

Medizinische Klinik C (Direktor: Prof. Dr. J.F. Riemann)
Gastroenterologie, Hepatologie, Diabetologie
Klinikum der Stadt Ludwigshafen gGmbH
Akademisches Lehrkrankenhaus der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz



Neues Nichtdispersives Infrarotspektrometer in ¹³C-Harnstoff-Atemtests

Dirk Hartmann, Dieter Schilling, Jürgen F. Riemann¹

vorgelegt zur Publikation in der

Deutschen Medizinischen Wochenschrift

Korrespondenzanschrift:

Dr. med. Dieter Schilling
Medizinische Klinik C
Klinikum der Stadt Ludwigshafen gGmbH
Bremerstraße 79
67063 Ludwigshafen am Rhein
Telefon: 0621/503-4100
Fax: 0621/503-4114
e-mail: MedCLu@t-online.de

Neues Nichtdispersives Infrarotspektrometer in ¹³C-Harnstoff-Atemtests

Einleitung: Der ¹³C-Harnstoff-Atemtest zum nichtinvasiven Nachweis einer Helicobacter pylori Infektion hat weite Verbreitung in der klinischen Diagnostik gefunden. Zur Analytik des Isotopenverhältnisses wurden preisgünstigere Alternativen zur teuren Massenspektrometrie (IRMS) auf der Basis der isotopenselektiven Infrarotspektroskopie (NDIRS) entwickelt. In dieser Studie untersuchten wir prospektiv unter klinischen Bedingungen ein vereinfachtes und damit preisgünstigeres NDIR-Spektrometer im Vergleich zur Massenspektroskopie.

Methoden: 100 Patienten (53 Männer, 47 Frauen, mittleres Alter 59±14 Jahre) mit dyspeptischen Symptomen unterzogen sich dem ¹³C-Harnstoff-Atemtest zum Nachweis einer Helicobacter pylori Infektion. Die Analytik der Atemproben erfolgte sowohl mit IRMS als auch mit NDIRS.

Ergebnisse: Die Ergebnisse der ¹³CO₂-Exhalation (Delta-over-baseline-Werte) zeigten im Vergleich beider Methoden eine hohe Übereinstimmung. Die mittlere Differenz zwischen IRMS- und NDIRS-Ergebnissen lag bei 0,05±1,16 ‰. In Bezug auf IRMS als Goldstandard erreichte die Analytik mittels NDIRS in der qualitativen Eruiierung der Atemtestergebnisse eine Sensitivität von 95% und eine Spezifität von 99%.

Schlussfolgerung: Dieses neue NDIR-Spektrometer stellt eine zuverlässige, deutlich preisgünstigere Alternative zur herkömmlichen Massenspektroskopie für die ¹³C-Atemtest-Analytik dar. Somit ist jetzt auch eine Verbreitung der Atemtest-Diagnostik in kleinen gastroenterologischen Einheiten möglich.

Schlüsselwörter: ¹³CO₂-Atemtest, Massenspektrometrie, nichtdispersive Infrarotspektroskopie, Helicobacter pylori Infektion

New nondispersive infrared spectrometry in ¹³C-urea breath tests

Background: ¹³C-urea breath test have become clinical routine for the diagnosis of Helicobacter pylori infection. For the analysis of the ¹³CO₂/¹²CO₂ enrichment in breath, less expensive alternatives to the expensive mass spectrometry (IRMS) have been developed on the basis of the isotope-selective infrared spectroscopy (NDIRS). In this prospective study we tested under clinical conditions a simplified and thus less expensive NDIR-spectrometer by comparing with mass spectroscopy.

Methods: 100 patients (53 men, 47 women, mean age 59±14 years) with dyspeptic symptoms were tested for Helicobacter pylori infection using the ¹³C-urea breath test. The isotopr ratio analysis of the breath samples was performed in duplicate both using IRMS and NDIRS.

Results: The results of the baseline-corrected ¹³CO₂-exhalation values between IRMS and NDIRS were in excellent agreement. The mean difference between both methods was 0,05±1,16 ‰. Evaluating the qualitative urea breath test results in reference to IRMS as the reference the NDIRS had a sensitivity of 95% and a specificity of 99%.

