



**COMPARAÇÃO DO ^{13}C -UBT COM MÉTODO CONVENCIONAL
PARA DIAGNÓSTICO DA INFECÇÃO POR *Helicobacter pylori* NO
HOSPITAL DAS CLÍNICAS DE BOTUCATU-SP**

CAIO SANTILONI CURY

Monografia apresentada ao Instituto de
Biociências, Universidade Estadual "Júlio de
Mesquita Filho" - UNESP, Campus de
Botucatu, para obtenção do título de
Bacharel em Física Médica

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus por estar comigo nesse fim de uma etapa, e o começo de um novo passo para o futuro.

Gostaria de agradecer também a minha família, que é a base de tudo o que eu sou hoje e sempre esteve comigo em todos os momentos da minha vida, seja ele bom ou ruim. Em especial a minha mãe Valquiria e a minha irmã Sarah, que sem elas eu não seria ninguém, sempre estiveram ao meu lado e sempre me deram suporte para tudo o que eu achava ser certo para ser feito nessa vida.

E ao meu orientador, Prof. Assist. Dr. Vladimir Eliodoro Costa, a oportunidade de fazer estágio em uma área que gostei muito, por todos os ensinamentos, a dedicação comigo, a paciência, as conversas e os incentivos que me deu durante todo o tempo de estágio.

RESUMO

Com a descoberta do *Helicobacter pylori* e a utilização do diagnóstico com ^{13}C -*urea breath test* (^{13}C -UBT) analisado por espectrômetro de massa de razão isotópica - IRMS o diagnóstico tornou-se mais simples, mas no Brasil esse tipo de diagnóstico ainda não é utilizado. O objetivo deste trabalho é avaliar o ^{13}C -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 ^{13}C -UBT analisado com IRMS para detecção de infecção por *H. pylori* foi excelente considerando a comparação com o exame histopatológico.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	6
2 OBJETIVO	9
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	9
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	10
5 CONCLUSÃO	14
6 BIBLIOGRAFIA	14

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Diagnóstico da Infecção do <i>Helicobacter pylori</i> em humanos pelo teste respiratório com ureia marcada com carbono-13 (^{13}C -UBT): análise comparativa com exame histopatológico.....	10
Tabela 2: Comparação entre os gêneros dos pacientes e se isso influencia na presença de <i>H. pylori</i>	12
Tabela 3: Tabela de confusão.....	13

1 INTRODUÇÃO

Após a descoberta do *Helicobacter pylori* em 1979, que rendeu o Prêmio Nobel de Medicina e Fisiologia em 2005 para 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 alta (Marshall et al., 1984). Esta descoberta contribuiu para inúmeras publicações científicas sobre o tema que concluiu que a bactéria infecta a mucosa gástrica da maioria dos indivíduos com doença ulcerosa duodenal ou gástrica e gastrite antral. A erradicação da bactéria cura a gastrite e as úlceras duodenais, bem como, diminui a recidiva de úlcera duodenal (Selgrad et al., 2009).

O gênero *Helicobacter* foi definido por estudos de composição do RNA ribossômico, de sequenciamento e hibridação do DNA da bactéria. Este gênero, juntamente com outros (*Campylobacter*, *Arcobacter* e *Wolinella*), constitui a superfamília VI de bactérias gram-negativas.

A morfologia do *H. pylori*, observada à microscopia ótica e eletrônica, é homogênea, apresentando-se com estrutura encurvada ou espiralada, de superfície lisa e extremidades arredondadas, móvel, não-esporulada e microaerófila. Mede aproximadamente 0,5µm a 0,1µm de largura e 3µm de comprimento, possuindo de quatro a seis flagelos unipolares embainhados e bulbos terminais nas extremidade lisas.

