

Aus dem Forschungszentrum Borstel
Leibniz-Lungenzentrum
Lehrstuhl für Respiratory Medicine & International Health
Prof. Dr. med. Dr. h.c. C. Lange

**Erstellung von Medikamentenregimen basierend auf DNS-Sequenzierung
bei multiresistenter Tuberkulose**

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
– aus der Sektion Medizin –
vorgelegt von
Hans-Peter Grobbel
aus
Bad Berleburg

Lübeck 2024

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. h.c. Christoph Lange

Ko-Betreuer: Prof. Dr. med. Karl-Friedrich Klotz

2. Berichterstatter/Berichterstatterin: Prof. Dr. med. Dennis Nurjadi

Tag der mündlichen Prüfung: 02.07.2024

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 03.07.2024

– Promotionskommission der Sektion Medizin –

1 Inhaltsverzeichnis

1	Inhaltsverzeichnis	3
2	Abkürzungsverzeichnis.....	5
3	Abbildungsverzeichnis	6
4	Tabellen.....	7
5	Tabellen im Anhang	7
6	Zusammenfassung	8
7	Summary	10
8	Einleitung	12
8.1	Epidemiologie	12
8.2	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> – Der Erreger der Tuberkulose.....	13
8.3	Übertragung und klinische Manifestation	14
8.4	Diagnose	14
8.5	Therapie	15
8.6	Antibiotikaresistenzen	16
8.6.1	Diagnostik von Resistenzen.....	17
8.7	Fragestellungen dieser Arbeit	24
9	Methoden.....	25
9.1	Studiendesign und Studienteilnehmer	25
9.2	Genotypische Resistenztestung.....	25
9.2.1	Präanalytische Phase:	25
9.2.2	Analytische Phase	26
9.2.3	Postanalytische Phase.....	26
9.3	Phänotypische Resistenztestung in Flüssigkulturen	27
9.4	Messung der Minimalen Hemmkonzentrationen	28
9.5	Ethik	30
9.6	Behandlungsalgorithmus	31
9.7	Datenauswertung	32

10	Ergebnisse.....	33
10.1	Studienteilnehmer	33
10.2	Demografische und klinische Ausgangsmerkmale der Teilnehmer.....	34
10.3	Genotypische Resistenztestung.....	34
10.4	Algorithmus-basierter Entwurf eines MDR/RR-Tuberkulose-Behandlungsschemas 41	
11	Diskussion.....	43
11.1	Limitierungen.....	45
12	Fazit	47
13	Ausblick	47
13.1	Herausforderungen bei der Etablierung von molekularer Resistenztestung.....	47
13.2	Zukunft der genotypischen Medikamentenresistenztestung	48
14	Quellenverzeichnis	50
15	Anhang	67
16	Danksagung	71
17	Publikationsliste Hans-Peter Grobbel (Stand: 09.11.2023)	72

2 Abkürzungsverzeichnis

BCG	Bacille Calmette-Guérin
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DZIF	Deutsches Zentrum für Infektionsforschung
gDST	genotypische Medikamentenempfindlichkeitstestung
GU	Growth Unit
HIV	Humanes Immundefizienz Virus
IGRA	Interferon-Gamma-Release-Assay
KI	Konfidenzintervall
KK	Kritische Konzentration
LPA	Line-Probe Assay
M. tuberculosis	Mycobacterium tuberculosis
MGIT	Mycobacteria Growth Indicator Tube
MHK	Minimale Hemmkonzentration
MIQ	Mikrobiologisch-infektiologischer Qualitätsstandard
NGS	Next Generation Sequencing
NTM	Nichttuberkulöse Mykobakterien
PCR	Polymerasekettenreaktion
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
pDST	phänotypische Medikamentenempfindlichkeitstestung
RR-TB	Rifampicin-resistente Tuberkulose
TB	Tuberkulose
WHO	Weltgesundheitsorganisation

3 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Einschluss von Patienten.....	33
Abbildung 2 Daten zu phänotypischen und genomischen Medikamentenempfindlichkeitstests...	35
Abbildung 3 Verteilung der Ergebnisse von Medikamentenempfindlichkeitstests (MET) durch genomische (Next Generation Sequencing (NGS)) und phänotypische (Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT)) Verfahren	36
Abbildung 4 Übersicht über abweichende Testergebnisse zwischen Vorhersage der Medikamentenresistenz durch NGS und der Medikamentenresistenztestung durch MGIT (Mycobacteria Growth Indicator Tube)	37
Abbildung 5 Von dem Algorithmus abgeleitete Behandlungsschemata auf der Grundlage verschiedener Methoden zur Prüfung der Empfindlichkeit gegenüber Arzneimitteln	42

