UNESP- UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO".

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS - CAMPUS BOTUCATU

DEPARTAMENTO DE FÍSICA E BIOFÍSICA.

CARLOS ALBERTO ZANUTTO BASSETTO JUNIOR

VALOR DE CORTE PARA TESTE RESPIRATÓRIO COM ISÓTOPOS ESTÁVEIS (CARBONO 13) NO DIAGNÓSTICO DO *Helicobacter pylori* UTILIZANDO IRMS PARA ANÁLISE DO SOPRO

BOTUCATU

2013

UNESP- UNIVEERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JULIO DE MESQUITA FILHO.

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS - CAMPUS BOTUCATU

DEPARTAMENTO DE FÍSICA E BIOFÍSICA.

CARLOS ALBERTO ZANUTTO BASSETTO JUNIOR

ORIENTADOR: PROF. DR. VLADIMIR ELIODORO COSTA

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO APRESENTADO AO CONSELHO DE CURSO DE FÍSICA MÉDICA DO INSTIUTO DE BIOCIÊNCIAS DA UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA CAMPUS BOTUCATU COMO REQUESITO PARA A OBTENÇÃO DO TÍTULO DE BARACHEL EM FÍSICA MÉDICA.

BOTUCATU

2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE - CRB 8/5651

Bassetto Junior, Carlos Alberto Zanutto.
Valor de corte para teste respiratório com isótopos estáveis (carbono 13) no diagnóstico do Helicobacter pylori utilizando IRMS para análise do sopro / Carlos Alberto Zanutto Bassetto Junior. - Botucatu, 2013

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Física Médica) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu
Orientador: Vladirmir Eliodoro Costa
Capes: 10500006

1. Helicobacter pylori. 2. Ureia. 3. Carbono - Isotopos. 4. Espectrometria de massa.

Palavras-chave: Helicobacter pylori.; IRMS; Urea Breath Test; Valor de corte.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por mais uma oportunidade de trabalho, estudo e progresso.

Ao Professor Dr. Vladimir Eliodoro Costa por ter ajudado, me orientado e dado a oportunidade nesse trabalho.

Ao técnico Evandro Silva que ajudou com as analises das amostras e ensinou sobre o funcionamento dos equipamentos.

Aos meus pais, que com amor sempre foram o alicerce para os meus planos e objetivos. As minhas irmãs, meus avôs por estarem sempre ao meu lado e a Gethiely pelo amor, carinho e companheirismo.

BASSETTO JUNIOR, C. A. Z. **Valor de corte para teste respiratório com isótopos estáveis (Carbono 13) no diagnóstico do *Helicobacter pylori* utilizando IRMS para análise do sopro.** 2013. 29 p. Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2013.

RESUMO

Após o isolamento do *Helicobacter pylori* numa lesão na mucosa estomacal por Marshall e Wareen, trabalho condecorado com o Nobel de Fisiologia ou Medicina em 2005, vários outros trabalhos mostraram a relação entre a presença do *H. pylori* e enfermidades no sistema digestório, como gastrites, úlceras gástricas, duodenais e peptídicas, e até mesmo com o câncer de estomago. O teste de sopro por ureia marcada com carbono 13 (^{13}C) (*^{13}C-Urea Breath Test* - ^{13}C-UBT), é um método diagnóstico não invasivo que através do sopro do paciente indica a presença do *H. pylori* utilizando isótopos estáveis. Esse trabalho teve como objetivo encontrar o valor de corte ideal (valor que delimita entre positivo e negativo) para o ^{13}C-UBT. Foi utilizado Espectrômetro de Massa de Razões Isotópicas (IRMS) para diagnóstico de infecção do *H. pylori* na população brasileira. Foram selecionados pacientes da Seção de Endoscopia do Hospital das Clínicas da UNESP de Botucatu. Com os resultados foi possível constatar que o melhor valor de corte está entre 2,5 a 6 ‰ da diferença sobre o valor basal (*Delta Over Baseline* – DOB).

Palavras-chave: *Urea Breath Test*; Valor de Corte, IRMS, *Helicobacter pylori*.

BASSETTO JUNIOR, C. A. Z. **Cut-off for breath test with stables isotopes (Carbon 13) to *Helicobacter pylori* diagnostics utilizing IRMS for analyzes the breath.** 2013. 29 p. Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2013.

ABSTRACT

After the isolation of *Helicobacter pylo*ri from an injury at the stomach mucosa by Marshall and Wareen, work that was recognized with the Nobel Prize of Medicine or Physiology in 2005, many other works showed the relationship between the presence of *H. pylori* and diseases at the digestive system, such as gastritis, gastric, duodenal and peptic ulcer, and stomach cancer. The *^{13}C-Urea Breath Test* - ^{13}C-UBT is a non-invasive diagnostic method that utilizes the breath of a patient to determine the presence of *H. pylori* through stable isotopes. This work aimed to find an ideal ^{13}C-UBT Isotopic Ratio Mass Spectroscopy cut-off value (a threshold between positive and negative) to diagnose *H. pylori* infection at Brazilian population. Patients were selected at the UNESP-Botucatu Clinical Hospital Endoscopy Section. With these results it was possible to indicate that the best cut-off value is between 2.5 to 6 ‰ of Delta Over Baseline (DOB).

Keywords: Urea Breath Test, Cutoff, IRMS, *Helicobacter pylori*,

SUMÁRIO

1) INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....8
2) OBJETIVOS.....12
3) MATERIAIS E MÉTODOS.....12
4) RESULTADOS E DISCUSSÕES.....15
4.1) Resultados Exames Histológicos.....15
4.2) Turnover Carbono 13.....16
4.3) Determinação do melhor valor de Corte.....19
5) CONCLUSÃO.....25
REFERÊNCIAS…….....26

1) INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Em 1983, Marshall e Wareen isolaram a *Helicobacter pylori* a partir da mucosa do estômago de pacientes. Esses autores estavam investigando a mucosa de pacientes que possuíam ulceras gástricas, gastrites, etc. Eles concluíram que a bactéria isolada, a *H. pylori*, estava fortemente associada à gastrite antral e outras doenças do sistema digestório, como úlceras gástricas e câncer gástrico [1]. Porém, até aquele momento não havia dados nem estudos para que essa hipótese fosse totalmente confirmada. Com o passar dos anos, muitos artigos científicos foram publicados comprovando esta hipótese [2, 3, 4, 5, 6, 7].

