

*Magdalena Klatt, Zofia Zwolska, Agnieszka Napiórkowska, Ewa Augustynowicz-Kopec

Wiarygodność testów lekooporności *Mycobacterium tuberculosis* jako istotny element nadzorowanego leczenia gruźlicy

Reliability of the results of drug susceptibility testing *Mycobacterium tuberculosis* as an important factor of supervised treatment of tuberculosis

Zakład Mikrobiologii, Instytut Gruźlicy i Chorób Płuc w Warszawie
Kierownik Zakładu: prof. nadzw. dr hab. med. Ewa Augustynowicz-Kopec

Streszczenie

Wstęp. Odkrycie i wprowadzenie do terapii w drugiej połowie XX wieku leków przeciwprątkowych stało się punktem przełomowym w tysiącletniej historii gruźlicy. Następnym zastosowaniem antybiotyków do leczenia gruźlicy stało się niestety zjawisko narastania lekooporności prątków.

Brak wystandaryzowanych metod określania wrażliwości prątków gruźlicy powoduje trudności w prawidłowym określeniu fenotypu oporności. Testy lekowrażliwości wykonywane bez zachowania należytej kontroli i interpretacji wyników mogą błędnie klasyfikować szczepy *M. tuberculosis* jako wrażliwe lub odporne. Wzrost liczby zachorowań na gruźlicę wywołaną przez prątki odporne na leki spowodował konieczność wprowadzenia i rozwoju szybkich metod diagnostycznych.

Cel pracy. Celem pracy była ocena przydatności automatycznego systemu Bactec MGIT 960 do określania oporności prątków gruźlicy na cztery podstawowe leki (RMP, INH, SM, EMB).

Materiał i metody. Analizie poddano szczepy *M. tuberculosis* wyizolowane od 63 chorych z IGiChP oraz z innych placówek diagnozujących gruźlicę w Polsce. Lekooporność na cztery podstawowe leki wykonano na pożywce L-J oraz na pożywce płynnej w automatycznym systemie Bactec MGIT 960.

Wyniki. Wśród 252 wykonanych oznaczeń lekooporności zgodność wyników dla wszystkich leków (SM, INH, RMP i EMB) wyniosła 94,8%. Najwyższą zgodność wyników testów wrażliwości na pożywce jajowej L-J oraz w aparacie Bactec MGIT 960 uzyskano dla izoniazidu i rifampicyny – 62/63 oznaczenia (98,4%). Czas oczekiwania na wynik lekowrażliwości na pożywkach płynnych wynosił od 4,6 do 12,8 dni (średnio 8,95 dni), co przy 28-42 dniach (średnio 36,67 dni) potrzebnych do uzyskania wyniku oporności oznaczonego na pożywce L-J jest różnicą zmienną statystycznie ($p < 0,001$).

Wnioski. System Bactec 960 MGIT pozwala na szybkie i wiarygodne uzyskanie wyniku lekowrażliwości *Mycobacterium tuberculosis*, co umożliwia skrócenie czasu oczekiwania na wynik oraz szybsze włączenie prawidłowego leczenia.

Słowa kluczowe: gruźlica, testy lekooporności, Bactec MGIT 960

Summary

Introduction. The discovery and introduction antituberculous drugs to the therapy in the second half of XX century, became a turning point in the history of tuberculosis. Unfortunately, this has resulted in closely associated with the use of drugs, the phenomenon of rising drug resistance among *M. tuberculosis* strains. Lack of standardized methods for susceptibility testing causes difficulties in correctly identifying resistance phenotype. These tests are performed without laboratory quality control may show erroneous results. The phenomenon of drug-resistant TB strains has necessitated the introduction and development of rapid diagnostic methods.

The aim of this study was to evaluate the usefulness of automated Bactec MGIT 960 system for determining the phenotype of resistance to the four basic drugs (RMP, INH, SM, EMB) among *Mycobacterium tuberculosis* strains.

Material and methods. The present analysis is based on the results of susceptibility testing of 63 *M. tuberculosis* strains isolated from patients at IGiChP or other Polish centers where tuberculosis is diagnosed. Drug susceptibility testing was performed on solid medium (L-J) by proportion method and liquid medium using the Bactec MGIT 960 system.

Results. Compatibility of drug resistance results for all drugs in both methods was 94.8%. The highest compatibility of the results on solid medium (L-J) and Bactec MGIT 960 system obtained for isoniazid and rifampicin – 62/63 marks (98.4%).

The time waiting for the results of susceptibility testing of liquid medium ranged from 4.6 to 12.8 days (average 8.95 days), and of solid medium from 28-42 days (average 36.67 days) ($p < 0.001$).

Conclusions. The Bactec MGIT 960 system allows to get rapid and reliable results of drug susceptibility testing of *M. tuberculosis* strains. This system reduces the waiting time for results, and allows faster including the correct treatment of the patient.

Key words: tuberculosis, drug susceptibility testing, Bactec MGIT 960

WSTĘP

Odkrycie i wprowadzenie do terapii w drugiej połowie XX wieku leków przeciwprątkowych stało się punktem przełomowym w tysiącletniej historii gruźlicy. Niestety to wielkie osiągnięcie wyzwoliło bardzo niekorzystne, ściśle związane ze stosowaniem leków, zjawisko narastania lekooporności prątków gruźlicy (1). Lekooporne szczepy *M. tuberculosis* pojawiły się już w pierwszych latach stosowania leków przeciwprątkowych (2, 3, 4, 5). Jednak przez kilka dziesiątków lat problem nie wydawał się szczególnie niebezpieczny dla skutecznej walki z gruźlicą.

Pierwsze poważne doniesienia medyczne obrazujące zagrożenie rozprzestrzeniania się prątków lekoopornych pochodzą z lat 80. XX wieku i dotyczą gruźlicy u chorych zakażonych wirusem HIV w USA i Europie (6, 7, 8, 9). Dane te wkrótce zwróciły uwagę całego świata na duże odsetki gruźlicy wywołanej prątkami opornymi na leki występujące w wielu krajach, również u ludzi HIV (-), oraz na bardzo niebezpieczny problem łatwej transmisji prątków lekoopornych w niektórych środowiskach (10, 11, 12, 13, 14, 15).

Należy dodać, że prace nad częstością występowania gruźlicy lekoopornej w wielu regionach świata nie były prowadzone systematycznie. Tak więc nadzór nad zapobieganiem powstawania lekooporności w gruźlicy został zlekceważony, co doprowadziło w latach 1985-1990 do ujawnienia dramatycznej sytuacji pojawienia się wielu krajach szczepów o oporności typu MDR i XDR (16, 17).

