

Agnieszka Napiórkowska, Ewa Augustynowicz-Kopeć, Zofia Zwolska

Zakład Mikrobiologii, Instytut Gruźlicy i Chorób Płuc w Warszawie
Kierownik: prof. dr hab. n. med. Z. Zwolska

Fenotyp oporności prątków gruźlicy na pirazynamid (PZA) w badaniach ogólnopolskich

Phenotypic characterization of pyrazinamide-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolated in Poland

Praca finansowana z grantu Ministerstwa Nauki i Informatyki nr R1302103

Abstract

Introduction: Pyrazinamide (PZA) is an important first-line antituberculous drug, which is applied together with INH, RMP, EMB and SM. This drug plays a unique role in the first phase of TB therapy because it is active within macrophages and kills tubercule bacilli.

Testing of the resistibility of *Mycobacterium tuberculosis* to PZA is technically difficult because PZA is active only at acid pH. Therefore routine drug resistibility testing of *M. tuberculosis* for PZA is not performed in many laboratories. The objective of our study was to estimate the resistibility for PZA among *M. tuberculosis* isolates from polish patients in 2000–2008 years.

Material and methods: We analyzed *M. tuberculosis* strains with different resistibility to first-line antituberculous drugs. The strains were isolated from 1909 patients with tuberculosis. The strains were examined for PZA resistibility by the radiometric Bactec 460-TB method. The PZA-resistant strains were examined for following MIC PZA for drug concentration: 100, 300, 600, 900 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Results: PZA resistance among *M. tuberculosis* strains was found in 6.7% untreated patients and in 22.2% previously treated patients ($p < 0.001$). In both groups resistance to PZA was correlated with drug resistance for INH+RMP+SM+EMB in 32.7% untreated patients and in 34.5% previously treated ones ($p < 0.8$). The PZA-monoresistant strains were observed in 20.8% untreated patients groups.

Among resistant strains: in 3.4% MIC for PZA was $> 100 \mu\text{g}/\text{mL}$, in 11.6% $\geq 300 \mu\text{g}/\text{mL}$, in 8.9% $\geq 600 \mu\text{g}/\text{mL}$ and in 76% $\geq 900 \mu\text{g}/\text{mL}$.

Conclusions: Among *M. tuberculosis* strains PZA resistance was found in 6.7% of untreated patients and in 22.2% of previously treated patients.

Among the PZA-resistant strains very high MIC value for PZA ($\geq 900 \mu\text{g}/\text{mL}$) was revealed for 76% *M. tuberculosis* strains.

Key words: tuberculosis, *Mycobacterium tuberculosis*, PZA-resistance

Pneumonol. Alergol. Pol. 2010; 78, 4: 256–262

Streszczenie

Wstęp: Pirazynamid (PZA) jest jednym z najważniejszych leków przeciwprątkowych, stosowanym wspólnie z INH, RMP, EMB i SM. Lek ten odgrywa kluczową rolę w pierwszej fazie leczenia choroby, ponieważ działa silnie wewnątrz makrofagów, gdzie przeżywają prątki gruźlicy. Określenie fenotypu oporności na PZA jest trudne ze względu na aktywność leku jedynie w kwaśnym środowisku. Głównie z tego powodu ten test jest wykonywany w niewielu laboratoriach na świecie, a informacje o PZA-oporności są fragmentaryczne.

Celem pracy była analiza oporności na PZA szczepów *Mycobacterium tuberculosis* wyizolowanych od polskich chorych w latach 2000–2008.

Adres do korespondencji: dr hab. n. med. Ewa Augustynowicz-Kopeć, Zakład Mikrobiologii IGIChP, ul. Płocka 26, 01–138 Warszawa, tel./faks: 22 43 12 182, e-mail: e.kopec@igichp.edu.pl

Praca wpłynęła do Redakcji: 07.11.2009 r.

Copyright © 2010 Via Medica
ISSN 0867–7077

Materiał i metody: Analizie poddano szczepy *M. tuberculosis* o różnym fenotypie oporności na 4 podstawowe leki wyizolowane od 1909 chorych. Fenotyp oporności na PZA określono metodą radiometryczną Bactec 460-TB. Szczepem opornym na PZA określono MIC dla stężeń PZA: 100, 300, 600, 900 $\mu\text{g/ml}$.