Em 2005, de tão impactante que foi a descoberta e o isolamento da *Helicobacter pylori*, bem como o papel que esta bactéria atua em várias doenças, o seu descobrimento foi o motivo de Marshall e Warren serem premiados com o Nobel de Fisiologia ou Medicina.

A *H. pylori* fica alojada nas células epiteliais do estômago, promovendo lesões devido à liberação de toxinas e estimulando a produção de citocina pelas células [6]. A *H. pylori* produz uma enzima, a uréase, que atua na sua proteção. A enzima quebra a ureia, encontrada em condições fisiológicas no estomago, em amônia e dióxido de carbono. A amônia atua como um receptor de H+ deixando o ambiente próximo da bactéria mais básico [7]. Através de secreções de lipases e proteases, a *H. pylori*, atua diretamente na degradação do muco que reveste a parede do estômago, expondo-o ao contato do ácido clorídrico promovendo o aparecimento de úlceras e lesões [6].

Atualmente, segundo algumas estimativas, cerca de 80% da população de países subdesenvolvidos e de 20-50% da população de países desenvolvidos estão contaminados com a *H. pylori* [2]. Sabe-se muito pouco sobre a forma de contaminação. Esse é ainda um ponto muito controverso. Alguns pesquisadores suspeitam que o mecanismo de contaminação esteja ligado à ingestão de alimentos mal lavados. Evidencias também comprovam que a falta de saneamento básico pode ser agente causador de contaminação pela *H. pylori* [8].

Outro ponto a destacar é que na maioria dos casos o indivíduo contrai a bactéria em sua infância, sendo que a infecção pode ser assintomática e o individuo contaminado só percebe a presença devido a dores e o aparecimento de alguns sintomas, mas apenas na idade adulta [9,10,11].

Há duas formas de detecção da *H. Pylori*, por métodos invasivos e métodos não invasivos. 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 pela *H. pylori*. Nos centros de diagnósticos brasileiros este exame predomina devido ao aproveitamento da infraestrutura para realização da endoscopia gástrica e a falta de outras opções de diagnósticos. Entretanto, esse procedimento requer que o paciente seja anestesiado. Pacientes mais idosos, assim como os pacientes na idade infantil, têm dificuldades para realizar esse tipo de procedimento [12,13].

O diagnóstico não invasivo mais utilizado é o teste respiratório com ureia marcada com Carbono - C-UBT (do inglês, Urea Breath Test). Inicialmente usou-se o Carbono 14 (possui 8 nêutrons e 6 prótons em seu núcleo - (^{14}C)), que é um radioisótopo ou isótopo radioativo, para marcar a ureia e um detector de radiação para analisar o sopro (^{14}C-UBT), [13]. Atualmente o uso do ^{14}C na marcação da ureia para este teste foi banido e substituído pelo Carbono 13 (possui 7 nêutrons e 6 prótons em seu núcleo – (^{13}C)) que não é radioativo, e portanto, um isótopo estável [14]. O desuso do ^{14}C aconteceu devido ao controle rigoroso para uso de material radioativo e a exposição do paciente à radiação.

O teste de sopro por carbono 13 (^{13}C-UBT) foi proposto por Graham em 1987 [14]. Ele se baseia na hidrólise de ureia marcada com ^{13}C. A hidrólise ocorre porque a *H. pylori* sintetiza uma enzima, chamada de enzima uréase. Dessa forma, se o paciente possui em seu estomago a bactéria, consequentemente, possui a enzima uréase que irá hidrolisar a ureia em amônia, gás carbônico ($^{13}CO_2$) e água. O gás carbono é então absorvido no intestino delgado chega à corrente sanguínea e, posteriormente, aos pulmões, onde é expirado [12,13,15].

O exame de UBT consiste em coletar o sopro de um indivíduo antes e após a ingestão da ureia marcada. O valor inicial é denominado valor basal, pois será o valor utilizado como referência. Após a ingestão da ureia marcada é realizado outras coletas do sopro (valor após a ingestão). Faz-se então a diferença entre os valores de sopro após a ingestão e o valor de base e se obtém a diferença sobre a linha de base (do inglês, Delta Over Baseline-DOB) [12,13,15].

A razão isotópica entre o carbono 13 e carbono 12 (^{13}C/^{12}C) é expressa em ‰ (permil) e apresentada em DOB[13]. Consegue-se inferir se o paciente está ou não infectado através da análise do valor do DOB. O valor de corte é o valor limite que caracteriza o exame diagnóstico como positivo ou negativo, sendo que se o valor for acima do ponto de corte o exame é positivo, caso contrário é negativo.

A análise da razão isotópica pode ser realizada por quatro tipos de equipamentos: Isotope Ratio Mass Spectrometer - IRMS; Non-Dispersive, Isotope-Selective Infrared Spectroscope - NDIRS. [3,16,17]; Laser-Assisted Ratio Analyser - LARA [18]; e Fourier

Transform Infrared Spectroscopy - FTIR [19], mas estes dois últimos não são tão utilizados quanto o IRMS e o NDIRS.

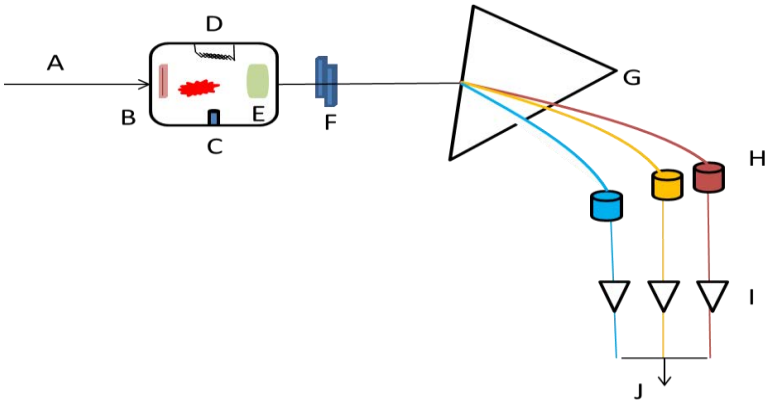
O principio básico de funcionamento do IRMS se baseia no fenômeno natural de átomos possuírem isótopos. Isto é, um átomo possui o mesmo número de prótons, porém o número de nêutrons é diferente. Isso faz com que núcleos atômicos iguais possuam massas diferentes, oriunda do excesso de nêutrons. Átomos de carbono, por exemplo, possui os isótopos ^{12}C, ^{13}C, ^{14}C, sendo que cada um desses possuem 6, 7 e 8 nêutrons no seu núcleo. Quando esses átomos se ligam ao átomo de oxigênio formando o Dióxido de Carbono (CO_2), ocorrem diferenças nas massas moleculares dessas moléculas. Sendo que $^{12}CO_2$, $^{13}CO_2$, $^{14}CO_2$ possuem respectivamente, 44, 45 e 46 unidades de massa atômicas. Através dessa diferença de massa e do princípio de que se um íon é acelerado através de uma diferença de potencial e depois ao passar por um campo magnético (B) terá velocidade e sua trajetória alterada para um movimento circular, a equação que rege esse fenômeno é dada por [21]:

$$\frac{m}{z} = \frac{R^2 B^2}{2V} \tag{1}$$

Onde m é a massa do íon, z é a carga do íon, R é raio da trajetória circular, B é o campo magnético e V é o potencial por onde o íon foi acelerado. Com isso, as cargas (z) para as moléculas $^{12}CO_2$, $^{13}CO_2$, $^{14}CO_2$ serão as mesmas, porém suas massas são diferentes. Com isso a trajetória circular (R) será diferente. Sendo diretamente proporcional a relação entre o raio da trajetória e a sua massa molecular.

O aparelho de IRMS funciona da seguinte forma. O gás é introduzido e é transportado por um fluxo de Hélio (He). O Hélio é um gás inerte e tem a função de carregar as moléculas de CO_2 no sistema. As amostras de CO_2 são ionizadas através de um filamento que emite elétrons e são acelerados para colidir ou para se aproximar o necessário para arrancar um elétron da molécula e assim formar uma molécula catiônica [21]. Depois, os cátions originados são acelerados através da diferença de potencial e passam pelo campo magnético, onde terão sua trajetória alterada. Por fim, os íons que foram separados de acordo com o raio são coletados num detector Faraday que geram sinais elétricos. Os sinais elétricos são analisados pelo software que dará como resposta a razão isotópica entre as moléculas. A figura 1, a seguir, retrata melhor esse sistema.

Figura 1: Esquema simplificado do funcionamento de um aparelho de Espectrometria de massa de razões isotópicas (IRMS).



A: CO_2+He; B: Repele os elétrons, C: Armazenador de elétrons, D: filamento, E: Acelerador de íons, F: Lentes Focalizadoras, G: Analisador Magnético, H: Detectores Faraday, I: Amplificadores e J: Computador. Fonte: Adaptado de Ferreira [21].

A amostra é arrasta pelo fluxo de He e é ionizada formando uma molécula de cátion. O cátion é então focalizado e passa pelo campo magnético, onde terá sua trajetória mudada. O cátion terá um raio de acordo com a sua massa, assim se separam os elementos isotópicos e se mede a razão entre eles com a análise do software [22].

Algumas observações são importantes. Desde o início da aplicação do teste, muitas mudanças foram realizadas a fim de aperfeiçoar o exame. Os valores da quantidade de ureia a ser utilizada, a necessidade de ingerir a ureia com alimentos para distribuí-la por todo o estomago, promovendo o maior contato entre a ureia e a parede do estômago; jejum antes do teste de sopro; efeitos de antibióticos, e outros medicamentos como os inibidores de bombas de prótons (P*roton Pump Inhinbition*) foram alvos de várias discussões e pesquisas. Essas discussões pode ser encontradas em vários artigos [2,5,9,15]. De acordo com os trabalhos mais recentes, o valore de ureia marcada é de 75mg diluída em 10 mL de ácido cítrico é mais bem aceito para promover o diagnostico [13]. A função do ácido cítrico é promover a rápida digestão da ureia e assim promover a rápida absorção do $^{13}CO_2$ e diminuindo o tempo do exame. Os 200 mL de água tem a função de distribuir toda a ureia na parede do estômago [12].

2) OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo encontrar o valor de corte ideal para o ^{13}C-UBT e analisados com IRMS para diagnóstico de infecção da *H. pylori* na população brasileira.

3) MATERIAIS E MÉTODOS

Nesse trabalho foi utilizado um IRMS do tipo ABCA (do inglês, Automated Breath Carbon Analyzer) da marca SerCon.

Os indivíduos utilizados neste estudo foram selecionados na seção de endoscopia do Hospital das Clínicas de Botucatu, antes de efetuarem o exame de Endoscopia Digestiva Alta - EDA. Cinquenta e dois pacientes foram convidados e aceitaram participar dessa pesquisa. Para a seleção desses pacientes foram realizadas entrevistas que se consistiu em: 1) Explicação do teste respiratório, seus benefícios e o impacto que ele poderá ter para pacientes no futuro; 2) Indagar se o paciente faz uso de medicamentos como inibidores de bomba de prótons (omeprazol) nas duas últimas semanas e antibióticos nas quatro últimas semanas [15]. 3) Se está em jejum a mais de quatro horas [15]; 4) Se possuem mais de 18 anos; 5) Indagar se aceita participar da pesquisa.

Para o procedimento foi realizado o seguinte protocolo:

1) O paciente assopra com auxílio de canudinho de plástico descartável em um tubo descartável de 12 mL fornecido pela fabricante da ureia.
2) A solução de 10 ml de ácido cítrico com 75mg de ureia marcada é diluída em 200 mL de água em um copo descartável. A ureia BREATHQUALITY UBT ^{13}C-UREA da marca ABANALITICA é composta 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 [15].
3) Após a ingestão é pedido para o paciente fazer bochecho com água para limpar a cavidade bucal e assim eliminar eventuais resultados falso-positivos oriundos de bactérias da cavidade bucal [5].
4) Inicia-se o cronometro e então se começam as coletas, em tubos enumerados conforme a tabela a seguir.

Tabela 1: Numeração dos tubos e o tempo de coleta.

Tubos	Tempo (minutos)
1;2	0
3;4	5
5;6	7.5
7;8	10
9;10	12.5
11;12	15
13;14	17.5
15;16	20
17;18	22.5
19;20	25
21;22	27.5
23;24	30
25;26	35
27;28	40
29;30	45

Fonte: Elaborado pelo autor.

