

*Agnieszka Napiórkowska, Zofia Zwolska, Ewa Augustynowicz-Kopec

Oporność na pirazynamid (PZA) wśród prątków gruźlicy wyizolowanych od chorych z województwa mazowieckiego w latach 2008-2010¹⁾

Resistance to pyrazinamide among *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated from patients from the Mazovian Voivodeship in 2008-2010 years

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

Streszczenie

Wstęp. Właściwości przeciwpłatkowe pirazynamidu poznano już ponad 50 lat temu i od tego czasu lek ten stosowany jest w leczeniu gruźlicy jako jeden z najważniejszych obok RMP, INH, EMB i SM. Pomimo że PZA zajmuje tak ważne miejsce w leczeniu gruźlicy, WHO do tej pory nie zalecało zbierania danych o częstości występowania oporności na PZA wśród szczepów *Mycobacterium tuberculosis* oraz nie rekomendowało oznaczenia lekooporności na ten lek. Wynika to głównie z trudności w wykonaniu testu lekooporności na PZA. Nie wiadomo więc, jak szeroko rozpowszechniona jest na świecie oporność na PZA.

Cel pracy. Celem naszej pracy była analiza oporności na PZA szczepów *Mycobacterium tuberculosis* wyizolowanych od chorych z województwa mazowieckiego w latach 2008-2010.

Materiał i metody. Analizie poddano szczepy *M. tuberculosis* o różnym fenotypie oporności na 4 podstawowe leki wyizolowane od 462 chorych. Fenotyp oporności na PZA określono metodą radiometryczną Bactec 460-TB. Szczepom opornym na PZA określono MIC dla stężeń PZA: 100, 300, 600, 900 µg/ml.

Wyniki. W grupie chorych nowo wykrytych 5,9% chorych wydalalo szczepy odporne na PZA. W grupie chorych wcześniej leczonych szczepy odporne na PZA wydalalo 14% chorych. W obu grupach chorych oporność na PZA była połączona z opornością na 4 leki INH+RMP+SM+EMB (14% u chorych nowo wykrytych i u 25% chorych wcześniej leczonych). Szczepy odporne wyłącznie na PZA występowały u 50% chorych nowo wykrytych. Dla 23,5% szczepów wartość MIC PZA wynosiła > 100 µg/ml, dla 17,6% ≥ 300 µg/ml, dla 14,7% ≥ 600 µg/ml i aż dla 44,1% ≥ 900 µg/ml.

Wnioski. Wśród szczepów *M. tuberculosis* stwierdzono wysokie odsetki oporności na PZA (5,9% u chorych nowo wykrytych, 14% u chorych wcześniej leczonych).

Większość szczepów opornych na PZA (44,1%) posiadała wysokie miano oporności – MIC PZA ≥ 900 µg/ml.

Słowa kluczowe: pirazynamid, lekooporność, *M. tuberculosis*, gruźlica

Summary

Introduction. The anti-tuberculous properties of pyrazinamide (PZA) were identified over 50 years ago, and since that time it has been one of the most important drugs used for the treatment of tuberculosis, in addition RMP, INH, EMB i SM. Although PZA plays such an important role in the treatment of tuberculosis, the World Health Organisation (WHO) has not issued a recommendation to collect data on the prevalence of PZA resistance among *Mycobacterium tuberculosis* strains or to perform susceptibility testing for this drug. This mainly results from the difficulty of the PZA susceptibility test. It is therefore unknown how prevalent PZA resistance is worldwide.

The aim of study. The aim of our study was to estimate the resistibility for PZA among *M. tuberculosis* isolates from patients from the Mazovian Voivodeship in 2008-2010 years.

Material and methods. We analysed *M. tuberculosis* strains with different resistibility to first-line antituberculous drugs. The strains were isolated from 462 patients with tuberculosis. The strains were examined for PZA resistibility by the radiometric Bactec 460-TB method. The PZA-resistant strains were examined for the following MIC PZA for drug concentration: 100, 300, 600, 900 µg/ml.

