

Pruebas de aliento en el diagnóstico de enfermedades digestivas

J.P. Gisbert e Y. González-Lama

Servicio de Aparato Digestivo. Hospital Universitario de la Princesa. Madrid. España.

RESUMEN

La determinación de carbono o hidrógeno marcados en el aliento ha permitido un acercamiento a los mecanismos patogénicos más íntimos de diversas enfermedades digestivas. Así, la prueba del aliento con urea marcada con ^{13}C es un método diagnóstico no agresivo, sencillo y seguro, que posee una excelente exactitud tanto para el diagnóstico inicial de la infección por *Helicobacter pylori* como para la confirmación de su erradicación tras la administración de tratamiento. Además, la sencillez, la reproducibilidad y la inocuidad de este tipo de exploraciones las ha hecho atractivas para sustituir a otras más molestas, caras e incómodas que se han utilizado de forma tradicional para explorar diferentes ámbitos de la gastroenterología. En este sentido, se han desarrollado diversos tests del aliento que permiten una estimación fiable de la función hepática o pancreática exocrina, de la motilidad gastrointestinal, en lo que se refiere al vaciamiento gástrico o al tiempo de tránsito orocecal, y un acercamiento diagnóstico a los problemas clínicos que se pueden derivar del sobrecrecimiento bacteriano o de la malabsorción de diferentes azúcares.

BREATH TESTS IN THE DIAGNOSIS OF GASTROINTESTINAL DISEASES

Determination of carbon or hydrogen markers in breath has allowed closer investigation of the pathogenic mechanisms of several gastrointestinal diseases. Thus, the ^{13}C -urea breath test is a nonaggressive, simple and safe test with excellent accuracy both in the initial diagnosis of *Helicobacter pylori* infection and in confirmation of its eradication following treatment. Moreover, because of the simplicity, reproducibility and safety of these types of procedure, they have tended to substitute more uncomfortable and expensive

techniques that were traditionally used in gastroenterology. Several breath tests have been developed that allow reliable evaluation of liver or exocrine pancreatic function, gastrointestinal motility, as related to gastric emptying or orocecal transit time, and a diagnostic approach to clinical problems that could be due to bacterial overgrowth or malabsorption of various sugars.

INTRODUCCIÓN

Las pruebas del aliento que detectan la presencia de carbono o hidrógeno marcados con ^{13}C tras la administración de diversas sustancias, sustratos de diferentes rutas enzimáticas, ha permitido una aproximación a los mecanismos fisiopatológicos de diversas enfermedades digestivas de una forma indirecta¹. A lo largo del presente artículo, se revisará la utilidad de las diferentes pruebas del aliento en la valoración de la capacidad funcional hepática, la reserva pancreática exocrina, el sobrecrecimiento bacteriano, la motilidad gastrointestinal, la malabsorción de hidratos de carbono y, fundamentalmente, la infección por *Helicobacter pylori*.

PRUEBA DEL ALIENTO PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA INFECCIÓN POR *H. PYLORI*

La infección por *H. pylori* desempeña un papel fundamental en el desarrollo de diversas lesiones gastroduodenales, por lo que su identificación representa un tema clínicamente relevante. Los métodos diagnósticos de la infección por *H. pylori* se han dividido tradicionalmente en directos e indirectos². Los primeros se basan en la demostración directa del microorganismo mediante el estudio de muestras obtenidas por biopsia gástrica. Son, por tanto, técnicas que precisan una endoscopia y, por ello, resultan agresivas o molestas para el enfermo. Los métodos indirectos se basan en el estudio y la detección de ciertas características de la bacteria (p. ej., la capacidad de hidrolizar la urea) o de la respuesta del sistema inmunitario del huésped frente a la infección (cuantificación

Correspondencia: Dr. J.P. Gisbert.
Playa de Mojácar, 29. Urb. Bonanza.
28669 Boadilla del Monte.
Madrid. España.
Correo electrónico: gisbert@meditex.es

Recibido el 29-11-2004; aceptado para su publicación el 29-11-2004.

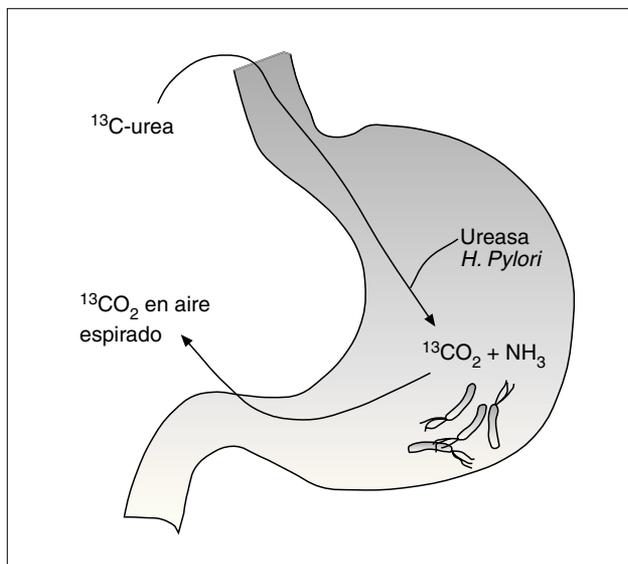


Fig. 1. Fundamento de la prueba del aliento con urea marcada con ^{13}C .

de anticuerpos específicos mediante las diversas pruebas serológicas). Este tipo de técnicas no precisan endoscopia y, por tanto, pueden considerarse poco agresivas o molestas para el enfermo. La prueba del aliento con urea (PAU) se basa en la capacidad de la ureasa producida por *H. pylori* para hidrolizar una solución de urea previamente marcada con el isótopo ^{13}C o ^{14}C . Como se representa gráficamente en la figura 1, el CO_2 marcado se absorbe, se difunde a la sangre, es transportado a los pulmones y de allí es excretado a través del aire espirado.

La utilización de ^{13}C comporta indudables ventajas (en comparación con el ^{14}C), ya que se trata de un isótopo natural estable y no radiactivo, que puede utilizarse tantas veces como sea necesario³. Por el contrario, la PAU que utiliza ^{14}C , técnica que no está autorizada por las autoridades sanitarias españolas para el diagnóstico de *H. pylori*, se asocia a una dosis de radiación que, aunque considerablemente baja, hace necesario disponer de licencia para su manejo, precisa un almacenamiento adecuado y no permite su empleo en mujeres embarazadas o en niños. En esta última población, la PAU con ^{13}C se configura como una prueba ideal para la determinación de la infección por *H. pylori*, y recientemente se ha demostrado que este test posee el mismo –excelente– rendimiento diagnóstico en niños que en adultos³. En el otro extremo de la vida, algunos autores han comprobado cómo la PAU es también notablemente precisa para diagnosticar la infección por *H. pylori* en los pacientes ancianos⁴.

Para confirmar la erradicación de *H. pylori* tras el tratamiento la prueba que se debe emplear dependerá de la enfermedad de base. Así, en la úlcera duodenal o en la dispepsia –en caso de que se decida administrar tratamiento en ella– la PAU es el método diagnóstico de elección^{5,6}. En estas situaciones la PAU confirma precozmente la desaparición de *H. pylori* tras el tratamiento, a diferencia de

las técnicas serológicas, que precisan un período prolongado para objetivar el efecto de la erradicación⁷. De ahí que en el momento actual la PAU deba considerarse la técnica de elección para confirmar la erradicación de *H. pylori* (cuando no es precisa la gastroscopia), lo que deberá comprobarse al menos 4 semanas después de haber finalizado el tratamiento².

La exactitud diagnóstica de la PAU ha sido muy elevada en la mayoría de los estudios publicados –entre el 90 y el 100%–, e incluso con cifras superiores al 95% cuando únicamente se consideran aquellos protocolos metodológicamente más correctos⁷⁻¹⁹. La elevada sensibilidad obtenida en la mayoría de los estudios podría ser debida a que la PAU valora la totalidad de la mucosa gástrica, a diferencia de los métodos diagnósticos basados en el análisis de la muestra obtenida por biopsia, que están sujetos por tanto a la distribución heterogénea de *H. pylori* en la cavidad gástrica. No obstante, el empleo de antibióticos o inhibidores de la bomba de protones en los días previos a la realización de la prueba es una causa demostrada de resultados falsos negativos³. Por ello, se recomienda que transcurra al menos un mes desde la finalización del tratamiento antibiótico hasta la realización de la prueba y al menos 14 días desde la retirada de los inhibidores de la bomba de protones⁵. La especificidad de la PAU es también excelente³; aunque se ha descrito que, al menos en teoría, pueden obtenerse resultados falsos positivos como consecuencia de la existencia en el estómago de otras bacterias productoras de ureasa, la relevancia clínica de este hecho parece ser muy limitada².

