

Prueba piloto para la detección de *Helicobacter pylori* con test de amoníaco en aire espirado

Diego Federico Daino,¹ Luis Soifer,² José Pedestá,³ Juan Rome¹

¹ Hospital San Roque de Gonnet, Buenos Aires, Argentina

² Centro de Educación Médica e Investigaciones Clínicas, CEMIC, Buenos Aires, Argentina.

³ Asociación Argentina de Hidrógeno – CONICET.

Acta Gastroenterol Latinoam 2015;45:012-017

Resumen

Introducción. En Argentina contamos con poca accesibilidad a los métodos diagnósticos no invasivos más sensibles y específicos para la detección de *Helicobacter pylori* (HP) como el test del aliento urea-C13. Por esto mismo proponemos el desarrollo de un nuevo método para la medición de la concentración de amoníaco (NH₃) espirado con el fin de lograr un diagnóstico rápido, preciso, accesible y de bajo costo.

Objetivo. Determinar la utilidad de un método no invasivo para la detección de HP, a través de la medición de NH₃ en la respiración. **Materiales y métodos.** Se evaluaron 23 pacientes mayores de 21 años que acudieron al consultorio de Gastroenterología. A todos se les practicó videoendoscopia digestiva alta con biopsias gástricas (antro, cuerpo e incisura angular). Las muestras fueron remitidas para estudio histopatológico y prueba de ureasa. Los sujetos que tuvieron ambas pruebas negativas (no infectados) o positivas (infectados) fueron seleccionados para la medición del NH₃ en aire espirado.

Resultado. Se estableció una prevalencia de HP de 60,9% (14 pacientes). De éstos, 10 tuvieron diferencias significativas entre la medición de NH₃ basal y posterior a la ingestión de urea, arrojando una especificidad de 88,9% y una sensibilidad de 71,43%, pero con un índice de Jouden mayor de 50%. **Conclusión.** Aunque se debe seguir desarrollando experiencia, los resultados de este estudio piloto sugieren que la medición de NH₃ en el aire espirado tras la ingestión de urea no marcada sería aplicable como prueba diagnóstica de HP, teniendo en cuenta su bajo costo y simple manejo comparado con los métodos no invasivos tradicionales.

Palabras claves. *Helicobacter pylori*, test de amoníaco en aire espirado, test de ureasa, test del aliento urea-C13.

Pilot test for *Helicobacter pylori* detection with ammonia breath test

Summary

Background. In Argentina we have little access to the more sensitive and specific non-invasive diagnostic methods for the detection of *Helicobacter pylori* (HP), such as the urea breath test. The upper gastrointestinal videoendoscopy, with biopsy for histological analysis and rapid urease test remains as the usual method in our country, but the cost is high and the accessibility is also limited. For this reason we propose to develop a new fast, accurate, accessible and inexpensive method for measuring the concentration of expired NH₃ in order to achieve a diagnosis of active infection. **Objective.** To determine the utility of a non-invasive method for detecting HP through the measurement of ammonia in the breathing. **Materials and methods.** We studied 23 patients older than 21 years, attending the Gastroenterology clinic. All patients who meet the inclusion criteria were evaluated with an upper gastrointestinal videoendoscopy and gastric biopsies (antrum, body and incisura angularis). Samples were analyzed by histopathological examination and urease test. The subjects with both negative tests (non-infected) or positive (infected) were selected for ammonia measurement in exhaled air. **Results.** The prevalence of HP infection was 60.9% (14 patients). Ten of these patients had significant differences between the baseline ammonia and the ammonia after urea ingestion, yielding a specificity of 88.9% and a sensitivity of 71.43%, with a Jouden index higher than 50%. **Conclusion.** Although the experience must be carried forward, the results of this pilot study suggest that the measurement of ammonia in breath test after ingestion of unmarked urea would be applicable as a diagnostic test for HP, taking into account its low cost and easy management compared to conventional non-invasive methods.

Key words. *Helicobacter pylori*, test of ammonia in breathe test, urease test, test of 13C-urea breathe Test.