Conclusion: This new developed isotope-selective nondispersive infrared spectroscopy is going to become a reliable, but low-cost alternative to expensive isotope ratio mass spectrometry in the analysis of ¹³C-breath tests. All these characteristics make NDIRS particulary suitable for laboratories where the daily number of assays is small or for use in the doctor's office

Key words: ¹³CO₂-breath test, isotope ration mass spectrometry, nondispersive infrared spectrometry, Helicobacter pylori infection

Einleitung

Der ^{13}C -Harnstoff-Atemtest zum nichtinvasiven Nachweis einer *Helicobacter pylori* Infektion hat weite Verbreitung in der klinischen Diagnostik gefunden. Im Vergleich zur Biopsie wird eine Sensitivität und Spezifität von 90-100% erreicht [3,11]. Auf Grund der Nichtinvasivität und der exzellenten diagnostischen Genauigkeit entwickelte sich dieses Verfahren in den letzten Jahren zum Standard im Screening von Patienten und in der Erfolgskontrolle nach Eradikationstherapie.

Das am häufigsten eingesetzte Testverfahren zur Untersuchung des $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$ Isotopenverhältnisses ist die Massenspektrometrie (IMRS). Auf Grund der hohen Kosten wurden preisgünstigere Alternativen zur ^{13}C -Analytik in der Atemluft auf der Basis der isotopenselektiven Infrarotspektroskopie entwickelt (NDIRS). In mehreren Untersuchungen konnte die Genauigkeit des NDIRS im Vergleich zur Massenspektroskopie gezeigt werden [9,4,2]. In dieser Studie untersuchten wir prospektiv ein neu entwickeltes, kommerziell erhältliches NDIR-Spektrometer mit vereinfachter Technik und deutlich geringerem Platzbedarf im Vergleich zur Massenspektrometrie in ^{13}C -Harnstoff-Atemtests.

Material und Methodik

Patienten

100 Patienten (53 Männer, 47 Frauen, mittleres Alter 59 ± 14 Jahre) mit dyspeptischen Symptomen wurden mit dem ^{13}C -Harnstoff-Atemtest auf eine *Helicobacter pylori* Infektion untersucht. Kein Patient stand unter einer Medikation mit Antibiotika, Protonenpumpenhemmern oder H_2 -Rezeptor-Antagonisten.

¹³C-Harnstoff-Atemtest

Nach einer nächtlichen Nüchternphase wurden den Patienten 75 mg ¹³C-Harnstoff, gelöst in 200 ml 0,1n Zitronensäure, verabreicht. Die Atemluft wurde vor und 30 Minuten nach Trinken der Testlösung gewonnen. Die Atemproben wurden für beide Testverfahren getrennt gesammelt. Ein Delta over baseline Wert >5 ‰ 30 Minuten nach dem Trinken der Testlösung galt als Nachweis für eine Helicobacter pylori Infektion [6].

Analyse von ¹³CO₂ in der Atemluft

Für die Massenspektrometrie wurde die Atemluft vom Patienten in 10 ml Vakkutainergefäßen geblasen (Labco Exutainer System, Europa Scientific, Crewe, England). Anschließend erfolgte eine Analyse mit dem Massenspektrometer (ABCA, Europa Scientific, Crewe, England).

Für die NDIR-Spektrometrie wurde die Luft in Aluminiumbeutel mit einem Volumen von 150 ml ausgeatmet (Tecobag, Tesseraux GmbH, Bürstadt, Deutschland). Die Beutel wurden anschließend direkt mit einem der Portventile des NDIR-Spektrometers (HeliFan plus, Fischer Analystechnik, Leipzig, Deutschland) verbunden und analysiert (**Abb. 1 und 2**).

Abb. 1: *Isotopenselektives Infrarotspektroskop (NDIRS) HeliFan plus.*

Abb. 2: *Technischer Aufbau des NDIRS-Gerätes*

Zur Kontrolle der Stabilität des ¹³CO₂/¹²CO₂-Verhältnisses über einen längeren Zeitraum wurde bei 10 Patienten die Atemluft in den oben genannten

Aluminiumbeuteln für 14 Tage bei Raumtemperatur lichtgeschützt aufbewahrt. Nach 14 Tagen erfolgte dann eine erneute Analyse mit dem NDIR-Spektrometer.

