

JAKUB URBAN

Helicobacter pylori – diagnostyka i leczenie

Helicobacter pylori – Diagnostic Methods and Therapy

Katedra i Zakład Chirurgii Stomatologicznej Śląskiego Uniwersytetu Medycznego

Streszczenie

Wskazania bezwarunkowe do diagnozowania i leczenia zakażenia *Helicobacter pylori* obejmują: chorobę wrzodową żołądka, niewyjaśnioną dyspepsję u pacjentów poniżej 45. r.ż. bez objawów klinicznych, niezróżnicowany chłoniak MALT, stan po endoskopowej resekcji we wczesnej fazie raka żołądka oraz pierwszy stopień pokrewieństwa z chorymi na raka żołądka. Nadal są rozwijane metody diagnozowania zakażenia tą bakterią, dzięki czemu zwiększa się specyficzność i czułość testów diagnostycznych. W pracy omówiono podstawy oraz ocenę skuteczności badań inwazyjnych w diagnostyce *Helicobacter pylori* (biopsja i badanie endoskopowe oraz wykrywanie DNA, RNA techniką PCR w soku żołądkowym) oraz nieinwazyjnych (urazowego testu oddechowego, badań serologicznych oraz wykrywania DNA, RNA techniką PCR w ślinie i kale). Największą czułość i swoistość ma kapsułkowy ureazowy test oddechowy (UBT). W leczeniu eradycyjnym stosuje się najczęściej schemat OAT (14-dniowa kuracja, omeprazol, amoksycylina i tynidazol). Dalsze ulepszanie metod diagnostycznych oraz ujednolicanie procedur eradycyjnych powinno prowadzić do lepszych wyników zapobiegania i leczenia konsekwencji tego zakażenia, dla którego niszą ekologiczną może być jama ustna (**Dent. Med. Probl. 2010, 47, 4, 487–495**).

Słowa kluczowe: *Helicobacter pylori*, diagnostyka, hodowla, serologia, eradycja.

Abstract

Unconditioned indications to diagnostics and treating of *Helicobacter pylori* infection are: ulcerative disease, dyspepsia of unknown origin in patients under 45 years of age without other clinical symptoms, MALT lymphangioma of undefined type, status after the endoscopic resection of gastric cancer in early stages and first degree of consanguinity with suffering from gastric cancer. The methods of *Helicobacter pylori* diagnostics are still evolving. The specificity and sensitivity of diagnostic tests increases. The paper discusses basics and valuation of the invasive studies in *Helicobacter pylori* diagnostics (biopsy with endoscopic evaluation and DNA, RNA replication with PCR technique from gastric juice) as well as non-invasive ones (urea breath test, serologic researches and PCR application – detecting of the DNA and RNA in stool and saliva). Urea breath test (UBT) has the highest sensitiveness and specificity. In the *H. pylori* eradication, OAT scheme is most commonly used (14 days of therapy with Omeprazole, Amoxicillin and Tinidazole). Further improvements of the diagnostic methods and standardizing of eradication procedures should effect in better results of preventing and treatment of the infection consequences, particularly that oral cavity may be an ecological niche of the bacteria (**Dent. Med. Probl. 2010, 47, 4, 487–495**).

Key words: *Helicobacter pylori*, diagnostics, culture, serology, eradication.

Helicobacter pylori (*Hp*) jest drobnoustrojem, który doczekał się wielu opracowań i analiz oraz nieustannie pozostaje w kręgu zainteresowań wielu badaczy. Nadal są rozwijane metody rozpoznawania zakażenia tą bakterią, dzięki czemu zwiększa się swoistość i czułość przeprowadzanych testów diagnostycznych. Rozpoznawanie obecności bakterii w żołądku jest obecnie zadowalająco precyzyjne. Wykrywanie *Hp* w jamie ustnej stwarza

natomiast wciąż wiele trudności, a uzyskane wyniki badań bywają niekiedy rozbieżne.

W tabeli 1 i 2 przedstawiono bezwarunkowe i warunkowe wskazania do diagnostyki i terapii zakażenia *Hp*.

Wyniki terapii eradycyjnej u pacjentów przyjmujących niesteroidowe leki przeciwzapalne (n.i.p.z.) są rozbieżne. *Hp* i przyjmowane n.i.p.z. niezależnie i znacząco zwiększają ryzyko krwa-

Tabela 1. Wskazania bezwarunkowe do diagnozowania i leczenia zakażenia *Helicobacter pylori***Table 1.** Unconditional indications to diagnose and treat *Helicobacter pylori* infection

Choroba wrzodowa żołądka (aktywna lub o dodatnim wywiadzie) Niewyjaśniona dyspepsja u pacjentów poniżej 45. r.ż. bez objawów alarmowych Niskozróżnicowany chłoniak MALT Po endoskopowej resekcji we wczesnej fazie raka żołądka Pierwszy stopień pokrewieństwa z chorymi na raka żołądka
--

Tabela 2. Wskazania warunkowe do rozpoczęcia diagnostyki i leczenia zakażenia *Helicobacter pylori***Table 2.** Conditional indications to diagnose and treat *Helicobacter pylori* infection

Zbadana dyspepsja niewrzodowa (np. dyspepsja czynnościowa) Przyjmowanie n.l.p.z. Choroba refluksowa żołądkowo-przełykowa Populacje zwiększonego ryzyka raka żołądka (Japonia i wybrane regiony Chin) Niewyjaśniona anemia z niedoboru żelaza u dorosłych Idiopatyczna plamica małopłytkowa (i.t.p.)
--

wienia z wrzodów żołądka. Ryzyko krwawienia jest wielokrotnie podwyższone, jeżeli oba te czynniki występują jednocześnie. Eradykacja *Hp* wydaje się, że ma odmienny skutek u pacjentów przewlekłe stosujących n.l.p.z. oraz u stosujących je doraźnie. Jest ona skuteczna u pacjentów poddanych długotrwałej terapii, lecz jest niewystarczająca, by zapobiec w pełni chorobie wrzodowej n.l.p.z.-zależnej. U pacjentów z powikłaną chorobą wrzodową, o której wiadomo z wywiadu, wymagających dalszego leczenia n.l.p.z. lub aspiryną, zastosowanie terapii z użyciem inhibitorów pompy protonowej jest lepszym rozwiązaniem niż terapia eradykacyjna *Hp*.