¹⁾ Praca finansowana ze środków przeznaczonych na działalność statutową Instytutu Gruźlicy i Chorób Płuc w ramach planu naukowego – temat nr 1 zadania badawczego nr 22.

Results. PZA resistance among *M. tuberculosis* strains was found in 5,9% untreated patients and in 14% previously treated patients. In both groups resistance to PZA was correlated with drug resistance for INH+RMP+SM+EMB in 14% untreated patients and in 25% previously treated ones. The PZA-monoresistant strains were observed in 50% untreated patients groups.

Among resistant strains for 23,5% strains MIC for PZA was $> 100 \mu\text{g/ml}$, for 17,6% MIC for PZA $\geq 300 \mu\text{g/ml}$ 14,7% $\geq 600 \mu\text{g/ml}$ and 44,1% $\geq 900 \mu\text{g/ml}$.

Conclusions. Among *M. tuberculosis* strains PZA resistance was found in 5,9% untreated patients and in 14% previously treated patients.

Among the PZA-resistant strains very high MIC value for PZA ($\geq 900 \mu\text{g/ml}$) was revealed for 44% *M. tuberculosis* strains.

Key words: pyrazinamide, drug resistance, *M. tuberculosis*, tuberculosis

WSTĘP

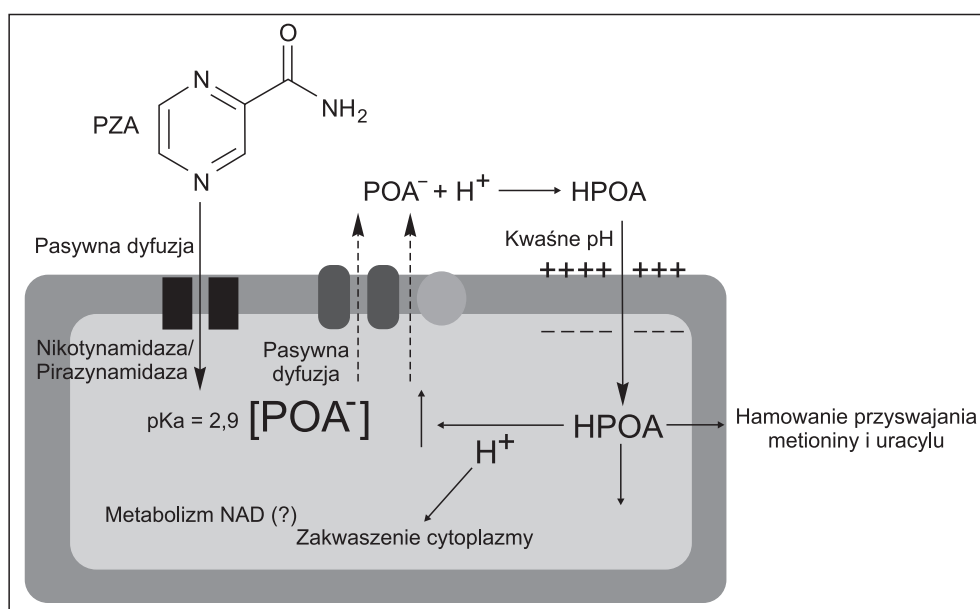
Pirazynamid (PZA) należy do grupy leków przeciwprątkowych tzw. pierwszej linii, razem z izoniazidem (INH), rifampicyną (RMP), streptomycyną (SM) i etambutolem (EMB) stosowany jest w rekomendowanym przez WHO schemacie leczenia przeciwprątkowego. Lek ten odgrywa kluczową rolę w pierwszej fazie antybiotykoterapii, działa silnie wewnątrzkomórkowo, gdzie przeżywają prątki gruźlicy (1).