O gênero *Helicobacter* é composto atualmente de, no mínimo 27 espécies que compartilham propriedades comuns, especialmente aquelas relacionadas com a vida no estômago, onde podem localizar-se no fundo e no corpo, mas é principalmente no antro onde as bactérias são encontradas em maior densidade. O *H. pylori* pode distribuir-se de maneira focal, segmentar ou difusa ao longo da mucosa gástrica, localizando-se no interior ou sob a camada de muco que recobre o epitélio da superfície ou das fovéolas, em íntimo contato com a membrana luminal das células epiteliais que revestem a mucosa gástrica.

O *H. pylori* possui capacidade excepcional de aderência. É adaptado para colonizar somente a mucosa gástrica, sendo observado raramente em áreas de

mataplasia intestinal. No duodeno, a bactéria coloniza áreas de mataplasia gástrica, fator de grande importância para seu papel na patogênese da úlcera péptica duodenal. A afinidade do *H. pylori* pelas células mucíparas gástricas deve-se à composição neutra do muco gástrico, diferente dos mucopolissacarídeos ácidos produzidos pelas células caliciformes da metaplasia intestinal (Ladeira et al., 2003).

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 invasivos (Selgrad et al., 2009).

Os métodos diagnósticos invasivos são realizados, na grande maioria, por endoscopia digestiva alta, onde se realiza 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.

Os diagnósticos não invasivos mais utilizados são o teste respiratório com ureia marcada no Carbono - 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 fecal (Selgrad et al., 2009), (Calvet et al., 2009) e (Peng et al., 2009). 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* (Gisbert et al., 2004), (Braden et al., 2007) e (Braden et al. 2009).

Inicialmente usou-se o ^{14}C -UBT, que é um radioisótopo ou isótopo radioativo, para marcar a ureia e um detector de radiação para analisar o sopro (Braden et al., 2007). Atualmente o uso do ^{14}C na marcação da ureia para este teste foi substituído pelo ^{13}C -UBT que não é radioativo, e portanto, um isótopo estável (Graham et al., 1987). O

desuso do ^{14}C aconteceu devido ao controle rigoroso para uso de material radioativo e a exposição do paciente à radiação.

Na ureia marcada com ^{13}C , a análise do sopro do paciente é feita pela razão isotópica $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$. Se a razão aumentar o paciente apresenta infecção por *H. pylori* (Braden et al., 2007). A razão isotópica $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ é expressa em ‰ e é apresentada em Delta over baseline-value - DOB que a diferença do valor da amostra menos o valor basal (Braden et al., 2007). A análise da razão isotópica $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ pode ser realizada por quatro tipos de equipamentos: *Isotope Ratio Mass Spectrometer* - IRMS; *Non-Dispersive Isotope-Selective Infrared Spectroscope* - NDIRS (Kato et al., 2004), (Machado et al., 2006) e (Leal et al., 2011); *Laser-Assisted Ratio Analyser* - LARA (Savarino et al., 2000); e *Fourier Transform Infrared Spectroscopy* - FTIR (Motta et al., 2009), 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 (Parente et al., 2001) e (Machado et al., 2006). 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 à 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.

A dose de ureia utilizada no teste respiratório já foi alvo de controvérsias, mas hoje a literatura chegou a um consenso que o mínimo necessário para o exame em adultos e crianças é de 75 mg de ureia com 1,4 g de ácido cítrico (Parente et al., 2001), (Kopácová et al. 2005), (Calvet et al., 2009) e (Braden et al., 2009), sendo que quase todos os fabricantes utilizam estas doses independentemente do tipo de analisador.

Não existe registro no Brasil do uso do ^{13}C -UBT analisado por IRMS.

2 OBJETIVO

O objetivo é a comparação dos resultados obtidos através do ^{13}C -UBT analisado por IRMS (Espectrômetro de Massa de Razão Isotópica) com os da EDA (Endoscopia Digestiva Alta), e verificar possíveis relações do resultado com a idade, sexo dos pacientes e o horário de coleta.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Foram selecionados 52 pacientes todos adultos 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 contra indicações para o ^{13}C -UBT: 1) não querer participar da pesquisa; 2) estar em jejum menor que 4 horas; 3) possuir menos de dezoito anos de idade; 4) ter administrado inibidores de bomba de prótons (omeprazol) ou antibióticos nas últimas quatro semanas.

