

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU
CENTRO DE ISÓTOPOS ESTÁVEIS “PROF. DR. CARLOS DUCATTI”

TRABALHO DE CONCLUSÃO DO CURSO DE FÍSICA MÉDICA

**TESTE RESPIRATÓRIO PARA DETECÇÃO DA INFECÇÃO
PELO *HELICOBACTER PYLORI* UTILIZANDO UREIA
ENDÓGENA E ANALISADO POR IRMS**

Ana Beatriz Marques Carlos

Botucatu
2018

Ana Beatriz Marques Carlos

**TESTE RESPIRATÓRIO PARA DETECÇÃO DA INFECÇÃO
PELO *HELICOBACTER PYLORI* UTILIZANDO UREIA
ENDÓGENA E ANALISADO POR IRMS**

Trabalho de conclusão de curso apresentado
ao Instituto de Biociências da Universidade
Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”,
Campus de Botucatu, como requisito para
obtenção do Título de Bacharel em Física
Médica.

Orientador: Prof. Adj. Vladimir Eliodoro Costa

Centro de Isótopos Estáveis – IBB/UNESP

Botucatu
2018

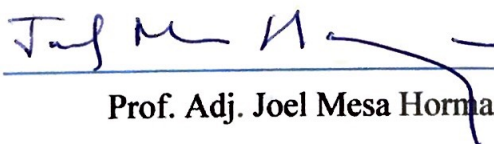
Examinadores

A handwritten signature in blue ink, consisting of a large loop followed by a horizontal stroke and a diagonal line crossing it.

Prof. Adj. Vladimir Eliodoro Costa

A handwritten signature in blue ink, featuring a large loop followed by several vertical strokes and a horizontal line.

Prof. Dr. Paulo Roberto Rodrigues Ramos

A handwritten signature in blue ink, starting with a large loop followed by a horizontal line and a diagonal stroke.

Prof. Adj. Joel Mesa Hormaza

Agradecimentos

Sou muito grata aos meus pais, pessoas maravilhosas de quem eu muito me orgulho e reconheço que fizeram ser quem sou. Mostraram-me que o mundo é muito grande para sonhar pequeno, assim como foram e estão presentes em cada passo dando seu suporte em todos os aspectos da vida. Minha irmã Ana Laura, e minha avó Marieta também fazem parte deste agradecimento, pois sempre estão presente torcendo e orando por mim.

Agradeço ao meu orientador por toda atenção, cuidado, orientação e dedicação. Tudo o que vejo nele, seu caráter e humildade, inspiram-me a traçar caminhos cada vez mais audaciosos, porque sei que tenho com quem contar.

Deixo aqui minha gratidão ao Centro de Isótopos Estáveis “Prof. Dr. Carlos Ducatti” e toda sua equipe, que estiveram presente em cada parte deste TCC, com apoio muito além do acadêmico. Sempre pude contar com todos eles, Mariana, Cibele, Nádia, Evandro, professor Paulo, Lúcia Cristina e todos os alunos.

Agradeço também aos meus professores e amigos que fiz nesta universidade, acompanhamo-nos uns aos outros durante esses anos, e por isso só tenho o que agradecer por toda convivência, carinho e companheirismo.

Agradeço à FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pelo apoio financeiro (número de processo: 2017/13021-7).

Resumo

A infecção pelo *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) deve estar presente em cerca de metade da população mundial e pode estar associada a úlceras pépticas, gastrite e câncer de estômago. Seu diagnóstico pode ser realizado por meio de métodos não invasivos como o teste respiratório com isótopos estáveis do carbono (^{13}C -UBT). Recentemente, foi proposto um novo protocolo para o ^{13}C -UBT sem a necessidade de usar a ureia marcada no ^{13}C na solução ácida e sendo analisada a razão isotópica do sopro por espectroscopia de cavidade, mas este novo protocolo ainda não havia sido verificado pela análise do sopro por espectrometria de massa de razão isotópica (ABCA-IRMS). Desta forma, o objetivo deste projeto foi avaliar a detecção da infecção pelo *H. pylori* através do ^{13}C -UBT com ureia endógena utilizando o ABCA-IRMS para análise do sopro de pacientes do Setor de Endoscopia do Hospital das Clínicas de Botucatu. Os resultados foram comparados com a histopatologia padrão ouro, e concluiu-se não ser possível detectar a infecção por *H. pylori* através do ^{13}C -UBT com ureia endógena analisado pelo ACBA-IRMS.

Palavras-chave: diagnóstico não invasivo, ^{13}C -UBT, isótopo estável de carbono, *H. pylori*.

Abstract

Helicobacter pylori (*H. pylori*) infection must be present in about half of the world population and may be associated with peptic ulcers, gastritis and stomach cancer. Its diagnosis can be performed by non-invasive methods such as the carbon stable isotope breath test (^{13}C -UBT). Recently, a new protocol for ^{13}C -UBT was proposed without the need to use ^{13}C -labeled urea in the acid solution and the isotopic ratio of the blow was analyzed by cavity spectroscopy, but this new protocol had not yet been verified by the blow analysis by isotopic ratio mass spectrometry (ABCA-IRMS). Thus, the objective of this project is to evaluate the *H. pylori* infection detection through ^{13}C -UBT with endogenous urea using the ABCA-IRMS for analysis of patients' breath in the Endoscopy Department of Hospital das Clínicas de Botucatu. The results were compared with the gold standard histopathology, and it was concluded that it is not possible to diagnose *H. pylori* infection through ^{13}C -UBT with endogenous urea analyzed by ACBA-IRMS.