Correspondencia: Diego Federico Daino
E-mail: dfdaino@hotmail.com

El *Helicobacter pylori* (HP) sigue siendo actualmente una de las infecciones más comunes en el mundo y se encuentra asociada a un número importante de enfermedades gastrointestinales altas como gastritis crónica, enfermedad úlcera péptica, linfoma y adenocarcinoma gástrico. Por esto mismo es de enorme importancia contar en la clínica diaria con métodos diagnósticos que sean rápidos, confiables y accesibles. La prevalencia de HP es variable, dependiendo del nivel y condiciones socioeconómicas de la población, por lo que hace más vulnerables a las poblaciones de países en desarrollo.¹

En la Argentina actualmente se encuentran pocos datos sobre la prevalencia de HP. Según datos estadísticos realizados por un estudio epidemiológico nacional, la seroprevalencia global del HP en Argentina fue $35,7 \pm 3,8\%$, siendo la edad el factor predictivo más importante.² Según el Club Argentino de Estómago y Esófago la seroprevalencia estaría cercana al 55,9% en la población global, siendo en pacientes pediátricos del 15%.³ Sin embargo, estudios poblacionales realizados en la provincia de San Luis registran una seroprevalencia en población adulta del 75,9% al 80%, por lo que es importante la heterogeneidad de las distintas poblaciones argentinas, algunas de las cuales están más expuestas que otras.^{4,5}

Muchos métodos diagnósticos han sido desarrollados en los pasados 25 años para la detección del HP. Entre ellos se encuentran los estudios invasivos (*test* de la ureasa rápida, histología, cultivo, reacción de cadena de polimerasa), y no invasivos (serología, *test* con C_{13} en aire espirado, determinación de antígeno en materia fecal).

En nuestro país contamos con poca accesibilidad a los métodos diagnósticos no invasivos más sensibles y específicos para la detección de HP, como el *test* del aliento urea- C_{13} . Este *test* ha tenido excelentes resultados,⁶⁻¹⁰ desde la primera publicación realizada por Graham y col a partir de la cual se demostró su utilidad para el diagnóstico inicial y seguimiento del tratamiento, con una sensibilidad aproximada de 97% a 100% y una especificidad de 95% a 100%, siendo considerado por algunos autores como el *gold standard*.¹¹⁻¹⁶ Sin embargo, el *test* del aliento con C_{13} -urea es relativamente caro y poco accesible en algunas regiones del país. Además, requiere el uso de radionucleótidos limitando su aplicación en niños y embarazadas. El método para la detección de HP más accesible en nuestra población sigue siendo la videoendoscopia digestiva alta con toma de biopsia tanto para el análisis histológico como para el *test* rápido de ureasa, con una sensibilidad y especificidad superior al 95%. Sin embargo, además de ser un procedimiento invasivo, no todas las poblaciones cuentan con estos recursos.

La alta actividad de la ureasa del HP provoca la ruptura de la urea en amoníaco (NH_3) y CO_2 . Este conocimiento ha llevado al desarrollo de metodologías que podrían servir como indicadoras de infección activa, ya sea midiendo el CO_2 como hace el *test* del aliento con C_{13} -urea o midiendo NH_3 en el aire espirado.

En los fluidos corporales, especialmente en la sangre, se encuentra principalmente amonio (NH_4), mientras que una pequeña parte se halla como NH_3 . Los pacientes con HP pueden desarrollar niveles elevados de NH_3 en jugo gástrico.¹⁸ El NH_3 es absorbido a través del lumen gastrointestinal y convertido en gran parte a urea por el hígado, la cual es excretada por los riñones. Sin embargo, una pequeña cantidad de NH_3 se excreta por los pulmones. Actualmente la medición de amonio en aire espirado ha sido fruto de pocos estudios en humanos. El amonio está presente normalmente en la respiración a muy bajas concentraciones (entre 100 y 2.000 partes por billón) y se encuentra como parte de una compleja mezcla de compuestos orgánicos volátiles, haciendo que su medición sea dificultosa y poco confiable con sensores convencionales.¹⁹

Nosotros, por lo tanto, proponemos el desarrollo de un nuevo método para la medición de la concentración de NH_3 espirado, con el fin de lograr un diagnóstico de infección activa por HP que sea rápido, preciso, accesible y de bajo costo.

Creemos, por lo tanto, que un resultado favorable en el marco de esta propuesta de investigación significa un enorme avance para hacer el diagnóstico de la infección por HP y fundamentalmente para comprobar su erradicación efectiva.

Materiales y métodos

Objetivos

Primario. Evaluar la sensibilidad, especificidad y reproducibilidad de un método no invasivo de diseño simple y bajo costo tendiente a evaluar los niveles de NH_3 en la respiración de pacientes que presenten o no HP según dos métodos validados: el *test* rápido de ureasa y la histología.

