

Uso de Isótopos Estáveis para detecção de infecção por *Helicobacter pylori* em humanos no Brasil

Use Stable Isotope for detection of *Helicobacter pylori* infection in humans from Brazil

Vladimir E. Costa^{1,2}, Evandro T. da Silva¹, Edson M. Bruder², Carlos Ducatti^{1,2} e Maria A. M. Rodrigues³

¹Centro de Isótopos Estáveis, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (UNESP) – Botucatu (SP), Brasil.

²Departamento de Física e Biofísica, Instituto de Biociências, UNESP – Botucatu (SP), Brasil.

³Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina, UNESP – Botucatu (SP), Brasil.

Resumo

O teste respiratório com ureia marcada com ¹³C (¹³C-UBT), utilizando como analisador o espectrômetro de massa de razão isotópica (IRMS), é um diagnóstico não invasivo e com boa precisão para detectar infecção por *Helicobacter pylori* em humanos adultos e crianças. Este teste, analisado com IRMS, ainda não é empregado no Brasil. O objetivo deste trabalho é avaliar o ¹³C-UBT analisado por IRMS para detecção da infecção por *H. pylori* comparando com o exame histopatológico em pacientes submetidos ao exame de endoscopia digestiva alta no Hospital das Clínicas de Botucatu. Os resultados mostraram que a avaliação do método de diagnóstico ¹³C-UBT analisado com IRMS, para detecção de infecção por *H. pylori*, foi excelente, considerando a comparação com o exame histopatológico. Essa avaliação era esperada, pois o ¹³C-UBT possui alta sensibilidade e especificidade para o exame quando comparado a outros métodos de diagnóstico, mas ainda não tinha sido realizado no Brasil. Para a área de clínica médica, o ¹³C-UBT apresenta uma evolução importante, pois pode facilitar tanto o diagnóstico, como o tratamento da infecção por *H. pylori*. Para a pesquisa no Brasil, o ¹³C-UBT contribui tanto a área da Física Médica como para a epidemiologia e farmacologia. Com isso, foi concluído que o ¹³C-UBT pode ser utilizado para diagnosticar infecção do *H. pylori* em pacientes no Brasil.

Palavras-chave: marcação por isótopo, isótopos de carbono, *Helicobacter pylori*, testes respiratórios.

Abstract

The urea breath test labeled with ¹³C (¹³C-UBT), using the isotope ratio mass spectrometer (IRMS), is a noninvasive method with excellent accuracy for detecting *Helicobacter pylori* infection in adults and children. This test, analyzed on the IRMS, has not been used in Brazil yet. The aim of this study is to evaluate the usefulness of ¹³C-UBT analyzed by IRMS for the detection of *H. pylori* infection as compared with histopathology testing, in patients undergoing upper gastrointestinal endoscopy at the Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, Unesp. The results showed that the evaluation of ¹³C-UBT IRMS, for the diagnosis of *H. pylori* infection, was excellent, considering the comparison of the results with the histopathology test. This assessment was expected because the ¹³C-UBT has high sensitivity and specificity for the identification of *H. pylori* infection, when compared to other methods, but has not yet been performed in Brazil. In the area of clinical medicine, the ¹³C-UBT represents an important tool, since it is a noninvasive method which may facilitate both the diagnosis and evaluation of treatment of *H. pylori* infection. For research in Brazil, the ¹³C-UBT can contribute both to the area of medical physics, as a tool in epidemiology and pharmacology. In conclusion, the results of the present study demonstrate that the ¹³C-UBT is a useful noninvasive method for the diagnosis of *H. pylori* infection in patients in Brazil.

Keywords: isotope labeling, carbon isotopes, *Helicobacter pylori*, breath tests.

Introdução

Após a descoberta do *Helicobacter pylori* em 1979, que rendeu o Prêmio Nobel de Medicina e Fisiologia, em 2005, a B. J. Marshall e J. R. Warren, houve uma mudança revolucionária no entendimento do processo

de causa, diagnóstico e tratamento de vários processos patológicos do tubo digestivo alto¹. Esta descoberta, que concluiu que a bactéria infecta a mucosa gástrica da maioria dos indivíduos com doença ulcerosa duodenal ou gástrica e gastrite antral, contribuiu para inúmeras publicações científicas sobre o tema.