Obecne pogorszenie się sytuacji epidemiologicznej gruźlicy na świecie stało się faktem, a gruźlica jest najczęstszym i największym pojedynczym zabójcą ludzi wśród innych chorób zakaźnych.

Przedstawionej sytuacji epidemiologicznej towarzyszy również znaczny wzrost zachorowań spowodowanych szczepami prątków gruźlicy opornymi na leki. Szacunkowa ilość chorych z gruźlicą wywołaną prątkami o oporności typu MDR (szczepami opornymi na izoniazyd i rifampicynę) wyniosła w 2009 roku 250 000 przypadków, a odnotowano i zarejestrowano tylko niewiele ponad 30 000 zgłoszeń, co stanowi 12% wszystkich przypadków gruźlicy płucnej (18).

Do najważniejszych przyczyn stale pogarszającej się sytuacji epidemiologicznej gruźlicy na świecie należą: złe programy zwalczania choroby lub ich niedostateczna realizacja, lekceważenie problemu gruźlicy w krajach rozwiniętych, brak środków na leczenie choroby w krajach rozwijających się, rozprzestrzenienie się wirusa HIV oraz zjawisko lekooporności prątków, uznane przez ekspertów WHO za jedną z ważniejszych

przyczyn nasilenia gruźlicy we współczesnym świecie (19, 20, 21).

Istnieje zgodny pogląd, że lekooporność na leki przeciwprątkowe jest wynikiem niedostatecznej kontroli nad leczeniem gruźlicy (22, 23). Może ona przybierać różne formy: opóźnionej diagnostyki, braku kontroli nad przyjmowaniem leków przez chorych, jak również ordynowania niewłaściwych zestawów leków w nieodpowiednich dawkach, nieodpowiedniego czasu trwania terapii, okresowego braku leków, co powoduje ich nieregularne przyjmowanie. A zatem winę za niestosowanie się do zaleceń terapeutycznych ponosi zarówno chory (24), jak i personel medyczny (25, 26). Nie można również lekceważyć, jako przyczyny powstawania lekooporności, niewłaściwej jakości leków dostarczanych na rynek farmaceutyczny. Obszerny artykuł publikowany w 2001 roku omawia to zjawisko (27). A zatem, nabyta w trakcie leczenia lekooporność prątków jest wykładnikiem pracy wszystkich służb medycznych.

Oporność *Mycobacterium tuberculosis* na leki przeciwprątkowe, podobnie jak innych gatunków bakterii, powstaje w wyniku selekcji mutantów naturalnie opornych, stale obecnych w każdej populacji bakterii. Niepodobnie do innych bakterii u prątków cecha lekooporności nie jest przenoszona przez plazmidy lub transpozony (28). W czasie ich rozmnażania się oporność na leki rozwija się spontanicznie z częstością dobrze znaną dla poszczególnych leków: dla ryfampicyny (RMP) z częstością 10^{-10} podziałów komórkowych i prowadzi do lekooporności rzędu $1/10^9$ w środowisku wolnym od leku, dla izoniazylu (INH) częstość mutacji wynosi 10^{-7} - 10^{-9} podziałów komórkowych. W jamach gruźliczych populacja bakteryjna jest znaczna i zawsze większa niż 10^7 prątków (28), a więc i proporcja komórek wrażliwych do opornych jest niekorzystna dla leczenia.

Innym mechanizmem jest zmiana przepuszczalności ściany komórkowej, powodująca utrudnioną penetrację leku do wnętrza komórki lub zjawisko *efflux pump*, aktywnego usuwania leku z komórki. Może również nastąpić zmiana szlaków metabolicznych omijających „wrażliwe na leki” miejsca w komórce (29). Niezależnie od głównych mechanizmów powstawania, lekooporność prątków zawsze jest wynikiem działania procesu selekcji, tj. zmiany proporcji komórek wrażliwych do opornych na leki. A zatem lekooporność *Mycobacterium* jest wynikiem niedostatecznej inhibicji wzrostu prątków przez leki. Jeżeli wystąpi mutacja, lekooporne komórki szybko zastępują i eliminują wrażliwe, powodując lekooporność nabytą w trakcie leczenia.

Do głównych czynników selekcyjnych należą: podawanie leków w niewłaściwych dawkach i nieodpowiednim czasie, podawanie pojedynczego leku zamiast skojarzonych, przerwanie leczenia przez samego chorego np. z powodu wystąpienia objawów niepożądanych, zła biodostępność leku związana ze stanem zdrowia chorego lub złą jakością leków (30, 31).

Wystąpienie lekooporności zmusza do stosowania leków dodatkowych, mniej skutecznych niż leki podstawowe, powodujących częściej objawy uboczne, a jednocześnie znacznie droższych. Leczenie chorych z gruźlicą lekooporną jest około 100 razy droższe niż leczenie lekami podstawowymi (32).

Poważnym mankamentem testów lekooporności prątków gruźlicy, poza długim czasem oczekiwania na wynik (4-5 tygodni), jest brak dobrze wystandaryzowanych metod, co powoduje trudności w klinicznej interpretacji zjawiska lekooporności. Trudności ze standaryzacją antybiogramu prątków gruźlicy są częścią problemów metodycznych dotyczących, poza lekoopornością, również innych procedur diagnostycznych, takich jak: wyhodowanie szczepu, bakterioskopia i typowanie *Mycobacterium* do gatunku (33).

Wiarygodność testów lekowrażliwości prątków zależy od wielu czynników, z których do najważniejszych należą: wybór metody, wybór systemu hodowlanego (pożywki jajowe, agarowe, izotopowe itp.), stosowanie standardowych szczepów o znanym wzorze lekooporności, jakość czystych substancji leków, rodzaj i temperatura koagulacji pożywek jajowych i prawidłowość stosowania kryteriów lekooporności (34, 35).

Test lekooporności u prątków gruźlicy jest badaniem wysokospecjalistycznym i wg zaleceń WHO powinien być wykonywany w laboratoriach III stopnia referencyjności (36).