Key words: non-invasive diagnosis, ^{13}C -UBT, carbon stable isotope, *H. pylori*.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	7
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	8
2.1. <i>HELICOBACTER PYLORI</i>	8
2.2. TESTE RESPIRATÓRIO	9
2.3. ANÁLISE ISOTÓPICA DO SOPRO.....	10
3. MATERIAL E MÉTODOS	11
3.1. PACIENTES	11
3.2. PREPARO DO MATERIAL.....	12
3.3. APLICAÇÃO DO ¹³ C-UBT COM UREIA ENDÓGENA	12
3.4. ANÁLISE DO SOPRO	12
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	14
5. REFERÊNCIAS	19

1. Introdução

O *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) é um microrganismo espiralado com flagelos e do tipo gram negativo, que sobrevive na mucosa gástrica (MARSHALL; WARREN, 1984). A infecção causada por sua presença está relacionada a doenças gastrointestinais tais como gastrite, ulcerações e até mesmo câncer gástrico (GRAHAM; EL-OMAR, 2013). Acomete metade da população mundial, sendo que sua predominância é ligada a fatores como idade e nível socioeconômico. A infecção pelo *H. pylori* é mais comum em países subdesenvolvidos e a contaminação costuma ocorrer na infância (LADEIRA; SALVADORI; RODRIGUES, 2003).

Para erradicação da infecção causada pelo *H. pylori*, é necessário um diagnóstico seguro e eficiente (O'CONNOR; O'MORAIN; FORD, 2017). Para o diagnóstico, o exame invasivo, considerado padrão ouro, é a histopatologia através da Endoscopia Digestiva Alta (EDA) (COELHO et al., 2013; COELHO et al., 2018), o qual possui limitações e complexidades como precisar de sedativos em alguns casos, sangramentos ocasionais e não ser indicada para gestantes por ser um procedimento invasivo (ATKINSON; BRADEN, 2016; BRADEN, 2009).

O exame não invasivo, considerado padrão ouro, é o teste respiratório com ureia marcada no isótopo estável ^{13}C “ ^{13}C -Urea Breath Test” (^{13}C -UBT) (COELHO et al., 2018). O ^{13}C -UBT foi proposto pela primeira vez no final da década de 80 (GRAHAM et al., 1987) e consiste na coleta do sopro antes e depois da ingestão de uma solução ácida contendo ureia marcada com ^{13}C (^{13}C -ureia). O teste fundamenta-se na degradação do substrato ^{13}C -ureia no estômago (GISBERT; PAJARES, 2004). A detecção da infecção pelo *H. pylori* é feita a partir das análises da razão isotópica do carbono no sopro ($^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$) antes e depois da ingestão da solução. Se aumentar a razão isotópica o paciente está infectado, se permanecer a mesma, não. (BRADEN, 2009; GISBERT; PAJARES, 2004). A análise isotópica das amostras de sopro pode ser realizada por diferentes equipamentos que forneçam o valor de enriquecimento isotópico das amostras ($\delta^{13}\text{C}$) (COSTA et al., 2013; GISBERT; PAJARES, 2004; MAITY et al., 2014).

Recentemente, uma pesquisa mostrou uma nova forma de realizar o ^{13}C -UBT usando a ureia endógena presente no suco gástrico, ao invés de ingerir a ^{13}C -ureia (MAITY et al.,

2017). O teste em questão foi possível através de estudos anteriores que demonstraram a presença de ureia natural no suco gástrico (NEITHERCUT; ELNUJUMI; MCCOLL, 1993). No estudo de Maity et al. (2017) foi utilizada apenas uma solução ácida e as amostras de sopro foram analisadas por “*Integrated Cavity Output Spectroscopy*” (ICOS). Com os resultados das análises isotópicas, foi possível observar diferentes valores das razões isotópicas ($^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$) entre pacientes positivos e negativos para *H. pylori*.

O “*Isotope Ratio Mass Spectrometer*” (IRMS) é um equipamento muito preciso em análises de razões isotópicas (GISBERT; PAJARES, 2004; MUCCIO; JACKSON, 2009; SALEH et al., 2018). No entanto, já existe no mercado um IRMS do tipo “*Automated Breath ^{13}C Analyser*” (ABCA-IRMS), o qual é específico para análise de sopro. Entretanto, não existe ainda estudo utilizando ureia endógena para detecção da infecção pelo *H. pylori* analisando o sopro por meio de um ABCA-IRMS. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi realizar o ^{13}C -UBT para a detecção da infecção pelo *H. pylori* com ureia endógena utilizando o ABCA-IRMS para análise do sopro comparando-o com a histopatologia por meio da EDA.

2. Revisão de Literatura

2.1. *Helicobacter pylori*

O *H. pylori* é uma bactéria que pode colonizar a mucosa gástrica a partir da atividade ureática. A bactéria produz a enzima urease, a qual hidrolisa a ureia presente no suco gástrico produzindo amônia. A amônia atua aumentando o pH, permitindo que o *H. pylori* sobreviva às condições ácidas do estômago (LADEIRA; SALVADORI; RODRIGUES, 2003).