Se han propuesto numerosas modificaciones de la técnica de la PAU y se han publicado multitud de trabajos en relación a su metodología, a pesar de lo que, en la actualidad, no existe todavía una estandarización definitiva de la prueba. A continuación, se revisan los aspectos más relevantes del protocolo de esta prueba diagnóstica.

¿Qué equipamiento puede emplearse para detectar el ^{13}C ?

Para la realización de la PAU se ha empleado tradicionalmente la tecnología de espectrometría de masas de relaciones isotópicas. Sin embargo, esta técnica se asocia con una serie de inconvenientes, como su elevado coste, su relativa complejidad de uso y mantenimiento, su considerable tamaño y una cierta demora en la obtención de los resultados. Por ello, en una época más reciente se han desarrollado otras técnicas para detectar ^{13}C en el aire espirado, entre las que destaca la que utiliza la tecnología láser o la espectrofotometría de infrarrojos³. Este último método tiene una serie de ventajas, entre las que destaca, en primer lugar, su menor coste. Otra ventaja es que tiene un mantenimiento más sencillo, entre otros motivos porque no necesita helio para su funcionamiento. El pequeño tamaño del espectrofotómetro de infrarrojos, en comparación con el espectrómetro de masas, supone otra ventaja adicional, haciendo del primer método una atractiva opción para los laboratorios que procesan un reducido nú-

mero de muestras o para el uso en la propia consulta del médico. Esta última alternativa se ve favorecida por la rapidez con la que se obtienen los resultados, pues éstos están disponibles en tan sólo unos pocos minutos^{3,19,20}.

No obstante, el espectrómetro de masas posee también algunas ventajas con respecto a la tecnología de infrarrojos^{3,19}. En primer lugar, su precisión es muy elevada, lo que exige la recogida de tan sólo una pequeña cantidad de aire espirado en tubos de reducido tamaño (10 ml); en contraste, el espectrofotómetro de infrarrojos precisa la obtención de un volumen de aire considerablemente mayor, por lo que se necesita utilizar bolsas en lugar de tubos. En segundo lugar, permite el procesamiento automatizado de un elevado número de muestras (más de 200, esto es, más de 100 pacientes al día), lo que lo hace ideal para grandes centros sanitarios, típicamente de referencia, donde se realicen numerosas pruebas del aliento; sin embargo, el espectrofotómetro de infrarrojos sólo permite el procesamiento de un número muy limitado de muestras. Por último, el pequeño tamaño de los tubos del espectrómetro de masas en los que se recoge el aire espirado facilita el almacenamiento de las muestras y su envío a otros centros, lo que permite que el equipo esté disponible únicamente en algunos centros de referencia, abaratándose con ello los costes considerablemente³.

¿Es preciso el ayuno previo a la PAU?

La mayoría de los protocolos recomiendan realizar la PAU tras un período de ayuno de, al menos, 4 h. Esta recomendación se basa en la suposición de que la «comida de prueba» que generalmente se utiliza para retrasar el vaciamiento gástrico será menos efectiva si no se ha mantenido un período de ayunas previo. Además, se ha sugerido que la presencia de comida en el estómago puede contribuir a que la variabilidad de la excreción de ¹³CO₂ sea mayor.

Algunos autores sugieren que la ausencia del ayuno se asocia con falsos negativos de la PAU en los pacientes infectados y, al mismo tiempo, con falsos positivos en aquellos que no sufren la infección^{21,22}. En este sentido, Mana et al²³ realizaron dos pruebas sucesivas, con y sin ayuno, a un grupo de voluntarios sanos; la concordancia entre los dos protocolos fue perfecta respecto a los casos *H. pylori*-positivos, pero un 33% de los pacientes *H. pylori*-negativos en condiciones de ayuno fueron considerados erróneamente infectados, al realizar el test tras la ingesta alimentaria.

No obstante, la diferencia entre los valores δ (con los que se cuantifica el resultado de la prueba) en condiciones de ayuno o sin restricciones de dieta ha sido muy reducida en algunos estudios^{23,24} o incluso inexistente en otros²⁵. Así, algunos autores han demostrado que la eliminación del requisito del ayuno no reduce la exactitud diagnóstica de la PAU, haciendo la prueba más fácil y cómoda para el paciente²⁴⁻³⁰. Incluso, alguno de estos autores ha demostrado la equivalencia de ambos protocolos, con y sin ayuno, en el mismo grupo de pacientes^{24,27,28}.

En resumen, la necesidad del ayuno previo a la PAU continúa representando un capítulo debatido. Por tanto, aunque es probable que este aspecto metodológico no sea esencial para efectuar la prueba, parece prudente la realización de la PAU en ayunas (lo que en la práctica no supone un gran trastorno para el paciente) hasta que nuevos datos clarifiquen definitivamente la cuestión.

¿Es necesaria una «comida de prueba»^{29,30}? ¿Cuál es la mejor?

Se han empleado distintas «comidas de prueba» con la intención de mejorar los resultados de la PAU, pues se ha sugerido que la administración de urea sin dicho preparado previo daría lugar al vaciamiento del sustrato antes de que pudiera producirse la suficiente interacción con *H. pylori*, con el consiguiente riesgo de resultados falsos negativos³. La solución de ácido cítrico es, en la actualidad, una de las más utilizadas, y se ha descrito que gracias a su empleo se obtienen unas concentraciones máximas de ¹³CO₂ en aliento más elevadas y precoces³¹⁻³⁷. En consecuencia, se ha sugerido que la administración de ácido cítrico incrementaría el poder de discriminación entre los valores positivos y negativos de la PAU.

El grupo alemán de Malfertheiner et al fue el primero en describir y optimizar el protocolo de la PAU en el que se administraba la urea 10 min después de la ingestión de una solución de ácido cítrico³⁸. Posteriormente, este mismo grupo demostró que este protocolo podía simplificarse, sin perder exactitud diagnóstica, al administrar la urea disuelta en la propia solución de ácido cítrico^{38,39}. Esta modificación hace posible preparar el volumen total de la solución (urea disuelta en ácido cítrico) que se requiere para todos los pacientes en los que se llevará a cabo la PAU durante un día o incluso varias semanas³⁸.

Además del ácido cítrico, el zumo de naranja también se ha evaluado como «comida de prueba»^{34,40-43}, aunque las comparaciones directas entre ambas alternativas son excepcionales^{34,41}. En uno de estos estudios comparativos se demostró que ambas «comidas de prueba» eran igualmente efectivas⁴¹. Sin embargo, en un reciente estudio se concluye que el ácido cítrico se asocia con mejores resultados que el zumo de naranja en el diagnóstico de la infección por *H. pylori*³⁴. Así, cuando se empleó ácido cítrico se alcanzó una sensibilidad del 100%, mientras que ésta fue del 88% cuando se administró zumo de naranja. Estas diferencias son atribuidas a una menor recuperación de ¹³CO₂ cuando se emplea zumo de naranja en lugar de ácido cítrico³⁴. Por último, el zumo de piña parece asociarse con resultados insatisfactorios, con una exactitud diagnóstica menor del 90%⁴⁴.

No obstante, es preciso señalar que algunos autores han obtenido también resultados esperanzadores sin emplear ácido cítrico (u otra «comida de prueba»^{25,28,37,45-51}), aunque alguno de estos estudios únicamente ha incluido pacientes que no habían recibido tratamiento erradicador³⁷ o un número muy reducido de éstos postratamiento^{49,50}. En este sentido, la exactitud diagnóstica de la PAU debe eva-

luarse y confirmarse no sólo antes de recibir tratamiento sino también tras la administración de antibióticos para *H. pylori*, situación en la que, a pesar de la persistencia de la infección, la densidad de microorganismos en la mucosa gástrica es menor. De este modo, Menegatti et al⁵² han demostrado que la sensibilidad de la PAU con ácido cítrico para el diagnóstico de la infección por *H. pylori* tras el tratamiento erradicador es del 100%, mientras que esta cifra desciende hasta el 80% cuando se prescinde del ácido cítrico.