Pojawienie się na świecie szczepów o wzorach oporności MDR i XDR spowodowało konieczność wprowadzenia i rozwoju szybkich metod. Obecnie w literaturze można spotkać szereg metod, które dzielą się na dwie grupy: fenotypowe i genotypowe. Metody fenotypowe polegają na wykrywaniu efektu działania leku na metabolizm lub rozmnażanie się prątków w porównaniu do kontroli, tj. populacji prątków nieeksponowanych na działanie leku. Testy mierzące ten efekt wykonuje się w hodowli prątków na pożywkach stałych lub płynnych – w systemach automatycznych lub manualnych. W zależności od użytego systemu czas wykonanego badania trwa od 5 dni do 4 tygodni. Metody na pożywkach stałych i płynnych są rekomendowane przez WHO, również do prowadzenia programów epidemiologicznych rozprzestrzeniania się gruźlicy lekoopornej na świecie. Systemy automatyczne pozwalają na szybkie wykonanie testu, ale wymagają dużego nakładu pracy, odpowiedniego zabezpieczenia technicznego, tj. stałego dopływu prądu i systemów zabezpieczających przed utratą danych.

CEL PRACY

Celem pracy było zbadanie czy nowy, automatyczny system hodowli Bactec MGIT 960 wprowadzo-

ny do diagnostyki gruźlicy w Polsce **jest przydatny do wykonywania testów lekooporności na cztery główne leki** – izoniazyd (INH), rifampicynę (RMP), streptomycynę (SM) i etambutol (EMB). Cel realizowano porównując wyniki do otrzymanych w metodzie konwencjonalnej na pożywce Löewensteina – Jensena (L-J).

MATERIAŁ I METODY

Badania wykonano na 63 szczepach izolowanych od chorych w IGiCHP i innych placówkach diagnostyki gruźlicy w Polsce. Dla wszystkich szczepów wykonano test wrażliwości na pożywce jajowej L-J własnej produkcji (wg metodyki obowiązującej w Polsce) (37) oraz na pożywce płynnej w automatycznym aparacie Bactec MGIT 960 (Becton Dickinson) (wg zaleceń producenta).

Przygotowanie hodowli prątków na pożywkach płynnych

Z hodowli prątków uzyskanej na pożywkach jajowych przygotowywano zawiesinę o gęstości 0,5 McFarlanda, rozcieńczano ją 100-krotnie i posiewano na próbówkę z płynną pożywką MGIT wzbogaconą odpowiednim suplementem. Inkubowano do czasu uznania jej przez system za hodowlę dodatnią. Każda hodowla na pożywce płynnej, dla której wykonano test wrażliwości, była wykorzystana do tego badania w ciągu 1-5 dni od momentu uznania przez aparat za dodatnią. Jeśli użyto jej w 1 bądź 2 dniu po uzyskaniu wzrostu, traktowana była jako inoculum do dalszych badań, jeśli była użyta w 3-5 dniu po uzyskaniu wzrostu była rozcieńczana w stosunku 1:5 jałową solą fizjologiczną i dopiero wtedy stosowana jako inoculum.

Przygotowanie kontroli wzrostu szczepów badanych w aparacie Bactec MGIT 960

wymagało rozcieńczenia inoculum w stosunku 1:100. Tak rozcieńczona hodowla prątków była posiewana na jedną próbówkę MGIT bez leków (kontrola testu lekowrażliwości).

Przygotowanie i posiew pożywek z lekami w aparacie Bactec MGIT 960

Leki dodawano do pożywek w ilości 0,1 ml. Stężenia leków w pożywkach wynosiły: 1,0 µg/ml dla (SM), 0,1 µg/ml dla (INH), 1,0 µg/ml dla (RMP) oraz 5,0 µg/ml dla (EMB). Do przygotowanych probówek z lekami dodawano po 0,5 ml odpowiedniej zawiesiny badanych szczepów (zgodnie z procedurą producenta).

Kontrolę czystości hodowli sprawdzano na agarze krwawym.

Kontrolę poprawności przygotowanych pożywek jajowych prowadzono w sposób typowy ze szczepem standardowym *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇Rv.

WYNIKI

Wśród 252 wykonanych oznaczeń zgodność wyników dla wszystkich leków (SM, INH, RMP i EMB) wyniosła 94,8%

(tab. 1). Wyniki rozbieżne dotyczyły 13 oznaczeń (5,2%). Najwyższą zgodność wyników testów wrażliwości na pożywce jajowej L-J oraz w aparacie Bactec MGIT 960 uzyskano dla izoniazylu i rifampicyny – 62/63 oznaczenia (94,8%). Dla leków tych uzyskano po jednym wyniku niezgodnym: szczep oporny na RMP na pożywce jajowej oznaczony został jako wrażliwy w aparacie Bactec MGIT 960, szczep wrażliwy na INH na pożywce jajowej oznaczony został jako oporny w aparacie Bactec MGIT 960.

Zgodność wyników dla streptomycyny wyniosła 58/63 oznaczenia (92,1%), otrzymano tu pięć wyników niezgodnych; w jednym przypadku stwierdzono oporność na pożywce L-J i wrażliwość w aparacie Bactec MGIT 960, w pozostałych czterech przypadkach sytuacja była odwrotna – szczepy wykazały wrażliwość na pożywce jajowej i oporność w aparacie Bactec MGIT 960.

Najniższą zgodność wynoszącą 57/63 oznaczenia (90,5%) uzyskano dla etambutolu. W czterech przypadkach szczepy wrażliwe na pożywce jajowej uznane zostały za odporne w aparacie Bactec MGIT 960, natomiast dwa szczepy odporne na pożywce jajowej oznaczone zostały jako wrażliwe w aparacie Bactec MGIT 960.

Czułość metody Bactec MGIT 960 (zdolność do wykrycia oporności) wyniosła 100% dla INH, 94,1% dla RMP, 93,3% dla SM oraz 66,7% dla EMB.

Specyficzność metody Bactec MGIT 960 (zdolność do wykrycia wrażliwości) wyniosła 100% dla RMP, 97,7% dla INH, 93,0% dla EMB oraz 91,7% dla SM.

Wśród 63 badanych szczepów prątków gruźlicy 41 (65,1%) wykazywało pełną wrażliwość na wszystkie cztery leki. Testy wrażliwości dla tych szczepów wy-

konane obiema metodami były zgodne; czułość i specyficzność metody dla szczepów wrażliwych wyniosły 100% (tab. 2).

Średni czas oczekiwania na wyniki testów wrażliwości na pożywce jajowej L-J wynosił dla wszystkich badanych szczepów 36,67 dnia (w zakresie od 28 do 42 dni), dla szczepów wrażliwych 36,19 dnia (w zakresie 28-42 dni), dla szczepów opornych 37,55 dnia (w zakresie 28-42 dni) (tab. 3). Różnice w czasie wzrostu szczepów wrażliwych i opornych na pożywkach jajowych w testach wrażliwości nie różniły się statystycznie ($p < 0,05$).