4 Tabellen

Tabelle 1. Auflistung der kritischen Konzentrationen (KK).....	30
Tabelle 2. Schrittweiser Aufbau eines MDR/RR-Tuberkulose -Behandlungsschemas.....	32
Tabelle 3. Demografische Daten der Studienteilnehmer	34
Tabelle 4. Diagnostische Genauigkeit von genotypischen Medikamentenresistenztestung mittels Next Generation Sequencing (NGS) im Vergleich zu Flüssigkulturen mittels Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT) als Referenzstandard.....	39
Tabelle 5. Diagnostische Genauigkeit der Resistenztestung durch die Minimale Hemmkonzentration mittels Sensititre™ MYCOTBI- und UKMYC-Platten im Vergleich zu Flüssigkulturen mittels Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT) als Referenzstandard	40

5 Tabellen im Anhang

Anhang-Tabelle 1: Einzelheiten zu Diskrepanzen zwischen den Ergebnissen des Next Generation Sequencing (NGS) und der Flüssigkultur (MGIT – Mycobacteria Growth Indicator Tube), einschließlich der entsprechenden Polymorphismen	67
---	----

6 Zusammenfassung

Mit einer jährlichen Anzahl von schätzungsweise 10,6 Millionen neuerkrankten Menschen und einer Anzahl von 1,3 Millionen Toten ist die Tuberkulose die am häufigste zum Tod führende bakterielle Infektionskrankheit weltweit. Die Weltgesundheitsorganisation geht davon aus, dass derzeit 410.000 Menschen pro Jahr an einer Form der Tuberkulose erkranken, gegen die die beiden besten Erstlinienmedikamente, Rifampicin und Isoniazid, nicht mehr wirksam sind. Rifampicin und Isoniazid-resistente Tuberkulose wird als multiresistente Tuberkulose bezeichnet (MDR-TB). In den meisten Ländern wird mit einem raschen molekularen Testverfahren nur eine Resistenz der Tuberkulosebakterien, *Mycobacterium tuberculosis*, gegenüber Rifampicin bestimmt. Da eine Rifampicin-Resistenz (RR-Tuberkulose) fast immer mit einer Isoniazid-Resistenz einhergeht, spricht man auch von MDR/RR-Tuberkulose. Die Heilungschancen einer MDR/RR-Tuberkulose liegen aktuell nur bei 60% und nur 43% der betroffenen Patienten* haben Zugang zu adäquaten Medikamenten. Maßgeschneiderte Behandlungsregime, mit denen sichergestellt ist, dass die verwendeten Medikamente auch wirksam sind, bilden die Voraussetzung, um eine MDR/RR-Tuberkulose erfolgreich zu behandeln.

Durch Mutationen im Genom der Tuberkulosebakterien können diese Resistenzen gegen Antibiotika erwerben. Diese Mutationen können durch Sequenzierungsverfahren identifiziert werden. Die Weltgesundheitsorganisation hat 2021 einen Katalog von Resistenz-assoziierten Mutationen veröffentlicht, dessen Anwendungen es erlaubt, Vorhersagen für das Auftreten von Antibiotikaresistenzen gegenüber 11 Medikamenten und einer Wirkstoffklasse zu treffen. Für eine umfangreiche Vorhersage von Antibiotikaresistenzen kann das gesamte Genom der Bakterien inzwischen kostengünstig sequenziert werden (engl. whole genome sequencing [WGS]). Alternativ werden nur bestimmte Gene sequenziert, in denen Mutationen zu Antibiotikaresistenzen führen können (engl. amplicon sequencing oder targeted sequencing). Ein etabliertes Sequenzierungsverfahren hierbei ist das Next Generation Sequencing (NGS). Für die Medikamente der Erstlinientherapie konnte gezeigt werden, dass, basierend auf den genetischen Informationen, die Wirksamkeit von Behandlungsregimen zuverlässig vorhergesagt werden kann.