Statistik:

Sensitivität und Spezifität wurden als qualitative Parameter in Bezug zur IRMS als Goldstandard berechnet. Die Korrelation von IRMS und NDIRS wurde deskriptiv mit einer linearen Regressionsanalyse getestet. Die Übereinstimmung zwischen beiden Methoden wurde durch Plotting der Delta-Werte gegen Ihren Durchschnitt dargestellt [1].

Ergebnisse:

Der Vergleich der Delta-over-baseline- Werte beider diagnostischer Verfahren zeigte eine exzellente Übereinstimmung (**Abb. 3**). Der Korrelationskoeffizient lag bei 0,997. Die mittlere Differenz zwischen beiden Methoden war $0,05 \pm 1,16 \delta\%$. Die Differenz der Delta-over-baseline-Werte wurde gegen Ihren Durchschnitt geplottet (**Abb.4**).

Abb. 3: *Korrelation der Delta-over baseline Werte von IRMS und NDIRS*

Abb. 4: *Altman-Bland Plot: Die Differenz der Delta-over-baseline-Werte zwischen beiden Methoden ist geplottet gegen den Durchschnitt der Datenpaare*

Von 100 untersuchten Patienten konnte bei 19 ein DOB-Wert größer $5,0 \delta\%$ mit der Massenspektrometrie als Hinweis für eine HP-Infektion gemessen werden. Im Vergleich zur Massenspektrometrie als Referenz beobachteten wir ein falsch negatives und ein falsch-positives Ergebnis mit der NDIRS-Methode. Die

Berechnung der qualitativen Testparameter des NDIR-Spektrometers im Vergleich zur Massenspektrometrie als Referenz erbrachte eine Sensitivität von 95% und eine Spezifität von 99%.

10 Proben wurden für 14 Tage aufbewahrt und erneut gemessen. Hier zeigte sich ebenfalls eine gute Übereinstimmung der Werte, wie in Tabelle 1 dargestellt (**Tab. 1**).

Tab. 1: Vergleich der Delta-over-baseline-Werte des NDIR-Spektrometers direkt nach Gewinnung der Atemluft und 14 Tage später

Diskussion

Die *Helicobacter pylori* Infektion spielt eine wichtige Rolle in der Pathogenese von Ulcera, MALT-Lymphomen und des Magencarcinoms [2,5,8,10]. Zur Diagnostik wurden invasive (Ösophagogastroduodenoskopie mit Biopsie) und nichtinvasive (Atemtest, Stuhltest) entwickelt. In vergleichenden Studien konnte gezeigt werden, dass vor allem der ^{13}C -Harnstoff-Atemtest die Sensitivität und Spezifität gegenüber den Biopsie-basierten Tests erreicht [3,11]. Auf Grund der Nichtinvasivität und der exzellenten diagnostischen Genauigkeit entwickelte sich dieses Verfahren in den letzten Jahren zum Standard im Screening von Patienten und in der Erfolgskontrolle nach Eradikationstherapie.

Das meist verbreitete Verfahren zur Analytik des $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$ -Isotopenverhältnisses in medizinischen Atemtests ist die Massenspektrometrie. Auf Grund der hohen Anschaffungs- und Unterhaltungskosten ist diese Methode jedoch hauptsächlich in großen Kliniken und Laboreinrichtungen vorhanden. Deshalb

wurden preisgünstigere Alternativen zur Massenspektrometrie auf der Basis der isotopenselektiven Infrarotspektroskopie entwickelt.