Średni czas oczekiwania na wyniki testów wrażliwości w systemie Bactec MGIT 960 wynosił dla wszystkich badanych szczepów 8,95 dnia (w zakresie od 4,6 do 12,8 dnia), dla szczepów wrażliwych 8,32 dnia (w zakresie 4,6-12,8 dni), dla szczepów opornych 10,13 dnia (w zakresie 8,1-12,6 dnia) (tab. 3). Różnice w czasie wzrostu szczepów wrażliwych i opornych na pożywkach płynnych w testach wrażliwości w aparacie Bactec MGIT 960 nie różniły się statystycznie ($p < 0,05$).

OMÓWIENIE WYNIKÓW I DYSKUSJA

Wg zaleceń WHO testy lekowrażliwości dla prątków gruźlicy powinny być wykonywane dla: 1) wszystkich chorych nowo wykrytych, 2) chorych prątkujących nadal po 3 miesiącach leczenia, 3) chorych leczonych na gruźlicę w przeszłości.

Czas uzyskania wyniku lekowrażliwości jest niezmiernie ważny, bowiem cała diagnostyka gruźlicy w 90% przypadków (a więc hodowla, identyfikacja oraz lekowrażliwość) powinna się zakończyć po 15-30 dniach

Tabela 1. Zgodność wyników lekowrażliwości w obu systemach hodowlanych.

Lek i jego stężenie	Liczba szczepów	Wyniki zgodne w obu metodach		Wyniki rozbieżne		Zgodność %	Czułość %	Specyficzność
		Szczepy wrażliwe	Szczepy odporne	LJ – W MGIT – O	LJ – O MGIT – W			
INH 0,1 µg/ml	63	42	20	1	0	98,4	100	97,7
RMP 1,0 µg/ml	63	46	16	0	1	98,4	94,1	100
SM 1,0 µg/ml	63	44	14	4	1	92,1	93,3	91,7
EMB 5,0 µg/ml	63	53	4	4	2	90,5	66,7	93,0

Tabela 2. Zgodność wyników lekowrażliwości dla szczepów wrażliwych w obu systemach hodowlanych.

Lek i jego stężenie	Liczba szczepów	Wyniki zgodne	Wyniki niezgodne	Zgodność %	Czułość %	Specyficzność %
INH 0,1 µg/ml	41	41	0	100	100	100
RMP 1,0 µg/ml	41	41	0	100	100	100
SM 1,0 µg/ml	41	41	0	100	100	100
EMB 5,0 µg/ml	41	41	0	100	100	100

Tabela 3. Czas oczekiwania na wynik testu oporności wykonanego na pożywce L-J oraz w aparacie Bactec MGIT 960.

	Liczba szczepów	Pożywka L-J (w dniach)		Bactec MGIT 960 (w dniach)	
		średnio	zakres	średnio	zakres
Szczepy wrażliwe	41	36,19	28-42	8,32	4,6-12,8
Szczepy odporne	22	37,55	28-42	10,13	8,1-12,6
Wszystkie badane szczepy	63	36,67	28-42	8,95	4,6-12,8

od dostarczenia materiału do laboratorium. Wiąże się to z koniecznością stosowania pożywek płynnych oraz nowoczesnych metod molekularnych (38, 39). System Bactec MGIT 960 jest w wielu krajach podstawowym narzędziem pracy w laboratoriach prątków, stosowanym do hodowli prątków z materiałów klinicznych oraz określania oporności szczepów *Mycobacterium tuberculosis*. W Polsce w system ten wyposażonych jest dziewięć laboratoriów.

Znaczenie wykonania testu oporności prątków gruźlicy w leczeniu chorych na gruźlicę było przez szereg lat dyskutowane i często deprecjonowane. Historycznie, zjawisko to wynikało z przekonania, że pierwotna lekooporność *Mycobacterium tuberculosis* jest zjawiskiem rzadkim. W Hong Kongu prowadzono badania zasadności wykonywania testów lekooporności przed leczeniem (40). Mitchison (41) i Fox (42) wykazali, że brak testów oporności na INH, SM i PAS nie ma związku z błędnym wyborem leków. Analizując dalej wykazali, że w populacji, w której oporność jest rzędu 10%, brak antybiogramu może spowodować wzrost oporności do 10,6%, a jego wykonanie spadek do wartości 8,9%. Analizę tę skrytykowało Amerykańskie Towarzystwo Chorób Płuc (ATS) na konferencji w 1974 roku (43). Powtórna analiza badań prowadzonych w Hong Kongu opublikowana w dokumencie ATS 11 lat później wykazała, że jeśli respektowano test lekooporności, tylko u 10% chorych z prątkami opornymi wystąpiło niepowodzenie w leczeniu *versus* 27%, gdy wynik antybiogramu został zignorowany i leczenie nie uległo zmianie (44). W dokumencie podkreślono, że częstość niepowodzeń koreluje z liczbą leków, na które wyizolowany szczep wykazuje oporność: 18, 28 i 60%, gdy oporność występuje na jeden, dwa lub trzy leki odpowiednio.

Przydatność znajomości wzoru oporności prątków u chorych przed włączeniem leczenia dla jego powodzenia została ponownie poddana ocenie wraz z wprowadzeniem do terapii RMP i PZA (45, 46). Wydawało się, że dołączenie do poprzednio stosowanych INH i SM, nowych, silnych leków – ryfampicyny i pyrazynamidu, pozwoli wyleczyć wszystkich chorych, niezależnie od oporności prątków na INH. Do takiego podejścia upoważniała wiara w skuteczność RMP. W tamtych latach nie przewidywano wystąpienia oporności na ryfampicynę.

W 15 lat później okazało się, że pierwotna oporność na RMP nie jest zjawiskiem rzadkim, a ponadto wzrasta jednolekowa oporność prątków na RMP (23). Obecnie wiadomo, że oporność na RMP i odsetek chorych, którzy nadal prątkują po 2-miesięcznym intensywnym leczeniu czterolekowym RMP, INH, EMB i PZA, stale wzrasta (47).

Analizując rolę jaką odgrywają dwa główne leki INH i RMP w krótkotrwałej terapii gruźlicy Ellard i Mitchison stwierdzają, że „niepowodzenie leczenia występuje częściej u chorych z pierwotną INH-opornością, ale wznowy po zakończeniu leczenia nie są związane z

pierwotną INH wrażliwością” (48).