* Obwohl in dieser Dissertationsschrift das generische Maskulinum verwendet wurde, sind stets alle Geschlechtsidentifikationen und Personen, die sich keinem Geschlecht zuordnen gleichermaßen gemeint.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es zu untersuchen, ob WGS-basierende Vorhersagen von Antibiotikaresistenzen auch bei der MDR/RR-Tuberkulose zur Erstellung von akkuraten Therapieregimen führten.

Zu diesem Zweck wurden die Profile NGS-basierter Vorhersagen von Antibiotikaresistenzen mit den Ergebnissen phänotypischer Antibiotikaresistenztestung der Tuberkulosebakterien von Patienten mit einer MDR/RR-Tuberkulose verglichen, die zwischen dem 1. Januar 2015 und dem 30. April 2019 in die Medizinische Klinik des Forschungszentrums Borstel aufgenommen worden waren. Anschließend wurde ein standardisierter Behandlungsalgorithmus angewendet, um – basierend auf den Ergebnissen der WGS-basierten Vorhersagen und der phänotypischen Resistenztestungen – individualisierte Therapieregime zu erstellen und zu ermitteln, wie häufig Patienten Antibiotika erhalten würden, gegenüber denen die Tuberkulosebakterien resistent sind, wenn man sich allein auf die WGS-basierten Vorhersagen verlässt.

Insgesamt wurden 70 konsekutive Patienten mit MDR/RR-Tuberkulose retrospektiv in diese Studie eingeschlossen. In 1.048 paarweisen Vergleichen von genotypischen, WGS-basierten und phänotypischen Resistenztestungen gab es 904 (86,3 %) Übereinstimmungen. Davon waren 549 (52,4%) übereinstimmend sensibel und 355 (33,9%) übereinstimmend resistent. In 68 (6,5%) Fällen waren Mutationen im Genom der Tuberkulosebakterien unbekannt. Davon waren 60 (5,7%) nicht mit Antibiotikaresistenzen assoziiert und 8 (0,8%) führten zu Antibiotikaresistenzen, die nicht vorhergesagt werden konnten. In 76 (7,2%) der Fälle traten diskordante Ergebnisse auf. Davon in 64 (6,1%) der Fälle niedrigschwellige Antibiotikaresistenzen, die durch das WGS-Verfahren vorhergesagt wurden, aber auch in 12 (1,1%) Fällen phänotypische Resistenzen, die durch das WGS-Verfahren nicht erkannt wurden.

Unter Anwendung eines standardisierten Behandlungsalgorithmus waren 289/292 (99,0%) aller Medikamente, die anhand der WGS-basierenden Vorhersagen gewählt wurden, auch in der phänotypischen Testung wirksam.

Diese Ergebnisse zeigen überzeugend, dass die WGS-basierten Vorhersagen von Antibiotikaresistenztestungen zur Erstellung individueller und wirksamer Therapieregime zur Behandlung von Patienten mit einer MDR/RR-Tuberkulose in hohem Maße geeignet sind.

7 Summary

With an estimated 10,6 million new cases and 1,3 million deaths each year, tuberculosis is the most common fatal bacterial infectious disease worldwide. The World Health Organization estimates that 410.000 people a year currently contract a form of tuberculosis against which the two best first-line drugs, rifampicin and isoniazid, are no longer effective. Rifampicin and isoniazid-resistant tuberculosis is called multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB). In most countries, only resistance of the tuberculosis bacteria, *Mycobacterium tuberculosis*, to rifampicin is determined with a rapid molecular test procedure. Since rifampicin resistance (RR tuberculosis) is almost always accompanied by isoniazid resistance, it is also referred to as MDR/RR tuberculosis. The chances of curing MDR/RR tuberculosis are currently only 60% and only 43% of affected patients have access to adequate medication. Tailor-made treatment regimen ensuring that the drugs used are also effective are the prerequisite for successfully treating MDR/RR tuberculosis.

Mutations in the genome of tuberculosis bacteria can cause them to acquire resistance to antibiotics. These mutations can be identified by sequencing methods. The World Health Organization has published a catalogue of resistance-associated mutations in 2021, the applications of which allow predictions to be made for the occurrence of antibiotic resistance to 11 drugs and one drug class. For a comprehensive prediction of antibiotic resistance, the entire genome of bacteria can now be sequenced at low cost (whole genome sequencing [WGS]). Alternatively, only certain genes in which mutations can lead to antibiotic resistance are sequenced (amplicon sequencing or targeted sequencing). An established sequencing method is Next Generation Sequencing (NGS). For first-line drugs, it has been shown that the efficacy of treatment regimens can be reliably predicted based on the genetic information. The aim of the present study was to investigate whether WGS-based prediction of antibiotic resistance also leads to the establishment of accurate treatment regimens in MDR/RR tuberculosis.