Diagnozowanie i leczenie zakażenia *Hp* jest zalecane u pacjentów poniżej 45. r.ż. z dyspepsją idiopatyczną występującą bez objawów alarmowych, takich jak: krwawienie, anemia, szybkie nasytowanie, utrata masy ciała o niewiadomej etiologii, nawracające wymioty oraz dodatni wywiad rodzinny w kierunku raka odcinka żołądkowo-jelitowego [1].

Rak żołądka jest rzadki u osób, które nie były zakażone *Hp*. Eradykacja zapobiega rozwojowi zmian przednowotworowych (zapalenie zanikowe błony śluzowej żołądka oraz metaplasja jelitowa) błony śluzowej żołądka. Brakuje jednak jednoznacznych dowodów, czy eradykacja *Hp* zmniejsza ryzyko rozwoju gruczolakoraka żołądka. Jest prawdopodobne, że ryzyko rozwoju raka utrzymuje się przez kilka lat po usunięciu bakterii [2].

Konsensus Europejski z Maastricht z 2000 r. w diagnostyce przewlekłej dyspepsji zaleca strategię *test and treat*, co oznacza, że zaleca badanie tej grupy chorych za pomocą testu nieinwazyjnego, a w razie stwierdzenia infekcji *Hp* leczenie zakażenia [3].

Celem pracy było przedstawienie współczesnych metod diagnozowania zakażenia *Helicobacter pylori* oraz zarysowanie problematyki terapii eradykacyjnej.

Metody diagnostyczne

Zakażenie *Hp* może być diagnozowane różnymi metodami, które można podzielić na: inwazyjne i nieinwazyjne (tab. 3).

Metody inwazyjne wymagają testów z wykorzystaniem endoskopii. Metody nieinwazyjne wykorzystują łatwo dostępny materiał badawczy, jak: wydychane powietrze, kał, ślina. Wybór testu diagnostycznego powinien opierać się na przesłankach klinicznych, czułości i swoistości testów oraz skuteczności, a także strategii diagnostycznej.

Metody inwazyjne

Jest to grupa metod, do przeprowadzenia których jest niezbędne pobranie wycinka błony śluzowej podczas badania endoskopowego. Najczęściej pobiera się 2 wycinki z okolicy przyodźwiernikowej i 2 z okolicy trzonu żołądka. Po ich pobraniu bada się je, stosując test ureazowy, badanie histopatologiczne, hodowlę lub technikę PCR w celu wykrycia materiału genetycznego drobnoustrojów.

Dla pacjenta endoskopia to badanie względnie obciążające, które niesie ryzyko krwotoku i perforacji. Ustalenia EHS (European *Helicobacter Study Group*) zalecają, aby pacjenci poniżej 45. r.ż. o dolegliwościach dyspeptycznych bez objawów alarmowych lub z objawami refluksu żołądko-

Tabela 3. Dwie grupy badań w diagnostyce *Helicobacter pylori***Table 3.** Two groups of methods in *Helicobacter pylori* diagnostics

Badania inwazyjne (Invasive tests)	Badania nieinwazyjne (Non-invasive tests)
1. Biopsja + badanie endoskopowe: <ul style="list-style-type: none"> – test ureazowy w wycinkach błony śluzowej – badanie histopatologiczne – hodowla – wykrywanie DNA i RNA metodą PCR 2. Wykrywanie DNA i RNA techniką PCR w soku żołądkowym	1. Ureazowy test oddechowy (UBT) 2. Badania serologiczne: <ul style="list-style-type: none"> – jakościowe – półilościowe – ilościowe 3. Wykrywanie DNA i RNA techniką PCR w ślinie i w kale

wo-przełykowego oraz ci, którzy nie przyjmują n.l.p.z., byli diagnozowani metodami nieinwazyjnymi drogą testu oddechowego lub antygenowego testu kałowego. Endoskopia powinna być natomiast wykonywana u pacjentów poniżej 45. r.ż. z objawami alarmowymi lub powyżej 45. r.ż. we wszystkich przypadkach, niezależnie od występowania lub braku objawów [4]. Badania endoskopowe dostarczają ponadto materiału badawczego do innego rodzaju testów, m.in. badań histopatologicznych, hodowlanych, szybkiego testu urazowego (RUT) oraz metod PCR.

Badanie histopatologiczne pozwala dokładnie ocenić stopień, rodzaj i zasięg zapalenia błony śluzowej żołądka. Obejmuje ono barwienie preparatów i podgląd w mikroskopie świetlnym pod powiększeniem nie mniejszym niż 400 razy. Może ono uwidocznienie obecności bakterii, a także typ stanu zapalnego. Do badania *Hp* wykorzystuje się srebrzenie metodą Warthina-Starry'ego, rozmaz Giemzy, Gimineza i McMullena, stosowanie fioletu krezolu, oranżu akrydyny oraz fuksyny karbolowej. Aktualne wytyczne zalecają użycie dwóch barwień – hematoksylina i eozyna (H&E) – w celu uwidocznienia komórek zapalnych oraz Giemzy lub Genty – do wykrycia *Hp* [5]. Rozmaz Genty ma tę przewagę, że ukazuje komórki zapalne i drobnoustroje. Ze względu na prostotę wykonania, wysoką czułość i mały koszt, w celu wykrycia bakterii zaleca się rozmaz metodą Giemzy zmodyfikowaną wg Graya. Wynik otrzymuje się po 2–3 dniach, a jego czułość jest duża (95–100%) [5]. Pomimo dużej czułości metody histopatologicznej, pole, liczba i rozmiar biopsji mają wpływ na dokładność diagnostyczną. Niejednolita kolonizacja może również spowodować błędy diagnostyczne.

Helicobacter pylori może być wyhodowany z materiału biopsyjnego żołądka. Kolonie są identyfikowane za pomocą rozmazów i testów biochemicznych jako Gram-ujemne, ureazododatnie, oksydazododatnie oraz katalazododatnie. Bakteria ta jest bardzo wrażliwa poza środowiskiem organizmu, dlatego też hodowla musi być przeprowadzona jak najszybciej. Pomimo że hodowla ma

wysoką swoistość (ok. 100%), czułość jest często niższa (70–80%) [5]. Może to być spowodowane niewystarczającym materiałem biopsyjnym, zbyt długim czasem transportu, narażeniem na skażenie środowiskowe oraz brakiem doświadczenia mikrobiologa – trudna technika wykonywania. Ponadto co najmniej 2 tygodnie przed badaniem należy przerwać leczenie antybiotykami, inhibitorami pompy protonowej i antagonistami receptora H2 [5].