En resumen, a la espera de más estudios que clarifiquen definitivamente el tema, probablemente deba seguir empleándose una «comida de prueba» (especialmente una solución de ácido cítrico) en el protocolo de la PAU. Aunque es posible que el beneficio de administrar esta «comida de prueba» se restrinja a unos pocos casos concretos, la simplicidad, la buena tolerancia y el reducido coste del ácido cítrico probablemente hagan recomendable su empleo sistemático en la práctica clínica.

¿Qué dosis de urea debe administrarse?

La dosis precisa de urea no está claramente establecida, y ésta ha disminuido progresivamente con el paso del tiempo. Mientras las primeras pruebas se realizaron con 350 mg de urea⁵³, posteriormente se han empleado con éxito 125 o 100 mg. Más recientemente se ha sugerido que 75 mg serían suficientes para obtener unos buenos resultados, ésta es la dosis de urea más utilizada en la actualidad³. Por último, diversos estudios han confirmado que incluso 50 mg de urea podrían permitir obtener una excelente exactitud diagnóstica^{41,50,54-57}.

La flora orofaríngea productora de ureasa puede, en teoría, causar falsos positivos de la PAU. Para obviar este problema, algunos investigadores han encapsulado la urea o han administrado el sustrato en forma de tabletas^{35,41,56,58}. Con esta forma de administración se han descrito excelentes resultados al emplear únicamente 50 mg de urea^{41,50,56,57} o incluso 38 mg de este sustrato⁵⁸. Puesto que la excreción endógena de CO₂ es menor en niños que en adultos, probablemente se requiere una dosis menor de urea en los primeros. Así, se ha demostrado que 50 mg de urea son más que suficientes para obtener excelentes resultados en la edad pediátrica⁵⁹⁻⁶³.

¿Cuándo tiempo después de ingerir la urea deben obtenerse las muestras de aliento?

Las muestras de aliento recogidas demasiado tarde pueden ser responsables de resultados falsos negativos, debido al vaciamiento de la urea del estómago³. Contrariamente, se ha constatado que los protocolos que recogen las muestras de aire espirado demasiado pronto (a los 5 o 10 min) pueden tener una menor especificidad (esto es, más falsos positivos), debido a la interferencia de los organismos productores de ureasa localizados en la cavidad oral^{12,62}. Por ello, clásicamente ha existido acuerdo en la

recogida de 2 muestras del aliento, una basal y la otra entre 20 y 30 min después de la ingestión de urea. No obstante, el problema de la interferencia de la flora orofaríngea podría obviarse con el empleo de la urea en forma de cápsulas o tabletas en lugar de su formulación líquida habitual, con lo que la PAU podría realizarse tan sólo 10 min después de haber ingerido la urea^{35,41,56}.

La elección del momento ideal para la recogida de las muestras de aliento depende del tiempo necesario para que se produzca la hidrólisis de la ¹³C-urea tras el contacto con la ureasa de *H. pylori*. Como se ha mencionado previamente, la solución de ácido cítrico induce un incremento más rápido del CO₂ marcado en el aliento³¹⁻³⁶, lo que sugiere que una toma de aliento a los 10-15 min podría ser apropiada³². Además, el ácido cítrico ha demostrado ser capaz de disminuir la interacción de la ureasa oral a través de la inducción de la producción de saliva³³. En resumen, cuando la PAU se lleva a cabo siguiendo el protocolo más ampliamente utilizado (esto es, con ácido cítrico y 75 mg de urea), la exactitud diagnóstica es excelente cuando las muestras de aliento se recogen tan pronto como a los 10-15 min tras haber ingerido la urea, lo que indica que probablemente es innecesario esperar hasta los tradicionales 30 min.

¿Cuál es el punto de corte más adecuado para discriminar entre pacientes *H. pylori* positivos y negativos?

La elección precisa del punto de corte para definir si la PAU es positiva o negativa representa un aspecto crítico y notablemente controvertido. El punto de corte se ha localizado clásicamente en 5 unidades δ ⁶⁴. Más recientemente, diversos autores han evidenciado que dicha cifra puede reducirse hasta 3,0 o 3,5‰ sin comprometer la sensibilidad y la especificidad de la PAU, e incluso mejorando su eficacia diagnóstica³. Por último, algunos investigadores han sugerido, incluso, la utilización de puntos de corte inferiores a los señalados, en torno a 2,5 unidades δ , aunque en general han empleado dosis inferiores de urea (la dosis de urea probablemente determina, a su vez, el punto de corte más adecuado)³.

Algunos autores han recomendado establecer una zona «gris» en la que los resultados serían considerados como no concluyentes³. La amplitud de esta zona indeterminada varía según los estudios, pero generalmente incluye valores entre 2,0 y 5,0‰, o incluso entre 2,5 y 3,5‰. Afortunadamente, sólo una mínima proporción de los pacientes (aproximadamente el 1-2%) se encuentran en esta zona «gris»³, lo que indica que cuando la PAU es positiva los valores δ habitualmente se encuentran muy por encima del punto de corte; en el sentido contrario, los valores δ de los pacientes no infectados se sitúan generalmente en cifras cercanas a cero y, por tanto, alejadas también del punto de corte. Estos hallazgos sugieren que los valores del test cercanos al punto de corte deberían interpretarse con cautela y confirmarse con una nueva PAU o con otros métodos diagnósticos.

El punto de corte seleccionado puede depender de la dosis de urea utilizada, de modo que el empleo de dosis menores de sustrato se debe acompañar de una disminución del punto de corte^{44,65}. Así, la mayoría de los protocolos que han administrado 75 mg de urea han empleado un punto de corte inferior al clásico 5,0‰ (generalmente, entre el 3,5 y el 5,0‰) y esta cifra se ha situado entre el 2,5 y el 3,5‰ en casi todos los protocolos que han administrado 50 mg de urea³. Además, la presentación de la urea, y no sólo su dosis, puede influir sobre el protocolo que se va a elegir, puesto que se ha sugerido que el punto de corte debería reducirse cuando se emplea el sustrato en forma de tabletas^{35,66}.

Finalmente, el punto de corte ideal puede también depender de que la PAU se realice antes o después de haber administrado tratamiento erradicador para *H. pylori*⁶⁷. De este modo, la densidad gástrica de microorganismos parece ser menor (en comparación con la situación pretratamiento) en los pacientes en los que a pesar de haber recibido tratamiento erradicador continúan estando infectados. Así, la mayoría de los estudios pretratamiento han situado el punto de corte en el 4‰, aproximadamente, mientras que esta cifra se encuentra más cerca del 3‰ en aquellos estudios llevados a cabo en pacientes en los que se pretende confirmar la erradicación de *H. pylori* tras el tratamiento³.

En resumen, la selección de un punto de corte único e invariable para todos los casos no parece realista, pues hemos revisado cómo el valor más adecuado puede depender de múltiples factores, como la comida de prueba empleada, la dosis y la formulación de la urea, o el escenario clínico (pre o postratamiento) en el que se emplee la PAU. Afortunadamente, debido a que los resultados positivos y negativos de la PAU tienden a situarse fuera del rango comprendido entre el 2 y el 5‰, es esperable que los cambios del punto de corte dentro de este rango tengan un efecto muy limitado en la exactitud diagnóstica del test⁶⁸.