Wir testeten prospektiv unter klinischen Bedingungen ein neu entwickeltes, kommerziell erhältliches NDIR-Spektrometer im Vergleich zur Massenspektrometrie. Die Ergebnisse der $^{13}\text{CO}_2$ -Exhalation (Delta-over-baseline-Werte) zeigten im Vergleich beider Methoden eine hohe Übereinstimmung. Die mittlere Differenz zwischen IRMS und NDIRS-Ergebnissen lag bei $0,05 \pm 1,16 \text{ } \delta\text{‰}$. Die isotopenselektive Infrarotspektroskopie stellt somit eine zuverlässige Alternative zur herkömmlichen Massenspektrometrie für die ^{13}C -Atemtest-Analytik dar. Dies entspricht den Ergebnissen vorangegangener Untersuchungen im Vergleich beider Methoden [2,4,9].

Gegenüber den bereits evaluierten NDIR-Spektrometern ist das Gerät HeliFan plus (Fischer Analysentechnik, Leipzig, Deutschland) eine Neuentwicklung auf der Basis eines vereinfachten Spektrometermoduls, das speziell an die Erfordernisse der medizinischen Atemtests angepasst wurde. Die Anordnung der Messküvetten für beide CO_2 -Isotope linear hintereinander lässt die Verwendung nur einer Messküvette zu und führt damit zur optischen und mechanischen Vereinfachung und zur wesentlichen Verkleinerung des Spektrometeranteils. Hieraus ergibt sich eine weitere Kosteneinsparung und ein deutlich geringerer Platzbedarf gegenüber anderen Geräten und vor allem der Massenspektrometrie. Dies macht den Einsatz von ^{13}C -Atemtests auch im niedergelassenen Bereich möglich und ist nicht an große Kliniken oder Laborgemeinschaften gebunden.

Durch die Neuentwicklung dieses NDIRS ist jetzt zur Messung des $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$ - Isotopenverhältnisses, gegenüber den bisher vorhandenen Geräten, ein deutlich kleineres Probenvolumen notwendig. Im mittleren patiententypischen CO_2 -Bereich von 2-3% ist ein Atemgasbedarf von lediglich 25-30 ml ausreichend.

Hierdurch ist es jetzt möglich Probenmaterial problemlos zu verschicken. Somit wird das Nutzen eines Gerätes von verschiedenen Institutionen möglich. Dass das Aufbewahren der Proben keinen Einfluss auf die Messung hat, konnten wir ebenfalls in dieser Studie nachweisen. Bei 10 Patienten wurden die Proben für 14 Tage aufbewahrt und anschließend einer erneuten Messung unterzogen. Hierbei zeigte sich eine hohe Übereinstimmung beider Messungen. Die maximale Abweichung der Delta-over-baseline-Werte lag bei 1,2 ‰ (Patient 6). Dies ist auf einen möglichen Gasverlust durch den Verschlussmechanismus der Aluminiumbeutel zurückzuführen. Das endgültige Ergebnis änderte sich jedoch bei keinem der untersuchten Patienten.

Ein Nachteil des getesteten NDIR-Spektrometer ist, dass lediglich 4 Proben hintereinander ohne erneutes Wechseln der Aluminiumbeutel analysiert werden können. Im Gegensatz hierzu kann mit einem handelsüblichen Massenspektrometer meist mehr als 200 Proben hintereinander automatisch gemessen werden. Daher ist der Einsatz in Institutionen mit einer großen Anzahl an täglichen Messungen schwierig, aber nicht unmöglich. Das Gerät HeliFan plus bietet sich jedoch auf Grund der niedrigen Kosten und des geringen Platzbedarf für einen Einsatz im niedergelassenen Bereich an. Durch die exzellente Übereinstimmung der beiden Methoden in der $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$ -Analytik ist der Einsatz dieses neuen Gerätes nicht auf die Helicobacter pylori Diagnostik beschränkt. Es wird somit eine umfassende gastroenterologische Funktionsdiagnostik mittels ^{13}C -Atemtests im niedergelassenen Bereich möglich.