Znaczenie wykrywania jednolekowej INH-oporności prątków u chorych nowo zdiagnozowanych jest przez niektórych autorów pomniejszane, przez innych uważane jest za najważniejszy element walki z gruźlicą (49). Natomiast zasadność wykrywania pierwotnej oporności na dwa lub więcej leków, szczególnie na RMP dla powodzenia terapii jest bezsporna (46, 47, 50, 51). Wczesne wykrycie oporności typu MDR i włączenie leków wg antybiogramu zmniejsza w sposób znamieny śmiertelność zarówno u HIV negatywnych, jak i HIV pozytywnych chorych (52, 53).

We wspólnie wydanym w 1990 roku dokumencie ATS i CDC (54) stwierdzono, że w większości amerykańskich regionów, w których pierwotna lekooporność *Mycobacterium tuberculosis* występuje rzadko, wykonywanie rutynowych antybiogramów dla wszystkich szczepów izolowanych od chorych nowo wykrytych jest nieuzasadnione. Inną opinię przedstawia w swoich pracach Heifetz, który wykazał, że całkowity koszt testów lekooporności dla 20 000 nowo wykrytych chorych na gruźlicę wynosi rocznie tylko około 1 mln USD (44) i jest równy kosztom związanym z wykrywaniem i leczeniem zaledwie 10 chorych z prątkami MDR.

Obecnie w USA standardowym, obowiązującym postępowaniem jest wykonywanie testów lekowrażliwości dla szczepów *M. tuberculosis* wyizolowanych od wszystkich chorych nowo zdiagnozowanych (55).

W diagnostyce mikrobiologicznej gruźlicy bardzo istotna jest wiarygodność otrzymanych wyników oraz czas oczekiwania na ostateczny wynik (39). W przeprowadzonych badaniach wyniki testów oporności szczepów prątków gruźlicy w systemie Bactec MGIT 960 porównano z wynikami oznaczania oporności metodą rutynowo stosowaną w polskich Laboratoriach Prątków, tj. metodą określania oporności prątków gruźlicy na pożywce jajowej Löewensteina – Jensena.

Uzyskane wyniki pozwalają na stwierdzenie, że wyniki lekooporności w systemie Bactec MGIT 960 są dostępne dla lekarzy klinicystów dużo wcześniej niż oznaczane na pożywce jajowej niezależnie od tego, czy badane szczepy są wrażliwe, czy odporne na leki. Czas oczekiwania na wynik lekowrażliwości na pożywkach płynnych wynosił od 4,6 do 12,8 dnia (średnio 8,95 dnia), co przy 28-42 dniach (średnio 36,67 dnia) potrzebnych do uzyskania wyniku oporności oznaczonego na pożywce L-J jest różnicą znamieną statystycznie ($p < 0,001$). Podobne wyniki czasu trwania testu wrażliwości w aparacie Bactec MGIT 960 podają inni autorzy (56, 57, 58), a wg niektórych czas ten jest jeszcze krótszy (59, 60, 61, 62, 63, 64).

Czas oczekiwania na wynik testu wrażliwości w dobie coraz powszechniejszego występowania i rozprzestrzeniania się szczepów opornych, w tym również o oporności typu MDR, na świecie (65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72) ma niebagatelne znaczenie. I choć w Polsce występowanie szczepów o oporności typu MDR od ponad 10 lat utrzymuje się na podobnym pozio-

mie (73, 74), należy się liczyć ze wzrostem ich liczby choćby ze względu na migracje ludności oraz bliskie sąsiedztwo z krajami o jednym z najwyższych wskaźników występowania szczepów tego rodzaju (Rosja, kraje byłego Związku Radzieckiego) (75, 76, 77, 78).

Szczepy wrażliwe wykazały 100% zgodność testów lekooporności dla wszystkich czterech podstawowych leków przeciwprątkowych. Wśród wszystkich badanych szczepów zgodność wyników wyniosła 98,4% dla INH i RMP, 92,1% dla SM oraz 90,5% dla EMB.

Brak pełnej korelacji wyników uzyskiwanych przy określaniu oporności prątków różnymi metodami obserwują także inni autorzy (56, 59, 60). Zwracają oni uwagę na fakt, że oporność na EMB w stężeniu 5,0 µg/ml w systemie Bactec MGIT 960 nie znajduje potwierdzenia w wynikach molekularnych testów oporności (56).

Wyniki uzyskane w tej pracy są zgodne z wynikami przedstawianymi w pracach innych autorów, którzy stwierdzają, że określanie oporności na SM i EMB stwarza wiele problemów i wymaga szczególnej ostrożności (57, 59, 63). Niezgodności uzyskiwanych wyników przypisywane są przede wszystkim heterogenności szczepów prątków gruźlicy, która najmocniej zaznacza się w odniesieniu do EMB (59, 79, 80).

Zjawisko heterogenności prątków polega na występowaniu w obrębie jednego szczepu osobników opornych i wrażliwych na określony lek. W zależności od tego, jak duża pula komórek opornych zostanie użyta w badaniu oporności, lek zahamuje lub nie wzrost bakterii na pożywce z lekiem. Otrzymane wyniki mogą być różne nawet wtedy, gdy badanie zostanie wykonane dla tego samego szczepu kilkakrotnie w tym samym lub jednocześnie w różnych laboratoriach (80).

Pewne wątpliwości mogą budzić wyniki uzyskane w niniejszej pracy dotyczące wiarygodności testów lekooporności na RMP w systemie Bactec MGIT 960. Szczep określony metodą konwencjonalną na pożywce L-J jako oporny w systemie Bactec MGIT 960 został uznany za wrażliwy. Otrzymanie w tym przypadku przez lekarza wyniku „wrażliwy” powoduje stosowanie w terapii leku nieaktywnego wobec badanego szczepu prątków. Z podobnym problemem spotkali się Ådjers-Koskela i wsp. (59) oraz Giampaglia i wsp. (80). Autorzy innych publikacji donoszą o 100% czułości aparatu Bactec MGIT 960 w wykrywaniu oporności na RMP (56, 58, 60, 63, 64).

Wyniki uzyskane dla INH są porównywalne z wynikami innych autorów (56, 58, 59, 63, 64, 80).

Mimo nieznacznych rozbieżności wyników uzyskiwanych dla dwóch najważniejszych leków przeciwprątkowych (INH i RMP) wszyscy autorzy zgodnie stwier-

dzają, że aparat Bactec MGIT 960 jest bardzo dobrym narzędziem pracy mikrobiologa, pozwalającym szybko określić, czy badany szczep prezentuje fenotyp MDR, czy też wykazuje pełną wrażliwość na leki przeciwprątkowe.