A ureia marcada com ^{13}C 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 ^{13}C -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 depurada q.b. a 10 ml (Braden et al., 2009).

O ^{13}C -UBT nos pacientes selecionados foi realizado na Seção de Endoscopia do Hospital das Clínicas de Botucatu 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 (Calvet et al., 2009) e (Leal et al., 2011); 3) coleta do sopro em duplicata após ingestão da ureia em 15 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 de rosca que é fechado imediatamente após o sopro (Braden et al., 2007). Os canudos e os tubos são descartáveis e fornecidos em um

kit junto com a ureia marcada. As análises dos sopros devidamente armazenados nos tubos foram realizadas em um IRMS (Espectrômetro de Massa de Razão Isotópica) no Centro de Isótopos Estáveis do Instituto de Biociências da UNESP de Botucatu.

Após o ^{13}C -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 local da Faculdade de Medicina de Botucatu e possui número de protocolo (292.236).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dados dos pacientes e os resultados do ^{13}C -UBT e do teste histopatológico para infecção por *H. pylori* são apresentados na Tabela 1. Considera-se o valor de corte entre 3,5 e 5,0 ‰.

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

Paciente				^{13}C -UBT	Exame histopatológico	
Nº	Idade	Sexo	Horário	DOB*	Antro	Corpo
1	37	M	Manhã	28,88	Positivo	Positivo
2	53	F	Tarde	31,43	Positivo	Positivo
3	48	F	Tarde	-0,48	Negativo	Negativo
4	41	F	Manhã	0,34	Negativo	Negativo
5	31	F	Tarde	14,15	Positivo	Positivo
6	44	M	Tarde	91,58	Positivo	Positivo
7	34	F	Tarde	18,55	Positivo	Positivo
8	55	M	Tarde	0,45	Negativo	Negativo
9	30	F	Tarde	0,23	Negativo	Negativo
10	32	F	Manhã	103,44	Positivo	Positivo
11	49	F	Manhã	28,64	Positivo	Positivo
12	47	M	Manhã	9,96	Positivo	Positivo
13	62	F	Tarde	-0,05	Negativo	Negativo

14	69	F	Manhã	0,43	Negativo	Negativo
15	62	M	Manhã	1,34	Negativo	Negativo
16	58	F	Tarde	28,88	Positivo	Positivo
17	59	M	Tarde	33,24	Positivo	Positivo
18	20	F	Tarde	1,12	Negativo	Negativo
19	18	F	Tarde	0,64	Negativo	Negativo
20	36	M	Manhã	19,09	Positivo	Positivo
21	29	F	Tarde	0,65	Negativo	Negativo
22	41	M	Tarde	0,77	Negativo	Negativo
23	64	M	Tarde	53,14	Positivo	Positivo
24	52	M	Tarde	47,58	Positivo	Positivo
25	34	F	Manhã	0,69	Negativo	Negativo
26	55	F	Manhã	0,77	Negativo	Negativo
27	48	M	Tarde	79,31	Positivo	Positivo
28	52	M	Tarde	0,62	Negativo	Negativo
29	59	M	Tarde	12,63	Positivo	Positivo
30	30	F	Manhã	0,75	Negativo	Negativo
31	69	M	Manhã	0,40	Negativo	Negativo
32	62	M	Tarde	12,81	Positivo	Positivo
33	54	M	Tarde	-0,01	Negativo	Negativo
34	42	F	Tarde	0,94	Negativo	Negativo
35	69	F	Tarde	-0,16	Negativo	Negativo
36	47	M	Tarde	0,53	Negativo	Negativo
37	67	F	Tarde	0,44	Negativo	Negativo
38	53	F	Tarde	0,44	Negativo	Negativo
39	70	M	Tarde	0,57	Negativo	Negativo
40	51	F	Tarde	38,39	Positivo	Positivo
41	57	M	Manhã	0,45	Negativo	Negativo
42	40	F	Tarde	0,62	Negativo	Negativo
43	40	F	Tarde	0,52	Negativo	Negativo
44	48	M	Tarde	-0,03	Negativo	Negativo
45	75	M	Tarde	0,77	Negativo	Negativo
46	61	F	Tarde	0,23	Negativo	Negativo