Literatur

- 1 Bland JM, Altman DG. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet* 1986;1:307-310
- 2 Braden S, Caspary WF, Lembcke B. Nondispersive infrared spectrometry for $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$ -measurements: A clinically feasible analyzer for stable isotope breath tests in gastroenterology. *Z Gastroenterol* 1999;37:477-481
- 3 Cutler AF, Havstad S, Ma CK, Blaser MU, Perez-Perez GI, Schubert TT. Accuracy of invasive and non-invasive tests to diagnose *Helicobacter pylori* infection. *Gastroenterology* 1995;109:136-141
- 4 Koletzko S, Haisch M, Seeboth I, Braden B, Hengels K, Koletzko B, Hering P. Isotope-selective non-dispersive infrared spectrometry for detection of *Helicobacter pylori* infection with ^{13}C -urea breath test. *Lancet* 1995;345:961-962
- 5 Labenz J, Börsch G. Evidence for the essential role of *Helicobacter pylori* in gastric ulcer disease. *Gut* 1994;35:19-22
- 6 Logan RP, Dill S, Bauer FE, Walker MM, Hirschl AM, Gummet PA. The European ^{13}C -urea breath test for the detection of *Helicobacter pylori*. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1991;3:915-918
- 7 Parsonnet J, Friedmann GD, Orentreich N, Vogelmann H. Risk for gastric cancer in people with *CagA*-positive or *CagA*-negative *Helicobacter pylori* infection. *Gut* 1997;40:297-301
- 8 Rauws EAJ, Tytgat GNJ. Cure of duodenal ulcer associated with eradication of *Helicobacter pylori*. *Lancet* 1990;335:1233-1235
- 9 Savarino V, Mela GS, Zentilin P, Bisso G, Pivari M, Mansi C, Mele MR, Bilardi C, Vigneri S, Celle G. Comparison of isotope ratio mass spectrometry and nondispersive isotope-selective infrared spectroscopy for ^{13}C -urea breath test. *Am J Gastroenterol* 1999;94:1203-1208
- 10 Witherell HL, Hansen S, Jellum E et al. Risk for gastric lymphoma in persons with *CagA*⁺ and *CagA*⁻ *Helicobacter pylori* infection. *J Infect Dis* 1997;176:1641-1644
- 11 Zagari RM, Bazzoli F, Pozzato P, Fossi S, De Luca L, Nicolini G, Berretti D, Roda E. Non-invasive methods for the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *Ital J Gastroenterol Hepatol* 1999;31:408-415

Abbildungen

Abb. 1: Isotopenselektives Infrarotspektroskop (NDIRS) HeliFan plus.