Úlceras duodenais e gástricas, assim como outras doenças gastrointestinais, eram consideradas doenças com causa nervosa (GRAHAM, 2014). Porém, a descoberta do *H. pylori* trouxe uma nova causa para aquelas doenças, e consequentemente novas alternativas de tratamento (MARSHALL; WARREN, 1984). Hoje se sabe que; além de úlceras, gastrites e câncer gástrico; doenças periodontais podem ser causadas pela infecção por *H. pylori* da cavidade oral (ZHENG et al., 2014). Assim como a presença da bactéria *H. pylori* na mucosa duodenal piora o estado clínico de pacientes com doença de *Parkinson* por prejudicar a mucosa e a biodisponibilidade de um medicamento usado para o tratamento da doença (LIU et al., 2017).

Estudos mostram que a infecção pelo *H. pylori* atinge cerca de metade da população mundial, e está distribuída em todos os cinco continentes, sendo que sua prevalência é maior em países com subdesenvolvimento (ATKINSON; BRADEN, 2016; KODAIRA; ESCOBAR; GRISI, 2002) como é possível visualizar na Figura 1. No Brasil, a infecção por *H. pylori* ocorre mais na infância e seus fatores de risco estão ligados a precárias condições de vida, como falta de saneamento básico e baixo nível educacional dos responsáveis (COELHO et al., 2018).



Figura 1- Distribuição da prevalência do *H. pylori*
Fonte: Adaptado de Graham (2013)

2.2. Teste respiratório

Os testes respiratórios para detecção da infecção pelo *H. pylori* (C-UBT) foram desenvolvidos como alternativas não invasivas à metodologia invasiva. Como o produto final analisado no teste respiratório é CO₂, é necessário o uso de um substrato marcado com carbono, e um deles é a ureia. A ureia é hidrolisada pela enzima urease, e em seu processo de metabolização, o CO₂ marcado é excretado pelos pulmões e coletado como amostra (BRADEN et al., 2007; DESROCHES et al., 1997).

Inicialmente o teste respiratório ¹⁴C-UBT era muito usado, a ureia era marcada com carbono 14, isótopo emissor de radiação, e o diagnóstico era feito através das cintilações produzidas na amostra (DESROCHES et al., 1997). Porém, como o uso do ¹⁴C-UBT expunha os pacientes à radiação, foi substituído pelo ¹³C-UBT, no qual a ureia é marcada com o isótopo estável carbono 13. O ¹³C-UBT é considerado o método não invasivo padrão ouro para detecção da infecção pelo *H. pylori* (COELHO et al., 2018) e seu protocolo padrão consiste na coleta de amostras de sopro antes e cerca de 15 minutos após a ingestão de uma solução de 200 mL de água com 75 mg de ¹³C-ureia junto com até 1,4 g de ácido cítrico ou ácido ascórbico ou suco de laranja. Estes aceleram o processo de hidrólise da ureia

(GISBERT; PAJARES, 2004). O ^{13}C -UBT ainda não faz parte da prática clínica em alguns países, como o Brasil, devido às dificuldades na importação do substrato marcado (COELHO, 2018).

Há pouco tempo, um grupo da Índia propôs uma nova metodologia para o ^{13}C -UBT, não utilizando o substrato marcado (MAITY et al., 2017). A partir de alguns estudos que mostraram existir ureia no suco gástrico (NEITHERCUT; ELNUJUMI; MCCOLL, 1993), o grupo conseguiu fazer o diagnóstico da infecção pelo *H. pylori*, mostrando que a ureia endógena pode ser hidrolisada e tem concentração de ^{13}C suficiente para detecção. O método consistiu na coleta do sopro antes e após (intervalos de 15 minutos por um período uma hora) a ingestão de 4 g de ácido cítrico dissolvidos em 200 mL de água. Tal estudo ocorreu num hospital em Calcutá, onde os pacientes foram submetidos à EDA e dentro de 1 ou 2 dias realizaram o ^{13}C -UBT com ureia marcada, e no dia seguinte o ^{13}C -UBT com ureia endógena. A análise das amostras foi realizada com um “*Integrated Cavity Output Spectroscopy*” (ICOS).

2.3. Análise isotópica do sopro

A análise das amostras de sopro podem ser realizadas por 5 técnicas diferentes que fornecem razão isotópica: 1) “*Isotope Ratio Mass Spectrometer*” (IRMS); 2) “*Non-Dispersive, Isotope Selective Infrared Spectroscope*” (NDIR); 3) “*Laser Assisted Ratio Analyser*” (LARA); 4) “*Fourier Transform Infrared Spectroscopy*” (FTIR) e 5) “*Integrated Cavity Output Spectroscopy*” (ICOS).

O IRMS e o NDIR são os mais empregados em análises de teste respiratório. O IRMS foi o primeiro equipamento a ser usado para esta finalidade, pois apresenta uma alta precisão, necessita de pouca quantidade de amostra e realiza detecção a baixos níveis de enriquecimento isotópico. Muitas amostras são processadas de uma única vez, porém seu sistema apresenta um alto custo (COSTA et al., 2013; GISBERT; PAJARES, 2004). Atualmente, no mercado existem IRMS de fluxo contínuo com amostradores específicos para análises do sopro de forma automática que são os ABCA-IRMS (MODAK, 2007). O NDIR é uma alternativa com menor custo e acurácia comparável a do IRMS. Contudo, apresenta algumas desvantagens como precisar de grande quantidade de amostra e processar poucas amostras por vez (GISBERT; PAJARES, 2004). FTIR, LARA e ICOS são menos empregados

em análises do sopro. O FTIR utiliza de uma técnica mais barata que os dois equipamentos mais utilizados, e sua acurácia também é menor. Emprega uma técnica de conversão dos dados do espectro em transformadas de Fourier (MOTTA et al., 2009). O LARA emprega espectroscopia a laser, e seu custo está entre o IRMS e o NDIR (GISBERT; PAJARES, 2004).