PRUEBA DEL ALIENTO PARA LA VALORACIÓN DE LA FUNCIÓN HEPÁTICA

En general, las hepatopatías crónicas son característicamente progresivas, por lo que históricamente ha sido importante el desarrollo de un test dinámico que permita al clínico estimar la reserva funcional hepática y definir tanto un pronóstico funcional o vital como el momento más adecuado para iniciar una determinada acción terapéutica. En este sentido, se han diseñado numerosos métodos que tratan de valorar la función hepática mediante su correlación con diversas rutas metabólicas de predominio hepático; sin embargo, pese a su satisfactoria correlación en algunos casos y la sencillez e inocuidad del procedimiento, no han podido sustituir a la ya clásica estadificación clinicobiológica de Child-Pugh. No obstante, aún queda algún papel para este tipo de exploraciones, ya que además de confirmar los datos clinicobiológicos, gracias a la exploración íntima de la función hepática, son capaces de evaluar la actividad de unas rutas enzimáticas concretas y de

determinar el impacto de diversas sustancias, farmacológicas o tóxicas, sobre una ruta metabólica específica.

Prueba el aliento en la valoración de la actividad del citocromo P-450

Uno de los primeros tests diseñados para valorar la función hepática fue el de la aminopirina marcada con ¹³C, cuya demetilación a cargo del citocromo P-450 es fácilmente determinable, ya que, como el diazepam, la eritromicina o la cafeína, su metabolismo sólo depende de la actividad de este citocromo. Sin embargo, no se ha conseguido demostrar una adecuada correlación entre los hallazgos de este test y la función hepática determinada por el estadio de Child-Pugh⁶⁹, además de que se han podido comprobar interacciones con diversos fármacos como el albendazol⁷⁰, los anticonceptivos⁷¹ o incluso los inhibidores de la bomba de protones⁷².

Por el contrario, la cafeína marcada con ¹³C ha sido recientemente validada como indicador de la función hepática con una buena correlación con la escala de Child-Pugh, en un grupo de 65 individuos que incluyó controles sanos, pacientes con hepatitis crónica en estadio no cirrótico y pacientes cirróticos, aunque también se comprobó un incremento significativo de los valores plasmáticos en los pacientes fumadores, lo que podría falsear los resultados⁷³.

Por otro lado, este tipo de test del aliento se ha empleado para determinar el fenotipo en el marco de estudios orientados a detectar posibles interacciones farmacológicas relacionadas con el citocromo P-450.

Prueba del aliento en la valoración de la actividad de enzimas citosólicas

Existen varias moléculas, cuyo metabolismo tiene lugar principalmente a escala citosólica hepática, que son susceptibles de ser administradas de forma oral o intravenosa para evaluar la función metabolizadora del hígado, que estará presumiblemente disminuida en la hepatopatía crónica.

Algunos aminoácidos esenciales se encuentran en este grupo; en concreto, la tirosina y la fenilalanina marcadas se han empleado en este sentido^{74,75}, y recientemente se ha comprobado en un grupo de 47 pacientes, 37 de ellos con hepatopatía crónica por el virus de la hepatitis C, una estrecha correlación entre la excreción acumulada de ¹³C-fenilalanina a los 45 min y el grado histológico de fibrosis según el sistema METAVIR⁷⁶.

Clásicamente se ha empleado la capacidad de eliminación de galactosa para medir la reserva funcional hepática, pero era necesaria la administración intravenosa del sustrato y repetidas extracciones de sangre. La prueba del aliento basada en el metabolismo de la galactosa marcada parece haber evitado estos inconvenientes, y podría tener un valor pronóstico y en la monitorización de la lesión hepática⁷⁷, aunque haya que mantener ciertas reservas

dada la importante variabilidad interindividual y la posible interacción con la hiperglucemia propia de los pacientes diabéticos mal controlados e incluso con algunos fármacos.

Prueba del aliento en la valoración de la actividad de las enzimas mitocondriales

Existen varias enfermedades hepáticas cuyo origen se encuentra en un defecto metabólico de las vías enzimáticas mitocondriales del hígado y cuyo sustrato histológico es la esteatosis microvesicular. Ello puede suceder en el contexto de la gestación, el síndrome de Reye o la toxicidad mediada por el ácido valproico o las tetraciclinas. Incluso el enolismo induce una disfunción mitocondrial que es la base de la esteatosis que se observa en este tipo de pacientes.

Se han desarrollado diferentes pruebas del aliento que evalúan la actividad de diversas rutas enzimáticas mitocondriales⁷⁸. Así, el ácido cetioisocaproico marcado con ¹³C ha servido para monitorizar esta función enzimática en alcohólicos, e incluso para distinguir los pacientes con esteatosis hepática de origen alcohólico de los de origen no alcohólico⁷⁹. Por su parte, la ¹³C-metionina se ha utilizado con éxito para monitorizar la función hepática mitocondrial tanto en pacientes alcohólicos como en hepatopatías de otro origen⁸⁰, o para monitorizar la función hepática en un caso de intoxicación aguda por ácido valproico⁸¹.

PRUEBA DEL ALIENTO PARA LA VALORACIÓN DE LA FUNCIÓN PANCREÁTICA

La función exocrina pancreática, pilar fundamental de la digestión de los nutrientes, se ha evaluado de forma clásica mediante diversas pruebas funcionales. De entre ellas, la prueba de la secretina o la ceruleína, junto con el test de Van de Kamer, siguen siendo el patrón oro, aunque su sensibilidad sea escasa o se trate de exploraciones metodológicamente complicadas de llevar a cabo. Así, se han desarrollado varios test del aliento basados en la administración de diferentes sustratos de enzimas pancreáticas que valoran la función de distintas fases de este proceso de digestión y absorción, fundamentalmente lipídica, y que han cobrado especial importancia clínica a la hora de valorar pacientes con fibrosis quística o pancreatitis crónica que precisan suplementos orales de enzimas pancreáticas, así como en neonatos en los que la función lipolítica puede ser aún inmadura.

En este sentido, estudios recientes han comprobado la utilidad de la prueba del aliento tanto con trioleína marcada con ¹³C en pacientes adultos con fibrosis quística, con el objeto de monitorizar la malabsorción y ajustar las dosis de suplementos enzimáticos⁸², como la de la hioleína marcada, para evaluar la sensibilidad y la reproducibilidad en voluntarios sanos comparados con pacientes con pancreatitis crónica con y sin esteatorrea⁸³. Por otro lado,

una mezcla de triglicéridos marcados también se ha empleado clásicamente en la evaluación de la malabsorción tanto en casos de pancreatitis crónica⁸⁴ como fibrosis quística⁸⁵; sin embargo, este procedimiento presenta problemas metodológicos y de interpretación clínica que aún no se han solventado del todo, ofreciendo una sensibilidad y reproducibilidad más baja de lo que cabría esperar, pudiendo verse afectada por la edad, el ejercicio o la dieta⁸⁶.

Otras aproximaciones a la función exocrina pancreática han sido menos prometedoras, ya que el resto de las enzimas, como la amilasa, se afecta de una manera menos llamativa en la insuficiencia pancreática. Así, la utilidad de otros test del aliento basados en las rutas enzimáticas de otros sustratos nutricionales como los carbohidratos no ha podido ser comprobada.

PRUEBA DEL ALIENTO Y SOBRECRECIMIENTO BACTERIANO

Un aumento en la cantidad o una variación en la calidad de la flora entérica de suficiente magnitud como para acompañarse de significación clínica (incomodidad abdominal, diarrea, malabsorción o déficit nutricionales) suele tener lugar en el seno de alguna enfermedad orgánica que favorezca el sobrecrecimiento bacteriano. Este tipo de circunstancia frecuentemente implica estasis, tanto como consecuencia de alteraciones anatómicas como de defectos motores en relación con neuro o miopatías congénitas, esclerodermia, diabetes, etc., sin olvidar que otras causas como la aclorhidria propia de la gastritis atrófica o del tratamiento con inhibidores de la bomba de protones facilitan el desarrollo de sobrecrecimiento bacteriano; la carencia de secreción biliar (hepatopatía crónica) o pancreática (pancreatitis crónica) podrían favorecer también este trastorno. Sin embargo, la demostración de la existencia de un sobrecrecimiento bacteriano en pacientes susceptibles de padecerlo ha sido tradicionalmente complicada desde el punto de vista técnico, ya que habitualmente requería la intubación intestinal, aspiración de contenido intestinal y su cultivo en diferentes medios. Además, los resultados son de difícil interpretación clínica, ya que el punto de corte en cuanto al número de colonias necesarias para el diagnóstico de sobrecrecimiento bacteriano ha estado debatido.