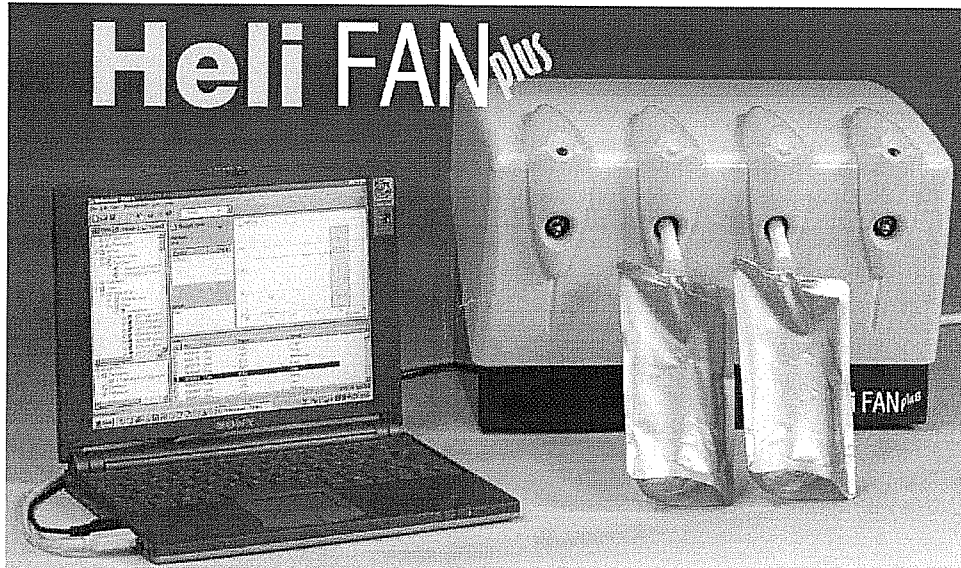


Abb. 2: Technischer Aufbau des NDIRS-Gerätes

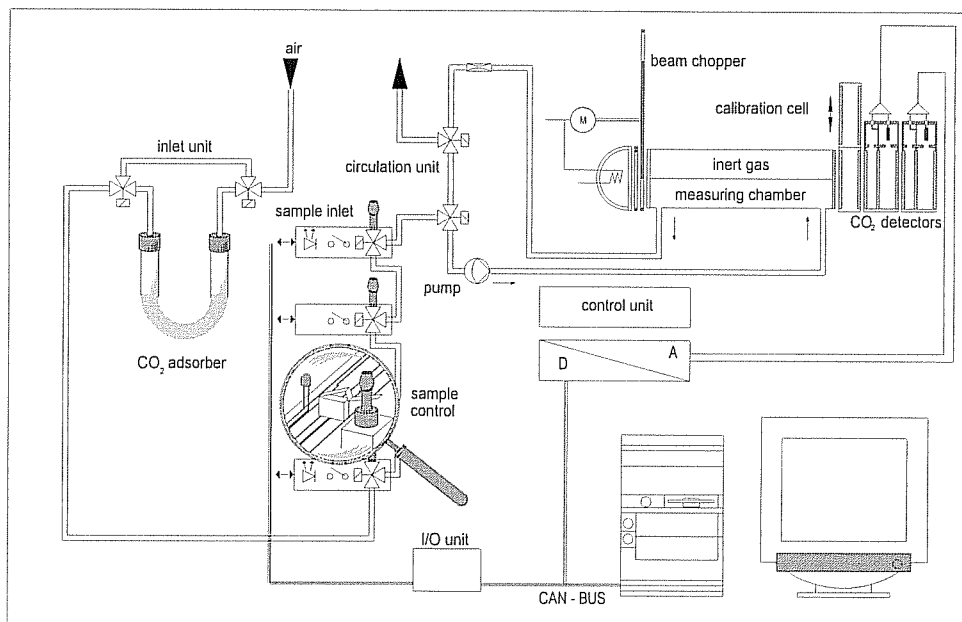


Abb. 3: Korrelation der Delta-over baseline Werte von IRMS und NDIRS

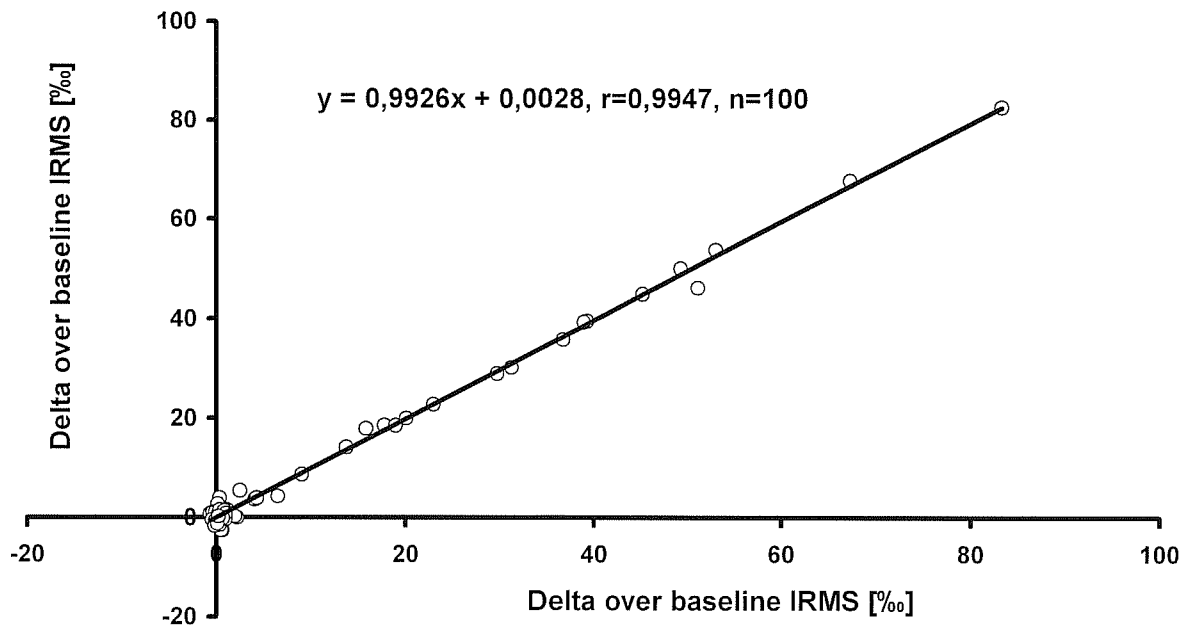


Abb. 4: Altman-Bland Plot: Die Differenz der Delta-over-baseline Werte zwischen beiden Methoden ist geplottet gegen den Durchschnitt der Datenpaare

