеллект: микропроцессорная система для сбора информации в режиме реального времени отделена от ЭС с системой Windows и связана с ним по USB-порту. Прибор полностью автоматизирован и управляется единым лицензионно-чистым первичным ПО, написанным под Windows и пригодным как для бытового, так и для промышленного компьютера.

Медицинская модификация масс-спектрометра „Хеликомасс“ оснащена источником ионов с электронным ударом, постоянным диспергирующим магнитом на основе магнитодвижущих элементов из Nd—Fe—В, трехколлекторной системой регистрации ионов, рассчитанной на массовые числа 44, 45 и 46, а также специализированной системой ввода пробы и компьютерным алгоритмом ее использования, защиты в поставляемое ПО. Ввод пробы базируется на использовании натекателя Мамырина [4]. Для обеспечения отсутствия памяти прибора используется многоходовый алгоритм его продувки сжатым воздухом и

откачки до форвакуумного давления, который будет детально описан в специальной публикации.

Высоковакуумная откачка прибора осуществляется полностью безмасляной насосной системой Pfeiffer vacuum 071E, включающей турбомолекулярный насос с производительностью 60 l/s и мембранный насос для предварительной откачки. Вакуум в приборе при отсутствии напуска пробы составляет 10^{-9} Torr, в рабочем режиме — 10^{-6} Torr; система напуска откачивается безмасляным мембранным насосом до остаточного давления 1 Torr.

Источник ионов с электронным ударом построен по схеме Нира с использованием горизонтальных отклоняющих пластин, расположенных в области между пластинами выходного коллиматора. Магнитное поле создается внешними магнитами из Nd–Fe–B, размещенными вне вакуума. Величина магнитного поля в источнике примерно 300 G. Со стороны ионизационной камеры, противоположной катоду, расположен коллектор, на который подается электрический потенциал, притягивающий электроны (~ 30 V) для недопущения вторичной эмиссии. Коллектор перехватывает до 95% тока катода. В качестве катода используется U-образная иридиевая проволока с нанесенной на поверхность окисью иттрия. Для получения высокой точности изотопных измерений используется специальный алгоритм настройки источника, который будет описан в отдельной публикации.

Выбор трехколлекторной системы регистрации основан на использовании молекулярного иона двуокиси углерода: массовое число 44 соответствует его основной изотопной модификации $C^{12}O^{16}O^{16}$; массовое число 45 — сумме изотопных модификаций $C^{13}O^{16}O^{16}$ и $C^{12}O^{16}O^{17}$; а массовое число 46 — $C^{12}O^{16}O^{18}$ и практически незначимым добавкам изотопных модификаций вещества, содержащих два минорных изотопа [5]. При медицинской диагностике массовые числа 44 и 45 используются как носители аналитической информации об изотопном соотношении C^{13}/C^{12} , а массовое число 46 используется как тестовый показатель наличия в выдохе следов алкоголя, что позволяет отбраковывать результаты, полученные при превышении этим фоном порогового уровня в 2⁰/₀₀ от содержания CO₂. Прибор работает в масс-спектрографическом режиме с одновременной регистрацией пиков на все три коллектора; для настройки и юстировки работа переводится в масс-спектрометрический режим с разверткой ускоряющим напряжением.