Hasta la fecha, se han ensayado diferentes pruebas del aliento para evitar estos procedimientos, encontrando en todos ellos problemas de sensibilidad y especificidad. Así, el test de la coliglicina marcada puede dar falsos positivos si los microorganismos no hidrolizan la amida unida a la molécula; tanto este test como el de la ¹³C-xilosa pueden falsearse por un tránsito rápido, y la prueba del aliento que detecta hidrógeno tras la administración de lactulosa es sensible sólo a microorganismos anaerobios, por lo que en algunos estudios se ha revelado como menos sensible que los anteriores⁸⁷.

La inocuidad y la sencillez de la prueba del aliento la han hecho atractiva para el estudio del impacto que podría te-

ner el sobrecrecimiento bacteriano en diversos escenarios clínicos. Así, ha servido para justificar los síntomas de dismotilidad que se dan en los pacientes intervenidos de obesidad mórbida mediante un *bypass* yeyunoileal⁸⁸ o la malnutrición de los pacientes gastrectomizados en relación con las diferentes reconstrucciones quirúrgicas⁸⁹. Además, recientemente se ha intentado atribuir al sobrecrecimiento bacteriano un papel en la génesis de los síntomas que se engloban en el cuadro que conocemos como síndrome del intestino irritable; este sobrecrecimiento se ha detectado mediante diferentes tests el aliento, habitualmente el de la lactulosa, en un alto porcentaje de los pacientes con este síndrome, y comprobado posteriormente cómo mejoran los síntomas al erradicar este sobrecrecimiento con antibioterapia⁹⁰.

PRUEBA DEL ALIENTO Y MOTILIDAD GASTROINTESTINAL

La motilidad gastrointestinal se ha estudiado con propósitos fisiopatológicos, farmacológicos o incluso clínicos, y el tiempo de vaciamiento gástrico y el tiempo completo de tránsito orocecal han sido los aspectos que más atención han suscitado.

Dado que en principio no hay mecanismos enzimáticos en el intestino que permitan la digestión de un azúcar como la lactulosa, el sorbitol o la propia glucosa, éstos llegan intactos hasta el colon, donde son digeridos por la flora produciendo hidrógeno y metano, dos gases que convenientemente marcados pueden permitir estimar el tiempo de tránsito digestivo; en este sentido, un estudio reciente llevado a cabo en 551 pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal sugiere que diferentes patrones en la proporción de hidrógeno y metano se correlacionarían con diferentes presentaciones clínicas, y que un predominio de la producción de metano estaría relacionado con la existencia de estreñimiento como síntoma predominante⁹¹. Sin embargo, estos procedimientos pueden presentar inconvenientes técnicos, ya que por sus propiedades osmóticas pueden acelerar precisamente el tránsito gastrointestinal; por este motivo es necesario emplear la menor dosis posible que permita mantener una correlación adecuada con el patrón oro, que hasta hoy son los métodos escintigráficos, o bien utilizar una prueba del aliento alternativa. Recientemente se ha propuesto una prueba del aliento basada en la inulina con hidrógeno marcado, que no presenta los inconvenientes del test de la lactulosa y sí tiene aparentemente una buena correlación con los métodos más clásicos⁹². Otro trabajo reciente propone que la combinación de un test del aliento con hidrógeno marcado, como el de la lactulosa, con otro basado en el ¹³C-acetato podría aumentar la eficacia de estos procedimientos para la detección de alteraciones motoras digestivas⁹³.

Hoy sabemos que existen muy diversas circunstancias que modifican el tiempo de tránsito orocecal, como algunas bebidas alcohólicas o la pimienta, además de numerosas enfermedades en las que puede verse afectado, como

la disfunción tiroidea, el embarazo, la hepatopatía crónica, el esprúe celíaco, la enfermedad de Crohn, la diabetes mellitus o la anorexia nerviosa. En estos casos un método sencillo y no invasivo, como el test del aliento, puede cobrar importancia clínica. Así, se ha empleado para detectar retardos en el tiempo de tránsito orocecal secundarios a estenosis en el seno de la enfermedad de Crohn; más aún, se ha podido relacionar este tiempo de tránsito orocecal con las diversas localizaciones de la enfermedad, estando más alargado en los casos de afectación ileal o ileocolónica, lo que podría ser útil a la hora de diseñar una estrategia terapéutica basada en tratamientos de liberación retardada⁹⁴.

Finalmente, el tiempo de vaciamiento gástrico representa también un importante capítulo en el estudio de la motilidad gastrointestinal, con implicaciones fisiopatológicas y clínicas. Una vez más, los métodos escintigráficos que se utilizan para su evaluación son complicados e incómodos, por lo que se han desarrollado varias pruebas del aliento que alcanzan una buena correlación con los métodos clásicos de forma más cómoda y sencilla. Así, el empleo de ácido octanoico marcado con ¹³C ha sido validado adecuadamente, incluso comparativamente con la ultrasonografía abdominal en tiempo real⁹⁵, por lo que resulta un método más reproducible y menos «operador dependiente»; de hecho, se ha empleado recientemente con éxito en estudios con interés fisiopatológico, como los que han tratado de determinar la influencia de la cantidad o el comienzo de la ingesta en el vaciamiento gástrico, pero también en otros con interés clínico en diferentes circunstancias, como en los pacientes nefróticos habitualmente en programa de diálisis, diabéticos o, fundamentalmente, pacientes con síntomas englobables dentro del cuadro de síndrome del intestino irritable o dispepsia. En estos últimos se ha centrado buena parte de la atención de los estudios más recientes, y se ha demostrado retrasos en el vaciamiento gástrico de algunos pacientes dispépticos. En este sentido, un reciente estudio llevado a cabo en un total de 722 de estos pacientes encontró que un 23% de los casos tendrían alargado el tiempo de vaciamiento gástrico para sólidos y un 35% lo tendrían para líquidos, lo que podría estar además en relación con las diferentes manifestaciones clínicas del cuadro⁹⁶. Por último, esta prueba del aliento también ha permitido demostrar que en niños con esprúe celíaco se encuentra alterado el tiempo de vaciamiento gástrico y que éste se normaliza tras realizar una dieta sin gluten⁹⁷.

Más recientemente se ha propuesto otra prueba del aliento para valorar el tiempo de vaciamiento gástrico basada en el acetato marcado con ¹³C, cuya fiabilidad y metodología han sido validadas⁹⁸.

PRUEBA DEL ALIENTO EN LA VALORACIÓN DE LA MALABSORCIÓN DE HIDRATOS DE CARBONO

Diversas pruebas del aliento se han empleado para la valoración de la digestión y el metabolismo de diferentes carbohidratos; en la literatura médica se puede encontrar

estudios que emplean como sustrato la glucosa, galactosa, fructosa o lactosa. De todos ellos, por su prevalencia y su posible papel en la génesis de algunas afecciones, el estudio más importante es el que valora la malabsorción de la lactosa o, lo que es lo mismo, la actividad de la lactasa, enzima propia de las vellosidades intestinales cuya actividad se pierde a lo largo de la vida en un importante porcentaje de individuos europeos; en ellos, la actividad reducida de esta enzima puede dar lugar a diversos síntomas tras la ingesta de leche, lo que constituye el cuadro denominado intolerancia a la lactosa. Por otra parte, la actividad de esta enzima puede emplearse como marcador de la integridad de la mucosa del intestino delgado, que puede afectarse en diferentes situaciones, como la enfermedad celíaca.

Una vez más, a pesar de que el patrón oro es la cuantificación de la actividad enzimática en biopsias de intestino delgado, el coste y la incomodidad de este procedimiento han dado paso al desarrollo de pruebas del aliento específicas. Aunque se ha empleado una prueba del aliento basada en la lactosa, tanto con hidrógeno como con carbono marcado para estimar la actividad de la lactasa intestinal, existen varios problemas técnicos que limitan la sensibilidad y la especificidad de cualquier test del aliento basado en la lactosa: el ejercicio puede aumentar la oxidación de la glucosa y la dosis a emplear está en debate, ya que dosis altas podrían sobreestimar la prevalencia de malabsorción. De hecho, un reciente estudio español en 67 pacientes ha propuesto la homogeneización del test del aliento con hidrógeno a 3 h con altas dosis de lactosa, alcanzando buenos resultados⁹⁹. Así, se ha propuesto un método combinado consistente en la detección de hidrógeno además de la de ¹³C durante el mismo test del aliento con la intención de aumentar su sensibilidad y especificidad¹⁰⁰.