O ICOS é um espectroscópio de cavidade que necessita de grande quantidade de amostras para análise, e por isso é bastante empregado em pesquisas ambientais (GUILLON; AGRINIER; PILI, 2015). A fabricante *Los Gatos Research* informa que sua melhor precisão 0,15‰ pode ser obtida com 100 segundos de coleta, considerando uma vazão de fluxo contínua de 2,5 L/min, correspondendo a aproximadamente 4 litros de amostra (LOS GATOS RESEARCH, 2018).

3. Material e Métodos

3.1. Pacientes

Este estudo contou com a participação de 28 pacientes (13 mulheres e 15 homens; com idades entre 28 e 77 anos) selecionados na Seção de Endoscopia do Hospital das Clínicas de Botucatu. Os pacientes que aceitaram participar da pesquisa foram selecionados por já estarem com seus exames de EDA com biópsia agendados, pois assim seria possível fazer a comparação da eficácia da metodologia proposta com o método padrão ouro. Os critérios de seleção para os pacientes participarem da pesquisa foram: estar em jejum maior de 4 horas e não ter administrado inibidores de bomba de prótons (IBP) ou antibióticos nas últimas quatro semanas que antecederam o estudo (MAITY et al., 2017). Porém, 12 pacientes que faziam ingestão de IBP foram submetidos ao ^{13}C -UBT com ureia endógena, na forma de verificar se a nova metodologia também apresentaria o resultado falso-negativo indicado pelo “3º Consenso Brasileiro em *Helicobacter pylori*” (COELHO et al., 2013).

O estudo seguiu as diretrizes do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Medicina de Botucatu através do Sistema de Informação de Pesquisa e Experimentação (SIPE) e da Plataforma Brasil, o qual está registrado como 82226017.7.0000.5411 no Certificado de Apresentação para Apreciação Ética (CAAE).

3.2. Preparo do Material

Para o ^{13}C -UBT com ureia endógena foi utilizado o ácido cítrico mono-hidratado (*Synth*), tubos para coleta das amostras, copos de 200 mL e canudos descartáveis. Para facilitar a aplicação do teste em cada paciente prepararam-se *eppendorfs* individuais com 4 g de ácido cítrico (MAITY et al., 2017) e os tubos de coleta do sopro foram devidamente identificados e armazenados.

3.3. Aplicação do ^{13}C -UBT com ureia endógena

Os pacientes foram abordados poucos minutos antes de realizarem a EDA e o ^{13}C -UBT com ureia endógena foi aplicado aos 28 indivíduos. A primeira coleta do sopro (basal) foi realizada com os pacientes em jejum, e estes receberam dois tubos identificados e um canudo para que assoprassem nos mesmos, ao término, os tubos foram fechados e devidamente armazenados. No copo descartável de 200 mL foi adicionado o conteúdo de um *eppendorf* de ácido cítrico e completado com água; após obter homogeneidade, os pacientes receberam a instrução de beber todo o conteúdo. Feito isso, aguardaram-se 15 minutos para coleta do próximo sopro, pois foi o tempo suficiente para que Maity et al. (2017) realizassem a detecção dos infectados pelo *H. pylori*. Passados os 15 minutos, os pacientes receberam novamente outros dois tubos para a coleta do sopro final. Com o término da aplicação do teste respiratório, os pacientes continuaram no aguardo de seu exame de EDA; e quando convocados pela equipe médica, o exame ocorria normalmente.

Durante a EDA houve coleta de amostras histológicas que foram analisadas no Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu. Com os dados histopatológicos, puderam-se comparar os resultados do ^{13}C -UBT com ureia endógena.

3.4. Análise do sopro

A análise do sopro foi realizada pelo ABCA-IRMS (marca SerCon) no Centro de Isótopos Estáveis “Prof. Dr. Carlos Ducatti” (CIE) do Instituto de Biociências de Botucatu da Universidade Estadual Paulista, Brasil. De acordo com as especificações do fabricante o ABCA-IRMS deve apresentar um desvio padrão menor que 0,2 ‰ para as análises do sopro, sendo seu valor típico 0,08 ‰ (SERCON GROUP, 2008). A fim de verificar a acurácia do equipamento, o ABCA-IRMS passou por um teste de repetição, o qual consistiu em analisar

sucessivamente 12 amostras de um gás de referência (CO₂ de um cilindro calibrado) e obter o desvio padrão. Para não haver interferência de efeito memória, as quatro primeiras análises foram descartadas e o valor do desvio padrão foi encontrado nas 8 análises sucessivas.

Após o teste de repetição, as amostras de sopro foram analisadas a partir de um amostrador automático que retira o sopro por meio de uma agulha e, retirando depois a água e outros gases das amostras do sopro, deixando apenas o CO₂. Este chegou até o espectrômetro de massa por meio do gás hélio, o qual funciona como um gás de arraste. As amostras foram então ionizadas, passando da fase gasosa para plasmática; desta forma seguiram uma trajetória curvilínea provocada por um campo magnético que as mudaram de trajetória com base na massa molecular. Assim, as moléculas de ¹²CO₂ foram separadas das de ¹³CO₂, de massas moleculares 44 u e 45 u respectivamente.