Hodowla wymagająca endoskopii charakteryzuje się dużą swoistością i jest konieczna do określenia wrażliwości na antybiotyki. Jednak jest trudna do wykonania i istnieje niebezpieczeństwo uzyskania wyników fałszywie ujemnych. Niektóre badania wykazały, że wyższy odsetek eradykacji osiąga się, gdy antybiotyki są wybierane na podstawie testów wrażliwości, a nie empirycznie [6]. Dowody potwierdzające zakażenie zwiększają również motywację pacjenta i lekarza, dzięki czemu podnoszą odsetek wyleczeń.

Szybki test ureazowy (RUT – *Rapid Urease Test*) to najprostszy, najtańszy i najszybszy sposób wykrycia bakterii w wycinkach błony śluzowej pobranych w badaniu endoskopowym. Został opracowany przez McNulty'ego i Wise'a. Metoda ta jest oparta na występowaniu aktywności enzymu ureazy *Hp*, który rozkłada mocznik do amoniaku. Wycinek umieszcza się w podłożu zawierającym 2% mocznik, agar, półpłynne podłoże Christensena, krążek bibuły filtracyjnej oraz wskaźnik w postaci czerwieni fenolowej. Amoniak zwiększa pH, co jest automatycznie rejestrowane przez wskaźniki. Pomimo że część komensalnych bakterii z jamy ustnej i gardła, która produkuje ureazę, jest połykana ze śliną, ten słabszy enzym jest szybko denaturowany w kwasie ludzkiego żołądka. Bakterią produkującą ureazę w błonie śluzowej żołądka jest również *Gastrospirillum hominis* [7]. Istnieją dane wskazujące, iż drobnoustroj ten jest związany ze stanem zapalnym błony śluzowej żołądka [7].

Obecnie jest dostępnych wiele komercyjnych testów ureazowych – na podstawie żelowej (CLO-test®, HpFast®), na podstawie bibułowej (bibuła

nasączona buforowanym roztworem mocznika – PyloriTek®, ProntoDry HpOne®), czy też na podstawie płynu (CPtest®, EndosChp®). Wynik testów daje odpowiedź (zmianę barwy podłoża z żółtego na czerwony) w czasie 1–24 godz. Testy te mają swoistość około 95%. Ich czułość jest jednak niższa i wynosi 85–95% [8]. Zwiększa się ona wraz z liczbą wykonanych biopsji oraz po inkubacji wycinków w temp 37°C. Wyniki fałszywie ujemne występują w przypadku pacjentów z achlorhydrią, a także u osób przyjmujących inhibitory pompy protonowej (PPI) z powodu zwiększonego pH soku żołądkowego, gdyż może to prowadzić do bardzo wysokich wartości pH w rejonach przyległych do *Hp* i zniszczenie ich przez aktywność ich własnej ureazy. Wyniki fałszywie ujemne można także otrzymać u pacjentów z krwawiącym wrzodem, ponieważ obecna w soku żołądkowym krew zakłóca reakcję ureazy z mocznikiem. Najwięcej wyników fałszywie pozytywnych daje natomiast odczyt po 24 godz. [9]. W porównaniu z badaniami histopatologicznymi, hodowlą i PCR testy ureazowe są znacznie szybsze i tańsze przy porównywalnej czułości oraz swoistości.

Analizując piśmiennictwo pod względem zakresów czułości i swoistości tych testów, spotyka się bardzo duże różnice w podawanych przedziałach. Uśredniając i podsumowując czułość badań hodowlanych, histopatologicznych oraz testu CLO, wynosi ona odpowiednio: 77,8–94,4; 88,9–90,9 i 82,1–94,4, a ich swoistość 100; 90,6–100; 95,5–96,9 [10–12].

Metody molekularne oferują dwie dostępne techniki badawcze: hybrydyzację *in situ* oraz metodę PCR. Hybrydyzacja *in situ* jest używana do wykrycia obecności *Hp* w starszych próbkach i do wykrycia swoistych markerów wirulencji oraz oporności na klarytromycynę. Czułość i swoistość diagnostyki z użyciem hybrydyzacji *in situ* wynosi odpowiednio: 95 i 100% [13].

Metoda polimerazowej reakcji łańcuchowej (PCR) jest szeroko stosowana w diagnostyce *Hp* w materiale biopsyjnym żołądka, w ślinie, kale czy też w badaniu oporności na klarytromycynę. PCR dostarcza informacji o występowaniu potencjalnych markerów wirulencji szczepu, które dają pogląd na możliwy rozwój choroby i jej przebieg oraz przypuszczalną skuteczność eradykacji. Jako cel amplifikacji wykorzystuje się różne primery oraz różne loci: 16S rRNA; A-, B-, C-ureazę; flaA; CagA; vacA oraz białko szoku cieplnego (hsp). Największą dokładność wykazuje stwierdzenie genu 16S rRNA [13]. Jedynymi wadami metod molekularnych są drogie procedury oraz większa trudność techniczna w porównaniu z hodowlą, metodami histopatologicznymi oraz szybkimi testami ureazowymi [15].

Metody nieinwazyjne

Metody te mogą być czynne lub bierne. Czynne wykrywają obecność *Hp* i dostarczają dowodów istnienia aktywnego zakażenia. Bierne dają dowody kontaktu z bakterią w pewnym okresie, lecz nie dowodzą istnienia aktywnego zakażenia. W testach tych wykrywa się swoiste przeciwciała.