A erradicação da bactéria cura a gastrite e as úlceras duodenais, bem como diminui a recidiva de úlcera duodenal. O contágio com o *H. pylori* ainda não está bem estabelecido, mas acredita-se que a principal forma de aquisição da bactéria seja por meio de alimentos mal lavados. O tratamento com antibióticos tem mostrado eficiência na maioria dos casos e os métodos diagnósticos para identificar a bactéria são divididos em dois grupos: invasivos e não invasivos².

Os métodos diagnósticos invasivos são realizados, na grande maioria, por endoscopia digestiva alta, onde se pode realizar biópsia para o exame histopatológico e para cultura, ou aplicar o teste rápido de uréase. Destes, o exame histopatológico é o que possui maior sensibilidade e especificidade para detecção de infecção por *H. pylori*. Nos centros de diagnósticos brasileiros, este exame predomina devido ao baixo custo e ao aproveitamento da infraestrutura para realização da endoscopia gástrica.

O maior inconveniente dos exames invasivos por meio da endoscopia é a necessidade de sedar o paciente em alguns casos, tornando o procedimento mais laborioso de ser executado, sem mencionar o desconforto gerado no paciente que não é sedado e submetido à endoscopia. A complexidade do exame pode aumentar quando o paciente é criança.

Os diagnósticos não invasivos mais utilizados são o teste respiratório com ureia marcada no Carbono (*C-Urea Breath Test*) ou C-UBT e o teste fecal. Destes, o C-UBT é o mais aceito por possuir maior sensibilidade e especificidade quando comparado com o teste fecal²⁻⁴. O C-UBT utiliza a ureia marcada com Carbono, que é ingerida via oral. Quando presente no estômago, o *H. pylori* degrada a ureia liberando o carbono marcado, que é absorvido pelo organismo e expelido como dióxido de carbono pela respiração. Caso o dióxido de carbono não contenha o carbono marcado em doses mais elevadas que o valor basal, o paciente não possui infecção por *H. pylori*⁵⁻⁷.

Inicialmente usou-se o ¹⁴C-UBT, que é um radioisótopo ou isótopo radioativo, para marcar a ureia, e um detector de radiação para analisar o sopro⁶. Atualmente o uso do ¹⁴C na marcação da ureia para este teste foi banido e substituído pelo ¹³C-UBT, que não é radioativo e, portanto, um isótopo estável⁸. O desuso do ¹⁴C aconteceu devido ao controle rigoroso para uso de material radioativo e a exposição do paciente à radiação. Na ureia marcada com ¹³C, a análise do sopro do paciente é feita pela razão isotópica ¹³C/¹²C. Se a razão aumentar, o paciente apresenta infecção por *H. pylori*⁶.

A análise da razão isotópica ¹³C/¹²C pode ser realizada por quatro tipos de equipamentos: “*Isotope Ratio Mass Spectrometer*” – IRMS; “*Non-Dispersive, Isotope-Selective Infrared Spectroscope*” – NDIRS⁹⁻¹¹; “*Laser-Assisted Ratio Analyser*” – LARA¹²; e “*Fourier Transform Infrared Spectroscopy*” – FTIR¹³, mas estes dois últimos não são tão utilizados quanto os IRMS e NDIRS.

O NDIRS é mais utilizado, devido ao baixo custo inicial, mas possui menor sensibilidade e especificidade, fazendo

apenas uma análise qualitativa, e leva maior tempo para realizar a análise do que o IRMS^{10,14}. Por outro lado, o IRMS, além de mais preciso, tem a capacidade de analisar maior número de amostras, igualando ou diminuindo seu custo ao do NDIRS a longo prazo. Ambos têm a facilidade de não precisar deslocar o paciente para um local específico, podendo ser realizado até mesmo em um leito de hospital.