Wyniki: W grupie chorych nowo wykrytych 6,7% wydalalo szczepy odporne na PZA. W grupie chorych wcześniej leczonych szczepy odporne na PZA wydalalo 22,2% ($p < 0,001$). W obu grupach chorych oporność na PZA była skorelowana z opornością na 4 leki INH + RMP + SM + EMB (32,7% u chorych nowo wykrytych i u 34,5% chorych wcześniej leczonych [$p < 0,8$]). Szczepy odporne tylko na PZA dominowały w grupie chorych nowo wykrytych (20,8%). Dla 3,4% szczepów wartość MIC PZA wynosiła $> 100 \mu\text{g/ml}$, dla 11,6% $\geq 300 \mu\text{g/ml}$, dla 8,9% $\geq 600 \mu\text{g/ml}$ i aż dla 76% $\geq 900 \mu\text{g/ml}$.

Wnioski: Wśród szczepów *M. tuberculosis* stwierdzono wysokie odsetki oporności na PZA (6,7% u chorych nowo wykrytych, 22,2% u chorych wcześniej leczonych). Większość szczepów opornych na PZA (76%) posiadała wysokie miana oporności — MIC PZA $\geq 900 \mu\text{g/ml}$.

Słowa kluczowe: gruźlica, *Mycobacterium tuberculosis*, PZA-oporność

Pneumonol. Alergol. Pol. 2010; 78, 4: 256–262

Wstęp

Właściwości przeciwpłatkowe pirazynamidu (PZA, *pyrazinamide*) poznano już ponad 50 lat temu i od tego czasu lek ten jest stosowany w leczeniu gruźlicy jako jeden z najważniejszych obok rifampicyny (RMP, *rifampin*), izoniazidu (INH, *isoniazid*), streptomycyny (SM, *streptomycin*) i etambutolu (EMB, *ethambutol*). Mimo że PZA zajmuje tak ważne miejsce w leczeniu gruźlicy, Światowa Organizacja Zdrowia (WHO, *World Health Organization*) do tej pory nie zalecała zbierania danych o częstości występowania oporności na PZA wśród szczepów *Mycobacterium tuberculosis* oraz nie rekomendowała 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 [1].

Pirazynamid jest lekiem, który swoją aktywność przeciwpłatkową wykazuje jedynie w środowisku kwaśnym (pH 5,0–6,0), dlatego działa silnie wewnątrz makrofagów oraz w masach martwiczych. Strukturalnie PZA jest analogiem nikotynamidu. Podobnie jak izoniazyd, PZA jest prolekiem i jest aktywowany przez enzym pirazynamidazę, wytwarzaną przez komórki prątków, który deaminuje lek do kwasu pirazynowego (POA). Zarówno biochemiczne podstawy tych przekształceń, jak i mechanizm działania na struktury komórkowe nie są jednak w pełni poznane, chociaż sugeruje się działanie leku na syntezę kwasów tłuszczowych [2–5]. Zaobserwowano, że pod wpływem kwaśnego pH zwiększa się wchłanianie i gromadzenie POA w komórkach prątków gruźlicy, który blokuje mechanizm aktywnego i biernego transportu komórkowego [6]. Zakładając, że działanie POA ma zaburzyć syntezę kwasów tłuszczowych [7], POA jako słaby kwas może potencjalnie zabijać prątki gruźlicy przez zmianę potencjału błonowego komórki [8].

Wrażliwość na PZA jest skorelowana z aktywnością amidazy, która u większości szczepów opornych obniża się lub całkowicie zanika, jak w przypadku szczepów naturalnie opornych na PZA — *M. bovis* i *M. bovis* BCG. Cecha ta jest szczególnie przydatna w różnicowaniu między *M. tuberculosis* i *M. bovis*.

Gruźlica wywołana przez *M. bovis*, stanowiąca głównie problem weterynaryjny, może być również transmitowana pomiędzy ludzi [9]. Gruźlica wywołana przez *M. bovis* jest wykrywana u ludzi zakażonych wirusem HIV [10, 11]. W wielu krajach rozwijających się, na przykład w Ameryce Łacińskiej, gruźlica spowodowana *M. bovis* jest przyczyną około 2% nowych przypadków gruźlicy płuc i 8% postaci pozapłucnych [12]. W regionach, gdzie gruźlica u ludzi i zwierząt występuje wspólnie i powoduje endemie, precyzyjne rozróżnienie gatunków *M. bovis* od *M. tuberculosis* ma istotne znaczenie w monitorowaniu rozprzestrzeniania się i transmisji do ludzi gruźlicy bydłowej. Najważniejszym powodem zmuszającym do różnicowania jest odmienny sposób leczenia, który u chorych na gruźlicę wywołaną przez *M. bovis*, gatunku naturalnie opornego na PZA, wymaga wyłączenia tego leku z leczenia [13].