Todas as amostras foram realizadas em duplicatas para garantia dos resultados e foram realizadas médias das duas medidas.

5) 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 292.236.

Os tubos foram analisados no CEI (Centro de Isótopos Estáveis /UNESP campus de Botucatu). Em média os tubos são analisados de 2-7 dias após a coleta.

Quando se faz um teste diagnóstico onde se tem duas hipóteses, positiva e negativa, a literatura epidemiológica médica sugere que e a curva Receiver Operator Characteristics (ROC) pode ser usada com grande fidedignidade [23, 24, 25]. Alguns trabalhos que determinaram o melhor valor de corte para ^{13}C-UBT utilizaram a curva ROC [4,13,17,26,27,28].

Para analisar a curva ROC é necessário utilizar um exame diagnóstico para comparação, geralmente utiliza-se o padrão-ouro. A partir disso, consegue-se estimar quão eficiente é o novo teste diagnóstico em relação ao padrão-ouro [23]. O padrão-ouro é um teste conhecido e adotado na literatura como o melhor teste para determinado tipo de exame diagnóstico. Para o teste de *H. pylori* no estômago, atualmente, o padrão-ouro é o teste de biopsia feito por endoscopia digestiva alta. Para mensurar essa comparação, utiliza-se a sensibilidade e a especificidade. Sensibilidade é o quanto o teste diagnóstico consegue informar o resultado positivo em comparação com o padrão. E a especificidade é o quanto que um teste consegue informar o resultado negativo em comparação com o padrão-ouro. Matematicamente falando, define-se sensibilidade como [24,25]:

$$S = \frac{VP}{VP + FP}. \tag{1}$$

Onde VP é o número de resultados positivos em relação ao padrão ouro e FP é o número de resultados falsos positivos.

Já a especificidade, tem-se que [24,25]:

$$E = \frac{VN}{VN + FN}. \tag{2}$$

Onde VN é o número de resultados negativos em relação ao padrão ouro e FN é o número de resultados falsos negativos.

Para construir uma curva ROC, analisam-se vários valores de cortes possíveis. Dessa forma, tem-se a especificidade e a sensibilidade para cada valor. Depois dos valores de sensibilidade e especificidade calculados, faz-se uma figura, onde os valores da sensibilidade são plotados com os valores de um menos a especificidade [24,25]. Quanto mais a curva se aproximar da sensibilidade e se distanciar dos valores de um menos a especificidade melhor é o teste diagnostico.

4) RESULTADOS E DISCUSSÕES

Para se obter um protocolo padrão para aplicação do ^{13}C-UBT analisado por IRMS em outras populações é necessário conhecer o comportamento do turnover do ^{13}C durante o teste em diferentes indivíduos, e a partir deste, identificar o melhor tempo para a coleta, o valor de corte para o teste e alguma relação do valor do teste com a densidade de colonização da mucosa gástrica.

A fim de estimar o melhor valor de corte e fazer uma análise sobre o turnover do carbono-13, separamos em três partes essa seção. Num primeiro momento, mostram-se os resultados do exame histológico. Em segundo, será mostrada a curva do turnover do carbono-13 analisado por IRMS. E por fim faz-se a análise e o resultado para o melhor valor de corte para o ^{13}C-UBT utilizando a curva ROC.

4.1) Resultados Exames Histológicos.

Dos 52 pacientes que participaram desse trabalho apenas 26 possuem exames de histologia, pois estes pacientes não foram submetidos à EDA. Os pacientes foram enumerados conforme a ordem cronológica de realização do teste. Na tabela 2 estão apresentados os resultados dos exames histológicos. Como se observa na tabela 2, os pacientes 1, 2, 11, 12, 13, 14, 17, 18, 22, 27, 31 e 35 estão contaminados com a bactéria nas duas regiões, antro e corpo. Os pacientes 5, 10, 15, 16, 20, 23, 24, 25, 26, 32, 33 e 36 não apresentam contaminação pela *H. pylori* em nenhuma das regiões investigadas.

Tabela 2: Resultados do exame de endoscopia, e o máximo valor de DOB para UBT.

PACIENTE		**RESULTADO**		
N°	**SEXO**	**HIST. ANTRO**	**HIST. CORPO**	**Máx. DOB**
1	M	P	P	31,29
2	F	P	P	37,96
3	F	N	N	1,40
5	F	N	N	0,70
10	*F*	N	N	*1,32*
11	F	P	P	26,41
12	M	P	P	91,58
13	*F*	P	P	*6,57*

14	F	P	P	20,45
15	M	N	N	1,35
16	F	N	N	0,82
17	F	P	P	103,79
18	F	P	P	30,38
20	*F*	N	N	*1,28*
22	M	P	P	12,64
23	F	N	N	0,24
24	*F*	N	N	*0,23*
25	F	N	N	0,89
26	M	N	N	1,53
27	F	P	P	36,93
31	M	P	P	38,68
32	F	N	N	1,31
33	F	N	N	0,90
35	M	P	P	39,05
36	F	N	N	1,23
37	M	P	N	1,27

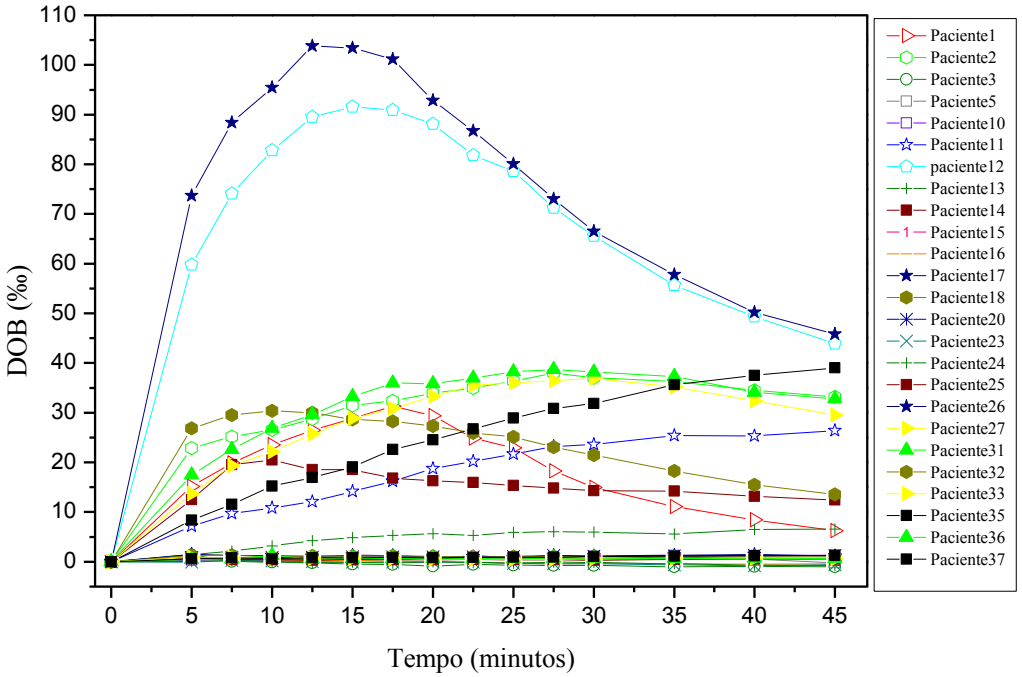
As letras N e P representam os resultados negativo e positivo, respectivamente.