A razão isotópica ¹³CO₂/¹²CO₂ foi calculada e convertida em enriquecimento relativo isotópico (δ¹³C) utilizando a calibragem padrão internacional do carbono, R_{PDB}=0,0112372. O enriquecimento relativo é dado pela equação (1), onde *R_{Amostra}* é a razão isotópica da amostra de sopro coletada (GARCIA, 2017; PEREZ, 2017).

$$\delta^{13}\text{C} (\text{‰}) = \frac{R_{\text{Amostra}}}{R_{\text{PDB}} - 1} \cdot 1000 \quad (1)$$

Os resultados foram obtidos a partir da variação do enriquecimento isotópico basal, coletado antes da ingestão do ácido cítrico; com aquele coletado depois da ingestão do ácido cítrico (final); dado pelo valor de “*Data Over Baseline*” (DOB) apresentado na equação (2) (GARCIA, 2017; PEREZ, 2017).

$$\text{DOB} (\text{‰}) = \delta^{13}\text{C}(\text{‰})_{\text{final}} - \delta^{13}\text{C}(\text{‰})_{\text{basal}} \quad (2)$$

Os pacientes que apresentaram DOB entre -0,95 ‰ até 1,04 ‰ para ¹³C foram considerados negativos para a infecção pelo *H. pylori*; e as variações fora desse padrão foram consideradas positivas, segundo o estudo de Maity et. al. (2017). Assim, utilizou-se do mesmo valor de corte para identificação de indivíduos positivos e negativos para o *H. pylori* neste trabalho.

4. Resultados e Discussões

O objetivo deste trabalho foi realizar o ^{13}C -UBT para a detecção da infecção pelo *H. pylori* com ureia endógena utilizando o ABCA-IRMS para análise do sopro comparando-o com a histopatologia por meio da EDA. Assim, selecionaram-se pacientes infectados e não infectados pelo *H. pylori* do Setor de Endoscopia do Hospital das Clínicas de Botucatu com EDA agendada. A aplicação do ^{13}C -UBT com ureia endógena seguiu o procedimento de Maity et al. (2017). Porém, antes de iniciar as análises do sopro foi realizado o teste de repetição no ABCA-IRMS, no qual os resultados estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 – Acurácia das medidas do $\delta^{13}\text{C}$ (‰) de 8 tubos de 12 mL preenchidos com CO_2 de um cilindro calibrado.

Tubos	$\delta^{13}\text{C}$ (‰) medido pelo ACBA-IRMS
1	-33,86
2	-33,78
3	-33,80
4	-33,73
5	-33,66
6	-33,86
7	-33,88
8	-33,99
Média	-33,83
Valor do cilindro	-34,20
Desvio Padrão	$\pm 0,10$

O desvio padrão das medidas da Tabela 1 está de acordo com as especificações de fábrica ($\leq 0,2\text{‰}$) e é suficiente para apresentar resultados confiáveis. Fazendo uma análise comparativa com os dados de Maity et. al (2017) percebe-se que o desvio padrão encontrado para o ICOS era de $0,05\text{‰}$, com amostras de 750 mL. Desvio muito menor que o informado em outros estudos do mesmo grupo utilizando o mesmo equipamento, $0,2\text{‰}$ (SOM et al., 2014). E menor até mesmo menor que o informado pela fabricante *Los Gatos Research*, $0,15\text{‰}$ em 100 segundos, ou seja, com 4000 mL de amostra.

Na Figura 2 são apresentados os valores de DOB em relação ao $\delta^{13}\text{C}$ dos 12 pacientes que haviam feito uso de IBP dentro das 4 semanas que antecederam o estudo.

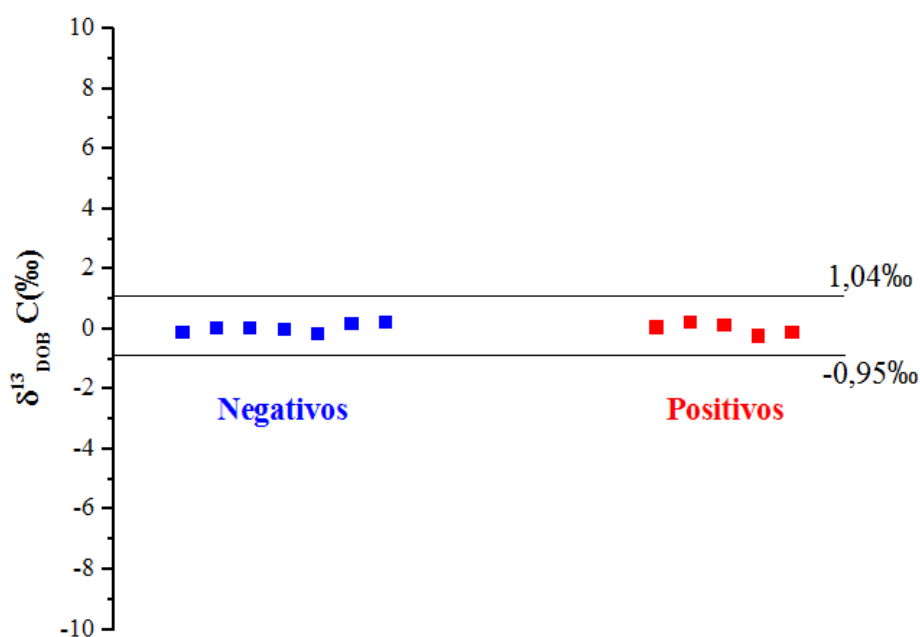


Figura 2 – Indivíduos que haviam feito uso de IBP foram distintos em positivos (vermelho) e negativos (azul) para a infecção pelo *H. pylori* através da biópsia.