Celem pracy była retrospektywna analiza częstości występowania oporności na PZA w zgromadzonej kolekcji szczepów *M. tuberculosis* oraz ustalenie wartości MIC PZA.

Materiał i metody

Analizie poddano szczepy *M. tuberculosis* wyizolowane i przesłane do Zakładu Mikrobiologii w latach 2000–2008 od 1909 chorych pochodzących z różnych rejonów Polski. Najwięcej chorych pochodziło z województwa mazowieckiego (17,8%), kujawsko-pomorskiego (16,3%) i małopolskiego (9,5%).

Wśród 1909 chorych było 505 (26,5%) kobiet i 1289 (67,5%) mężczyzn w wieku 6–95 lat. W badanej grupie było 1517 (79,5%) chorych nowo wykrytych i 392 (20,5%) wcześniej leczonych.

Wszystkie szczepy wyhodowano i lekooporność określono według standardowych metod. Przynależność do gatunku oznaczono przy użyciu testu niacynowego oraz metody *spoligotyping*.

Spoligotyping jest metodą genetyczną opartą na polimorfizmie regionu *Direct Repeat* (DR) charakterystycznego dla kompleksu *M. tuberculosis*. Liczba kopii sekwencji DR występujących w genomie prątków jest cechą charakterystyczną dla danego szczepu.

Na podstawie uzyskanego wzoru molekularnego metoda ta pozwala na identyfikację szczepów w obrębie kompleksu *Mycobacterium tuberculosis*, to znaczy: *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. canettii*, *M. microti*, *M. bovis*, *M. bovis BCG*, *M. caprae*, *M. pinnipedii*. Zasada metody *spoligotyping* i sposób jej wykorzystywania opisano we wcześniejszych artykułach [14, 15].

Lekooporność szczepów na cztery podstawowe leki oznaczano metodą klasyczną na pożywce Löwensteina-Jensena oraz w systemie Bactec 460-TB.

Fenotyp oporności na PZA szczepów określano metodą radiometryczną Bactec 460-Tb, na pożywce płynnej Middlebrooka 7H12 o pH w zakresie 5,9–6,0 i stężeniu granicznym PZA 100 µg/ml. W tym samym systemie ustalano wartości MIC PZA dla następujących stężeń leku 100, 300, 600 i 900 µg/ml.

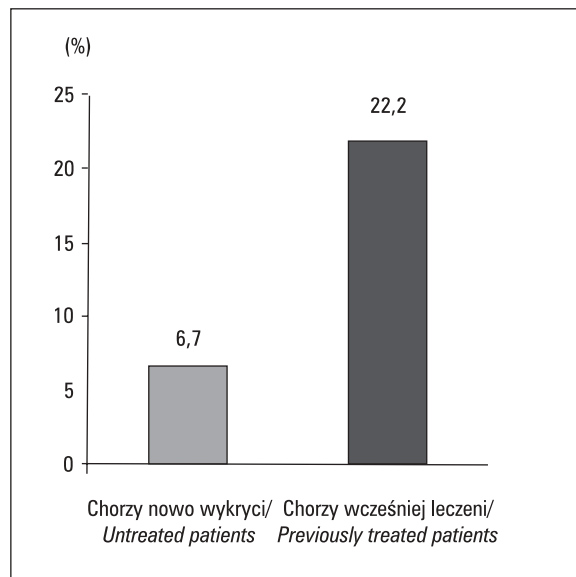
W pracy znamienność różnic oceniono testem *t*-Studenta.

Wyniki

W grupie 1909 chorych, od których wyizolowano prątki gruźlicy, u 188 (9,8%) stwierdzono szczepy odporne na PZA. Identyfikacja metodą *spoligotyping* oraz testem niacynowym wykazała, że wszystkie szczepy odporne na PZA należały do gatunku *M. tuberculosis*. Szczepy te stały się podstawą do dalszych analiz.

W grupie 1517 chorych nowo wykrytych zakażonych szczepami *M. tuberculosis* u 101 chorych (6,7%) stwierdzono szczepy odporne na PZA. Oporność na ten lek w grupie chorych wcześniej leczonych (392) wydalających prątki gruźlicy stwierdzono w 87 przypadkach (22,2%). Częstość oporności na PZA była w obu grupach chorych znamienne różna ($p < 0,001$) (ryc. 1).

Analizie poddano również oporność na inne leki podstawowe, z którymi skojarzona była oporność na PZA.