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.2) Turnover do Carbono 13.

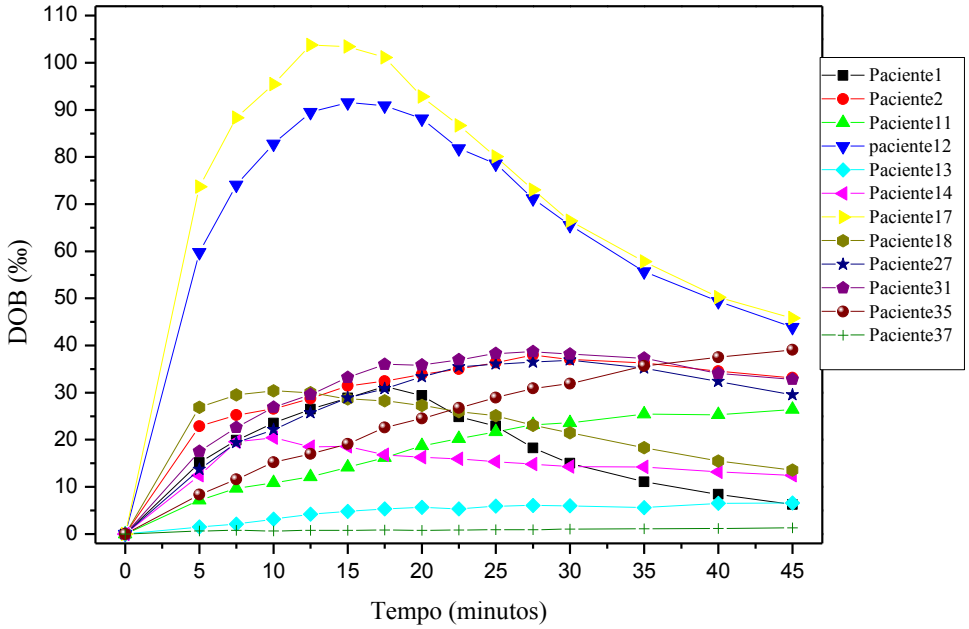
A análise do Turnover do Carbono-13 fornece informações sobre o comportamento e a mudanças nos valores do DOB – a variação da razão isotópica entre os carbonos 13 e 12 ($^{\frac{13}{12}}\delta$) em função do tempo. Na figura 2, é mostrado o turnover do Carbono-13 para pacientes submetidos ao exame de ^{13}C-UBT que possuem resultados histológicos. Na figura 3 é mostrado apenas o turnover para pacientes que possuíram resultados positivos e na figura 4 é mostrado o turnover para pacientes com resultado negativo para a *H. pylori*.

Figura 2: Turnover do Carbono 13 para pacientes com resultados histológicos.



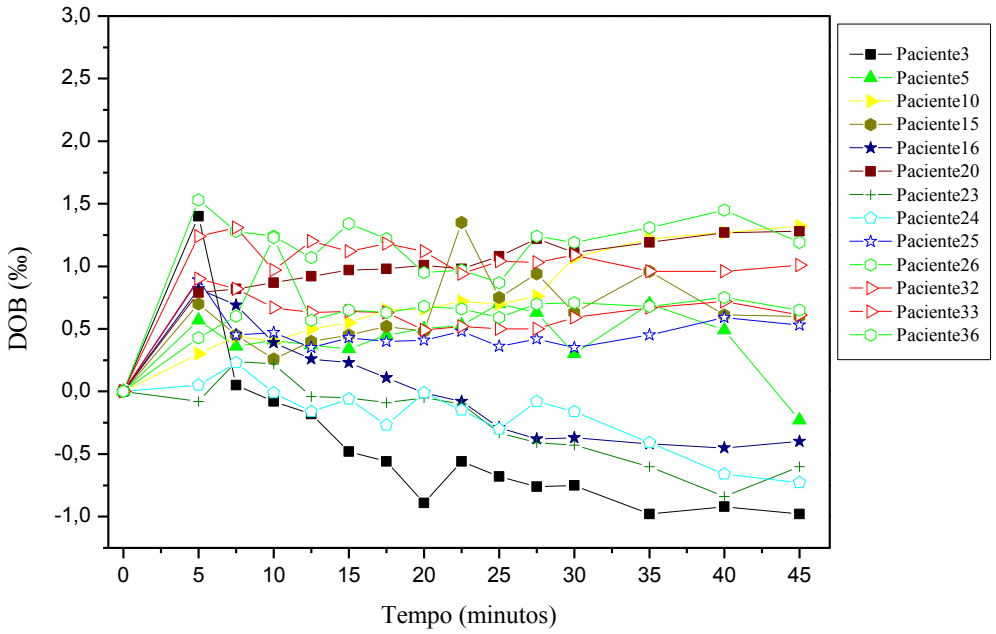
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 3: Turnover do Carbono 13 para indivíduos com resultado positivo de acordo com exames histológicos.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 4: Turnover do Carbono 13 para indivíduos com resultado negativo, de acordo com exames histológicos.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Observando as figuras 2, 3 e 4, vê-se que os pacientes infectados apresentam um crescimento abrupto do DOB, indicando o aumento do valor de DOB para pacientes que possuem a bactéria. Também se observa que para pacientes com resultados negativos não houve mudança. Sendo que estes permanecem praticamente constantes ao longo do tempo quando comparados com os casos positivos.