BIBLIOGRAFÍA

- Lacroix M, Mosora F, Pontus M, Lefebvre P, Luyckz A, Lopez-Habib G. Glucose naturally labeled with carbon-13: use for metabolic studies in man. *Science*. 1973;181:445-6.
- Gisbert JP. Revisión crítica de los métodos diagnósticos de infección por *Helicobacter pylori*. *Gastroenterol Hepatol*. 2000;23:135-43.
- Gisbert JP, Pajares JM. ¹³C-urea breath test in the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection—A critical review. *Aliment Pharmacol Ther*. 2004;20:1001-17.
- Gomollon F, Ducons JA, Santolaria S, Lera Omiste I, Guirao R, Ferrero M, et al. Breath test is very reliable for diagnosis of *Helicobacter pylori* infection in real clinical practice. *Dig Liver Dis*. 2003;35:612-8.
- Sainz R, Borda F, Dominguez E, Gisbert JP. Conferencia Española de Consenso sobre la infección por *Helicobacter pylori*. *Rev Esp Enferm Dig*. 1999;91:777-84.
- Malferteiner P, Megraud F, O'Morain C, Hungin AP, Jones R, Axon A, et al. Current concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection—The Maastricht 2-2000 Consensus Report. *Aliment Pharmacol Ther*. 2002;16:167-80.
- Atherton JC. Non-endoscopic tests in the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *Aliment Pharmacol Ther*. 1997;11 Suppl 1:11-20.
- Atherton JC, Spiller RC. The urea breath test for *Helicobacter pylori*. *Gut*. 1994;35:723-5.
- Pérez García JI, Pajares García JM, Jiménez Alonso I. Prueba del aliento con urea marcada con ¹³C para el diagnóstico en la infección por *H. pylori* en la mucosa gástrica. Validación del método. *Rev Esp Enferm Dig*. 1996;88:202-8.
- Bazzoli F, Zagari M, Fossi S, Pozzato P, Ricciardiello L, Mwangemi C, et al. Urea breath tests for the detection of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter*. 1997;2 Suppl 1:S34-7.
- Logan RP. Urea breath tests in the management of *Helicobacter pylori* infection. *Gut*. 1998;43 Suppl 1:S47-50.
- Perri F, Festa V, Clemente R, Quitadamo M, Andriulli A. Methodological problems and pitfalls of urea breath test. *Ital J Gastroenterol Hepatol*. 1998; 30 Suppl 3: S315-9.
- Thomas JE. ¹³C urea breath test. *Gut*. 1998;43 Suppl 3:S7-12.
- Bell GD. Clinical practice—Breath tests. *Br Med Bull*. 1998;54:187-93.
- Bazzoli F, Zagari M, Pozzato P, Fossi S, Ricciardiello GL, Nicolini G, et al. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection: non-invasive diagnostic tests. *Ital J Gastroenterol Hepatol*. 1998;30 Suppl 3:S313-4.
- Savarino V, Vigneri S, Celle G. The ¹³C urea breath test in the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *Gut*. 1999;45 Suppl 1:I18-22.
- Perri F. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection: which is the best test? The urea breath test. *Dig Liver Dis*. 2000;32 Suppl 3:S196-8.
- Graham DY, Klein PD. Accurate diagnosis of *Helicobacter pylori*. ¹³C-urea breath test. *Gastroenterol Clin North Am*. 2000;29:885-93.
- Parente F, Bianchi Porro G. The (¹³)C-urea breath test for non-invasive diagnosis of *Helicobacter pylori* infection: which procedure and which measuring equipment? *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2001;13:803-6.
- Gisbert JP, Gomollon F, Domínguez-Muñoz JE, Borda F, Jimenez I, Vazquez MA, et al. Comparación entre dos pruebas del aliento con ¹³C-urea para el diagnóstico de la infección por *Helicobacter pylori*: espectrometría de masas frente a infrarrojos. *Gastroenterol Hepatol*. 2003;26:141-6.
- Epple HJ, Kirstein FW, Bojarski C, Frege J, Fromm M, Riecken EO, et al. ¹³C-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;32:308-14.
- Savarino V, Mela GS, Zentilin P, Bisso G, Pivari M, Mansi C, et al. Comparison of isotope ratio mass spectrometry and non-dispersive isotope-selective infrared spectroscopy for ¹³C-urea breath test [see comments]. *Am J Gastroenterol*. 1999; 94:1203-8.
- Mana F, Franken PR, Ham HR, Reynaert H, Urbain D. ¹³C urea breath test with nondispersive isotope-selective infrared spectrometry: reproducibility and importance of the fasting status. *Helicobacter*. 2000;5:104-8.
- Braden B, Duan LP, Caspary WF, Lembcke B. More convenient ¹³C-urea breath test modifications still meet the criteria for valid diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *Z Gastroenterol*. 1994;32:198-202.
- Ng FH, Lai KC, Wong BC, Wong WM, Wong SY, Chow KC, et al. [¹³C]-urea breath test without prior fasting and without test meal is accurate for the detection of *Helicobacter pylori* infection in Chinese. *J Gastroenterol Hepatol*. 2002;17: 834-8.
- Perri F, Maes B, Geypens B, Ghoos Y, Hiele M, Rutgeerts P. The influence of isolated doses of drugs, feeding and colonic bacterial ureolysis on urea breath test results. *Aliment Pharmacol Ther*. 1995;9:705-9.
- Moayyedi P, Braunholtz D, Heminbrough E, Clough M, Tompkins DS, Mapstone NP, et al. Do patients need to fast for a ¹³C-urea breath test? *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 1997; 9:275-7.
- Wang WM, Lee SC, Wu DC, Chen LT, Liu CS, Peng CF, et al. Simplified ¹³C-urea breath test for the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection—The availability of without fasting and without test meal. *Kaohsiung J Med Sci*. 2000;16:607-13.
- Graham DY, Malaty HM, Cole RA, Martin RF, Klein PD. Simplified ¹³C-urea breath test for detection of *Helicobacter pylori* infection. *Am J Gastroenterol*. 2001;96:1741-5.