Secundarios. Establecer la relación existente entre la dosis de urea administrada y su correlación con el nivel de amonio espirado, y corroborar la respuesta al tratamiento.

Hipótesis

Existen diferencias en los niveles de NH_3 en el aire espirado por pacientes infectados con HP con respecto al de sujetos no infectados.

Diseño

Fue desarrollado un estudio experimental prospectivo en pacientes de ambos sexos mayores de 21 años, con síntomas gastrointestinales altos, que acudieron al consultorio de Gastroenterología. Fueron excluidos aquellos pacientes que presentaron cirrosis hepática, insuficiencia renal, gastrectomía o enfermedad pulmonar obstructiva crónica severa. También se excluyeron quienes recibieron tratamiento previo con inhibidores de la bomba de protones o antagonistas de la histamina en las dos semanas previas, o antibióticos o bismuto en el último mes, y quienes no aceptaron firmar el consentimiento informado.

Se definió sujeto no infectado a aquel individuo que presentó un *test* rápido de ureasa negativo y ausencia histológica de HP con tinción de Giemsa. Se consideró infectado por HP quien presentó ambos métodos positivos.

A todos los sujetos se les confeccionó una ficha con los datos filiatorios, los hábitos tóxicos, el consumo de fármacos en las últimas cuatro semanas, los antecedentes clínico-quirúrgicos y los síntomas gastrointestinales (epigastria, pirosis, náuseas, vómitos, melena, hematemesis, anemia crónica, saciedad precoz y/o plenitud postprandial). A todos aquellos pacientes que cumplían con los criterios de inclusión se les practicó una videoendoscopia digestiva alta con biopsias gástricas (antro, cuerpo e incisura angular). Las muestras fueron remitidas para el estudio histopatológico y la prueba de ureasa. En todos los casos incluidos la prueba de ureasa informada por el servicio de anatomía patológica fue coincidente con el resultado del estudio histopatológico. Todos los sujetos fueron seleccionados para la medición del NH_3 en aire espirado.

A cada sujeto se le realizaron 6 mediciones de NH_3 en aire espirado: 3 basales (primer tiempo) y 3 a los veinte minutos de haber ingerido 300 mg de urea contenida en cápsulas de gelatina (segundo tiempo). Para la determinación del NH_3 espirado se utilizó un dispositivo experimental con sensor electroquímico, expresándose el resultado en partes por billón por m^2 de superficie corporal (ppb/ m^2). La calibración del equipo fue realizada a través de técnica química de dilución de soluciones de NH_3 conocidas.

Las muestras de aire espirado fueron tomadas utilizando una bolsa hermética con pipeta de llenado conectada al dispositivo. Todos los sujetos participantes estaban en ayunas y dentro de los 15 minutos de haber cepillado sus dientes. Se llevaron a cabo tres determinaciones de 20 ml de aire cada una y se utilizó el valor medio de las mismas.

A efectos de su evaluación, la diferencia entre la media resultante de las 3 mediciones en el primer tiempo y la media de las 3 mediciones en el segundo tiempo de cada paciente se expresó como diferencia proporcional respec-

to de la primera medición. Las muestras fueron procesadas por un solo observador dentro de las siguientes 4 horas.

Todas las variables evaluadas se registraron en una base de datos en formato *Microsoft Excel*. Se utilizó como herramienta cuantitativa el *test* de prueba diagnóstica simple del *software EPIDAT, v.3.0*, de la Organización Mundial de la Salud, para el proceso de determinar en un paciente la presencia de la enfermedad no susceptible de ser observada directamente.