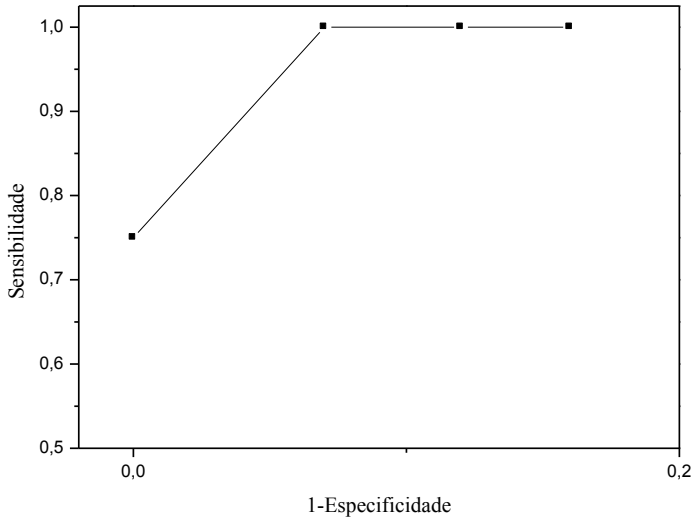
Outra observação é que para pacientes que possuem altos valores de DOB possuíram valores pequenos de tempo para que o DOB atingisse o seu valor máximo. E para pacientes que possuíram pequenos aumentos do valor de DOB o valor do tempo para que atingisse o seu valor máximo foi mais alto que para aqueles que tiveram altos valores de DOB. Com isso, observou-se que há uma relação inversamente proporcional entre o valor máximo de DOB e o tempo necessário para atingir o valor máximo DOB.

4.3) Determinação do valor de Corte da DOB para ^{13}C-UBT.

Os valores de corte testados para o DOB de UBT foram de: 15‰, 12‰, 10‰, 9‰, 8‰, 7‰, 6‰, 5‰, 4‰, 3,8‰, 3,6‰, 3,4‰, 3,2‰, 3‰, 2,75‰, 2,5‰ e 1‰. O resultado da curva ROC é apresentada na figura 5. Os valores analisados para comparação e determinação do melhor valor de corte foram os valores máximos de DOB. Não foi levado em consideração o tempo necessário para se atinja esse valor.

Analisando-se a tabela 2 e a Figura 5 que mostra a curva ROC observa-se que valores menores que 6 ‰ e maiores que 2,5 ‰ possuem valores de 1 sensibilidade e 0,93 especificidade indicando que qualquer valor entre eles poderiam ser adotados como melhor valor de corte. Entretanto, na literatura encontra-se vários artigos que apresentam valores entre 2‰ e 5‰ [4,13,17,26,27,28]. O problema encontrado nesse estudo é que possuímos um numero amostral, muito pequeno, impossibilitando observar valores variados de DOB e assim, impedindo que se faça uma analise mais analítica, realística e criteriosa.

Figura 5: Curva ROC para determinação do melhor valor de corte em pacientes submetidos a UBT e analisados com IRMS; padrão-ouro: teste histológico.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 2: Valores de DOB testados e os respectivos resultados para sensibilidade, especificidade, valores positivos, negativos, falsos positivos e falsos negativos.

DOB (‰)	Positivo IRMS VP	Negativo IRMS VN	Falso Postivo FP	Falso Negativo FN	Sens.	Esp.	Endoscopia Positivo	Endoscopia Negativo
15	10	16	0	3	1,00	0,84	13	13
10	11	15	0	2	1,00	0,88	13	13
9	11	15	0	2	1,00	0,88	13	13
8	11	15	0	2	1,00	0,88	13	13
7	11	15	0	2	1,00	0,88	13	13
6	12	14	0	1	1,00	0,93	13	13
5	12	14	0	1	1,00	0,93	13	13
4	12	14	0	1	1,00	0,93	13	13
3,8	12	14	0	1	1,00	0,93	13	13
3,6	12	14	0	1	1,00	0,93	13	13
3,4	12	14	0	1	1,00	0,93	13	13
3,2	12	14	0	1	1,00	0,93	13	13
3	12	14	0	1	1,00	0,93	13	13
2,75	12	14	0	1	1,00	0,93	13	13
2,5	12	14	0	1	1,00	0,93	13	13
1	21	5	7	0	0,75	1,00	13	13

Fonte: Elaborado pelo autor.

Uma forma de estimar e contornar esse problema é avaliar o melhor valor de corte e levar em consideração o que há na literatura. Gisbert e Pajares em 2004 publicaram um trabalho de revisão onde apresentam em uma tabela mais de vinte pesquisas sobre o valor de corte e eles, variavam de 2,5 a 5,5‰. [12]. Os resultados encontrados para a curva ROC foram de entre 2,5 a 6‰, portanto, pode-se inferir que o valor de corte deve estar entre 2,5 e 6‰. Porém como o valor máximo para paciente negativo foi de 1,5‰ valores próximos a esse poderia acarretar em um falso negativo.

Para esse estudo o melhor valor de corte está entre 2,5 a 6‰, sendo necessário aumentar o número amostral de pacientes para diminuir o intervalo do valor de corte. Esse intervalo possui valores de 0,93 para especificidade e 1 para sensibilidade. A tabela 3 mostra o máximo

DOB para os pacientes e o seu resultado para a presença da *H. pylori* no estomago de acordo com os valores de corte 2,5 a 6‰ para o UBT. Analisando a tabela, vê-se que qualquer valor adotado entre 2,5 e 6‰ apresentará o mesmo resultado, tanto para positivos como para negativos. As figuras 6 e 7 foram feitas baseadas nos resultados da tabela 3 e apresentam o turnover do ^{13}C de pacientes que tiveram resultados positivos para a presença da *H. pylori* e para pacientes que obtiveram resultados negativos para a presença da *H. pylori*, respectivamente.