Aparat Bactec MGIT 960 daje również możliwość oznaczania oporności na pyrazynamid (PZA), lek stosowany w początkowej fazie leczenia gruźlicy, dla którego w chwili obecnej nie ma opracowanej metody oznaczania oporności na pożywkach stałych. Pierwszą analizę oporności na PZA w Polsce przeprowadziła Napiórkowska i wsp. (81). Stwierdziła ona, że odsetek szczepów pierwotnie opornych na PZA u chorych nowo wykrytych wydalających prątki wrażliwe na inne leki jest bardzo wysoki i wynosi 20,8%.

Biorąc pod uwagę wyniki tych badań celowym działaniem wydaje się włączenie oznaczania oporności na PZA do rutynowej diagnostyki gruźlicy i obowiązkowe jej wykonywanie wraz z oznaczaniem oporności na pozostałe podstawowe leki przeciwprątkowe.

Aparat Bactec MGIT 960 może pracować jako instrument niezależny lub współpracować z komputerowym oprogramowaniem EpiCenter z modułem TB-eXiST. Oprogramowanie daje możliwość analizowania tempa wzrostu badanego szczepu na pożywkach zawierających leki i wyznaczania wartości MIC. Określenie MIC jest niezmiernie istotne w przypadku szczepów o oporności typu XDR oraz TDR. Oporność na stężenia krytyczne stosowane rutynowo przy oznaczaniu oporności w aparacie Bactec MGIT 960 nie zawsze daje kliniczną oporność na lek i konieczność wykluczenia go z terapii. W przypadku określenia MIC i stwierdzenia heterogennego typu oporności badanego szczepu istnieje szansa na kontynuację leczenia lekiem o najniższym poziomie oporności (79).

WNIOSKI

1. Automatyczny aparat Bactec MGIT 960 pozwala na szybkie i wiarygodne uzyskanie wyniku lekowrażliwości *Mycobacterium tuberculosis*.
2. Korelacja wyników lekowrażliwości uzyskanych w aparacie Bactec MGIT 960 i na pożywce L-J była zadowalająca i wynosiła 98,4% dla dwóch najważniejszych leków przeciwprątkowych – RMP i INH.
3. Należy dążyć do szerszego wprowadzenia testów lekooporności na pożywkach płynnych do rutynowej diagnostyki w Laboratoriach Prętka w Polsce. Pozwoli to na skrócenie czasu oczekiwania na wynik i szybsze włączenie prawidłowego leczenia, szczególnie w przypadkach gruźlicy wywołanej prątkami opornymi na leki.

PIŚMIENNICTWO

1. Neu HC: The crisis in antibiotic resistance. *Science* 1992; 257, 1064-1073.
2. Canetti G: Presents aspects of bacterial resistance in tuberculosis. *Am Rev Respir Dis* 1965; 92, 687-703.
3. Crofton J, Mitchison DA: Streptomycin resistance in pulmonary tuberculosis. *Br Med J* 1948; 2, 1009-1015.
4. Hong Kong Government Tuberculosis Service/British Medical Research Council. Drug-resistance in patients with pulmonary