Rycina 1. Oporność na PZA wśród szczepów *Mycobacterium tuberculosis* izolowanych od chorych na gruźlicę

Figure 1. PZA-resistance among *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated from tuberculosis patients

Analiza oporności na PZA w grupie nowo wykrytych chorych

W grupie 101 chorych nowo wykrytych oporność na PZA towarzyszyła oporności na SM + INH + RMP + EMB — u 33 chorych (32,7%), SM + INH + RMP oraz INH + RMP — u 12 chorych (11,9%), jak również oporności na INH + RMP + EMB — u 3 chorych (3%). U 20 chorych (19,8%) oporność na PZA towarzyszyła oporności innej niż typu MDR i dotyczyła oporności na SM lub SM + INH lub SM + INH + EMB. W grupie chorych nowo wykrytych występowała również oporność tylko na PZA, co dotyczyło 21 chorych (20,8%).

Analiza oporności na PZA w grupie chorych wcześniej leczonych

Wśród 87 chorych wcześniej leczonych zakażonych prątkami gruźlicy opornymi na PZA dominowała jednocześnie oporność na cztery leki SM + INH + RMP + EMB — u 30 chorych (34,5%), kolejno na SM + INH + RMP — u 25 chorych (28,7%), INH + RMP — u 14 chorych (16,1%) oraz INH + RMP + EMB — u 7 chorych (8%). Szczepy odporne na PZA o oporności innej niż MDR stanowiły 9,2% (8 chorych). Najmniejszy odsetek stanowiły szczepy wrażliwe na 4 podstawowe leki i odporne na PZA (3,4% — 3 chorych) (tab. 1).

Porównując wzory oporności szczepów *M. tuberculosis* opornych na PZA izolowanych od chorych nowo wykrytych i wcześniej leczonych,

Tabela 1. Częstość występowania oporności na PZA wśród szczepów *Mycobacterium tuberculosis* w zależności od wzoru oporności na leki przeciwprątkoweTable 1. Frequency of PZA-resistance among *Mycobacterium tuberculosis* strains with different susceptibility on first-line antituberculous drugs

Wzór oporności <i>Patter of resistance</i>	Liczba szczepów opornych na PZA <i>No of strains resistant to PZA</i>		Test t-Studenta <i>t-Student test</i>
	Chorzy nowo wykryci <i>Untreated patients</i>	Chorzy wcześniej leczeni <i>Previously treated patients</i>	
SIRE	33 (32,7%)	30 (34,5%)	p < 0,8
SIR	12 (11,9%)	25 (28,7%)	p < 0,01
IRE	3 (3,0%)	7 (8,0%)	p < 0,2
IR	12 (11,9%)	14 (16,1)	p > 0,4
Wrażliwy/ <i>Sensitive</i>	21 (20,8%)	3 (3,4%)	p < 0,001
Inne/ <i>Others</i>	20 (19,8%)	8 (9,2%)	p < 0,05
Razem/ <i>Total</i>	101 (100%)	87 (100%)	p < 0,2

S — streptomycyna/streptomycin, I — izoniazyd/izoniazid, R — rifampincyna/rifampin, E — etambutol/ethambutol

stwierdzono, że w obu analizowanych grupach dominowała oporność na 4 leki INH + RMP + SM + + EMB 32,7% i 34,5% (p < 0,8). Szczepy odporne jedynie na PZA dominowały w grupie chorych nowo wykrytych (20,8%), natomiast w grupie chorych wcześniej leczonych stanowiły niewielki odsetek (3,4%). Częstość oporności na PZA była w obu grupach znamienne różna (p < 0,001).

Najmniej chorych nowo wykrytych i leczonych wydalalo prątki gruźlicy odporne na INH + + RMP + EMB + PZA 3,0% i 8,0% (p < 0,2) (ryc. 2).

Analiza wartości MIC PZA dla szczepów *M. tuberculosis*

Wyznaczenie wartości MIC PZA wykonano dla 146 szczepów *M. tuberculosis* opornych na ten lek. Dla 5 szczepów (3,4%) wartość MIC wynosiła > 100 µg/ml, dla 17 szczepów (11,6%) ≥ 300 µg/ml, dla 13 szczepów (8,9%) MIC ≥ 600 µg/ml. Najwyższą wartość MIC ≥ 900 µg/ml stwierdzono dla 111 szczepów (76%) (ryc. 3).