Pomimo że PZA zajmuje tak ważne miejsce w leczeniu gruźlicy, WHO jak do tej pory nie zalecało zbierania danych o częstości występowania oporności na PZA wśród szczepów *Mycobacterium tuberculosis* oraz nie rekomendowało oznaczenia lekooporności na ten lek. Nie wiadomo więc, jak szeroko rozpowszechniona jest na świecie oporność *Mycobacterium tuberculosis* na PZA (2).

Pirazynamid jest lekiem, który swoją aktywność przeciwprątkową wykazuje jedynie w środowisku kwaśnym (pH 5,0-5,5), dlatego działa silnie wewnątrz makrofażów oraz w masach martwiczych. Strukturalnie PZA jest analogiem nikotynamidu i jest aktywowany przez enzym pirazynamidazę, wytwarzaną przez komórki prątków, który deaminuje lek do kwasu pirazynowego (POA). Szczepy odporne *M. tuberculosis* i naturalnie odporne *M. bovis* i *M. bovis* BCG nie posiadają enzymu deaminującego lek.

Mechanizm działania pirazynamidu jest najmniej poznany ze wszystkich stosowanych leków przeciwprątkowych. Pirazynamid do komórki bakteryjnej przenika głównie na drodze pasywnej dyfuzji, choć podejrzewa się, że pewną rolę odgrywa tu również aktywny transport leku przez pompę sodowo-potasową.

We wnętrzu komórki pirazynamid, pod wpływem enzymu ulega przekształceniu do anionu kwasu pirazynowego (POA⁻). Na drodze pasywnej dyfuzji POA⁻ zostaje usunięty z komórki *M. tuberculosis*, a następnie w kwaśnym środowisku jam gruźliczych zostaje zobojętniony przez jony wodorowe (H⁺). Jako elektrycznie obojętna cząsteczka – kwas pirazynowy (HPOA) wnika z powrotem do komórki bakteryjnej, gdzie odłączają się od niego jony wodorowe i obniżają pH cytoplazmy, co inaktywuje wiele kluczowych enzymów dla procesów metabolicznych prątków gruźlicy oraz najprawdopodobniej hamuje wbudowywanie metioniny w procesie syntezy białek oraz uracylu do RNA. Wzrost stężenia jonów wodorowych wewnątrz komórki wpływa również negatywnie na potencjał błony komórkowej oraz uszkodza kanały jonowe, a tym samym zakłóca jej normalne funkcjonowanie. Nie stwierdzono, aby pirazynamid wiązał się z jakimkolwiek składnikiem ściany komórkowej prątków (badania *in vitro*) (3, 4, 5, 6) (ryc. 1).



Ryc. 1. Mechanizm działania pirazynamidu (Zhang Y. i wsp., J Med Microbiol 2002).

Pierwsza teoria dotycząca mechanizmu działania pirazynamidu zakładała, że związek ten jest inhibitorem syntazy kwasów tłuszczowych I (Fas-I, *fatty acid synthase-I*). Badania laboratoryjne podają tę teorię w wątpliwość, ze względu na fakt, że nie wyizolowano, jak dotąd, szczepów bakterii opornych na pirazynamid, które posiadałyby mutacje w Fas-I (3).

CEL PRACY

Celem pracy była analiza częstości występowania oporności na pirazynamid wśród szczepów *M. tuberculosis* wyizolowanych od chorych z województwa mazowieckiego.

MATERIAŁ I METODY

Analizie poddano szczepy prątków gruźlicy wyizolowane w latach 2008-2010 od 462 chorych z województwa mazowieckiego.

W badanej grupie chorych było 360 (77,9%) mężczyzn w wieku od 10 do 97 lat oraz 102 (22,1%) kobiety w wieku od 14 do 88 lat. Chorych nowo wykrytych było 376 (81,4%), a wcześniej leczonych – 86 (18,6%).