47	66	F	Manhã	104,31	Positivo	Positivo
48	53	F	Tarde	39,17	Positivo	Positivo
49	42	F	Tarde	-0,77	Negativo	Negativo
50	53	F	Manhã	1,71	Negativo	Negativo
51	59	M	Manhã	31,67	Positivo	Positivo
52	56	F	Tarde	0,32	Negativo	Negativo

*DOB - Delta Over Baseline-value

Os resultados mostraram que a sensibilidade e a especificidade do ^{13}C -UBT foram ambos de 100%.

Os valores do ^{13}C -UBT são fornecidos em ‰ (permil) no IRMS e apresentados em DOB, 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 ^{13}C -UBT.

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

Verificou-se se a idade, gênero e o horário da coleta influenciam no resultado do exame. Vemos na Tabela 2, se o gênero da pessoa influencia no resultado do teste.

Tabela 2: Comparação entre os gêneros dos pacientes e se isso influencia na presença de *H. pylori*.

	Presença de <i>H. pylori</i>	Total	Porcentagem
Masculino	11	22	50%
Feminino	9	30	30%
Total	20	52	

Tabela 3: Tabela de confusão.

	Positivo	Negativo	
Positivo	38,46%	0,00%	Precisão: 100,00%
Negativo	0,00%	61,54%	Valor Preditivo Negativo: 100,00%
	Sensibilidade: 100,00%	Especificidade: 100,00%	Acurácia: 100%

Com a tabela de confusão acima podemos ver que a acurácia do teste é de 100% mostrando que o exame é uma exame de alto acerto, mostra também a sensibilidade de 100% e a especificidade de 100%.

Como ainda não havia sido feito no Brasil, ajudará de uma forma boa o diagnóstico da bactéria, pois é um exame não invasivo, com um valor baixo para o exame. Mostrando que o exame por ^{13}C -UBT analisado por IRMS poderá ser utilizado na pesquisa e na clínica médica brasileira para a detecção de infecção por *H. pylori*. Agora que temos uma padronização para a população da região de Botucatu, ficará mais fácil ainda o diagnóstico.

O exame irá facilitar e muito na área de clínica médica pois facilitará o diagnóstico e o tratamento da infecção por *H. pylori* contribuindo assim para a área de Física Médica, como também a área de epidemiologia e farmacologia.

Mas a frente poderemos estender o estudo com crianças, havendo algumas alterações no protocolo, pois não se sabe exatamente se em crianças a resposta é a mesma ou não.

Em síntese o estudo mostra que o método do ^{13}C -UBT é adequado e muito importante para o diagnóstico de infecção por *H. pylori* em pacientes brasileiros. Sendo um grande avanço nessa área.

5 CONCLUSÃO

A avaliação do teste ¹³C-UBT foi excelente, pois mostrou que sua especificidade e sensibilidade são de 100% se comparado com o Padrão Ouro que é a endoscopia dos pacientes submetidos a esse exame no Hospital das Clínicas de Botucatu. Não foram encontrado diferença estatística nos resultados entre sexo dos pacientes.

6 BIBLIOGRAFIA

Braden, B. *Methods and functions: Breath tests. Best practice & research. Clinical gastroenterology*, vol. 23, p. 337–52, Jan. 2009.

Braden, B., Lembcke, B., Kuker, W. e Caspary, W. F. *13C-breath tests: current state of the art and future directions. Digestive and liver disease*, vol. 39, p. 795–805, Sep. 2007.