Os resultados da Figura 2 confirmaram que o uso de IBP produz falso-negativo no ¹³C-UBT (COELHO et al., 2013), mesmo quando realizado com ureia endógena, como era esperado, porém pela primeira vez avaliado. A Tabela 2 apresenta os valores de $\delta^{13}\text{C}_{\text{basal}}$, os valores de DOB e os resultados das biópsias de todos os pacientes. Na Tabela 2 é possível perceber que nem todos os pacientes realizam biópsias de antro e corpo na prática clínica, outro fator limitante da EDA. A média dos valores de $\delta^{13}\text{C}_{\text{basal}}$ mostram que a maioria dos pacientes têm baixo valor de enriquecimento isotópico, exceto por dois pacientes que apresentara valores mais altos (N = 27 e 28).

Tabela 2 – Valores de $\delta^{13}\text{C}_{\text{basal}}$, DOB e resultado das biópsias de todos os 28 pacientes submetidos ao ^{13}C -UBT com ureia endógena e a EDA para detecção da infecção pelo *Helicobacter pylori*

N	$\delta^{13}\text{C}_{\text{basal}}$	DOB (‰)	Biópsia antro	Biópsia corpo	IBP
1	-28,38	-0,09	N	-	X
2	-30,37	0,24	P	-	X
3	-26,94	0,07	-	N	X
4	-27,47	0,07	-	N	X
5	-28,24	0,16	P	-	X
6	-25,83	0,01	-	N	X
7	-26,41	-0,21	P	-	X
8	-26,22	-0,12	-	-	X
9	-27,76	0,19	-	N	X
10	-26,21	-0,07	-	P	X
11	-29,23	0,26		N	X
12	-29,10	0,09	-	P	X
13	-29,94	0,50	N	-	-
14	-27,09	-0,03	-	N	-
15	-27,50	0,17	-	N	-
16	-28,30	-0,30	-	N	-
17	-27,30	-0,05	P	-	-
18	-25,21	0,36	P	-	-
19	-24,32	0,40	-	P	-
20	-28,30	0,01	P	-	-
21	-26,13	-0,09	N	-	-
22	-27,32	0,79	N	-	-
23	-25,77	-0,33	-	P	-
24	-24,93	0,05	P	-	-
25	-24,24	0,14	P	-	-
26	-23,18	-0,40	N	-	-
27	-22,87	-1,23	-	N	-
28	-16,55	-9,03	-	N	-
Média	-26,46				

Onde: P = positivo, N = negativo e X = afirmativo para uso de IBP nas 4 semanas que antecederam o teste.

Na Figura 3 estão os resultados do DOB com os valores de corte sugeridos por Maity et. al (2017) dos pacientes dentro dos critérios de seleção. É possível observar que dois pacientes obtiveram valores de DOB abaixo do valor de corte.

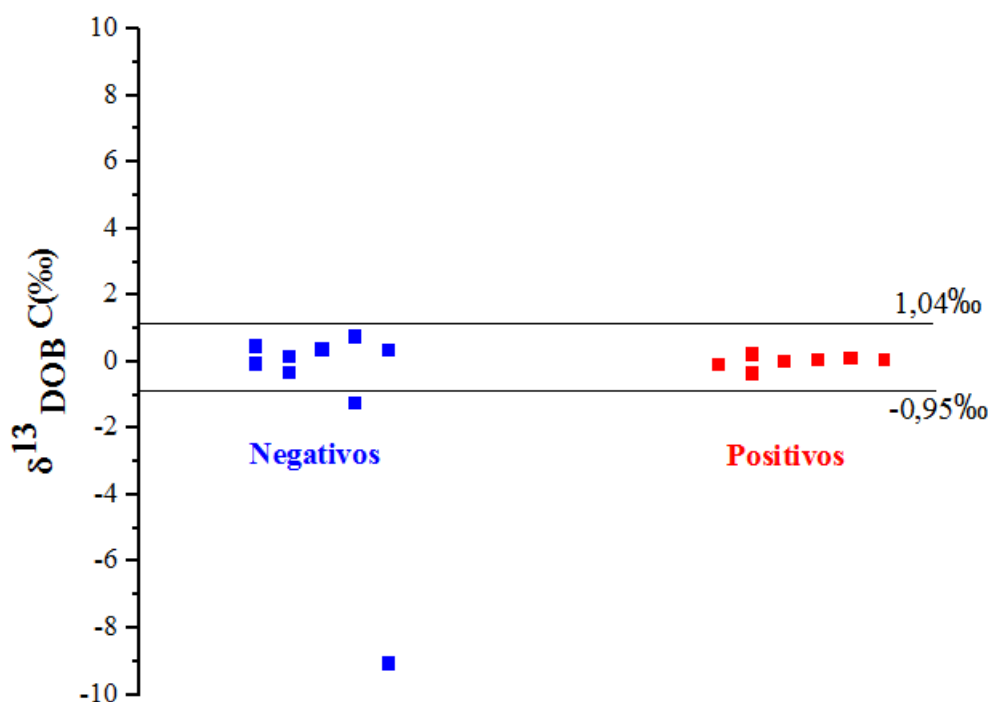


Figura 3 – Indivíduos positivos (vermelho) e negativos (azul) para a infecção pelo *H. pylori* confirmados pela biópsia.