Wszystkie szczepy były wyhodowane według standardowych metod, miały wykonaną identyfikację gatunkową z zastosowaniem testu niacynowego oraz metodą spoligotyping (7). Wszystkie analizowane szczepy należały do gatunku *Mycobacterium tuberculosis*, nie stwierdzono ani jednego szczepu należącego do gatunku *M. bovis* lub *M. bovis* BCG.

Lekooporność szczepów na cztery podstawowe leki oznaczano metodą klasyczną na pożywce Löwensteina-Jensena.

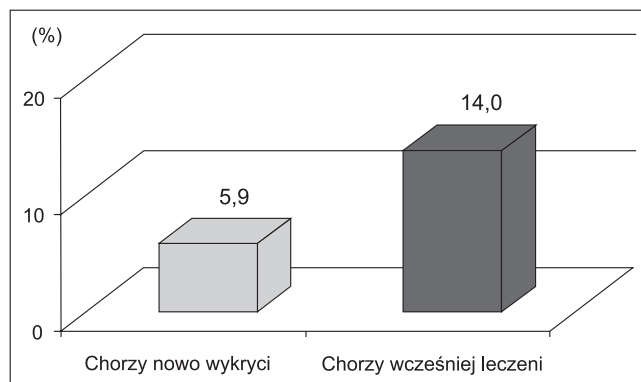
Fenotyp oporności na PZA określano metodą radiometryczną Bactec 460-Tb. W systemie Bactec 460-Tb oporność na PZA wykonuje się z zastosowaniem płynnej pożywki Middlebrooka 7H12 o pH w zakresie 5,9-6,0 zawierającej kwas palmitynowy znakowany ^{14}C . Rosnące prątki metabolizują zawarty w pożywce substrat do $^{14}\text{CO}_2$. Ilość produkowanego $^{14}\text{CO}_2$ jest wprost proporcjonalna do intensywności wzrostu prątków w pożywce. Dodanie PZA w stężeniu 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ do pożywki powoduje zahamowanie wzrostu *M. tuberculosis*. Znajduje to odzwierciedlenie w spadku ilości $^{14}\text{CO}_2$ w stosunku do kontroli, w której ilość $^{14}\text{CO}_2$ oraz indeks wzrostu systematycznie rośnie. W przypadku szczepów opornych obserwuje się nieznaczną różnicę lub całkowity jej brak w indeksie wzrostu pomiędzy kontrolą, a badanym szczepem.

Wartości MIC PZA wyznaczano również w systemie Bactec 460TB dla następujących stężeń leku 100, 300, 600 i 900 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

WYNIKI

W grupie 462 chorych z województwa mazowieckiego, od których wyizolowano prątki gruźlicy u 34 (7,4%) stwierdzono szczepy oporne na PZA. W grupie chorych nowo wykrytych szczepy oporne na PZA wyizolowano od 22 chorych (5,8%), a w grupie wcześniej leczonych od 12 (14%) (ryc. 2) Dalsza anali-

za badań dotyczyła oporności szczepów *M. tuberculosis* na inne leki podstawowe, z którymi skojarzona była oporność na PZA.



Ryc. 2. Oporność na PZA wśród szczepów *Mycobacterium tuberculosis* izolowanych od chorych na gruźlicę pochodzących z województwa mazowieckiego.

Analiza oporności na PZA w grupie chorych nowo wykrytych

W grupie 22 chorych nowo wykrytych wydających prątki oporne na PZA u 11 (50%) nie stwierdzono oporności na 4 inne leki przeciwprątkowe. U pozostałych chorych oporność na PZA towarzyszyła oporności na SM+INH+RMP+EMB, SM+INH+RMP, INH+RMP – 3 chorych (13,6%) oraz oporności na SM – 2 chorych (5,9%). W analizowanej grupie było 3 chorych z opornością typu pre-XDR (*pre-extensively drug-resistant*) na SM+INH+RMP oraz ofloksacynę (OFL) (tab. 1).