No Brasil, o ¹³C-UBT analisado por NDIRS começou a ser utilizado em pesquisa há mais de dez anos¹⁵, e hoje já pode ser encontrado em clínicas particulares, mas ainda não se tem relato do serviço ser oferecido para pacientes atendidos no setor público. O ¹³C-UBT analisado por IRMS, LARA ou FTIR ainda não são utilizados no Brasil, nem mesmo em protocolos de pesquisa. Em setembro de 2012, entrou em operação no Centro de Isótopos Estáveis do Instituto de Biociências de Botucatu-UNESP, mais um IRMS capaz de realizar análises de razão isotópica do dióxido de carbono para o teste respiratório.

O objetivo deste trabalho é avaliar o ¹³C-UBT analisado por IRMS para detecção da infecção por *H. pylori*, comparando com o exame histopatológico em pacientes submetidos ao exame de endoscopia digestiva alta no Hospital das Clínicas de Botucatu.

Material e Métodos

Os pacientes foram selecionados no momento que se apresentaram na Seção de Endoscopia do Hospital das Clínicas de Botucatu para realizar o exame de endoscopia digestiva alta pré-agendado. Na seleção, foram observadas quatro contraindicações para o ¹³C-UBT:

- 1) não querer participar da pesquisa;
- 2) estar em jejum menor de 4 horas;
- 3) possuir menos de dezoito anos de idade;
- 4) ter administrado inibidores de bomba de prótons ou antibióticos nas últimas quatro semanas⁷.

A ureia marcada com ¹³C utilizada no trabalho foi o composto líquido comercializado com a forma farmacêutica e conteúdo de solução para uso oral — em frasco de 10 mL contendo as seguintes especificações: princípio ativo de 75 mg de ¹³C-ureia (isótopo estável, não radioativo de carbono); excipiente de (substância inativa usada como veículo do princípio ativo que completam a massa ou volume especificado) ácido cítrico monohidratado em água purificada q.b. a 10 mL.

O ¹³C-UBT, nos pacientes selecionados, foi realizado na Seção de Endoscopia do Hospital, e consistiu em três etapas:

- 1) coleta do sopro em duplicata antes da ingestão da ureia e em jejum;
- 2) ingestão oral da ureia dissolvida em 200 mL de água, início do registro do tempo e bochecho com água na boca sem ingestão^{3,11};
- 3) coleta do sopro em duplicata após ingestão da ureia após 10 minutos.

Cada coleta de sopro é feita por meio de um canudo, onde o paciente assopra dentro de um tubo de 12 mL com tampa, que é fechado imediatamente após o sopro⁶. Os canudos e os tubos são descartáveis e fornecidos em um *kit* junto com a ureia marcada. A análise dos sopros devidamente armazenados nos tubos foi realizada no Centro de Isótopos Estáveis do Instituto de Biociências da UNESP, campus de Botucatu, em um IRMS.

Após o ¹³C-UBT, os pacientes foram submetidos à endoscopia digestiva alta, onde foi realizada biópsia de antro e corpo gástrico para histologia. Este trabalho foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu 4429/12.

Resultados

Os dados dos pacientes e os resultados do ¹³C-UBT e do exame histopatológico para infecção do *H. pylori* são apresentados na Tabela 1 na ordem de realização dos exames. Considerando o valor de corte entre 3,5 – 5,0‰⁷, a sensibilidade e especificidade do ¹³C-UBT foram ambas de 100%.

Os valores do ¹³C-UBT são fornecidos em ‰ (per mil), no IRMS, e apresentados em DOB (Delta over baseline-value), que é a diferença entre o valor da amostra e o valor basal inicial sem ingestão da ureia marcada, devido a uma padronização universal para o ¹³C-UBT⁶.

Estes resultados possuem precisão de $\pm 0,2\%$ no IRMS e a coleta do sopro dentro do tubo é totalmente automatizada, portanto as possíveis discrepâncias dos resultados podem estar associadas mais à coleta do sopro para o tubo pelo paciente do que à análise no IRMS.