Testy bierne

Występują 3 rodzaje testów serologicznych. Najczęściej stosuje się test ELISA, który wykrywa immunoglobuliny w surowicy pacjenta i może rozpoznać każdą z ich klas. Test aglutynacji z wykorzystaniem lateksu nie wymaga skomplikowanej aparatury i również może wykryć wszystkie klasy immunoglobulin. Jest szybszy niż ELISA i częściej używany w badaniach przyłóżkowych. Kolejnym testem jest test Western-blot, który także wykrywa wszystkie typy immunoglobulin, lecz ma przewagę rozpoznawania swoistych antygenów w jednej analizie. Ogólnodostępne testy na podstawie Western-blot są używane w badaniach przyłóżkowych, gdyż są szybkie i nie wymagają skomplikowanej aparatury. Ogólna dokładność serologicznych analiz wynosi średnio 78% (80–84%) [16]. Oznacza to, że w rejonach niskiego rozpowszechnienia *Hp* pozytywna wartość przewidywana stanowi około 50% (połowa dodatnich wyników będzie fałszywie pozytywna), dlatego dodatnie wyniki serologiczne muszą być potwierdzane innymi metodami. Sero-logia może być również dodatnia przez miesiące, a nawet lata po udanej eradykacji [16]. Diagnostyka oparta na badaniach serologicznych nie nadaje się do oceny wyników leczenia. Rozpoznanie zakażenia w badaniu serologicznym jest pewniejsze po stwierdzeniu wysokiego miana swoistych przeciwciał. W stosunku do tej metody stawia się zarzut, że wynik badania nie rozstrzyga o aktualnej kolonizacji bakteryjnej. Tylko część badaczy łączy wysokie miano swoistych przeciwciał z obecnością zmian zapalnych wywołanych zakażeniem *Hp* [17]. Ujemny wynik badania serologicznego wyklucza obecność bakterii w żołądku [18]. Negatywna wartość przewidywana jest doskonała i ujemny wynik praktycznie całkowicie wyklucza zakażenie bakterią. Sero-logia może być użyteczna, kiedy inne testy diagnostyczne mogą być fałszywie negatywne, jak u pacjentów z krwawiącymi wrzodami, zmianami zanikowymi, chłoniakiem MALT, przebytą operacją żołądka oraz aktualnie przyjmujących PPI lub antybiotyki [18].

Testy serologiczne są oparte na diagnostyce swoistych przeciwciał anti-*Hp* typu IgG w surowicy pacjenta. Niektóre z nich wykrywają również obecność IgA w ślinie lub IgG w moczu. Przewagą

testów serologicznych jest to, że można je wykonywać w większości szpitali czy laboratoriów klinicznych bez aparatury specjalistycznej.

Czułość i swoistość testów zależy od użytego antygeny, kontekstu klinicznego oraz złotego standardu jako porównania i występowania *Hp* w danej populacji. Podsumowując, czułość wynosi około 90–97% (pewna część badań podaje przedział 80–85%), a swoistość między 50–96% [19–23]. Najpoważniejszą wadą tych testów jest niemożność rozgraniczenia, czy jest to aktywna infekcja, czy ślad po ekspozycji na *Hp*. Poziomy przeciwciał mogą przetrwać we krwi pacjentów po terapii eradykacyjnej przez długi czas.

Zgodność diagnostyczna testu oddechowego (^{13}C) z testem ELISA wynosi około 96%, a zgodność HelicoTest® (IgG) z testem oddechowym około 85% [24]. Test enzymatyczny ELISA jest przydatny do ilościowego oznaczenia surowiczych przeciwciał anti-*Hp*, nie może jednak potwierdzić czynnego zakażenia tą bakterią. Test oddechowy (UBT – *urease breath test*) pozostaje nadal nieinwazyjnym złotym standardem oceny czynnego zakażenia *Hp* [25]. Test przesiewowy HelicoTest, oznaczający przeciwciała IgG p/*Hp* w pełnej krwi włośniczkowej, można również zastosować w odniesieniu do śliny jako materiału podstawowego. Stężenie przeciwciał IgG dla *Hp* w ślinie jest znacznie mniejsze niż we krwi. Dlatego rozcieńczenie śliny musi być mniejsze niż krwi, w przeciwnym wypadku test daje wyniki fałszywie ujemne [26].

Wadą testów ELISA jest możliwość występowania reakcji fałszywie dodatnich, spowodowanych podobieństwem antygenowym (*E. coli*, *H. influenzae*, *C. coli*, *C. jejuni*). Reakcje krzyżowe mogą być też wykazywane przez drobnoustroje używane do przygotowania szczepionek uodporniających (*Propionibacterium* sp., *Bordetella pertussis*) [27]. Proponuje się, aby równolegle z testami ELISA wykonywać test Western-blot pozwalający ocenić, które antygeny *Hp* i z jaką intensywnością są rozpoznawane przez przeciwciała występujące w surowicy pacjentów z objawami dyspepsji. Nasilenie reakcji z określonymi antygenami *Hp* uznaje się za wskaźnik zakażenia tymi bakteriami [28]. Testy wykorzystujące technikę Western blot (Milena-Blot® IgG lub IgA) umożliwiają wykrycie aktualnego zakażenia *Hp* na podstawie interakcji surowic pacjentów z wysoce swoistym antygenem (białka 20, 26 i 35kDa), a ponadto określenie szczepu jako CagA (+) lub CagA(–). Pacjenci zakażeni szczepami CagA dodatnimi częściej przechodzą bardziej zaостре zapalenie błony śluzowej żołądka i występuje u nich większe prawdopodobieństwo rozwoju zapalenia zanikowego oraz metaplastacji jelitowej, a także częstsze występowanie wrzodu dwunastnicy i raka żołądka typu jelitowe-

go. Przeciwciała przeciw CagA i VacA mogą być rozpoznane z użyciem metod immunologicznych (ELISA, ImmunoBlot). Po eradykacji przeciwciała znikają po różnym czasie, lecz niektóre, takie jak przeciwciała anti-CagA mogą przetrwać latami [14, 29]. Szybkie testy immunoenzymatyczne mogą oznaczać IgG w moczu (URINELISA Hp®, RAPIRUN Hp®) oraz antygeny w kale (Premier Platinum-HpSA®).

Powszechnie dostępne szybkie testy serologiczne (QuickVue One-Step HP®), oparte na technikach aglutynacji, hemaglutynacji, odwrotnej immunofluorescencji, immunoblottingu oraz testy lateksowe, pozwalają na stwierdzenie w ciągu kilku minut obecności przeciwciał *Hp* we krwi pobranej (mniejsza czułość i swoistość – używane jako testy w celu wstępnego wykluczenia obecności przeciwciał) [13].

Najnowsze metody diagnostyki z zakresu immunochromatografii (ICT) lub testu immunoblot wykorzystują marker CIM. Jest to rekombinowane białko homologiczne do białka sekrecyjnego *Hp*. Zgodnie z zaleceniami producentów obecność przeciwciała anti-CIM IgG jest czułym wskaźnikiem aktywnej infekcji [30].