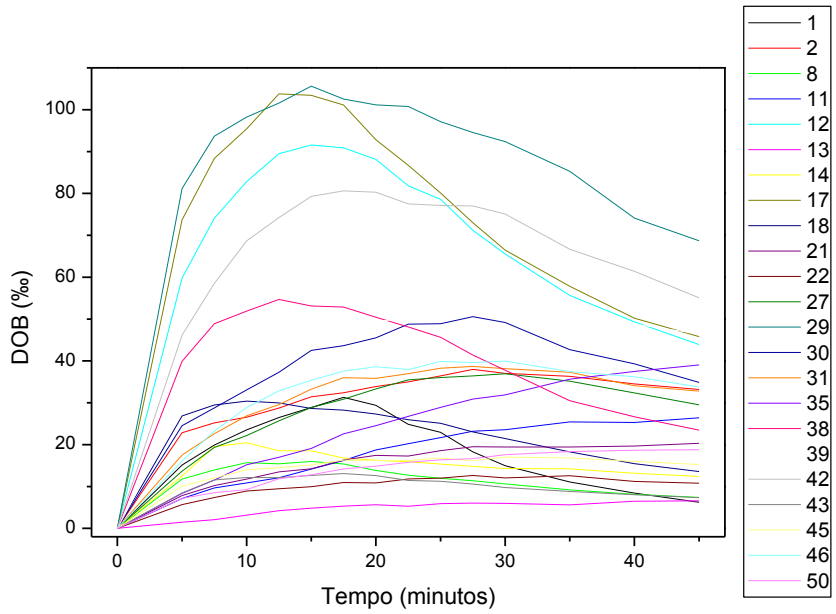
Tabela 3: Máximo valor de DOB e a classificação do resultado para valor de corte compreendido entre 2,5 a 6‰.

Paciente	Sexo	Idade	Max. DOB (‰)	UBT
01	M	37	31,29	P
02	F	53	37,49	P
03	F	48	1,40	N
04	F	55	0,69	N
05	F	41	0,70	N
06	F	35	0,44	N
07	M	48	2,11	N
08	M	45	15,99	P
09	M	72	0,54	N
10	F	113	1,32	N
11	F	31	26,41	P
12	M	44	91,58	P
13	F	36	6,57	P
14	F	34	20,45	P
15	M	55	1,35	N
16	F	30	0,82	N
17	F	32	103,79	P
18	F	49	30,38	P
19	F	36	1,29	N
20	F	48	1,28	N
21	F	62	20,33	P
22	M	47	12,64	P

23	F	62	0,24	N
24	F	20	0,23	N
25	F	69	0,89	N
26	M	62	1,53	N
27	F	58	36,93	P
28	M	48	0,75	N
29	F	58	105,62	P
30	F	53	50,56	P
31	M	59	38,68	P
32	F	20	1,31	N
33	F	18	0,90	N
34	F	47	1,85	N
35	M	36	39,05	P
36	F	29	1,23	N
37	M	41	1,27	N
38	M	64	54,67	P
39	M	52	52,77	P
40	F	34	1,38	N
41	F	55	1,14	N
42	M	48	80,61	P
43	M	59	13,09	P
44	M	52	0,95	N
45	M	56	17,04	P
46	F	50	39,93	P
47	M	53	0,75	N
48	F	30	0,88	N
49	M	69	1,02	N
50	M	62	18,79	P
51	M	54	0,08	N
52	F	42	1,19	N

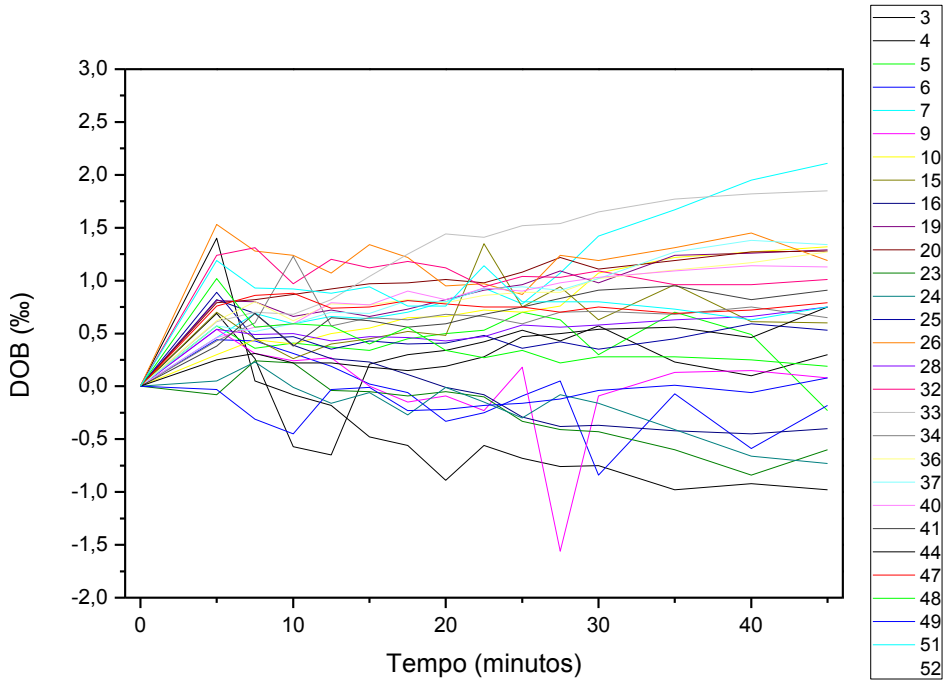
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 6: Turnover do Carbono-13 para todos os pacientes que foram classificados como positivos de acordo com o valor de corte calculado nesse trabalho.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 7: Turnover do Carbono-13 para todos pacientes que foram classificados com resultado negativo de acordo com o valor de corte proposto nesse trabalho.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Observando as figuras 6 e 7, pode-se observar que para resultados tidos como negativos o valor de DOB não variam. Para resultados positivos, pode-se observar que há uma relação inversamente proporcional entre o valor máximo de DOB e o tempo.

Analisando a tabela 3, observa-se que dentre os pacientes selecionados, 44% (23 pacientes) estavam contaminados com a *H. pylori*, enquanto que 56% (29 pacientes) não estavam contaminados com a bactéria. Este é um resultado preocupante e expressivo. O diagnóstico por UBT pode ser uma ferramenta de medicina preventiva, sendo que a descoberta da bactéria no estômago em fase inicial poupa recursos e pode impedir que pacientes desenvolvam doenças mais graves e evitando sofrimentos para eles.