Discussão e conclusões

A avaliação do método de diagnóstico ¹³C-UBT para detecção de infecção por *H. pylori* foi excelente, considerando a comparação com o exame histopatológico nos pacientes submetidos ao exame de endoscopia digestiva alta no Hospital das Clínicas de Botucatu.

Essa avaliação era esperada, pois o ¹³C-UBT possui alta sensibilidade e especificidade para o exame quando comparado a outros métodos de diagnóstico, mas ainda não tinha sido realizado no Brasil. Outro fato, também esperado, foi a ausência de relação dos resultados com a idade e/ou sexo dos pacientes^{4-7,11}.

Este trabalho mostra que o ¹³C-UBT analisado por IRMS pode ser utilizado na pesquisa e na clínica médica no Brasil para detecção de infecção por *H. pylori*, mas o protocolo de aplicação deve ser revisto também para a população brasileira.

Para a área de clínica médica, o ¹³C-UBT apresenta uma evolução importante, pois pode facilitar tanto o diagnóstico como o tratamento da infecção por *H. pylori*. Para a pesquisa no Brasil, o ¹³C-UBT contribui tanto para a área da Física Médica como para a epidemiologia e farmacologia.

Tabela 1. Diagnóstico da Infecção do *Helicobacter pylori* em humanos pelo teste respiratório com ureia marcada com carbono-13 (¹³C-UBT): análise comparativa com exame histopatológico.

Nº	Paciente		¹³ C-UBT	Exame Histológico	
	Idade	Sexo	DOB	Antro	Corpo
1	37	Masc.	23,53	Positivo	Positivo
2	53	Fem.	26,55	Positivo	Positivo
3	48	Fem.	-0,08	Negativo	Negativo
4	41	Fem.	0,41	Negativo	Negativo
5	31	Fem.	10,85	Positivo	Positivo
6	44	Masc.	82,81	Positivo	Positivo
7	34	Fem.	20,45	Positivo	Positivo
8	55	Masc.	0,26	Negativo	Negativo
9	30	Fem.	0,39	Negativo	Negativo
10	32	Fem.	95,43	Positivo	Positivo
11	49	Fem.	30,38	Positivo	Positivo
12	47	Masc.	8,91	Positivo	Positivo
13	62	Fem.	0,22	Negativo	Negativo
14	69	Fem.	0,47	Negativo	Negativo
15	62	Masc.	1,24	Negativo	Negativo
16	58	Fem.	22,16	Positivo	Positivo
17	59	Masc.	26,88	Positivo	Positivo
18	20	Fem.	0,97	Negativo	Negativo
19	18	Fem.	0,67	Negativo	Negativo
20	36	Masc.	15,19	Positivo	Positivo
21	29	Fem.	1,23	Negativo	Negativo

DOB: Delta over baseline-value.

Posteriormente, o ¹³C-UBT pode ser avaliado e utilizado em crianças e, para isso, fica sugerido uma reavaliação do protocolo, que já difere entre populações no mundo — por exemplo, o tempo de coletado sopro após a ingestão da ureia marcada, o valor de corte que caracteriza o exame positivo ou negativo, o tempo necessário para o jejum e até uma possível correlação da densidade de colonização da mucosa gástrica pelo *H. pylori*^{11,16-19}.

Em síntese, o presente estudo demonstra adequabilidade do método ¹³C-UBT para diagnóstico de infecção pelo *H. pylori* em pacientes no Brasil.