Ze względu na małą czułość i swoistość testów wykrywających przeciwciała IgA wydaje się, że mogą być one stosowane tylko jako testy dodatkowe. Większość autorów zajmująca się badaniami serologicznymi uważa, że podwyższone miano przeciwciał IgG oraz IgA jest odbiciem toczącego się stanu zapalnego w żołądku [31–34].

Testy czynne

Testy z tej grupy są dokładne, praktyczne, łatwe, dostępne i są podstawą diagnostyki *Helicobacter pylori*, jeżeli pacjent nie wymaga endoskopii.

Ureazowy test oddechowy (UBT) jest oparty na aktywności ureazowej, która występuje w zakażeniu aktywnym. Aktywność ureazy bakteryjnej jest największa w środowisku kwaśnym i dlatego zaleca się w czasie testu popijanie tabletek moczniaka sokiem pomarańczowym, a najlepiej cytrynowym [35]. Jej dokładność diagnostyczna jest znacząco większa od badań hodowlanych, badań histopatologicznych oraz testu CLO. W badaniu tym w pierwszej kolejności pobiera się powietrze wydychane, a następnie doustnie podaje się znakowany moczniak ^{13}C . Jest on hydrolizowany przez ureazę do amoniaku i CO_2 , który jest absorbowany przez błonę śluzową żołądka do naczyń krwionośnych, a przez krew transportowany do płuc. W wydychanym powietrzu, zebranym do specjalnego woreczka, oznacza się procentową zawartość znakowanego CO_2 . Pomiar znakowanego $^{14}\text{CO}_2$ dokonuje się na podstawie oceny aktywności pro-

mieniotwórczej, a $^{13}\text{CO}_2$ na podstawie oznaczeń z użyciem spektrometrii masowej. Znakowany ^{13}C mocznik jest zwykle podawany pacjentowi z posiłkiem testowym, aby opóźnić opróżnienie żołądka i zwiększyć czas kontaktu z błoną śluzową. Po spożyciu mocznika próbki oddechowe są zbierane po 20 min przez wydychanie do odczynnika wiążącego CO_2 . Ureazowy test oddechowy ma bardzo wysoką czułość i swoistość w przedziale 95–97% [36]. Test ten może jednak nie być wiarygodny, gdy wykonuje się go u pacjentów po operacjach żołądka i u osób przyjmujących inhibitory pompy protonowej oraz ranitydynę. Wyniki fałszywie dodatnie mogą wystąpić przy obecności *Hp* w jamie ustnej oraz po spożyciu posiłku testowego zawierającego wodorowęglany. Z powodu bardzo dużej dokładności diagnostycznej test ten może być alternatywą dla endoskopii w diagnozowaniu zakażenia *Hp* [35].

Test oddechowy z wykorzystaniem mocznika znakowanego ^{14}C nie wymaga posiłku testowego. Jest ponadto nieinwazyjny, obiektywny, szybki, prosty do wykonania oraz relatywnie niedrogi. Metoda ta jest bardzo czuła, chociaż jej swoistość jest niższa w porównaniu z metodami inwazyjnymi uważanymi za złoty standard. Pomimo że ^{14}C UBT wymaga ekspozycji na radioizotop, promieniowanie następce dla tej mikrodawki (Pytest. TRI-Med.®) wynosi tylko 0,14–0,3 mRem, mniej niż dzienne promieniowanie środowiskowe [37]. Jest to metoda bezpieczna, choć z badania wyklucza się kobiety ciężarne.

Oddechowy test ureazowy to również bardzo dobra metoda do oceny skuteczności terapii eradycznej. Pozwala uniknąć fałszywie negatywnych wyników charakterystycznych dla testów opartych na biopsji (na skutek ogniskowej kolonizacji bakterii) oraz fałszywie pozytywnych dla serologii wywołanych obecnością przeciwciał anti-*Hp* typu IgG [38].

Konwencjonalny UBT jest uważany za dokładną metodę nieinwazyjnej diagnostyki zakażenia *Hp*. Jej czułość i swoistość wynosi około 90–100% (96 i 98%). Próbkę są pobierane przynajmniej 10 min po spożyciu, ponieważ ureaza flory jamy ustnej może spowodować wyniki fałszywie dodatnie, gdy próbki oddechowe są zebrane zbyt wcześnie [37]. Odsetek wyników fałszywie dodatnich konwencjonalnego UBT szacuje się na poziomie 4,3–14,9% [9]. Obniżona swoistość może być związana z kilkoma czynnikami. Jednym z ważniejszych jest ureaza z flory bakteryjnej jamy ustnej. Oczyszczenie jamy ustnej pacjenta i opóźnienie czasu pobierania próbek to sposoby zmniejszenia odsetka fałszywych testów. Badanie wykonywane około 15 min po spożyciu jest mniej swoiste niż wykonywane po 30 min. Kapsułko-

wany UBT rzadko powoduje wyniki fałszywie pozytywne. Bardzo dobrze sprawdza się w diagnostyce zakażenia pierwotnego i potwierdzenia skuteczności terapii eradycznej. Pomimo dużej dokładności kapsułkowego UBT, badanie to nie zastąpi endoskopii, niekiedy jednak może być dla niego alternatywą.

UBT jest techniką obiektywną i powtarzalną, zdolną objąć całą błonę śluzową żołądka. Wykazuje wysoką czułość, ale małą swoistość. Ureazowy test oddechowy jest dotychczas najlepszą metodą diagnostyki zakażenia *Helicobacter pylori*. Serologia powinna być stosowana w pierwszej kolejności tylko wówczas, gdy istnienie niebezpieczeństwo, że wynik UBT może być fałszywie negatywny (np. u pacjenta z aktualnie krwawiącym wrzodem lub podczas terapii eradycznej). Bez względu na charakter testu UBT ma on przewagę wiarygodności w stosunku do badań serologicznych (tab. 4).

Test antygeny kałowy wykrywa obecność antygenów bakteryjnych w kale, które znikają, kiedy zakażenie jest wyleczone. Immunoanaliza enzymatyczna (EIA) wykrywa obecność antygeny *Hp* w próbkach kału. Próbkę są jednak wrażliwe na temperaturę pomieszczenia i muszą być zamrożone natychmiast po pobraniu. Testy poliklonalne są mniej dokładne niż testy monoklonalne. Test ten może być przydatny u dzieci, które nie mogą być poddane UBT.

Obecne badania sugerują, że oddechowy test mocznikowy i antygenowy test kałowy są równie dokładne w potwierdzaniu eradacji. Pozytywny wynik testu po 7 dniach od zakończenia leczenia eradycznego wskazuje na niepowodzenie terapii. Czułość i swoistość wynosi około 92% [39].