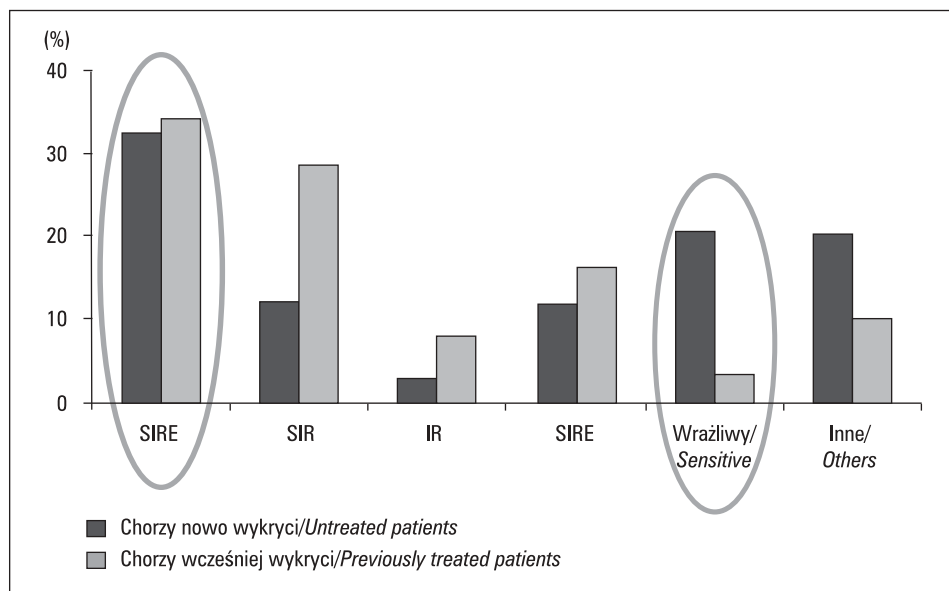
Dyskusja

Określenie oporności szczepów prątków gruźlicy na PZA należy do najtrudniejszych testów mikrobiologicznych [16]. Konwencjonalne testy oznaczenia lekooporności prątków mogą być zakończone w ciągu 7–28 dni zależnie od zastosowanego systemu hodowlanego [17]. Dla większości leków testy są wystandaryzowane, a wyniki powtarzalne. W przypadku PZA aktywność leku koreluje z pH pożywek, w związku z tym lek najbardziej aktywny jest w pH 5,5, mniej aktywny w pH 6 i całkowicie nieaktywny w pH obojętnym [18].

Znane są problemy związane z utrzymaniem w pożywkach hodowlanych warunków wymaganych do zachowania przeciwprątkowej aktywności PZA (pH 5,5 ≤ 6,0) równoległe z zachowaniem optymalnych warunków do wzrostu prątków (pH ok. 7,0). Ocenia się, że dla co najmniej 10% szczepów wyizolowanych z materiałów klinicznych nie można wykonać testu oporności, ponieważ nie wyrastają one przy tak niskim pH pożywek [19]. 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. Wiele informacji o mechanizmach oporności prątków na PZA dostarczyły badania na temat aktywnego wypompowywania leku przez komórkę bakteryjną (*efflux pump*) [12, 20–22].

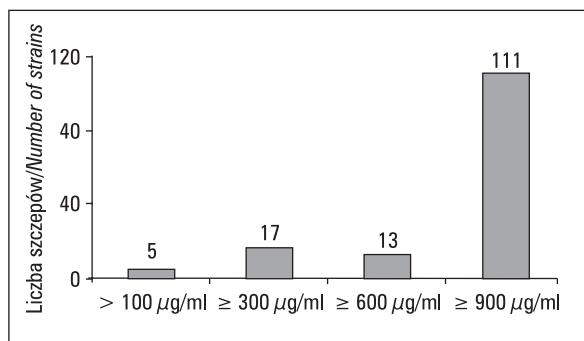
Problemem jest nie tylko utrzymanie niskiego pH w pożywkach, ale również ustalenie wartości krytycznego stężenia umożliwiającego fenotypowe określenie oporności na lek. Wprowadzenie systemu izotopowego Bactec 460-Tb umożliwiło wystandaryzowanie metodyki, chociaż test oporności na PZA ciągle należy do najtrudniejszych [19, 23].