5) CONCLUSÃO

O turnover apresentou uma relação inversamente proporcional entre o Máximo valor de DOB e o tempo. Ou seja, quanto maior o valor de DOB menor será o tempo para que esse valor seja atingido. Assim como, quanto menor o valor de DOB maior será o tempo para que esse valor seja atingido. Através da curva ROC foi encontrado que o melhor valor de corte varia de 2,5 a 6‰, sendo necessário aumentar o valor amostral para encontrar um valor de corte fixo, dentro desse intervalo. Com o intervalo de valor de corte pode-se constatar que 44% dos pacientes estavam contaminados com a *H. pylori* e 56% tiveram resultados negativos.

É importante também ressaltar que o ^{13}C-UBT é um teste muito menos invasivo que a endoscopia, sendo muito mais aconselhado para pacientes infantis e idosos. Se o exame fosse adotado como um teste de medicina preventiva poder-se-iam evitar vários transtornos aos pacientes, impedindo que a contaminação pela bactéria evolua para doenças mais graves, evitando dores, transtornos e sofrimento para o paciente. Também, poder-se-ia economizar recursos com internações, endoscopias e cirurgias.

REFERÊNCIAS

1. MARSHALL, B. J.; WARREN, J. R. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic-ulceration. **Lancet**, v. 323, n. 9769, p. 1311–1315, Jun. 1984.

2. MALFERTHEINER, P. et al. *Helicobacter pylori* eradication with a capsule containing bismuth subcitrate potassium, metronidazole, and tetracycline given with omeprazole versus clarithromycin-based triple therapy: a randomised, open-label, non-inferiority, phase 3 trial. **Lancet**, v. 307, n. 9769, p. 905-913, Mar. 2011.

3. KATO, M. et al. 13C-Urea breath test, using a new compact nondispersive isotope-selective infrared spectrophotometer: comparison with mass spectrometry. **Journal of Gastroenterology**, v. 39, n. 7, p. 629–634, Jul. 2004.

4. WONG, W. M. et al. 13C-urea breath test without a test meal is highly accurate for the detection of *Helicobacter pylori* infection in Chinese. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics,** v. 14, n. 10, p. 1353-1358, Maio 2000.

5. GISBERT, J. P.; PAJARES, J.M. 13C-urea breath test in the management of *Helicobacter pylori* infection J.P. **Digestive and Liver Disease,** v. 37, n. 12, p.899-906, Nov. 2005.

6. SIQUEIRA, J. S. et al. Aspectos gerais nas infecções por *Helicobacter pylori:* revisão, **RBAC,** v. 39, n. 1, p. 9-13, Jan. 2007.

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

8. KODAIRA, M. S. et al. Aspectos epidemiológicos do *Helicobacter pylori* na infância e adolescência. **Rev. Saúde Pública**, v. 36, n. 3, p. 356-369, 2002.

9. ELITSUR, Y. et al. Urea breath test in children: the United States prospective, multicenter study. **Helicobacter**, v. 14, p. 134-140, 2009.

10. QUEIROZ, D. M. et al. Natural history of *Helicobacter pylori* infection in childhood: eight-year follow-up cohort study in an urban community in northeast of brazil, **Helicobacter**, v. 17, n. 1, p.23-29, Jan. 2012.

11. ARAF, L. N. et al. *Helicobacter pylori* and iron-deficiency anemia in adolescents in brazil, **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v. 51, nº 4, p.477-480, Out. 2010.

12. 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, Set. 2007.

13. BRADEN, B. Methods and functions: breath tests. **Best Practice & Research. Clinical Gastroenterology**, v. 23, n. 3, p. 337–352, Jan. 2009.

14. GRAHAM, D. Y. et al. *Campylobacter-pylori* detected noninvasively by the C-13 Urea Breath Test. **Lancet**, v. 329, n. 8543, p. 1174–1177, 1987.

15. GISBERT J. P.; PAJARES, J. M. Review article: 13C-urea breath test in the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection - a critical review. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v. 20, n. 10, p. 1001–1017, Nov. 2004.

16. SELGRAD, M.; KANDULSKI, A.; MALFERTHEINER, P. *Helicobacter pylori*: diagnosis and treatment. **Current Opinion in Gastroenterology**, v. 25, n. 6, p. 549–556, Nov. 2009.

17. LEAL, Y. A. et al. 13C-urea breath test for the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection in children: a systematic review and meta-analysis. **Helicobacter**, v. 16, n. 4, p. 327–337, Ago. 2011.

18. SAVARINO, V. 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. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 45, n. 11, p. 2168–2174, 2000.

19. MOTTA, O. et al. New FTIR methodology for the evaluation of (13)C/(12)C isotope ratio in *Helicobacter pylori* infection diagnosis. **The Journal of Infection**, v. 59, n. 2, p. 90–94, Ago. 2009.

20. PARENTE, F.; PORRO, G. B. 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**, v. 13, n. 7, p. 803–806, Jul. 2001.

21. FERREIRA, A. I. A. J. V. **Espectrometria de massa de razões isotópicas**. 2008. 300f. Tese (Doutor) - Faculdade de Lisboa, Lisboa, 2008.

22. MUCCIO, Z.; JACKSON, G. P. Isotope ratio mass spectrometry. **Analyst**, v. 134, p.213-222, 2009.

23. PRATI, R. C.; BATISTA, G. E. A. P. A.; MONARD, M. C. Curvas ROC para a avaliação de classificadores. **IEEE Latin America Transactions**, v. 6, n. 2, p. 215-222, Jun. 2008.

24. MARTINEZ, E. Z.; NETO, F. L.;PEREIRA, B. B. A curva ROC para testes diagnósticos. **Cadernos Saúde Coletiva**, v. 11, n. 1, p. 7-31, 2003.

25. CASTANHO, M. J. P. et al. Avaliação de um teste em medicina usando uma curva ROC *fuzzy*. **Biomatemática**, v. 14, p. 19-28, 2004.

26. VAIRA, D. et al. 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. **Journal of Clinical Gastroenterology**, v. 43, n. 7, p. 693–694, 2009.

27. SUTO, H. et al. Endoscopic [13C]-urea breath test for quantification of *Helicobacter pylori* infection., **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, vol. 15, nº. 2, p. 161–167, Fev. 2000.

28. SHIRIN, H. et al. Effect of proton pump inhibitors on the continuous real time 13C-urea breath test. **The American Journal of Gastroenterology**, v. 98, nº 1, p .46-50, Jan. 2003.