30. Day AS, Veldhuyzen van Zanten S, Otleay AR, Best L, Griffiths A, Sherman PM. Use of LARA-urea breath test in the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection in children and adolescents: a preliminary study. *Can J Gastroenterol*. 2003; 17:701-6.
31. Domínguez-Muñoz JE, Leodolter A, Sauerbruch T, Malfert-heiner P. A citric acid solution is an optimal test drink in the 13C-urea breath test for the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection [see comments]. *Gut*. 1997;40:459-62.
32. Graham DY, Runke D, Anderson SY, Malaty HM, Klein PD. Citric acid as the test meal for the 13C-urea breath test. *Am J Gastroenterol*. 1999;94:1214-7.
33. Eggers RH, Kulk P, Tegeler R, Lüdtke FE, Lepsien G, Meyer B. A methodological analysis of the 13C-urea breath tests for detection of *Helicobacter pylori* infections: high sensitivity and specificity within 30 minutes using 75 mg of 13C-urea. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 1990;2:437-44.
34. Leodolter A, Domínguez-Muñoz JE, Von Arnim U, Malfert-heiner P. Citric acid or orange juice for the 13C-urea breath test: the impact of pH and gastric emptying. *Aliment Pharmacol Ther*. 1999;13:1057-62.
35. Hamlet A, Stage L, Lonroth H, Cahlin C, Nystrom C, Pettersson A. A novel tablet-based 13C urea breath test for *Helicobacter pylori* with enhanced performance during acid suppression therapy. *Scand J Gastroenterol*. 1999;34:367-74.
36. Chey WD, Chathadi KV, Montague J, Ahmed F, Murthy U. Intragastric acidification reduces the occurrence of false-negative urea breath test results in patients taking a proton pump inhibitor. *Am J Gastroenterol*. 2001;96:1028-32.
37. Gisbert JP, Vázquez MA, Jiménez I, Cruzado AI, Carpio D, Del Castillo E, et al. 13C-urea breath test for the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection before treatment: is citric acid necessary? *Dig Liver Dis*. 2000;32:20-4.
38. Leodolter A, Domínguez-Muñoz JE, Von Arnim U, Manes G, Malfertheiner P. 13C-urea breath test for the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. A further simplification for clinical practice. *Scand J Gastroenterol*. 1998;33:267-70.
39. Leodolter A, Domínguez-Muñoz JE, Von Arnim U, Kahl S, Peitz U, Malfertheiner P. Validity of a modified 13C-urea breath test for pre- and posttreatment diagnosis of *Helicobacter pylori* infection in the routine clinical setting. *Am J Gastroenterol*. 1999;94:2100-4.
40. Labenz J, Barsch G, Peitz U, Aygen S, Hennemann O, Tillenburg B, et al. Validity of a novel biopsy urease test (HUT) and a simplified 13C-urea breath test for diagnosis of *Helicobacter pylori* infection and estimation of the severity of gastritis. *Digestion*. 1996;57:391-7.
41. Gatta L, Vakil N, Ricci C, Osborn JF, Tampieri A, Perna F, et al. Effect of proton pump inhibitors and antacid therapy on C urea breath tests and stool test for *Helicobacter pylori* infection. *Am J Gastroenterol*. 2004;99:823-9.
42. Coelho LG, Reber M, Passos MC, Aguiar RO, Casaes PE, Bueno ML, et al. Application of isotope-selective non-dispersive infrared spectrometry for the evaluation of the 13C-urea breath test: comparison with three concordant methods. *Braz J Med Biol Res*. 1999;32:1493-7.
43. Riepl RL, Folwaczny C, Otto B, Klauser A, Blendinger C, Wiebecke B, et al. Accuracy of 13C-urea breath test in clinical use for diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *Z Gastroenterol*. 2000;38:13-9.
44. Ellenrieder V, Glasbrenner B, Stoffels C, Weiler S, Bode G, Moller P, et al. Qualitative and semi-quantitative value of a modified 13C-urea breath test for identification of *Helicobacter pylori* infection. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 1997;9: 1085-9.
45. Malaty HM, El-Zimaity HM, Genta RM, Klein PD, Graham DY. Twenty-minute fasting version of the US 13C-urea breath test for the diagnosis of *H. pylori* infection. *Helicobacter*. 1996;1:165-7.
46. Oksanen A, Bergstrom M, Sjøstedt S, Gad A, Hammarlund B, Seensalu R. Accurate detection of *Helicobacter pylori* infection with a simplified 13C urea breath test. *Scand J Clin Lab Invest*. 1997;57:689-94.
47. Miwa H, Murai T, Ohkura R, Nagahara A, Watanabe H, Terai T, et al. Usefulness of the [13C]-urea breath test for detection of *Helicobacter pylori* infection in fasting patients. *J Gastroenterol Hepatol*. 1998;13:1039-43.
48. Casellas F, Lopez J, Borruel N, Saperas E, Vergara M, de Torres I, et al. The impact of delaying gastric emptying by either meal substrate or drug on the [13C]-urea breath test. *Am J Gastroenterol*. 1999;94:369-73.
49. Wong WM, Wong BC, Wong KW, Fung FM, Lai KC, Hu WH, et al. (13)C-urea breath test without a test meal is highly accurate for the detection of *Helicobacter pylori* infection in Chinese. *Aliment Pharmacol Ther*. 2000;14:1353-8.
50. Wong WM, Wong BC, Li TM, Wong KW, Cheung KL, Fung FM, et al. Twenty-minute 50 mg 13C-urea breath test without test meal for the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection in Chinese. *Aliment Pharmacol Ther*. 2001;15:1499-504.
51. Chen TS, Chang FY, Chen PC, Huang TW, Ou JT, Tsai MH, et al. Simplified 13C-urea breath test with a new infrared spectrometer for diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *J Gastroenterol Hepatol*. 2003;18:1237-43.
52. Menegatti M, Stanghellini V, Landi F, Farinelli S, Mucci F, Ali A. 13C with and without test meal vs 14C urea breath test (UBT) to detect *H. pylori* before and after treatment. *Gut*. 1997;41 Suppl 3:A162.
53. Graham DY, Klein PD, Evans DJ Jr., Evans DG, Alpert LC, Opekun AR, et al. *Campylobacter pylori* detected noninvasively by the 13C-urea breath test. *Lancet*. 1987;1:1174-7.
54. Sheu BS, Lee SC, Yang HB, Wu HW, Wu CS, Lin XZ, et al. Lower-dose (13)C-urea breath test to detect *Helicobacter pylori* infection-comparison between infrared spectrometer and mass spectrometry analysis. *Aliment Pharmacol Ther*. 2000; 14:1359-63.
55. Liao CC, Lee CL, Chiang TC, Lee SC, Huang SH, Tu TC, et al. The 13C-urea breath test to detect *Helicobacter pylori* infection: a validated simple methodology with 50 mg 13C-urea. *Aliment Pharmacol Ther*. 2002;16:787-92.
56. Gatta L, Vakil N, Ricci C, Osborn JF, Tampieri A, Perna F, et al. A rapid, low-dose, 13C-urea tablet for the detection of *Helicobacter pylori* infection before and after treatment. *Aliment Pharmacol Ther*. 2003;17:793-8.
57. Wong WM, Lam SK, Lai KC, Chu KM, Xia HH, Wong KW, et al. A rapid-release 50-mg tablet-based 13C-urea breath test for the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *Aliment Pharmacol Ther*. 2003;17:253-7.
58. Bielanski W, Konturek SJ. New approach to 13C-urea breath test: capsule-based modification with low-dose of 13C-urea in the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *J Physiol Pharmacol*. 1996;47:545-53.
59. Canete A, Abunaji Y, Alvarez-Calatayud G, DeVicente M, Gonzalez-Holguera JA, Leralta M, et al. Breath test using a single 50-mg dose of 13C-urea to detect *Helicobacter pylori* infection in children. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2003;36: 105-11.
60. Bazzoli F, Cecchini L, Corvaglia L, Dall'Antonia M, De Giacomo C, Fossi S, et al. Validation of the 13C-urea breath test for the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection in children: a multicenter study. *Am J Gastroenterol*. 2000;95:646-50.
61. Machado RS, Patricio FR, Kawakami E. 13C-urea breath test to diagnose *Helicobacter pylori* infection in children aged up to 6 years. *Helicobacter*. 2004;9:39-45.
62. Rowland M, Lambert I, Gormally S, Daly LE, Thomas JE, Hetherington C, et al. Carbon 13-labeled urea breath test for the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection in children. *J Pediatr*. 1997;131:815-20.
63. Kawakami E, Machado RS, Reber M, Patricio FR. 13 C-urea breath test with infrared spectroscopy for diagnosing *Helicobacter pylori* infection in children and adolescents. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2002;35:39-43.
64. Logan RPH, Dill S, Bauer FE, Marjorie MW, Hirschl AM, Gummert PA, et al. The European 13C-urea breath test for the detection of *Helicobacter pylori*. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 1991;3:915-21.
65. Klein PD, Malaty HM, Martin RF, Graham KS, Genta RM, Graham DY. Noninvasive detection of *Helicobacter pylori* infection in clinical practice: the 13C urea breath test [see comments]. *Am J Gastroenterol*. 1996;91:690-4.
66. Gisbert JP, Ducons J, Gomollon F, Dominguez-Munoz JE, Borda F, Mino G, et al. Validación de la prueba del aliento con ¹³C-urea para el diagnóstico inicial de la infección por *Helicobacter pylori* y la confirmación de su erradicación tras el tratamiento. *Rev Esp Enferm Dig*. 2003;95:115-20.