Ponieważ żaden test nie jest w 100% dokładny, może wynikać konieczność użycia dwóch testów o różnych mechanizmach, np. UBT w połączeniu z testem kałowym lub serologią. Dodatnia serologia musi być potwierdzona innymi metodami.

Podsumowując, UBT jest najlepszym testem diagnostycznym spośród metod nieinwazyjnych. Monoklonalny antygenowy test kałowy jest nieco

Tabela 4. Ocena wybranych testów do diagnozowania zakażenia *Helicobacter pylori*

Table 4. Evaluation of chosen tests in *Helicobacter pylori* diagnostics

	Serologia (Serology)	Konwencjonalne UBT (Conventional UBT)	Kapsułkowe UBT (Capsule UBT)
Czułość	90,6	100	100
Swoistość	85,1	85,1	95,7
Dokładność	88	93	98

mniej dokładny, ale jest dobrym rozwiązaniem, szczególnie u dzieci. Badania sprawdzające eradykację powinny być wykonywane nie wcześniej niż 4 tygodnie po zakończeniu terapii. Nieinwazyjne badania powinny być przeprowadzane w celu potwierdzenia eradykacji, oprócz przypadków, gdzie jest wskazana powtórna endoskopia, np. u pacjentów z wrzodem żołądka. Pojedynczy test (z wyjątkiem hodowli) nie jest jednak wystarczający do stwierdzenia zakażenia. Wytoczne europejskie jako złoty standard diagnostyczny zalecają dlatego przeprowadzenie przynajmniej 2 różnych testów [3]. Zwyczajowo jednak w praktyce klinicznej często używa się jednej metody diagnostycznej, wybranie więc odpowiedniego testu jest najważniejsze.

Złoty standard diagnostyczny

European Consensus Group ustaliła pierwotnie w 1997 r. w Maastricht, że złotym standardem diagnostycznym jest test ^{13}C UBT. W 2002 r. zmodyfikowano te ustalenia i podano jako złoty standard przeprowadzenie przynajmniej 2 różnych testów [3].

Ślina ze względu na łatwość pobierania i przechowywania może być dobrym materiałem do badań diagnostycznych i epidemiologicznych [40]. Jej przydatność w diagnostyce *Helicobacter pylori* jest porównywalna z krwią [14, 41].

Może istnieć związek między właściwą higieną jamy ustnej a zakażeniem *Hp*. Wykazano, że osoby z uzębieniem naturalnym i dobrą higieną jamy ustnej mają istotnie niższy wskaźnik zakażenia *Hp* niż użytkownicy uzupełnień protetycznych [42].

Większość metod diagnostycznych wykrywających *Hp* jest wrażliwa na przyjmowane przez pacjentów leki chemioterapeutyczne. Antybiotyki, związki bizmutu oraz inhibitory pompy protonowej nie powinny być stosowane przez 4 tygodnie przed badaniem *Hp* z użyciem metod wykrywających ureazę, takich jak szybki test urazowy (RUT) wykonywany podczas endoskopii i UBT. Podawanie inhibitorów pompy protonowej powinno być wstrzymane przynajmniej tydzień przed testami diagnostycznymi.

Ocena terapii eradykacyjnej

Wytoczne American Collage of Gastroenterology (ACG) wymieniają 4 grupy pacjentów, które

w szczególny sposób powinny być poddane badaniom potwierdzającym eradykację po terapii: pacjenci z infekcją *Hp* powiązaną z występowaniem wrzodów żołądka, poddani resekcji we wczesnym stadium raka żołądka, pacjenci z chłoniakiem MALT lub z przetrwałymi objawami dyspeptycznymi po leczeniu.

Ocena skuteczności leczenia eradykacyjnego jest bezwzględnie wymagana w przypadkach: wrzodów żołądka, krwawienia z wrzodu dwunastnicy, powikłań choroby wrzodowej w wywiadzie, braku poprawy klinicznej po leczeniu, chłoniaka żołądka typu MALT oraz choroby Menetriera.

Proponuje się następujące schematy łączenia leków: OAT (kuracja 14-dniowa: omeprazol, amoksycylina, tynidazol), OAC (7-dniowa: omeprazol, amoksycylina, klarytromycyna). U pacjentów leczonych zestawem OAT ujawnił się związek między stanem uzębienia a skutecznością leczenia eradykacyjnego z powodu dużej oporności *Hp* w odniesieniu do pochodnych nitroimidazolowych [43], bardzo małego stężenia amoksycyliny w ślinie [44], braku właściwej higieny jamy ustnej, małej liczby zębów własnych oraz dużej aktywności próchnicy. Nie oznacza to jednak, że w każdym przypadku nieskutecznej eradykacji zestawem OAT niepowodzenie leczenia należy wiązać z przetrwaniem bakterii w jamie ustnej. Użytkowanie ruchomych uzupełnień protetycznych może obniżać skuteczność terapii eradykacyjnej u pacjentów leczonych zestawem OAT, co należy uwzględnić, wybierając zestaw leków do eradykacji [45].

W razie niepowodzenia eradykacji z użyciem standardowej klarytromycyny poczwórna terapia eradykacyjna z wykorzystaniem bizmutu jest zalecana jako druga z kolei [46]. W polskiej populacji obserwuje się dużą oporność bakterii na klarytromycynę, więc stosuje się schemat kuracji 14-dniowej z użyciem inhibitora pompy protonowej, amoksycyliny i metronidazolu.

Dalsze ulepszanie metod diagnostycznych oraz ujednolicenie procedur diagnostycznych może doprowadzić do większej przejrzystości wyników i porównywalności między badaniami w różnych ośrodkach. Wszechstronne poznanie charakteru *Helicobacter pylori* w każdym środowisku, w tym w jamie ustnej, pozwoli na uzyskanie bardziej pewnych i długotrwałych wyników leczenia.