Tabela 1. Częstość występowania oporności na PZA wśród szczepów *Mycobacterium tuberculosis* w zależności od wzoru oporności na leki przeciwprątkowe. S – streptomycyna, I – izoniazyd, R – ryfampincyna, E – etambutol, O – ofloksacyna, A – amikacyna, C – kapreomycyna.

Wzór oporności	Liczba szczepów opornych na PZA	
	Chorzy nowo wykryci	Chorzy wcześniej leczeni
SIRE	3 (14%)	3 (25%)***
SIR	3 (14%)*	3 (25%)**
IRE	0	2 (16,7%)
IR	3 (14%)	2 (16,7%)
Wrażliwy	11 (50%)	2 (16,7%)
Inne	2 (9%)	0
Razem	22 (100%)	11 (100%)

*w tym 1 chory z opornością typu pre XDR SIR+O

**3 chorych z opornością typu pre-XDR SIR+O

***w tym 1 chory z opornością typu pre-XDR SIR+O, 1 chory z oporności atypu XDR SIRE+CAO

Analiza oporności na PZA w grupie chorych wcześniej leczonych

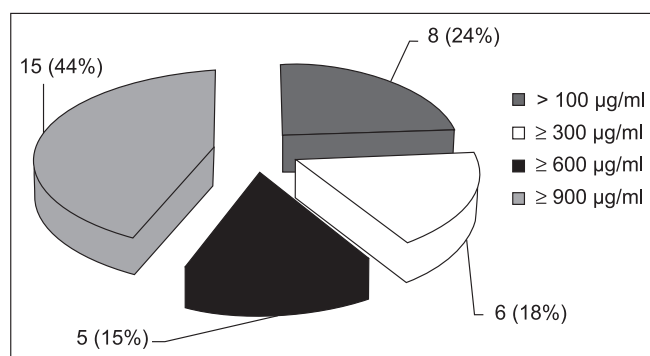
W grupie 11 chorych wcześniej leczonych oporność na PZA towarzyszyła oporności na SM+INH+RMP+EMB, SM+INH+RMP – 3 chorych (27,3%). Oporność na PZA występowała również z opornością na INH+RMP+EMB i INH+RMP – 2 chorych (18,2%).

W grupie chorych wcześniej leczonych oporność tylko na PZA dotyczyła 2 chorych (18,2%).

W analizowanej grupie było 4 chorych z opornością typu pre-XDR (3 z opornością na SM+INH+RMP+OFL i 1 z opornością na SM+INH+RMP+EMB+OFL) oraz 1 chory z opornością typu XDR (*extensively drug-resistant*) na SM+INH+RMP+EMB+OFL+AN+CAP (tab. 1).

Analiza wartości MIC PZA dla szczepów *M. tuberculosis*:

Wśród 34 szczepów *M. tuberculosis* opornych na PZA stwierdzono, że wartość MIC wynosiła w przypadku: 8 szczepów (23,5%) $\geq 100 \mu\text{g/ml}$, 6 szczepów (17,6%) $\geq 300 \mu\text{g/ml}$, 5 szczepów (14,7%) MIC $\geq 600 \mu\text{g/ml}$. Wartość MIC powyżej $900 \mu\text{g/ml}$ stwierdzono u 14 szczepów (44,1%) (ryc. 3).



Ryc. 3. Wartości MIC PZA w $\mu\text{g/ml}$ dla 34 szczepów *M. tuberculosis* badanych metodą BACTEC 460 Tb.

DYSKUSJA

Określenie lekooporności prątków gruźlicy na PZA należy do najtrudniejszych testów mikrobiologicznych (8). Dla większości leków testy te są wystandaryzowane, a wyniki powtarzalne (9). W przypadku pirazynamidu poprawność wykonania testu w dużej mierze zależy od pH pożywki. W środowisku obojętnym, optymalnym dla wzrostu prątków, PZA nie wykazuje aktywności prątkobójczej, natomiast silne zakwaszenie pożywki nie sprzyja rozwojowi prątków, a nawet zupełnie go hamuje (10).