Calvet, X., Sánchez-Delgado, J., Montserrat, A., Lario, S., Ramírez-Lázaro, M. J., Quesada, M., Casalots, A., Suárez, D., Campo, R., Brullet, E., Junquera, F., Sanfeliu, I. e Segura, F. *Accuracy of diagnostic tests for Helicobacter pylori: a reappraisal. Clinical infectious diseases*, vol. 48, p. 1385–91, May 2009.

Gisbert, J. P. e Pajares, J. M. *Review article: 13C-urea breath test in the diagnosis of Helicobacter pylori infection -- a critical review. Alimentary pharmacology & therapeutics*, vol. 20, p. 1001–17, Nov. 2004.

Graham, D. Y., Klein, P. D., Evans, D. J., Evans, D. G., Alpert, L. C., Opekun, A. R. e Boutton, T. W. *Campylobacter-pylori detected noninvasively by the C-13 Urea Breath Test. Lancet*, vol. 329, p. 1174–1177, May. 1987.

Kopácová, M., Bures, J., Vorísek, V., Konstacký, M., Rejchrt, S., Zivný, P., Douda, T. e Palicka, V. *Comparison of different protocols for 13C-urea breath test for the diagnosis of Helicobacter pylori infection in healthy volunteers. Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation*, vol. 65, p. 491–8, Jan. 2005.

Kato, M., Saito, M., Fukuda, S., Kato, C., Ohara, S., Hamada, S., Nagashima, R., Obara, K., Suzuki, M., Honda, H., Asaka, M. e Toyota, T. *13C-Urea breath test, using a new compact nondispersive isotope-selective infrared spectrophotometer: comparison with mass spectrometry. Journal of gastroenterology*, vol. 39, p. 629–34, Jul. 2004.

Ladeira, M.S.P., Salvadori, D.M.F., Rodrigues, M.A.M. Biopatologia do *Helicobacter pylori*. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*. vol. 39, n. 4, p. 335-342, Mar. 2003

Leal, Y. A., Flores, L. L., Fuentes-Pananá, E. M., Cedillo-Rivera, R. e Torres, J. *¹³C-urea breath test for the diagnosis of Helicobacter pylori infection in children: a systematic review and meta-analysis*. *Helicobacter*, vol. 16, p. 327–37, Aug. 2011.

Machado, R. S., Kawakami, E., Da Silva Patrício, F. R. e Reber, M. *Urease activity does not reflect the degree of colonization by Helicobacter pylori in children*. *Pediatrics international*, vol. 48, p. 398–402, Aug. 2006.

Marshall, B. J. e Warren, J. R. *Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic-ulceration*. *Lancet*, vol. 323, p. 1311–1315, Jun. 1984.

Motta, O., De Caro, F., Quarto, F. e Proto, A. *New FTIR methodology for the evaluation of (¹³C)/(¹²C) isotope ratio in Helicobacter pylori infection diagnosis*. *The Journal of infection*, vol. 59, p. 90–4, Aug. 2009.

- Parente, F. e Bianchi Porro, G. *The (13)C-urea breath test for non-invasive diagnosis of Helicobacter pylori infection: which procedure and which measuring equipment? European journal of gastroenterology & hepatology*, vol. 13, p. 803–6, Jul. 2001.
- Peng, N.-J., Lai, K.-H., Lo, G.-H. e Hsu, P.-I. *Comparison of noninvasive diagnostic tests for Helicobacter pylori infection. Medical principles and practice*, vol. 18, p. 57–61, Jan. 2009.
- Savarino, V., Landi, F., Dulbecco, P., Ricci, C., Tessieri, L., Biagini, R., Gatta, L., Miglioli, M., Celle, G. e Vaira, D. *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. Digestive Diseases and Sciences*, vol. 45, p. 2168–2174, Jan. 2000.
- Selgrad, M., Kandulski, A. e Malfertheiner, P. *Helicobacter pylori: diagnosis and treatment. Current opinion in gastroenterology*, vol. 25, p. 549–56, Nov. 2009.