- tuberculosis presenting at chest clinics in Hong Kong. *Tubercle* 1964; 45: 77-95.
5. Public Health Service Cooperation Investigation. Prevalence of drug resistance in previously untreated patients. *Am Rev Respir Dis* 1964; 89: 327-336.
 6. Centers for Disease Control. Nosocomial transmission of multi-drug-resistant tuberculosis among HIV-infected persons – Florida and New York, 1988-1991. *MMWR* 1991; 40: 585-591.
 7. Coronado VG, Beck-Sangue CM, Hutton MD et al.: Transmission of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* among persons with human immunodeficiency virus infection in an urban hospital: epidemiologic and restriction fragment length polymorphism analysis. *J Infect Dis* 1993; 168: 1052-1055.
 8. Monno L, Angarano G, Carbonara S et al.: Emergence of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in HIV-infected patients. *Lancet* 1991; 337: 852
 9. Small PM, Shafer RW, Hopewell PC et al.: Exogenous reinfection with multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in patients with advanced HIV infection. *N Engl J Med* 1993; 328: 1137-1144.
 10. Borgdorff MW, Nagelkerke NJ, van Soolingen D et al.: Analysis of tuberculosis transmission between nationalities in the Netherlands in the period 1993-1995 using DNA fingerprinting. *Am J Epidemiol* 1998; 147: 187-195.
 11. Centers for Disease Control. Nosocomial transmission of multi-resistant tuberculosis to health-care workers and HIV-infected patients in a urban hospital – Florida. *MMWR* 1990; 39: 718-722.
 12. Centers for Disease Control. Transmission of multi-resistant tuberculosis from an HIV-positive client in a residential substance-abuse treatment facility – Michigan. *MMWR* 1991; 40: 129-131.
 13. Coninx D, Mathieu C, Debacker M et al.: First-line tuberculosis therapy and drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in prisons. *Lancet* 1999; 353: 969-973.
 14. Dooley SW, Villarino ME, Lawrence M et al.: Nosocomial transmission of tuberculosis in a hospital unit for HIV-infected patients. *JAMA* 1992; 267: 2632-2634.
 15. Ritacco V, Di Lonardo M, Reniero A et al.: Nosocomial spread of human immunodeficiency virus-related multidrug-resistant tuberculosis in Buenos Aires. *J Infect Dis* 1997; 176: 637-642.
 16. Di Perri G, Cruciani M, Danzi MC et al.: Nosocomial epidemic of active tuberculosis among HIV-infected patients. *Lancet* 1989; 2: 1502-1504.
 17. Raviglione MC, Rieder HL, Styblo K et al.: Tuberculosis trends in Eastern Europe and the former USSR. *Tubercle Lung Dis* 1994; 75: 400-416.
 18. WHO. GLC Annual Report 2009. Geneva, Switzerland 2010. Document WHO/HTM/TB/2010.7.
 19. Alland D, Kalkut GE, Moss AR et al.: Transmission of tuberculosis in New York City: an analysis by DNA fingerprinting and conventional epidemiologic methods. *N Engl J Med* 1994; 330: 1710-1716.
 20. Anti-tuberculosis drug resistance in the world. Report No. 2. Prevalence and trends. The WHO/IUATLD Global Project on Anti-tuberculosis Drug Resistance Surveillance. Geneva 2000, WHO/CDS/TB/2000/278.
 21. Edlin BR, Tokars JI, Grieco MH et al.: An outbreak of multidrug-resistant tuberculosis among hospitalized patients with the acquired immunodeficiency syndrome. *N Engl J Med* 1992; 326: 1514-1521.
 22. Long R, Nibert E, Chomyc S et al.: Transcontinental spread of multidrug-resistant *Mycobacterium bovis*. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 159: 2014-2017.
 23. Ridzon R, Whitney CG, McKenna MT et al.: Risk factors for rifampin mono-resistant. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157: 1881-1884.
 24. Fox W: Compliance of patients and physicians: experience and lessons from tuberculosis. *BMJ* 1983; 287: 33-35.
 25. Ruber AJ, Garro LC: Social and cultural factors in the successful control of tuberculosis. *Public Health Rep* 1992; 107: 626-636.
 26. Sumartojo E: When tuberculosis treatment fails: a social behavioral account of patients adherence. *Am Rev Respir Dis* 1993; 147: 1311.
 27. Laserson KF, Kenyon AS, Kenyon TA et al.: Substandard tuberculosis drugs on the global market and their simple detection. *Int J Tuberc Lung Dis* 2001; 5: 448-454.
 28. Telenti A: Genetics and pulmonary medicine. 5. Genetics of drug resistant tuberculosis. *Thorax* 1998; 53: 793-797.
 29. Espinal MA, Kim SJ, Suarez PG et al.: Standard short-course chemotherapy for drug resistant tuberculosis; treatment outcomes in 6 countries. *JAMA* 2000; 283: 2537-2545.
 30. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Emergence of *Mycobacterium tuberculosis* with extensive resistance to second-line drugs – worldwide, 2000-2004. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2006; 55: 301-305.
 31. Valayati A, Masjedi M: Emergence of new forms of totally drug-resistant tuberculosis bacilli. *Chest* 2009; 136: 420-5.
 32. Iseman MD, Madsen LA: Drug-resistant tuberculosis. *Clin Chest Med* 1989; 10: 341-353.
 33. Zwolska Z, Augustynowicz-Kopeć E: Aktualna sytuacja epidemiologiczna gruźlicy i nowe zagrożenia dla świata. Postępy w medycynie zakażeń. [W:] Hryniewicz (red), Warszawa 2006; 71-79. 1989; 10, 341-353.
 34. Klatt M: Częstość występowania gruźlicy z prątkami lekoopornymi w Polsce oraz ocena wiarygodności rutynowych testów lekooporności. Praca doktorska IGICHP, Warszawa 2003.
 35. Laszlo A, Rahman M, Raviglione M et al.: Quality assurance programme for drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* in the WHO/IUATLD supranational laboratory network: first round of proficiency testing. *Int J Tuberc Lung Dis* 1997; 1 (3): 231-238.
 36. Anti-tuberculosis drug resistance in the World. Raport no. 4. The WHO/IUATLD on Anti-tuberculosis drug resistance surveillance. WHO/HTM/TB/2008.394
 37. Janowiec M: Mikrobiologia gruźlicy. PZWL, Warszawa 1977.
 38. Tenover FC, Crawford JT, Huebner RE et al.: The Resurgence of Tuberculosis: Is Your Laboratory Ready? *J Clin Microbiol* 1993; 31, 4: 767-770.
 39. Drobniewski FA, Hoffner S, Rüsche-Gerdes S, Skenders G, Thomsen V and the WHO European Laboratory Strengthening Task Force: Recommended standards for modern tuberculosis laboratory services in Europe. *Eur Respir J* 2006; 28: 903-909.
 40. Hong Kong Tuberculosis Treatment Services and British Medical Research Council Investigation. A study in Hong Kong to evaluate the role of pretreatment susceptibility tests in the selection of regimens of chemotherapy for pulmonary tuberculosis. *Am Rev Respir Dis* 1972; 106: 1-22.
 41. Mitchison DA: Implications of the Hong Kong study on policies of sensitivity testing. *Bull Int Union Tuberc* 1972; 47: 9-14.
 42. Fox W: General considerations in the choice and management of regions of chemotherapy for pulmonary tuberculosis. *Bull Int Union Tuberc* 1972; 47: 49-67.
 43. Gangadharam PR: Drug resistance in mycobacteria. CRC Press, Boca Raton, FL USA 1984; 119.
 44. Heifets LB, Cangelosi GA: Drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*: a neglected problem at the turn of the century. *Int J Tuberc Lung Dis* 1999; 3: 564-581.
 45. Coates AR, Mitchison DA: The role of sensitivity tests in short course chemotherapy. *Bull Int Union Tuberc* 1983; 58: 111-114.
 46. Mitchison DA, Nunn AJ: Influence of initial drug resistance on the response to short-course chemotherapy of pulmonary tuberculosis. *Am Rev Respir Dis* 1986; 133: 423-430.
 47. Farmer P, Bayona J, Becerra M et al.: The dilemma of MDR-TB in the global era. *Int J Tuberc Lung Dis* 1998; 2: 869-876.
 48. Ellard GA, Mitchison DA: The differing roles of isoniazid and rifampicin in short-course treatment. *Int J Tuberc Lung Dis* 1998; 2 (suppl 2): S177.
 49. Weyer K, Kleeberg HH: Primary and acquired drug resistance in adult black patients with tuberculosis in South Africa: results of a continuous national drug resistance surveillance programme involvement. *Tubercle Lung Dis* 1992; 73: 106-112.
 50. Heymann SJ, Brewer TF, Wilson ME, Fineberg HV: The need for global action against multidrug-resistant tuberculosis. *JAMA* 1999; 281: 2138-2140
 51. Manalo F, Tan F, Sharbaro JA, Iseman MD: Community based short-course treatment of pulmonary tuberculosis in a developing nation. Initial report of an eight-month, largely intermittent regimen in a population with a high prevalence of drug resistance. *Am Rev Respir Dis* 1990; 146: 1301-1305.