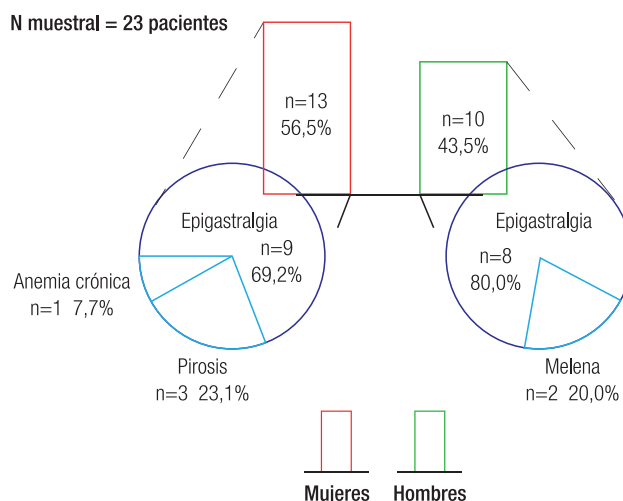
Resultados

Fueron encuestados 150 pacientes, de los cuales 27 presentaban criterios clínicos de inclusión. De ellos, 4 pacientes fueron excluidos (3 con *test* de urea negativa e histopatología positiva y 1 con *test* de urea positivo e histopatología negativa). Este último paciente podía ser un falso positivo por contaminación con una bacteria productora de ureasa.

De los 23 incluidos, 13 (56,5%) eran mujeres y 10 (43,5%) hombres. El promedio de edad global fue 52,6 años (rango 22 a 81 años). La edad promedio fue 54 años (rango 22 a 81 años) para las mujeres y 50,9 años (rango 23 a 74 años) para los hombres. El motivo de consulta más frecuente fue la epigastria en 17 pacientes (73,9%), seguido de la pirosis en 3 (13,0%), la melena en 2 (8,7%) y la anemia crónica en 1 (4,3%) (Figura 1).

Se estableció la presencia de infección por HP en 14 pacientes (60,9%) (Figura 2). Para los 9 pacientes no infectados, la diferencia entre mediciones resultó negativa (entre

Figura 1. Motivo de consulta según sexo.



Prueba piloto para la detección de *Helicobacter pylori* con *test* de amoníaco en aire espirado. Diego Daino, Luis Soifer.

0% y - 4,4 %) en 8 casos y positiva (+ 5,8%) en 1. En los 14 pacientes infectados los valores de la diferencia se distribuyeron de la siguiente forma: rango de 36 a 55,6% en 10, diferencia nula en 3 y diferencia negativa (- 1,4%) en 1.

En la Tabla 1 se muestran los resultados de la anatomía patológica. En la Tabla 2 se ven las diferencias de medición de NH_3 con respecto al valor del primer tiempo en orden

ascendente. De esta tabla surge que se obtuvo un resultado incorrecto en el 28,5% de los pacientes infectados y en el 11,1% de los no infectados. Estos datos se sometieron a una prueba de diagnóstico simple con un nivel de confianza del 95%. La Tabla 3 muestra la relación entre la prueba diagnóstica y la anatomía patológica, y la Tabla 4 los resultados de la evaluación de la prueba diagnóstica.

Figura 2. Presencia de *Helicobacter pylori*.

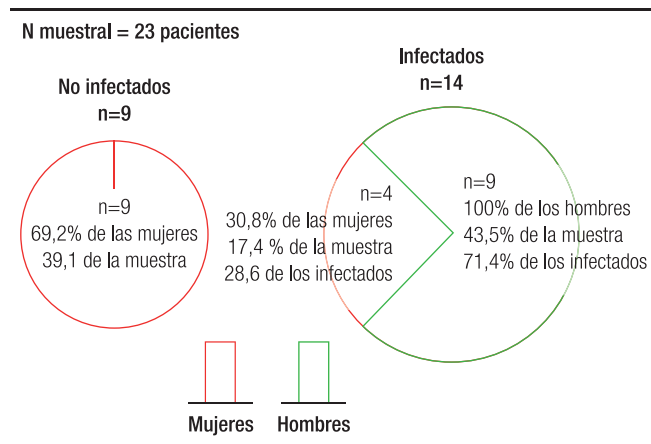


Tabla 1. Resultados de la anatomía patológica.

Informe de anatomía patológica	n
HP negativo - normal	2
HP negativo - gastritis crónica.	4
HP negativo - gastritis crónica en actividad	2
HP negativo - gastritis crónica intestinal con foco metaplasia intestinal	1
HP positivo - normal	1
HP positivo - gastritis crónica con folículos linfoides	7
HP positivo - intensa gastritis crónica en actividad	5
HP positivo - gastritis crónica	1
Total de informes	23

HP: *Helicobacter pylori*.

Tabla 2. Diferencias de medición de NH_3 con respecto al valor del primer tiempo en orden ascendente.