Quanto aos 16 pacientes da Figura 3, dentro dos critérios de seleção, percebe-se que os 7 pacientes positivos não apresentaram variação na razão isotópica. E, portanto, não foi possível avaliar a detecção da infecção pelo *H. pylori* com o ¹³C-UBT com ureia endógena utilizando o ABCA-IRMS. Com relação aos dois pacientes que obtiveram valores de DOB abaixo do valor de corte, isso pode ser explicado a partir de um estudo, o qual demonstrou que diferentes populações possuem abundância natural de ¹³C no organismo específica devido à dieta disponível em diferentes regiões (TANIS et al., 2000). Este estudo conseguiu avaliar, a partir da análise isotópica do sopro, a variação da abundância natural de ¹³C no organismo através do enriquecimento ou empobrecimento natural de ¹³C na dieta de seus participantes (TANIS et al., 2000). Tal estudo abordou dois grupos de pessoas, um com baixa abundância natural de ¹³C associado ao maior consumo de alimentos derivados de plantas C₃; e outro grupo com alta abundância natural de ¹³C relacionado ao maior consumo de alimentos derivados de plantas C₄. Ambos os grupos foram monitorados pelo valor isotópico do sopro e submetidos a dietas ricas e empobrecidas naturalmente em ¹³C após o jejum de 12 horas. Com isso foi possível perceber que a abundância natural do organismo está associada a dieta a longo prazo, e tende a voltar a este valor, após uma refeição rápida com abundância diferente (TANIS 2000).

Assim, os dois pacientes negativos da Figura 3, cujos valores de DOB ficaram abaixo do valor de corte, pode ser justificado pela ingestão de uma dieta rápida rica em ^{13}C , ou seja, derivada de dieta C_4 . Isso fica claro quando se analisa a Tabela 2 que apresenta os valores de $\delta^{13}\text{C}_{\text{basal}}$, sendo destes pacientes ($N = 27$ e 28) muito mais enriquecidos em ^{13}C . Acredita-se que os altos valores no $\delta^{13}\text{C}_{\text{basal}}$ seja relacionado à quebra do jejum com algum alimento baseado em plantas C_4 , como um café adoçado com açúcar de cana (cana de açúcar é uma planta C_4). E durante a coleta do sopro desses dois pacientes, a abundância natural de ^{13}C estava sofrendo variação, o que resultou nos valores obtidos. Por mais que todos os pacientes disseram estar em jejum, não tem como controlar ou ter certeza da afirmação, pois os pacientes não foram monitorados antes de chegarem à Seção de Endoscopia, quando logo foram submetidos teste respiratório ^{13}C -UBT com ureia endógena, e em seguida à EDA.

Buscando entender o motivo pelo qual o ^{13}C -UBT com ureia endógena utilizando o ABCA-IRMS não detectou a infecção pelo *H. pylori*, apresentam-se os aspectos relacionados ao teste. O tempo de coleta de 15 minutos foi o mesmo escolhido por Maity et al. (2017) suficiente e preferível para detecção do *H. pylori*. Este tempo também é suficiente para o ^{13}C -UBT com ureia marcada (GISBERT; PAJARES, 2004) descartando a possibilidade do tempo ser insuficiente. Outro aspecto relacionado a não detecção do teste pode ser atribuído ao baixo enriquecimento natural de ^{13}C na ureia endógena, insuficiente para o diagnóstico. Neste estudo não foi realizada a análise na ureia endógena antes da aplicação do ^{13}C -UBT com ureia endógena, como foi no estudo de Maity et al. (2017) pois, tratava-se de um procedimento idêntico.

Vale ressaltar que Maity et al. (2017) aplicou o ^{13}C -UBT com ureia endógena no dia seguinte a aplicação do ^{13}C -UBT com ^{13}C -ureia, etapa não realizada neste trabalho. Caso este procedimento de aplicação do ^{13}C -UBT com ureia marcada um dia antes tenha influenciado nos resultados do ^{13}C -UBT com ureia endógena, não faz sentido a eficiência da metodologia proposta por Maity et al. (2017).

Em resumo, a metodologia de não usar ^{13}C -ureia no ^{13}C -UBT para detecção do *H. pylori* é muito interessante e inovadora, porém, os resultados deste trabalho mostram que a metodologia não foi eficiente, apesar de manter o mesmo procedimento para o ^{13}C -UBT com ureia endógena e análise isotópica com equipamento de acurácia comparável. Assim conclui-se neste trabalho que o ^{13}C -UBT com ureia endógena e analisado por ABCA-IRMS não detecta a infecção pelo *H. pylori*.