52. Drobniowski FA: Is death inevitable with multiresistant TB plus HIV infection? *Lancet* 1997; 349: 71-72.
53. Turett GS, Telzak EE, Torian LV et al.: Improved outcomes for patients with multidrug – resistant tuberculosis. *Clin Infect Dis* 1995; 21: 1238-1244.
54. American Thoracic Society. Diagnostic standards and classification of tuberculosis. *Am Rev Respir Dis* 1990; 142 (suppl), 725-735.
55. Centers for Disease Control and Prevention. Initial therapy for tuberculosis in the era of multidrug resistance – recommendations of the Advisory Council for the elimination of tuberculosis. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 1993; 42: 1-8.
56. Ardito F, Posteraro B, Sanguinetti M et al.: Evaluation of BACTEC Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT 960) Automated System for Drug Susceptibility Testing of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 2001; 39, 12: 4440-4444.
57. Balabanova Y, Drobniowski F, Nikolayevskyy V et al.: An Integrated Approach to rapid Diagnosis of Tuberculosis and Multidrug Resistance Using Liquid Culture and Molecular Methods In Russia. *PLoS ONE* 2009; 4, 9: e7129.
58. Tortoli E, Benedetti M, Fontanelli A, Simonetti MT: Evaluation of Automated BACTEC MGIT 960 System for Testing Susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to Four Major Antituberculosis Drugs: Comparison with the Radiometric BACTEC 460TB and the Agar Plate Method of Proportion. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 2, 607-610.
59. Adjers-Koskela K, Katila M-L: Susceptibility Testing with the Manual Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT) and the MGIT 960 System Provides rapid and Reliable Verification of Multidrug-Resistant Tuberculosis. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 3: 1235-1239.
60. Bemer P, Palicova F, Rüscher-Gerdes S et al.: Multicenter Evaluation of Fully Automated BACTEC Mycobacteria Growth Indicator Tube 960 System for Susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 2002, 40, 1: 150-157.
61. Palaci 1996, Tortoli E, Benedetti M, Fontanelli A, Simonetti MT: Evaluation of Automated BACTEC MGIT 960 System for Testing Susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to Four Major Antituberculosis Drugs: Comparison with the Radiometric BACTEC 460TB Method and the Agar Plate Method of Proportion. *J Clin Microbiol* 2002; 40, 2: 607-610.
62. Ardito F, Sanguinetti M, Sechi LA et al.: Comparison of the mycobacteria growth indicator tube with radiometric and solid culture for isolation of mycobacteria from clinical specimens and susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. *New Microbiol* 2000; 23, 2: 151-158.
63. Johansen IS, Thomsen VO, Marjamäki M et al.: Rapid, automated, nonradiometric susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* complex to four first-line antituberculous drugs used in standard short-course chemotherapy. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2004; 50: 103-107.
64. Kontos F, Maniati M, Costopoulos C et al.: Evaluation of the fully automated Bactec MGIT 960 system for the susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* to first-line drugs: a multicenter study. *J Microbiol Methods* 2004; 56: 291-294.
65. WHO/IUATLD global project on anti-tuberculosis drug resistance surveillance. Anti-tuberculosis drug resistance in the world. Report no: WHO/HTM/TB/2008.394. Geneva, Switzerland. WHO 2008.
66. WHO. Multidrug and extensively drug-resistant tuberculosis: 2010 global report on surveillance and response. Geneva, Switzerland. WHO 2010.
67. Gandhi NE, Nunn P, Dheda K et al.: Multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis: a threat to global control of tuberculosis. *Lancet* 2010; 375: 1830-1843.
68. Hannan MM, Peres H, Maltez F et al.: Investigation and control of a large outbreak of multi-drug resistant tuberculosis at a central Lisbon hospital. *J Hospit Infect* 2001; 47: 91-97.
69. Xiao-yan Y, You-ping L, You-wen M et al.: Time and spatial distribution of multidrug-resistant tuberculosis among Chinese people, 1981-2006: a systematic review. *Int J Infect Dis* 2010; 14: e828-e837.
70. Rumina H, Kauser J, Vikram M et al.: Trends in *Mycobacterium tuberculosis* resistance, Pakistan, 1990-2007. *Int J Infect Dis* 2009; 13: e377-e382.
71. Shamaei M, Marjani M, Chitsaz E et al.: First-line anti-tuberculosis drug resistance patterns and trends at the national TB referral center in Iran-eight years of surveillance. *Int J Infect Dis* 2009; 13, 5: e236-e240.
72. Van der Spoel van Dijk A, Makhoahle P, le Roux K: Sudden Increase in Multidrug Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Strains Investigated in South-Eastern Free State, South Africa. *Int J Infect Dis* 2008; 12, supplement 1, e345.
73. Augustynowicz-Kopeć E, Zwolska Z, Jaworski A et al.: Drug resistant tuberculosis in Poland in 2000: second national survey and comparison with the 1997 survey. *Int J Tuberc Lung Dis* 2003; 7: 645-651.
74. Augustynowicz-Kopeć E, Zwolska Z: Gruźlica wywołana prątkami o oporności XDR w Polsce. Badania mikrobiologiczne i molekularne. *Pneumonol Alergol Pol* 2007; 75: 32-39.
75. WHO, The Global Plan to Stop TB 2011-2015.
76. Mdivani N, Zangaladze E, Volkova N et al.: High prevalence of multidrug-resistant tuberculosis in Georgia. *Int J Infect Dis* 2008; 12: 635-644.
77. Pardini M, Niemann S, Varaine F et al.: Characteristics of drug-resistant tuberculosis in Abkhazia (Georgia), a high-prevalence area in Eastern Europe. *Tuberc* 2009; 89: 317-324.
78. Zwolska Z: Epidemiological situation in tuberculosis in post-Soviet countries. New risk and solutions. *Int J Infect Contr* 2009; 5, 3, 73: p. 41.
79. Springer B, Lucke K, Calligaris-Maibach R et al.: Quantitative Drug Susceptibility Testing of *Mycobacterium tuberculosis* by Use of MGIT 960 and EpiCenter Instrumentation. *J Clin Microbiol* 2009; 47, 6: 1773-1780.
80. Giampaglia CMS, Martins MC, de Oliveira Vieira GB et al.: Multi-center evaluation of an automated BACTEC 960 system for susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. *Int J Tuberc Lung Dis* 2007; 11, 9: 986-991.
81. Napiórkowska A, Augustynowicz-Kopeć E, Zwolska Z: Fenotyp oporności prątków gruźlicy na pirazyamid (PZA) w badaniach ogólnopolskich. *Pneumonol Alergol Pol* 2010; 78, 4: 256-262.

otrzymano/received: 18.08.2011
 zaakceptowano/accepted: 14.09.2011

Adres/address:
 *Magdalena Klatt
 Zakład Mikrobiologii IGiChP
 ul. Płocka 26, 01-138 Warszawa
 tel./fax: (22) 431-21-82
 e-mail: m.klatt@igichp.edu.pl