Referências

1. Marshall BJ, Warren JR. Unidentified Curved Bacilli in the Stomach of Patients with Gastritis and Peptic-Ulceration. *Lancet*. 1984;1(8390):1311-5.
2. Selgrad M, Kandulski A, Malfertheiner P. Helicobacter Pylori: Diagnosis and Treatment. *Curr Opin Gastroenterol*. 2009;25(6):549-56.
3. Calvet X, Sánchez-Delgado J, Montserrat A, Lario S, Ramírez-Lázaro MJ, Quesada M, et al. Accuracy of Diagnostic Tests for Helicobacter pylori: a Reappraisal. *Clin Infect Dis*. 2009;48(10):1385-91.
4. Peng NJ, Lai KH, Lo GH, Hsu PI. Comparison of Noninvasive Diagnostic Tests for Helicobacter pylori Infection. *Med Princ Pract*. 2009;18(1):57-61.
5. Gisbert JP, Pajares JM. Review Article: 13C-Urea Breath Test in the Diagnosis of Helicobacter pylori Infection - a Critical Review. *Aliment Pharmacol Ther*. 2004;20(10):1001-17.
6. Braden B, Lembcke B, Kuker W, Caspary WF. 13C-breath tests: current state of the art and future directions. *Dig Liver Dis*. 2007;39(9):795-805.
7. Braden B. Methods and functions: Breath tests. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2009;23(3):337-52.
8. Graham DY, Klein PD, Evans DJ Jr, Evans DG, Alpert LC, Opekun AR, et al. Campylobacter pylori detected noninvasively by the 13C-Urea Breath Test. *Lancet*. 1987;1(8543):1174-7.
9. Kato M, Saito M, Fukuda S, Kato C, Ohara S, Hamada S, et al. 13C-Urea Breath Test, Using a New Compact Nondispersive Isotope-Selective Infrared Spectrophotometer: Comparison with Mass Spectrometry. *J Gastroenterol*. 2004;39(7):629-34.
10. Machado RS, Kawakami E, Da Silva Patrício FR, Reber M. Urease Activity Does Not Reflect the Degree of Colonization by Helicobacter pylori in Children. *Pediatr Int*. 2006;48(4):398-402.
11. Leal Y a, Flores LL, Fuentes-Pananá EM, Cedillo-Rivera R, Torres J. 13C-Urea Breath Test for the Diagnosis of Helicobacter pylori Infection in Children: a Systematic Review and Meta-Analysis. *Helicobacter*. 2011;16(4):327-37.
12. Savarino V, Landi F, Dulbecco P, Ricci C, Tessieri L, Biagini R, et al. Isotope Ratio Mass Spectrometry (IRMS) Versus Laser-Assisted Ratio Analyzer (LARA): A Comparative Study Using Two Doses of [13 C] Urea and Two Test Meals for Pre- and Posttreatment Diagnosis of Helicobacter pylori Infection. *Dig Dis Sci*. 2000;45(11):2168-74.
13. Motta O, De Caro F, Quarto F, Proto A. New FTIR methodology for the evaluation of (13)C/(12)C isotope ratio in Helicobacter pylori infection diagnosis. *Journal Infect*. 2009;59(2):90-4.
14. Parente F, Bianchi Porro G. The (13)C-urea breath test for non-invasive diagnosis of Helicobacter pylori infection: which procedure and which measuring equipment? *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2001;13(7):803-6.
15. Kawakami E, Machado RS, Reber M, Patrício FR. 13 C-Urea Breath Test With Infrared Spectroscopy for Diagnosing Helicobacter pylori Infection in Children and Adolescents. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2002;35(1):39-43.
16. Vaira D, Gatta L, Ricci C, Di Mario F, Lanzini A. Accuracy of Urea Breath Tests Tablets After 10 Minutes Compared With Standard 30 Minutes to Diagnose and Monitoring Helicobacter pylori Infection : A Randomized Controlled Trial. *J Clin Gastroenterol*. 2009;43(7):693-4.
17. Suto H, Azuma T, Ito S, Ito Y, Miyaji H, Yamazaki Y, et al. Endoscopic [13C]-urea breath test for quantification of Helicobacter pylori infection. *J Gastroenterol Hepatol*. 2000;15(2):161-7.
18. Kopácová M, Bures J, Vorisek V, Konstacký M, Rejchrt S, Zivný P, et al. Comparison of different protocols for 13C-urea breath test for the diagnosis of Helicobacter pylori infection in healthy volunteers. *Scand J Clin Lab Invest*. 2005;65(6):491-8.
19. Mana F, Franken PR, Ham HR, Urbain D. Cut-off point, timing and pitfalls of the 13C-urea breath test as measured by infrared spectrometry. *Dig Liver Dis*. 2001;33(1):30-5.