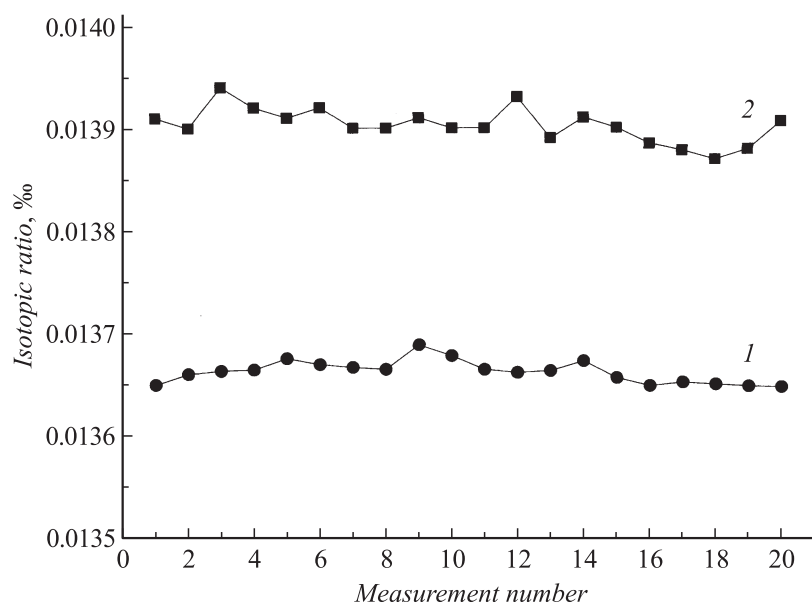


Рис. 1. Изотопные соотношения C^{13}/C^{12} в эталоне (1) и в выдохе оператора Ш. (2) при последовательных измерениях и использовании алгоритма продувки и откачки системы напуска, применяемой при медицинских измерениях. Время одного цикла измерения — 15 min.

Тестирование прибора проводилось путем многократного последовательного измерения изотопного соотношения углерода в эталоне, в качестве которого использовался коммерческий углекислый газ медицинской чистоты. Одновременно в качестве дополнительного способа использовалось измерение изотопного соотношения в выдохе оператора; измерения проводились последовательно, с использованием алгоритма очистки системы напуска, применяемого при медицинских измерениях. Результаты этих измерений представлены на рис. 1. Время одиночного измерения с учетом продувки и откачки системы напуска составляет ~ 7 min, последовательных измерений пробы и стандарта — 15 min.

Представленные на графике величины изотопного отношения R рассчитывались по формуле, обычно принятой в изотопных измерениях:

$$R = [I(45)/33]/[I(44) + I(45)/33], \quad (1)$$

где $I(44)$ и $I(45)$ — интенсивность сигнала для массовых чисел 44 и 45 соответственно, а 33 — отношение измерительных сопротивлений в приемных электрометрах. В этих расчетах вклад минорного изотопа O^{17} в измеряемую величину игнорируется, так как его учет создает поправку, заведомо не превышающую 0.5‰ .

Видно, что измерения, проводимые последовательно в течение рабочего дня (всего используется 20 измерений), дают незначительный разброс: среднеквадратичное отклонение (СКО) при доверительной вероятности 95% составляет $\sim 1.7\text{‰}$. СКО, вычисленное не по измерениям эталона, а по изотопному составу выдоха оператора, имеет несколько большую величину и составляет $\sim 2.6\text{‰}$, что обусловлено дополнительным физиологическим разбросом данных. Отметим, что систематические различия в изотопном составе углерода, входящего в коммерческий CO_2 , полученный из минерального сырья, и входящего в состав CO_2 , получаемого при выдохе оператора, надежно регистрируются прибором.

Для проведения предварительных медицинских испытаний использовалась диагностика инфицированности больных с помощью препарата „ ^{13}C -карбамид TEST“. Данный препарат выпущен в виде порошка карбамида, обогащенного на 28–32% изотопом ^{13}C с расфасовкой по 75 ml в расчете на одно измерение; препарат изготавливается в России и рекомендован к использованию по методике ВОЗ [6]. Для сравнения использовалась диагностика тех же больных на сертифицированном серийном масс-спектрометре Breathmat компании Finnigan-Mat, Германии с использованием того же препарата. Типичные кривые изменения изотопного состава C^{12}/C^{13} в выдохе больного, зарегистрированные на обоих приборах, представлены на рис. 2. Как видно, имеет место очень хорошее качественное и даже количественное совпадение результатов, особенно с учетом временных различий между проведенными измерениями. Действительно, общий ход кривых полностью воспроизводится на обоих приборах, а количественные результаты различаются не больше чем на 5‰ ; данные различия лежат в пределах физиологической variability организма.