Presencia de <i>Helicobacter pylori</i>	Nivel de NH_3 en aire espirado (ppb/m ²)			Resultado
	Primer tiempo	Segundo tiempo	Diferencia (%)	
No infectado	135	135	0,0	Correcto
No infectado	135	135	0,0	Correcto
No infectado	138	138	0,0	Correcto
No infectado	140	135	-3,6	Correcto
No infectado	140	135	-3,6	Correcto
No infectado	141	141	0,0	Correcto
No infectado	142	135	-4,9	Correcto
No infectado	142	138	-2,8	Correcto
No infectado	138	146	5,8	Incorrecto
Infectado	135	160	18,5	Correcto
Infectado	135	160	18,5	Correcto
Infectado	135	165	22,2	Correcto
Infectado	135	180	33,3	Correcto
Infectado	135	180	33,3	Correcto
Infectado	135	210	55,6	Correcto
Infectado	140	145	3,6	Correcto
Infectado	140	145	3,6	Correcto
Infectado	140	165	17,9	Correcto
Infectado	140	170	21,4	Correcto
Infectado	135	135	0,0	Incorrecto
Infectado	135	135	0,0	Incorrecto
Infectado	135	135	0,0	Incorrecto
Infectado	143	141	-1,4	Incorrecto

Tabla 3. Relación entre la prueba diagnóstica y la anatomía patológica.

Estado de los pacientes según la anatomía patológica			
Prueba diagnóstica	Infectados	No infectados	Total
Infectados	10	1	11
No infectados	4	8	12
Total	14	9	23

Tabla 4. Resultados de la evaluación de la prueba diagnóstica.

	Valor	IC 95%
Sensibilidad (%)	71,43	67,7-75,1
Especificidad (%)	88,89	83,2-94,6
Valor predictivo positivo (%)	90,91	86,2-95,6
Valor predictivo negativo (%)	66,67	62,3-71,0
Índice de Jouden	0,60	

IC 95%: Intervalo de confianza del 95%

Discusión

Los resultados de este estudio piloto sugieren que la medición de NH_3 en aire espirado (utilizando un sensor electroquímico) tras la ingestión de urea no marcada sería aplicable como prueba diagnóstica de HP. A diferencia del trabajo realizado por Kearney y col,¹⁹ quienes encontraron en pacientes infectados tasas de niveles de NH_3 en aire espirado basal más bajas que en pacientes no infectados, en nuestro trabajo no hubo diferencias significativas en cuanto a las mediciones basales de ambos grupos. Este hallazgo contrariaría la hipótesis de que los pacientes infectados con HP tienen una *up-regulation* de enzimas hepáticas que incorporan el NH_3 en el ciclo de la urea.

El aumento de NH_3 en la respiración después de la ingestión de urea contradice los hallazgos de Plevris y col,²⁰ quienes no encontraron diferencias en los niveles de NH_3 en sangre entre pacientes que presentaban HP positivo y negativo. Sin embargo, en este estudio se utilizaron dosis mucho mayores de urea no marcada (100 mg/kg) y además se incluyeron sujetos con enfermedad hepática crónica que, como sabemos, presentan un importante incremento de NH_3 en sangre y aire espirado.²¹ Otros estudios proporcionan evidencia a favor de este trabajo, como el estudio realizado por Chittajallu y col que demuestra un aumento de NH_3 en el jugo gástrico posteriormente a la infusión de urea intragástrica.²²

En nuestro estudio la prueba diagnóstica arroja alta especificidad pero se encuentra acompañada de un resultado en el cálculo de Jouden ligeramente mayor al 50%. El cálculo de Jouden deberá acercarse mucho más al valor 1 para adjudicar significación a la aplicación. Por ello, será necesario continuar desarrollando la experiencia con un aumento del número muestral. No se deberá soslayar la capacidad diagnóstica del método estudiado, la simpleza de su manejo y su bajo costo, comparado con los métodos tradicionales.