Mimo prowadzonych przez wiele lat badań nie ma zgodności co do kryterium oporności prątków



Rycina 2. Oporność na PZA wśród szczepów *Mycobacterium tuberculosis* izolowanych od chorych nowo wykrytych i wcześniej leczonych w zależności od wzoru oporności na leki podstawowe

Figure 2. PZA-resistance among *Mycobacterium tuberculosis* strains in relation to different susceptibility to first-line antituberculous drugs isolated from untreated and previously treated patients



Rycina 3. Wartości MIC PZA [µg/ml] dla 146 szczepów *Mycobacterium tuberculosis* badanych metodą Bactec 460 Tb

Figure 3. MIC value for PZA [µg/mL] for 146 *Mycobacterium tuberculosis* strains examined by the Bactec 460 Tb method

na PZA w warunkach *in vitro*. Na pożywce agarowej Middlebrooka Cohna 7H10 stężenie krytyczne leku wynosi 25 µg/ml, w systemie Bactec — 100 µg/ml [12, 24]. Obecnie, gdy wiadomo, że za oporność na PZA odpowiadają między innymi mutacje w genie *pncA*, łatwiej jest obserwować korelacje między wartościami MIC a obecnością mutacji i wnioskować, czy należy zmienić wartości krytyczne MIC w różnych metodach mikrobiologicznych.

W badaniach własnych w grupie 1909 chorych na gruźlicę 188 wydalalo prątki odporne na PZA, w związku z tym ich wzrost nie był hamowany przy granicznym stężeniu 100 µg/ml, co potwierdziły badania wartości MIC u tych szczepów. Wśród

analizowanych szczepów miana oporności na PZA były wysokie — około 80% wykazywała najwyższą wartość MIC ≥ 900 µg/ml, a tylko 3,4% (5 szczepów) posiadało wartość nieco wyższą niż wartość krytyczna (MIC PZA > 100 µg/ml).

Weryfikacje wiarygodności testów lekooporności przeprowadzone w 4 regionach w Kalifornii wykazały, że spośród 1916 badanych szczepów *M. tuberculosis* określonych przez laboratoria jako odporne na PZA, 14 (0,7%) było faktycznie wrażliwych na ten lek [25]. Wśród błędnie oznaczonych były 2 szczepy należące do innego gatunku — *M. bovis* i *M. bovis* BCG, które — jak wiadomo — są naturalnie odporne na PZA. Oprócz szczepów błędnie oznaczonych znaleziono 3 szczepy *M. tuberculosis* odporne jedynie na PZA [26]. Jednolekowa oporność na PZA nie zawsze jest markerem gatunku *M. bovis*, może również dotyczyć *M. tuberculosis*. W związku z tym oporność na ten lek nie może być dłużej pewnym testem identyfikacji *M. bovis* [22, 27].

Gatunkowa identyfikacja spokrewnionych genetycznie *M. tuberculosis* i *M. bovis* jest konieczna ze względu na ich różne znaczenie w epidemiologii i postępowaniu w leczeniu gruźlicy u ludzi [10, 26, 28]. W pracy własnej wszystkie analizowane szczepy zostały zidentyfikowane metodami biochemicznymi i molekularnymi jako *M. tuberculosis*.

Analiza materiału własnego wskazała, że szczepy odporne na PZA wyizolowane od 24 cho-

rych były wrażliwe na cztery podstawowe leki. W grupie nowo wykrytych takich chorych było 21 (20,8%), a w grupie chorych wcześniej leczonych tylko 3 (3,4%). Wysoki odsetek chorych nowo wykrytych wydalających prątki odporne jedynie na PZA świadczy o tym, że zachorowania te są wynikiem transmisji ze środowiska, a nie błędów leczenia.

Oporność jednolekową na PZA opisano również w kohortowych badaniach szczepów *M. tuberculosis* izolowanych od chorych w Kanadzie [29]. 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 polskich chorych będzie zbadanie pokrewieństw genetycznych między tymi szczepami [30].

Jest rzeczą zastanawiającą, że oporność na PZA wśród szczepów izolowanych w Polsce jest relatywnie wysoka (6,7% u chorych nowo wykrytych i 22,2% u 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 około 70%. Jak można tłumaczyć 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 $1/10^4$. Przy rozległych zmianach gruźliczych, w których występuje duża populacja prątków (np. 10^{10} – 10^{14}), selekcja naturalnie opornych mutantów następuje bardzo łatwo i szybko [31, 32].

W badaniach gruźlicy eksperymentalnej prowadzonych na zwierzętach udowodniono, że ten wartościowy lek przeciwprątkowy może być stosowany tylko przez 2–3 miesiące z powodu łatwego i szybkiego nabywania lekooporności [32]. Wydłużanie czasu terapii potęguje zjawisko lekooporności.