Piśmiennictwo

- [1] TALLEY N.J., VAKIL N.: Guidelines for the management of dyspepsia. *Am. J. Gastroenterol.* 2005, 100, 2324–2337.
- [2] MALFERTHEINER P., SIPPONEN P., NEUMANN M., MOAYYEDI P., MEGRAUD F., XIAO S.D., SUGETO K., NYREN O., LEPRIDAL H.: *Helicobacter pylori* eradication has the potential to prevent gastric cancer: a state of the art critique. *Am. J. Gastroenterol.* 2005, 100, 2100–2115.
- [3] MALFERTHEINER P., MEGRAUD F., O'MORAIN C., HUNGIN A.P., JONES R., AXON A., GRAHAM D.Y., TYTGET G.: Current concept in the management of *H. pylori* infection – the Maastricht 2-2002 consensus report. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 2002, 16, 167–180.
- [4] HEANEY A., COLLINS J.S., WATSON R.G., MCFARLAND R.J., BAMFORD K.B., THAM T.C.: A prospective randomised trial of a test and treat policy versus endoscopy based management in young *Helicobacter pylori* positive patients with ulcer-like dyspepsia referred to a hospital clinic. *Gut* 1999, 45, 186–190.
- [5] RICCI C., HOLTON J., VOIRA D.: Diagnosis of *Helicobacter pylori*: Invasive and non-invasive tests. *Best Res. Clin. Gastroenterol.* 2007, 21(2), 299–313.
- [6] ROMANO M., MARMO R., CUOMO A.: Pretreatment antimicrobial susceptibility testing is cost saving in the eradication of *Helicobacter pylori*. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* 2003, 1, 273–278.
- [7] FISHER R.: *Gastrosprillum hominis*, another gastric spiral bacterium. *Gig-Dis.* 1992, 10, 3, 144–149.
- [8] ZEGARSKI W., DĄBROWIECKI, GOSPODAREK E., SZCZĘSNY W.: Ocena wartości wybranych metod w wykrywaniu zakażenia błony śluzowej żołądka bakterią *Helicobacter pylori*. *Acta Endosc. Pol.* 1995, 5(1), 31–36.
- [9] LEE J.M., BRESLIN N.P., FALLON C., O'MORAIN C.A.: Rapid urease test lack sensitivity in *Helicobacter pylori* diagnosis when peptic ulcer disease presents with bleeding. *Am. J. Gastroenterol.* 2000, 95, 1166–1170.
- [10] PENG N.J., LAI K.H., LIU R.S., LEE S.C., TSAY D.G., LO C.C., TSENG H.H., HUANG W.K., LO G.H., HSU P.I.: Endoscopic 13C-urea breath test for the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *Dig. Liver Dis.* 2003, 35, 73–77.
- [11] PENG N.J., LAI K.H., LIU R.S., LEE S.C., TSAY D.G., LO C.C., TSENG H.H., HUANG W.K., LO G.H., HSU P.I.: Capsule 13C-urea breath test for the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *World J. Gastroenterol.* 2005, 11, 1361–1364.
- [12] STEVENS M., LIVSEY S., SWANN R.: Evaluation of Sixteen EIAs for the Detection of Antibodies to *Helicobacter pylori*. London, Department of Health, 1997, 1–46.
- [13] BIELAŃSKI W.: Diagnostyka zakażeń *Helicobacter pylori*. *Medycyna po Dyplomie (Wydanie Specjalne)* 2006, 6, 44–49.
- [14] TIWARI S.K., KHAN A.A., AHMED K.S., AHMED I., KAUSER F., HASLALLE M.A., ALI S.M., ALVI A., HABEEB A., ABID Z., AHMED N.: Rapid diagnosis of *Helicobacter pylori* infection in dyspeptic patients using salivary secretion: a non-invasive approach. *Singapore Med. J.* 2005, 46, 224–228.
- [15] LISBY G.: Application of nuclei amid amplification to clinical microbiology. *Mol. Biotechnol.* 1999, 12, 75–99.
- [16] HO B., MARSHALL B.J.: Accurate diagnosis of *Helicobacter pylori*. Serologic testing. *Gastroenterol. Clin. North. Am.* 2000, 29, 853–862.
- [17] MORRIS A., NICHOLSON G., LLOYD G., HAINES D., TAYLOR D.: Seroepidemiology of *Campylobacter pyloridis*. *N. Z. Med. J.* 1986, 99, 657.
- [18] NURGALIEVA Z.Z., GRAHAM D.Y.: Pearls and pitfalls of assessing *Helicobacter pylori* status. *Dig. Liver Dis.* 2003, 35, 375–377.
- [19] EKESBO R., TOTH E., FORK F.T., HELD M., NILSSON I., WALDSTRÖM T., SJÖLURD I.C.: Chronic *Helicobacter pylori* infection in a population in southern Sweden analysed by histopathology, immunoblot and ELISA serology. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 2006, 18, 589–593.
- [20] ZUNIGA-NORIEGA J.R., BOSQUES-PADILLA F.J., PEREZ-PEREZ G.I.: Diagnostic utility of invasive test and serology for the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection in different clinical presentation. *Arch. Med. Res.* 2006, 37, 123–128.
- [21] KULLAVANIJAYA P., THONG-NGAM D., HANVIVATVONG O.: Analysis of eight different methods for the detection of *Helicobacter pylori* infection in patients with dyspepsia. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 2004, 19, 1392–1396.
- [22] GARZA-GONZALES E., BOSQUES-PADILLA F.J., TIJERINA-MENCHACA R.: Comparison of endoscopy based and serum based methods for the diagnosis of *Helicobacter pylori*. *Can. J. Gastroenterol.* 2003, 17, 101–106.
- [23] STENBERG A., COSCAS D., WAGNER Y.: Comparison of various *Helicobacter pylori* detection methods: serology, histology and bacteriology. *Isr. J. Med. Sci.* 1997, 33, 160–163.
- [24] PALKA M., TOMASIK T., WINDAK A., MARGAS G., KRZYSZTOF J.: Nieinwazyjna diagnostyka zakażenia *H. pylori* u pacjentów poniżej 45 r.ż. z zastosowaniem testu oddechowego i badań serologicznych. *Prob. Med. Rodz.* 2006, 3, 16, 10–14.
- [25] ROŚNIAK-BĄK K., PAWŁOWSKA A., OLSZOWIEC K., STĘPIEŃ A., PARADOWSKI M.: Ocena użyteczności klinicznej immunoenzymatycznego ilościowego testu ELISA nowej generacji do rozpoznawania zakażeń *Helicobacter pylori*. *Diagn. Lab.* 2008, 44, 305–315.
- [26] TADEUSIAK W.: Możliwość oznaczania w ślinie przeciwciał przeciwko *Helicobacter pylori* klasy IgG z zastosowaniem testu skryningowego HelicoTest.
- [27] JAROSIŃSKA A., CHMIELA M., ŁAWNIK M.: Znaczenie reakcji krzyżowych w diagnostyce zakażeń *H. pylori*. Konferencja. *Biologia Molekularna w Diagnostyce Chorób Zakaźnych i Biotechnologii*. Wydawnictwo SGGW, Warszawa 1999, 169–173.