Referencias

1. Everhart JE. Recent developments in the epidemiology of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterol Clin North Am* 2000;29:559-579.
2. Olmos JA, Ríos H, Higa R, The Argentinean Hp Epidemiologic Study Group. Prevalence of *Helicobacter pylori* infection in Argentina: results of a nationwide epidemiologic study. *J Clin Gastroenterol* 2000;31:33-37.
3. Pest PS, Corti R, Pedrana R, Varela A, Glanczpigel R, Schraier M. Seroprevalencia de la infección por *Helicobacter pylori* en la República Argentina: influencia de la edad, sexo, nivel socio-económico, área geográfica e infraestructura sanitaria: estudio multicéntrico realizado por el Club Argentino del Estómago y Duodeno. *Acta Gastroenterol Latinoam* 1999;29:297-305.
4. Mattana C, Vega A, Gómez P, Puig de Centorbi O. Perfil serológico de la infección por *Helicobacter pylori* en la población de San Luis (Argentina). *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2004;22:227-229.
5. Olmos JA, Rosa Diez G, Higa R, Algranati S, Ríos H, De Pula JA, Dos Ramos Farias E, Dávalos J. Seroprevalencia de *Helicobacter pylori* en hemodializados. *Acta Gastroenterol Latinoam* 2003;33:139-144.
6. Hamlet AK, Erlandsson KI, Olbe L, Svennerholm AM, Backman VE, Pettersson AB. A simple, rapid, and highly reliable capsule-based ^{14}C urea breath test for diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *Scand J Gastroenterol* 1995;30:1058-1063.
7. Klein PD, Malaty HM, Martin RF, Graham KS, Genta RM, Graham DY. Noninvasive detection of *Helicobacter pylori* infection in clinical practice: the ^{13}C -urea breath test. *Am J Gastroenterol* 1996;91:690-694.
8. Rauws EAJ, Royen EAV, Langenberg W, Woensel JV, Vrij AA, Tytgat GN. ^{14}C -urea breath test in *C. pylori* gastritis. *Gut* 1989;30:798-803.
9. Vaira D, Vakil N. Blood, urine, stool, breath, money, and *Helicobacter pylori*. *Gut* 2001; 48:287-289.
10. Graham DY, Klein PD, Evans DJ, Alpert LC, Opekun AR, Boutton TW. *Campylobacter pylori* detected noninvasively by the ^{13}C -urea breath test. *Lancet* 1987;1 (8543):1174-1177.
11. Epplé HJ, Kirstein FW, Bojarski C, Frege J, Fromm M, Riecken EO, Schulzke JD. ^{13}C -urea breath test in *Helicobacter pylori* diagnosis and eradication. Correlation to histology, origin of 'false' results, and influence of food intake. *Scand J Gastroenterol* 1997;32:308-314.
12. Goddard AF, Logan RP. Urea breath tests for detecting *Helicobacter pylori*. *Aliment Pharmacol Ther* 1997;11:641-649.

13. The Gastrointestinal Physiology Working Group. Helicobacter and gastritis in Peruvian patients: relationship to socioeconomic level, age and sex. *Am J Gastroent* 1990;85:819-823.
14. Marshall BJ, Barrett LJ, Prakash C, McCallum RW, Guerrant RL. Urea protects *Helicobacter* (*Campylobacter*) *pylori* from the bactericidal effect of acid. *Gastroenterology* 1990;99:697-702.
15. Mokuolu AO, Sigal SH, Lieber CS. Gastric juice urease activity as a diagnostic test for *Helicobacter pylori* infection. *Am J Gastroenterol* 1997;92:644-648.
16. Spanel P, Davies S, Smith D. Quantification of ammonia in human breath by the selected ion flow tube analytical method using H_3O^+ and O_2^+ precursor ions. *Rapid Commun Mass Spectrom* 1998;12:763-766.
17. Wagner C, Traud W. On the interpretation of corrosion processes through the superposition of electrochemical partial processes and on the potential of mixed electrodes. *Z Elektrochem Ang Physik Chemie* 1938; 44:301-402.
18. Stern M, Geary AL. Electrochemical polarization. A theoretical analysis of the shape of polarization curves. *J Electrochem Soc* 1957;104:50-63.
19. Kearney DJ, Hubbard T, Putnam D. Breath ammonia measurement in *Helicobacter pylori* infection. *Dig Dis Sci* 2002; 47:2523-2530.
20. Plevris JN, Morgenstern R, Hayes PC, Bouchier IA. Hyperammonaemia in cirrhosis and *Helicobacter pylori* infection. *Lancet* 1995;346:1104.
21. Adrover R, Cocozzella D, Ridruejo E, García A, Rome J, Podestá JJ. Breath-ammonia testing of healthy subjects and patients with cirrhosis. *Dig Dis Sci* 2012; 57:189-195.
22. Chittajallu RS, Neithercut WD, Macdonald AM, McColl KE. Effect of increasing *Helicobacter pylori* ammonia production by urea infusion on plasma gastrin concentrations. *Gut* 1991;32:21-24.