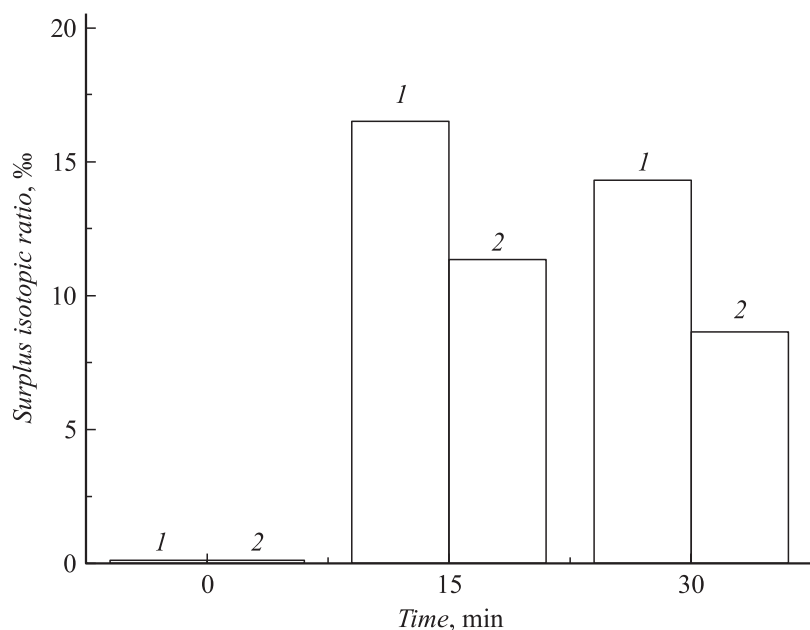


Рис. 2. Изменение изотопного соотношения C^{13}/C^{12} в выдохе больного Б. по данным измерений с использованием масс-спектрометров „Хеликомасс“ (1) и Breathmat (2).

Всего медицинское тестирование проводилось на 7 больных: у троих выявлена высокая степень осеменности, у одного — средняя степень, у двоих — низкая, а у одного больного осеменность не выявлена. Оценка величины осеменности проводилась по методике, рекомендованной ВОЗ на основе превышения изотопного соотношения C^{13}/C^{12} над нормой, регистрируемого через 15 min после приема изотопного обогащения препарата. Указанное превышение Δ рассчитывалось по формуле:

$$\Delta = [(R_{sam}/R_{st}) - 1] \cdot 1000^0/00, \quad (2)$$

где R_{sam} и R_{st} — изотопные отношения для пробы и эталона соответственно, рассчитанные по формуле (1).

Аналитические характеристики прибора, полученные в процессе испытаний, показывают также его пригодность для измерения изотопного состава других легких элементов: N, O, B (по ионам BF_2^+), Ar, Cl и S при условии установки специализированной коллекторной системы, согласованной с дисперсиями соответствующих типов ионов.

Таким образом, разработанный прибор полностью соответствует требованиям, предъявляемым к аппаратным средствам для реализации изотопного дыхательного теста и может быть использован для целей медицинской диагностики инфицированности человека *Helicobacter Pylori*. Прибор готов к проведению полномасштабных испытаний, которые предполагается провести с участием специалистов Медицинской академии им. И.И. Мечникова.

Список литературы

- [1] Кудрявцева Л.В., Щербаков П.Л., Иваников И.О., Говорун В.М. *Helicobacter pylori*-инфекция: современные аспекты диагностики и терапии. М., 2004.
- [2] Рапопорт С.И., Цодиков Г.В., Ходеев Ю.С., Зякун А.М., Семенова Н.В., Шубина Н.А. // Клиническая медицина. 2003. № 1. С. 19–23.
- [3] Галль Л.Н., Баженов А.Н., Кузьмин А.Г. // Масс-спектрометрия. 2008. Т. 5. № 4. С. 295–300.
- [4] Мамырин Б.А. // ПТЭ. 1990. № 1. С. 205–207.
- [5] Зякун А.М. Теоретические основы изотопной масс-спектрометрии в биологии. Пущино: Фотон-век, 2010. С. 7–18.
- [6] Цодиков Г.В., Рапопорт С.И., Зякун А.М. // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. 2003. № 13 (5). С. 163.