Dziesiątki artykułów opisują problemy związane z utrzymaniem w pożywkach hodowlanych warunków wymaganych do zachowania przeciwprątkowej aktywności leku ($\text{pH } 5,5 \leq 6,0$) równoległe z zachowanymi warunkami optymalnymi do wzrostu prątków. Ocenia się, że dla co najmniej 10% szczepów wyizolowanych z materiałów klinicznych, nie można wykonać testu oporności, ponieważ nie wyrastają one z powodu niskiego pH pożywek (10). Problemy z prawidłowym wykonaniem testu oporności na PZA mogą być również spowodowane użyciem zbyt dużego inoculum sprzyjającego agregacji komórek prątków, co prowadzi do podwyższenia pH pożywek, na których wykonuje się test. Podobny efekt może być widoczny w pożywkach

płynnych zawierających surowicę lub kompleks albuminowy, w których POA może być wiązany z białkami i tym samym inaktywowany. Ponadto wrażliwość na PZA zależy od fazy wzrostu prątków. Starzejące się, 3-miesięczne hodowle szczepu H₃₇Ra, były bardziej wrażliwe na PZA niż młode 4-dniowe hodowle będące w logarytmicznej fazie wzrostu. Wszystkie te trudności skutkują brakiem lub fałszywymi wynikami oporności na PZA (11, 12, 13, 15).

Głównie z tego powodu, przez wiele lat stosowania pirazynamidu w leczeniu gruźlicy testy lekooporności na PZA były możliwe tylko w nielicznych laboratoriach. Ponieważ nie wykonywano testów lekooporności, nie prowadzono badań wielośrodkowych, również z tych samych powodów WHO nie zbierało i nie zbiera danych o prevalencji oporności na pirazynamid wśród szczepów *Mycobacterium tuberculosis*.

Obecnie pirazynamid stosowany jest przeważnie w leczeniu empirycznym, a jak pokazały nasze badania odsetek chorych z opornością na PZA jest stosunkowo wysoki (lekooporność pierwotna 5,9%, nabyta 14%), poza tym wśród szczepów opornych na ten lek dominują szczepy z najwyższym mianem oporności, tj. MIC PZA $\geq 900 \mu\text{g/ml}$ (44,1%). Istnieje więc konieczność wprowadzenia testu PZA jako obowiązkowego do antybiogramu pierwszego rzutu i ocenę zjawiska w skali Polski.

Niepokojącym zjawiskiem jest również pojawienie się szczepów *M. tuberculosis* posiadających oporność na PZA przy jednoczesnej wrażliwości na pozostałe 4 leki przeciwprątkowe. Analiza własnego materiału wskazała, że szczepy odporne na PZA wyizolowane od 13 chorych były wrażliwe na cztery podstawowe leki. W grupie nowo wykrytych takich chorych było 11 (50%), a w grupie chorych wcześniej leczonych tylko 2 (16,7%). Wysoki odsetek chorych nowo wykrytych wydalających prątki odporne jedynie na PZA świadczy o tym, że zachorowania te są wynikiem transmisji szczepów pomiędzy chorymi, a nie są wynikiem niewłaściwego leczenia oraz złej dystrybucji leku w tkankach (15).

Oporność jednolekową na PZA opisano w kohortowych badaniach szczepów *M. tuberculosis* izolowanych od chorych w Kanadzie. Stwierdzono, że szczepy wyizolowane od 21 osób (20 z jednolekową opornością na PZA i 1 MDR) nie tylko posiadały tę samą mutację w genie *pncA*, ale również ten sam wzór RFLP, co było dowodem na transmisję tego samego szczepu wśród badanych chorych. Kolejnym etapem analizy szczepów opornych na PZA wyizolowanych od chorych z województwa mazowieckiego będzie zbadanie pokrewieństw genetycznych pomiędzy tymi szczepami (16).