67. Sheu BS, Lee SC, Yang HB, Kuo AW, Wang YL, Shiesh SC, et al. Selection of lower cutoff point of [13C]urea breath test is helpful to monitor *H. pylori* eradication after proton pump inhibitor-based triple therapy. *Dig Dis Sci.* 2000;45:1330-6.
68. Graham DY, Opekun AR, Jogi M, Yamaoka Y, Lu H, Reddy R, et al. False negative urea breath tests with H₂-receptor antagonists: interactions between *Helicobacter pylori* density and pH. *Helicobacter.* 2004;9:17-27.
69. Mion F, Queneau PE, Rousseau M, Brazier JL, Paliard P, Minaire Y. Aminopyrine breath test: development of a 13C-breath test for quantitative assessment of liver function in humans. *Hepatogastroenterology.* 1995;42:931-8.
70. Steiger U, Cotting J, Reichen J. Albendazole treatment of echinococcosis in humans: effects on microsomal metabolism and drug tolerance. *Clin Pharmacol Ther.* 1990;47:347-53.
71. Opekun AR Jr, Klein PD, Graham DY. [13C]Aminopyrine breath test detects altered liver metabolism caused by low-dose oral contraceptives. *Dig Dis Sci.* 1995;40:2417-22.
72. Giannini E, Romagnoli P, Fasoli A, Chiarbonello B, Malfatti F, Botta F, et al. Influence of *Helicobacter pylori* eradication therapy on 13C aminopyrine breath test: comparison among omeprazole-, lansoprazole-, or pantoprazole-containing regimens. *Am J Gastroenterol.* 2000;95:2762-7.
73. Park GJ, Katelaris PH, Jones DB, Seow F, Le Couteur DG, Ngu MC. Validity of the 13C-caffeine breath test as a noninvasive, quantitative test of liver function. *Hepatology.* 2003;38:1227-36.
74. Lara Baroque S, Razquin M, Jimenez I, Vazquez A, Gisbert JP, Pajares JM. 13C-phenylalanine and 13C-methacetin breath test to evaluate functional capacity of hepatocyte in chronic liver disease. *Dig Liver Dis.* 2000;32:226-32.
75. Perri F, Marras RM, Ricciardi R, Quitadamo M, Andriulli A. 13C-breath tests in hepatology (cytosolic liver function). *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2004;8:47-9.
76. Ishii Y, Suzuki S, Kohno T, Aoki M, Ito A, Takayama T, et al. L-[1-13C] phenylalanine breath test reflects histological changes in the liver. *J Surg Res.* 2003;114:120-5.
77. Herold C, Ganslmayer M, Ocker M, Zopf S, Gailer B, Hahn EG, et al. Inducibility of microsomal liver function may differentiate cirrhotic patients with maintained compared with severely compromised liver reserve. *J Gastroenterol Hepatol.* 2003;18:445-9.
78. Candelli M, Cazzato IA, Zocco MA, Nista EC, Fini L, Armuzzi A, et al. 13C-breath tests in the study of mitochondrial liver function. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2004;8:23-31.
79. Mion F, Rousseau M, Brazier JL, Minaire Y. Human hepatic macrovesicular steatosis: a noninvasive study of mitochondrial ketoisocaproic acid decarboxylation. *Metabolism.* 1995;44:699-700.
80. Spahr L, Negro F, Leandro G, Marinescu O, Goodman KJ, Rubbia-Brandt L, et al. Impaired hepatic mitochondrial oxidation using the 13C-methionine breath test in patients with macrovesicular steatosis and patients with cirrhosis. *Med Sci Monit.* 2003;9:CR6-11.
81. Spahr L, Negro F, Rubbia-Brandt L, Marinescu O, Goodman K, Jordan M, et al. Acute valproate-associated microvesicular steatosis: could the [13C]methionine breath test be useful to assess liver mitochondrial function? *Dig Dis Sci.* 2001;46:2758-61.
82. Ritz MA, Fraser RJ, Di Matteo AC, Greville H, Butler R, Cmielewski P, et al. Evaluation of the 13C-triolein breath test for fat malabsorption in adult patients with cystic fibrosis. *J Gastroenterol Hepatol.* 2004;19:448-53.
83. Sun DY, Jiang YB, Rong L, Jin SJ, Xie WZ. Clinical application of 13C-Hiolein breath test in assessing pancreatic exocrine insufficiency. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int.* 2003;2:449-52.
84. Boedecker C, Goetze O, Pfaffenbach B, Luypaerts A, Geypens B, Adamek RJ. 13C mixed-triglyceride breath test: isotope selective non-dispersive infrared spectrometry in comparison with isotope ratio mass spectrometry in volunteers and patients with chronic pancreatitis. *Scand J Gastroenterol.* 1999;34:1153-6.
85. Swart GR, Baartman EA, Wattimena JL, Rietveld T, Overbeek SE, Van den Berg JW. Evaluation studies of the 13C-mixed triglyceride breath test in healthy controls and adult cystic fibrosis patients with exocrine pancreatic insufficiency. *Digestion.* 1997;58:415-20.
86. Perri F, Andriulli A. «Mixed» triglyceride breath test: methodological problems and clinical applications. *Rev Med Univ Navarra.* 1998;42:99-103.
87. Rhodes JM, Middleton P, Jewell DP. The lactulose hydrogen breath test as a diagnostic test for small-bowel bacterial overgrowth. *Scand J Gastroenterol.* 1979;4:333.
88. Venturi M, Zuccato E, Restelli A, Mazzoleni L, Mussini E, Doldi SB. Utility of Hydrogen and Methane Breath Tests in Combination with X-Ray Examination after a Barium Meal in the Diagnosis of Small Bowel Bacterial Overgrowth after Jejunum-Ileal Bypass for Morbid Obesity. *Obes Surg.* 1994;4:144-8.
89. Iivonen MK, Ahola TO, Matikainen MJ. Bacterial overgrowth, intestinal transit, and nutrition after total gastrectomy. Comparison of a jejunal pouch with Roux-en-Y reconstruction in a prospective random study. *Scand J Gastroenterol.* 1998;33:63-70.
90. Lin HC. Small intestinal bacterial overgrowth: a framework for understanding irritable bowel syndrome. *JAMA.* 2004;292:852-8.
91. Pimentel M, Mayer AG, Park S, Chow EJ, Hasan A, Kong Y. Methane production during lactulose breath test is associated with gastrointestinal disease presentation. *Dig Dis Sci.* 2003;48:86-92.
92. Geboes KP, Luypaerts A, Rutgeerts P, Verbeke K. Inulin is an ideal substrate for a hydrogen breath test to measure the orocaecal transit time. *Aliment Pharmacol Ther.* 2003;18:721-9.
93. Urita Y, Hike K, Torii N, Kikuchi Y, Sasajima M, Miki K. Efficacy of lactulose plus 13C-acetate breath test in the diagnosis of gastrointestinal motility disorders. *J Gastroenterol.* 2002;37:442-8.
94. Tursi A, Brandimarte G, Giorgetti G, Nasi G. Assessment of oro-caecal transit time in different localization of Crohn's disease and its possible influence on clinical response to therapy. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2003;15:69-74.
95. Cappello G, Malatesta MG, Ferri A, Ciccaglione AF, Toracchio S, Grossi L, et al. Gastric emptying of a solid-liquid meal measured with 13C octanoic acid breath test and real-time ultrasonography: a comparative study. *Am J Gastroenterol.* 2000;95:3097-100.
96. Sarnelli G, Caenepeel P, Geypens B, Janssens J, Tack J. Symptoms associated with impaired gastric emptying of solids and liquids in functional dyspepsia. *Am J Gastroenterol.* 2003;98:783-8.
97. Perri F, Pastore M, Zicolella A, Annese V, Quitadamo M, Andriulli A. Gastric emptying of solids is delayed in celiac disease and normalizes after gluten withdrawal. *Acta Paediatr.* 2000;89:921-5.
98. Franke A, Harder H, Singer MV. Reliability of the [13C]-acetate breath test in the measurement of gastric emptying of ethanol solutions: a methodological study. *Scand J Gastroenterol.* 2004;39:722-6.
99. Casellas F, Malagelada JR. Applicability of short hydrogen breath test for screening of lactose malabsorption. *Dig Dis Sci.* 2003;48:1333-8.
100. Koetse HA, Stellaard F, Bijleveld CM, Elzinga H, Boverhof R, van der Meer R, et al. Non-invasive detection of low-intestinal lactase activity in children by use of a combined 13CO₂/H₂ breath test. *Scand J Gastroenterol.* 1999;34:35-40.