Kolejnym powodem oporności na PZA może być podawanie go jako jedyne leku w leczeniu gruźlicy. Jak wiadomo, leczenie gruźlicy wymaga użycia 3–4 leków równocześnie, szczególnie przy rozległych zmianach, co ma miejsce we wstępnej fazie leczenia. Z badań własnych oraz obserwacji pulmonologów wynika, że PZA bywa podawany w Polsce znacznie dłużej, na przykład przez 12 miesięcy, a nawet w monoterapii [33].

Jako że pierwsze przeprowadzone w Polsce badania oporności prątków gruźlicy na PZA [31] wykazały częste jej występowanie, Zwolska [34] zaproponowała, aby test lekooporności na PZA, możliwy do wykonania w kilkunastu laboratoriach w kraju, był wykonywany w Polsce rutynowo w antybiogramie podstawowym.

Wnioski

1. Oporność na PZA stwierdzono wśród szczepów *M. tuberculosis* izolowanych od 6,7% (101) chorych nowo wykrytych i 22,2% (87) chorych wcześniej leczonych. Nie było żadnego przypadku spowodowanego *M. bovis* lub *M. bovis* BCG.
2. Oporność na PZA często towarzyszyła oporności na cztery podstawowe leki (SM + INH + RMP + EMB) zarówno w grupie chorych nowo wykrytych (32,7%), jak i wcześniej leczonych (34,5%).
3. Oporność na PZA występowała również wśród szczepów wrażliwych na cztery podstawowe leki. U chorych nowo wykrytych takich przypadków było ponad 6-krotnie więcej niż u chorych leczonych, co świadczy o zakażeniu się szczepami opornymi na PZA i wymaga dalszych badań molekularnych nad ich transmisją.
4. Wobec powyższych faktów należy podkreślić, że test oporności na PZA nie może nadal stanowić testu różnicującego pomiędzy *M. bovis* i *M. tuberculosis*.
5. Wśród szczepów opornych na PZA dla 80% MIC PZA wynosił $\geq 900 \mu\text{g/ml}$.
6. Test oporności na PZA powinien należeć do podstawowego antybiogramu również u chorych na gruźlicę nowo wykrytą.

Piśmiennictwo

1. Yeager R., Monroe W.G.C., Dessau F.I. Pyrazinamide (aldinamide) in the treatment of pulmonary tuberculosis. *Am. Rev. Tuberc.* 1952; 65: 523–546.
2. Butler W.R., Kilburn J.O. Susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to pyrazinamidase and its relationship to pyrazinamidase activity. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1983; 24: 600–601.
3. Heifets L.B., Flory M.A., 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.
4. Raynaud C., Laneelle M.A., Senaratne R.H., Draper P., Laneelle G., Daffe M. Mechanisms of pyrazinamide resistance in mycobacteria: importance of lack of uptake in addition to lack of pyrazinamidase activity. *Microbiology* 1999; 145: 1359–1367.
5. Zimhony O., Cox J.S., Welch J.T., Vilcheze C., Jacobs W.R. Pyrazinamide inhibits the eukariotic-like fatty acid synthetase I (FAS-I) of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nat. Med.* 2000; 6: 1043–1047.
6. Rinder H., Mieskes K., Loscher T. Heteroresistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 2001; 5: 339–345.