Jest rzeczą zastanawiającą, że oporność na PZA wśród szczepów izolowanych w Polsce od chorych pochodzących z województwa mazowieckiego jest relatywnie wysoka (5,9% u chorych nowo wykrytych i 14% wcześniej leczonych) w stosunku do oporności na inne leki I rzędu. Analizując procentowy udział oporności na PZA wśród szczepów MDR w obu grupach

chorych stwierdzono, że jest on bardzo wysoki i wynosi w grupie chorych nowo wykrytych 41% a wśród chorych wcześniej leczonych ponad 80%. Jak można wytłumaczyć tak wysoki odsetek oporności na PZA w Polsce, w której oporność prątków gruźlicy na inne leki nie występuje tak często jak w innych krajach Europy Wschodniej?

Należy pamiętać, że częstość naturalnych mutacji prątków opornych na PZA jest wyższa niż dla pozostałych leków i wynosi 1/10⁴. Przy rozległych zmianach gruźliczych, w których występuje duża populacja prątków (np. 10¹⁰-10¹⁴) selekcja naturalnie opornych mutantów następuje bardzo łatwo i szybko (17,18).

W badaniach gruźlicy eksperymentalnej prowadzonych na zwierzętach udowodniono, że ten wartościowy lek przeciwprątkowy może być stosowany tylko 2-3 miesiące z powodu łatwego i szybkiego nabywania lekooporności. Wydłużanie czasu terapii potęguje zjawisko lekooporności (18, 19).

Kolejnym powodem oporności na PZA może być podawanie go jako jedynego leku w leczeniu gruźlicy.

Jak wiadomo leczenie gruźlicy wymaga 3-4 leków równocześnie, szczególnie przy rozległych zmianach, co ma miejsce we wstępnej fazie leczenia (20). Z badań własnych oraz obserwacji pulmonologów wiadomo, że PZA bywa podawany w Polsce znacznie dłużej np. przez 12 m-cy, a nawet w monoterapii (21).

WNIOSKI

1. Oporność na PZA stwierdzono wśród szczepów *M. tuberculosis* izolowanych od 5,9% (22) chorych nowo wykrytych i 14% (11) chorych wcześniej leczonych.
2. Oporność na PZA często towarzyszyła oporności na cztery podstawowe leki (SM+INH+RMP+EMB) zarówno w grupie chorych nowo wykrytych (14%) jak i wcześniej leczonych (25%).
3. Oporność na PZA występowała również wśród szczepów wrażliwych na cztery podstawowe leki. Zjawisko to w grupie chorych nowo wykrytych dotyczyło 50% chorych.
4. Wśród szczepów opornych na PZA dla 44,1% MIC PZA wynosił $\geq 900 \mu\text{g/ml}$.