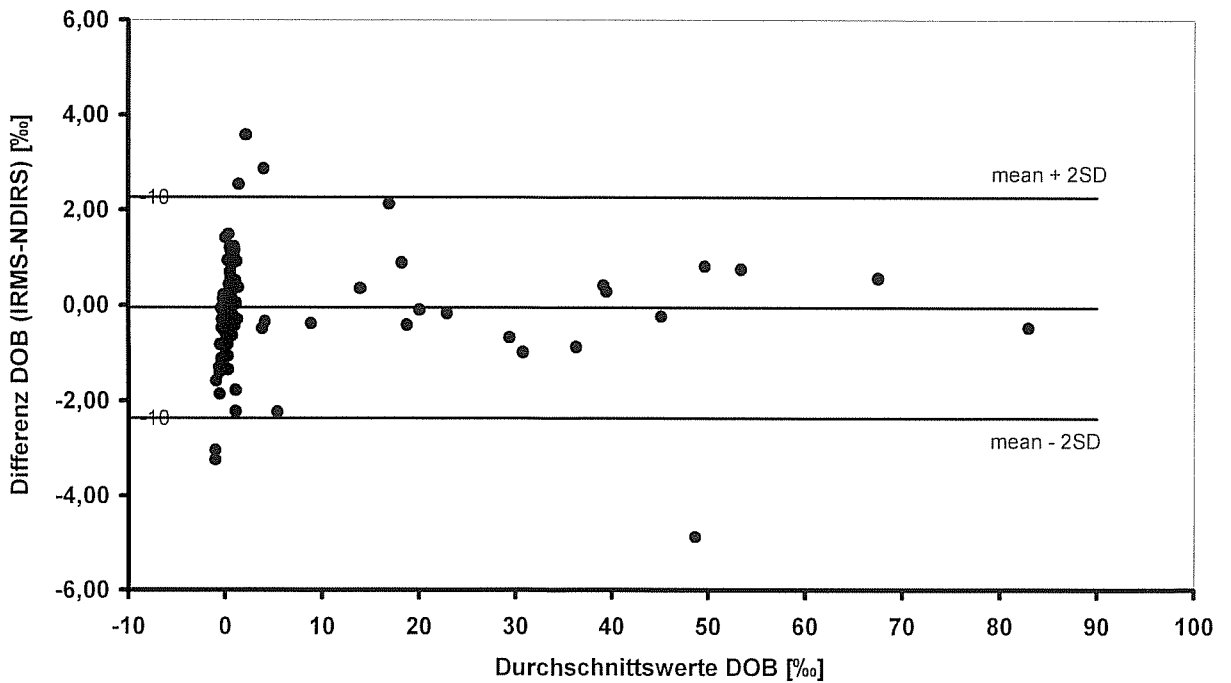


Tabelle 1: Vergleich der Delta-over-baseline Werte des NDIR-Spektrometers direkt nach Gewinnung (1. Wert) der Atemluft und 14 Tage später (2. Wert).

Patient	1. Wert	2. Wert
1	0,20	0,70
2	-0,10	-0,40
3	-0,80	0,00
4	17,70	17,90
5	1,40	0,70
6	12,50	11,30
7	1,20	0,50
8	1,10	1,30
9	0,00	-0,60
10	1,21	1,23