5. Referências

- ATKINSON, N. S. S.; BRADEN, B. Helicobacter Pylori Infection : Diagnostic Strategies in Primary Diagnosis and After Therapy. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 61, n. 1, p. 19–24, 2016.
- BRADEN, B. et al. 13C-breath tests: Current state of the art and future directions. **Digestive and Liver Disease**, v. 39, n. 9, p. 795–805, 2007.
- BRADEN, B. Methods and functions: Breath tests. **Best Practice and Research: Clinical Gastroenterology**, v. 23, n. 3, p. 337–352, 2009.
- COELHO, L. G. ONZAGA et al. 3rd Brazilian Consensus on Helicobacter pylori. **Arquivos de gastroenterologia**, v. 50, n. 2, p. 1–17, 2013.
- COELHO, L. G. et al. Performance of the 13 C-urea breath test for the diagnosis of H . pylori infection using a substrate synthesized in Brazil : A preliminary study. **Clinics**. 2018.
- COELHO, L. G. et al. IV th Brazilian Consensus Conference on Helicobacter pylori infection. **Arquivos de Gastroenterologia**. 2018.
- COSTA, V. E. et al. 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. **Revista Brasileira de Física Médica**, v. 7, n. 3, p. 191–194, 2013.
- DESROCHES, J. J. et al. Methodological validation and clinical usefulness of carbon-14-urea breath test for documentation of presence and eradication of Helicobacter pylori infection. **Journal of Nuclear Medicine**, v. 38, p. 1141–1145, 1997.
- GARCIA, B. D. E. O. INFLUÊNCIA DO JEJUM E DO ÁCIDO CÍTRICO NO TESTE. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Botucatu. 2017.
- GISBERT, J. P.; PAJARES, J. M. Review article: 13C-urea breath test in the diagnosis of Helicobacter pylori infection - A critical review. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, v. 20, n. 10, p. 1001–1017, 2004.
- GRAHAM, D. Y. History of Helicobacter pylori, duodenal ulcer, gastric ulcer and gastric cancer. **World Journal of Gastroenterology**, v. 20, n. 18, p. 5191–5204, 2014.
- GRAHAM, D. Y.; EL-OMAR, E. M. Helicobacter pylori. **Nature Reviews: Gastroenterology & Hepatology**, 2013.
- GUILLON, S.; AGRINIER, P.; PILI, É. Monitoring CO₂ concentration and $\delta^{13}\text{C}$ in an underground cavity using a commercial isotope ratio infrared spectrometer. **Applied Physics B**. p. 165–175, 2015.
- KODAIRA, M. S.; ESCOBAR, A. M. D. U.; GRISI, S. Aspectos epidemiológicos do Helicobacter pylori na infância e adolescência. **Revista Saúde Pública**, v. 36, n. 3, p. 356–369, 2002.

LADEIRA, M. S. P.; SALVADORI, D. M. F.; RODRIGUES, M. A. M. Biopatologia do *Helicobacter pylori* Biopathology of *Helicobacter pylori*. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 39, n. 4, p. 335–342, 2003.

LIU, H. et al. Eradication of *Helicobacter pylori* infection might improve clinical status of patients with Parkinson's disease, especially on bradykinesia. **Clinical Neurology and Neurosurgery**, v. 160, n. January, p. 101–104, 2017.

LOS GATOS RESEARCH. LGR-ICOS CCIA2-911/912/915. **AAB Measurements & Analytics**. Quebec, Canadá. 2018.

MAITY, A. et al. Residual gas analyzer mass spectrometry for human breath analysis: a new tool for the non-invasive diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. **Journal of Breath Research**, v. 8, n. 1, p. 16005, 2014.

MAITY, A. et al. Natural ^{18}O and ^{13}C -urea in gastric juice: a new route for non-invasive detection of ulcers. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, p. 1–8, 2017.

MARSHALL, B. J.; WARREN, J. R. Unidentified Curved Bacilli in the Stomach of Patients With Gastritis and Peptic Ulceration. **The Lancet**, v. 323, n. 8390, p. 1311–1315, 1984.

MODAK, A. S. Stable isotope breath tests in clinical medicine: a review. **Journal of breath research**, v. 1, n. 1, p. 14003, set. 2007.

MOTTA, O. et al. New FTIR methodology for the evaluation of $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ isotope ratio in *Helicobacter pylori* infection diagnosis. **Journal of Infection**, v. 59, n. 2, p. 90–94, 2009.

MUCCIO, Z.; JACKSON, G. P. Isotope Ratio Mass Spectrometry. **The Analyst**, v. 134, n. 2, p. 213–22, fev. 2009.

NEITHERCUT, W. D.; ELNUJUMI, A. M.; MCCOLL, K. E. L. Measurement of Urea and Ammonium Concentrations in Gastric-Juice. **Journal of Clinical Pathology**, v. 46, n. 5, p. 462–464, 1993.

O'CONNOR, A.; O'MORAIN, C. A.; FORD, A. C. Population screening and treatment of *Helicobacter pylori* infection. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 14, n. 4, p. 230–240, 2017.

SALEH, M. A. D. Timing carbon turnover ($\delta^{13}\text{C}$) in weaned piglet's brain by IRMS. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**. v. 90, p. 2469–2478, 2018.

PEREZ, G. G. Teste respiratório com isótopos estáveis do carbono para avaliação da função hepática nas fases da cirrose causada pela hepatite viral C. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Botucatu. 2017.

SERCON GROUP. ABCA2 Automated Breath $^{13}\text{CO}_2$ Analyser. **Product Information Sheet**. Crewe, U. K. 2008.

SOM, S. et al. Excretion kinetics of ^{13}C -urea breath test: influences of endogenous CO_2 production and dose recovery on the diagnostic accuracy of *Helicobacter pylori* infection. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 406, n. 22, p. 5405–5412, 18 set. 2014.

TANIS, A. A. et al. Influence of the ^{13}C -Enrichment of the Habitual Diet on a $^{13}\text{CO}_2$ Breath Test Used as an Index of Liver Glycogen Oxidation : A Validation Study in Western Europe and Africa. **Nutrition**, v. 9007, n. 99, p. 9–13, 2000.

ZHENG, Y. et al. Relationship between oral problems and *Helicobacter pylori* infection. **Archives of Oral Biology**, v. 59, n. 9, p. 938–943, 2014.