PIŚMIENNICTWO

1. Pyrazinamide. *Tuberculosis* 2008; 88 (2): 141-144.
2. Yeager R, Monroe WGC, Dessau FI: Pyrazinamide (aldinamide) in the treatment of pulmonary tuberculosis. *Am Rev Tuberc* 1952; 65: 523-546.
3. Zhang Y, Mitchison D: The curious characteristics of pyrazinamide: a review. *Int J Tuberc Lung Dis* 2003; 7 (1): 6-21.
4. Butler WR, Kilburn JO: Susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to pyrazinamidase and its relationship to pyrazinamidase activity. *Antimicrob Agents Chemother* 1983; 24: 600-601.
5. Heifets LB, Flory MA, Lindholm-Levy P: Does pyrazinoic acid as an active moiety of pyrazinamide have specific activity against *Mycobacterium tuberculosis*? *Antimicrob Agents Chemother* 1989; 33: 1252-1254.
6. Raynaud C, Laneelle MA, Senaratne RH et al.: Mechanisms of pyrazinamide resistance in mycobacteria: importance of lack of uptake in addition to lack of pyrazinamidase activity. *Microbiology* 1999; 145: 1359-1367.
7. Augustynowicz-Kopeć E, Kozłowska M, Zabost A et al.: Molekularne dochodzenia epidemiologiczne wśród ludzi blisko spokrewnionych chorujących na gruźlicę płuc. *Pneumo Info* 2007; 4 (3): 14-22.
8. Hewlett D, Horn DL, Alfata C: Drug-resistant tuberculosis: inconsistent results of pyrazinamide susceptibility testing. *JAMA* 1995; 273: 916-917.
9. Salfinger M, Hale YM, Driscoll JR: Diagnostic tools in tuberculosis: present and future. *Respiration* 1998; 65: 163-170.
10. Salfinger M, Heifets LB: Determination of pyrazinamide MICs for *Mycobacterium tuberculosis* at different pH by the radiometric method. *Antimicrob. Agents Chemother* 1988; 32: 1002-1004.
11. Siddiqi SH: Antimicrobial susceptibility testing: radiometric (BACTEC) tests for slow growing mycobacteria. [W:] Isenberg HD *Clinical microbiology procedure handbook*. ASM Press. Washington, DC 1992: 14-25.
12. Fernandes P, Ferreira BS, Cabral JMS: Solvent tolerance in bacteria: role of efflux and cross-resistance with antibiotics. *Int J Antimicrob Agents* 2003; 2: 211-216.
13. Ordway D, Viveiros M, Leandro C et al.: Clinical concentrations of thioridazine kill intra-cellular multi-drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Int J Antimicrob Agents* 2003; 47: 917-922.
14. Zhang Y, Permar S, Sun Z: Conditions that may affect the results of susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* to pyrazinamide. *J Med Microbiol* 2002; 51: 42-49.
15. Napiórkowska A, Augustynowicz-Kopeć E, Zwolska Z: Fenotyp oporności prątków gruźlicy na pirazynamid (PZA) w badaniach ogólnopolskich. *Pneumologia i Alergologia Polska* 2010; 78, 4: 256-262.
16. Cheng S, Thilbert L, Sanchez T et al.: pncA mutations as a major mechanism of pyrazinamide resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: spread of a monoresistant strain in Quebec, Canada. *Antimicrob. Agents Chemother* 2000; 44: 528-532.
17. Nguyen D, Brassard P, Westley J et al.: Widespread pyrazinamide – resistant *Mycobacterium tuberculosis* family in low-incidence setting. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 2878-2883.
18. Augustynowicz-Kopeć E: Gruźlica lekooporna w Polsce. Analiza epidemiologiczna, mikrobiologiczna i genetyczna. Rozprawa habilitacyjna. Akademia Medyczna w Warszawie. Warszawa 2007.
19. Grosset JH: Bacteriologic basis of short-course chemotherapy for tuberculosis. *Clin Chest Med* 1980; 1: 231-241.
20. Zwolska Z, Augustynowicz-Kopeć E: Prawidłowa realizacja programów monitorowania gruźlicy lekoopornej w Polsce. Konferencja Naukowo-Szkoleniowa Specjalistów Chorób Płuc, Zakopane 2007.
21. Zwolska Z: Propozycja włączenia testu PZA-oporności do podstawowego antybiogramu prątków gruźlicy. Konferencja Naukowo-Szkoleniowa Specjalistów Chorób Płuc, Zakopane 2007.

otrzymano/received: 18.08.2011
zaakceptowano/accepted: 14.09.2011

Adres/address:
*Agnieszka Napiórkowska
Zakład Mikrobiologii I GiChP
ul. Płocka 26, 01-138 Warszawa
tel./fax: (22) 431-21-82
e-mail: a.napiorkowska@igichp.edu.pl