- [28] CHMIELA M., ŁAWNIK M., CZKWIANIA E., RECHCIŃSKI T., PŁANETA-MAŁECKA I., RUDNICKA W.: Systemic humoral response to *Helicobacter pylori* in children and adults. Arch. Immunol. Ther. Exp. 1998, 46, 161–167.
- [29] LU C.Y., KUO C.H., LO Y.C., WU M.T., WU I.C., LU C.Y., SU Y.C., YU P.J., LEE Y.C., LIN S.Z., LIU S.C., IAN C.M., VANG W.M., VU D.C.: The best method of detecting prior *Helicobacter pylori* infection. World J. Gastroenterol. 2005, 11, 5672–5676.
- [30] RAHMAN H.Z.S., GEDEVANISCHVILI A., BUNGO M.W., VIJAYA-KUMAR V., CHAMOUN A., BIRBAUM Y., SCHLEGEL T.T.: Non-invasive diagnosis of *H. pylori* infection: Evaluation of serological tests with and without current infection marker CIM. World J. Gastroenterol. 2008, 14, 1231–1236.
- [31] FISHER N.: Salivary antibodies to *H. pylori*: screening dyspeptic patients before endoscopy. Lancet 1994, 344, 1016.
- [32] GOŚCINIAK G., SIMIŃSKA A., PONIEWIERKA E., GNUS J., JAWORSKA-BŁACH B.: Przeciwciała IgG i IgA w surowicy i soku żołądkowym chorych z różnymi schorzeniami górnego odcinka przewodu pokarmowego. Gastroenterol. Pol. 1994, 1, 147–151.
- [33] KREUNING J., LINDEMAN J., BIEMOND J., LAMERS C.: Relation between IgG and IgA antibody titres against *H. pylori* in serum and severity of gastritis in asymptomatic subjects. J. Clin. Pathol. 1994, 47, 227–233.
- [34] LUZZA F., IMENEO M., MALETTA M., MONTELEONE G., DOLDO P., BIANCONE L., PALLONE F.: Isotypic analysis of specific antibody response in serum, saliva, gastric and rectal homogenates of *Helicobacter pylori*-infected patients. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 1995, 10, 285–288.
- [35] LEODOLTER A., DOMINQUEZ-MUNOZ I.E., VON ARNING U., REITZ U., MALFELTHEINER P.: Citric acid or orange juice for the 13C-urea breath test: the impact of pH and gastric emptying. Aliment Pharmacol. Ther. 1999, 13, 1057–1062.
- [36] SŁOMIANSKI A., SHUBERT T., CUTLER A.F.: 13C urea breath test to confirm eradication of *Helicobacter pylori*. Am. J. Gastroenterol. 1995, 90, 224–226.
- [37] MARSHALL B.J.: The 14C urea breath test. In: *Helicobacter pylori*: techniques for clinical diagnosis and basic research. Eds.: Lee A., Megraud F., Saunders, London 1996.
- [38] PENG N.J., HSU P.I., LEE S.C., TSENG H.H., HUANG W.K., TSAY D.G., LO G.H., LIN C.K., CHENG J.S., LAI K.H.: Follow-up of *Helicobacter pylori* status by using 13C urea breath test in nonulcer dyspeptic patients after eradication therapy. Chin. Med. J. (Taipei) 2001, 64, 337–342.
- [39] GATTA L., PERNA F., RICCI C., OSBORN I.F., TAMPIEN A., BERNABUCCI V., MIGLIOLI M., VAMA P.: A rapid immunochromatographic assay for *Helicobacter pylori* in stool before and after treatment. Aliment Pharmacol. Ther. 2004, 20, 469–474.
- [40] GOŚCINIAK G., PONIEWIERKA E., IWAŃCZAK B., GRZESZEK T.: Przeciwciała IgA anty-*Helicobacter pylori* w surowicy i ślinie chorych ze schorzeniami górnego odcinka przewodu pokarmowego. Gastroenterol. Pol. 1996, 3, 2, 119–124.
- [41] SŁOWIŃSKA M.S., PIERZYŃSKA E., SŁOWIŃSKI R.: Występowanie przeciwciał przeciwko *Helicobacter pylori* w ślinie i krwi na podstawie piśmiennictwa i badań własnych. Nowa Stomatol. 2004, 9, 4, 46–48.
- [42] GASBARRINI G., PRETOLANI S., BONVICINI F., GALTO M.R., TONELLI E., MEGRAUND F., MAYO K., GHIRONZINI C., GRASSI M.: A population based study of *Helicobacter pylori* infection in a European country: the San Marino Study. Relations with gastrointestinal diseases. Gut 1995, 36, 838–844.
- [43] GOŚCINIAK G., GLUPCZYŃSKI Y., GOUTIER S., VAN DEN BORRE C., BUTZLER J.P., PRZONDO-MORDARSKA A.: Prevalence of antibiotic resistance in *Helicobacter pylori* strains in Poland. Clin. Microbiol. Infect. 1998, 4, 726–728.
- [44] WURST J., HARDEGGER U.: Penetration of clarithromycin into human saliva. Chemotherapy 1993, 39, 293–298.
- [45] NAMIOŁ D.B., NAMIOŁ Z., KEMONA A., GOŁĘBIEWSKA M.: Użytkowanie protez zębowych a skuteczność leczenia eradykacyjnego bakterii *Helicobacter pylori*. Gastroenterology 2000, 7, 341–344.
- [46] STENSTROM B., MENDIS A., MARSHALL B.: *Helicobacter pylori*: The latest in diagnosis and treatment. Austral. Family Phys. 2008, 37, 8, 609–612.

Adres do korespondencji:

Jakub Urban
ul. Piastowska 75
43-300 Bielsko-Biała
tel.: 609 024 603
e-mail: anduril@poczta.fm

Praca wpłynęła do Redakcji: 5.10.2010 r.
Po recenzji: 30.12.2010 r.
Zaakceptowano do druku: 31.12.2010 r.

Received: 5.10.2010
Revised: 30.12.2010
Accepted: 31.12.2010