7. Robert J., Trystram D., Truffot-Pernot C., Carbonnelle B., Grosset J. Surveillance of Mycobacterium tuberculosis drug resistance in France, 1995–1997. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 2000; 4: 665–672.
8. Zhang Y., Telenti A. Genetics of drug resistance in Mycobacterium tuberculosis. W: Jacobs W.R., Hatfull G.F. (red.). *Molecular genetics of mycobacteria*. DC, ASM Pres., Washington 2000: 235–254.
9. Bakshi C.S., Shah D.H., Verma R., Singh R.K., Malik M. Rapid differentiation of Mycobacterium bovis and Mycobacterium tuberculosis based on 12.7-kb fragment by a single tube multiplex-PCR. *Vet. Microbiol.* 2005; 1: 211–216.
10. Cosivi O., Grange J.M., Daborn C.J. i wsp. Zoonotic tuberculosis due to Mycobacterium bovis in developing countries. *Emerg. Infect. Dis.* 1998; 4: 59–70.
11. Blazquez B., de Los Monteros L.E.E., Samper S. i wsp. Genetic characterization of multidrug-resistant M. bovis strains from a hospital outbreak involving human immunodeficiency virus positive patients. *J. Clin. Microbiol.* 1997; 35: 1390–1393.
12. Canetti G., Fox W., Khomenko A. i wsp. Advances in techniques of testing mycobacterial drug sensitivity, and use of sensitivity tests in tuberculosis control programmes. *Bull. WHO* 1969; 41: 21–43.
13. Konno K., Feldman F.M., McDermott W. Pyrazinamide susceptibility and amidase activity of tubercle bacilli. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1967; 95: 461–469.
14. Augustynowicz-Kopeć E., Jagielski T., Kozińska M. i wsp. Znaczenie metody spoligotyping w dochodzeniach epidemiologicznych gruźlicy. *Pneumonol. Alergol. Pol.* 2007; 75: 22–31.
15. Augustynowicz-Kopeć E., Kozińska M., Zabost A. i wsp. Molekularne dochodzenia epidemiologiczne wśród ludzi blisko spokrewnionych chorujących na gruźlicę płuc. *Pneumo. Info* 2007; 4: 14–22.
16. Hewlett D., Horn D.L., Alfata C. Drug-resistant tuberculosis: inconsistent results of pyrazinamide susceptibility testing. *JAMA* 1995; 273: 916–917.
17. Salfinger M., Hale Y.M., Driscoll J.R. Diagnostic tools in tuberculosis: present and future. *Respiration* 1998; 65: 163–170.
18. Salfinger M., Heifets L.B. Determination of pyrazinamide MICs for Mycobacterium tuberculosis at different pH by the radiometric method. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1988; 32: 1002–1004.
19. Siddiqi S.H. Antimicrobial susceptibility testing: radiometric (BACTEC) tests for slow growing mycobacteria. W: Isenberg H.D. *Clinical microbiology procedure handbook*. ASM Press, Washington 1992: 14–25.
20. Fernandes P., Ferreira B.S., Cabral J.M.S. Solvent tolerance in bacteria: role of efflux and cross-resistance with antibiotics. *Int. J. Antimicrob. Agents* 2003; 2: 211–216.
21. Ordway D., Viveiros M., Leandro C. i wsp. Clinical concentrations of thioridazine kill intra-cellular multi-drug-resistant Mycobacterium tuberculosis. *Int. J. Antimicrob. Agents* 2003; 47: 917–922.
22. 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.
23. Salfinger M., Reller L.B., Demchuk B., Johnson Z.T. Rapid radiometric method for pyrazinamide susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis. *Res. Microbiol.* 1989; 140: 301–309.
24. Morlock G.P., Crawford J.T., Butler W.R. i wsp. Phenotypic characterization of pncA mutations of Mycobacterium tuberculosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2000; 44: 2291–2295.
25. Hannan M.M., Desmond E.P., Morlock G.P., Mazurek G.H., Crawford J.T. Pyrazinamide-mono-resistant Mycobacterium tuberculosis in the United States. *J. Clin. Microbiol.* 2001: 647–650.
26. Rosenkrantz B.G. The trouble with bovine tuberculosis. *Bull. Hist. Med.* 1985; 59: 155–175.
27. Marttila H.J., Marjamaki M., Vyshnevskaya E. i wsp. pncA mutations in pyrazinamide-resistant Mycobacterium tuberculosis isolates from northwestern Russia. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1999; 43: 1764–1766.
28. Dankner W.M., Waecker N.J., Essey K.M., Thompson M., Davis C.E. Mycobacterium bovis infection in San Diego: a clinicoepidemiologic study of 73 patients and a history review of forgotten pathogen. *Medicine* 1993; 72: 11–37.
29. Cheng S., Thilbert L., Sanchez T. i wsp. 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.
30. Nguyen D., Brassard P., Westley J. i wsp. Widespread pyrazinamide-resistant Mycobacterium tuberculosis family in low-incidence setting. *J. Clin. Microbiol.* 2003; 41: 2878–2883.
31. Augustynowicz-Kopeć E. Gruźlica lekooporna w Polsce. Analiza epidemiologiczna, mikrobiologiczna i genetyczna. Rozprawa habilitacyjna. Akademia Medyczna w Warszawie, Warszawa 2007.
32. Grosset J.H. Bacteriologic basis of short-course chemotherapy for tuberculosis. *Clin. Chest Med.* 1980; 1: 231–241.
33. Zwolska Z., Augustynowicz-Kopeć E. Prawidłowa realizacja programów monitorowania gruźlicy lekoopornej w Polsce. Konferencja Naukowo-Szkoleniowa Specjalistów Chorób Płuc, Zakopane 2007.
34. Zwolska Z. Propozycja włączenia testu PZA-oporności do podstawowego antybiogramu prątków gruźlicy. Konferencja Naukowo-Szkoleniowa Specjalistów Chorób Płuc, Zakopane 2007.