For this purpose, the profiles of NGS-based predictions of antibiotic resistance were compared with the results of phenotypic antibiotic resistance testing of the tuberculosis bacteria of patients with MDR/RR tuberculosis admitted to the Medical Clinic of the Research Centre Borstel between 1 January 2015 and 30 April 2019. A standardised treatment algorithm was then applied to create individualised treatment regimens based on the results of the WGS-based predictions and phenotypic resistance testing, and to determine how frequently patients would receive antibiotics to which the tuberculosis bacteria are resistant when relying on the WGS-based predictions alone.

A total of 70 consecutive patients with MDR/RR tuberculosis were retrospectively included in this study. In 1.048 pairwise comparisons of genotypic, WGS-based, and phenotypic resistance testing, there were 904 (86,3%) matches. Of these, 549 (52,4%) were matched susceptible and 355 (33,9%) matched resistant. In 68 (6,5%) cases, mutations in the genome of the tuberculosis bacteria were unknown. Of these, 60 (5,7%) were not associated with antibiotic resistance and 8 (0,8%) resulted in antibiotic resistance that could not be predicted. Discordant results occurred in 76 (7,2%) of the cases. Of these, 64 (6,1%) were low-threshold antibiotic resistances predicted by the WGS procedure, but also 12 (1,1%) were phenotypic resistances not detected by the WGS procedure.

Using a standardised treatment algorithm, 289/292 (99,0%) of all drugs selected using the WGS-based predictions were also effective in phenotypic testing.

These results convincingly demonstrate that WGS-based predictions of antibiotic resistance testing are highly suitable for establishing individualised and effective therapeutic regimens for the treatment of patients with MDR/RR tuberculosis.

8 Einleitung

Tuberkulose ist eine Infektionskrankheit, die durch Bakterien des *M. tuberculosis*-complex verursacht wird (1). Auf die Tuberkulose entfallen weltweit mehr Todesfälle als auf jede andere bakterielle Erkrankung (2). Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) schätzt, dass im Jahr 2022 etwa 10,6 Millionen Menschen neu an der Tuberkulose erkrankt sind (2). Insbesondere Tuberkuloseerreger (*Mycobacterium tuberculosis*-complex), die Medikamentenresistenzen aufweisen, stellen eine Herausforderung in der Behandlung der Tuberkulose dar (3). Für das Jahr 2022 gibt die WHO an, dass schätzungsweise 410.000 Menschen an einer Form der Tuberkulose erkrankt sind, bei denen die beiden besten Medikamente der Standardtherapie, Rifampicin und Isoniazid, nicht mehr wirksam sind (2). Tuberkulosebakterien, die gegenüber Rifampicin und Isoniazid resistent sind, werden als multiresistent (engl. multidrug-resistant; MDR) bezeichnet. Da fast alle Stämme von *M. tuberculosis*-complex, die gegenüber Rifampicin resistent (RR) sind, auch gegenüber Isoniazid resistent sind und der Nachweis einer RR-Tuberkulose einfach und schnell in dem gebräuchlichsten automatisierten molekularen Diagnoseverfahren gestellt werden kann, verwendet die WHO auch den Begriff der MDR/RR-Tuberkulose (2).

8.1 Epidemiologie

Die Tuberkulose begleitet den Menschen bereits seit ca. 70.000 Jahren. Genetische Daten deuten auf eine Koevolution von *M. tuberculosis*-complex und *Homo sapiens* mit einem Ursprung in Ostafrika hin (4). Bereits Hippokrates (ca. 460 bis 370 vor Christus) und Claudius Galenus (129 bis 200 nach Christus) beschreiben Tuberkulose-Epidemien und Therapieversuche (5). Robert Koch war der erste, der im Jahr 1882 das Bakterium *M. tuberculosis* als Erreger der Tuberkulose entdeckte und benannte (6). Den Begriff der »Tuberkulose« hatte Lukas Schönlein bereits 50 Jahre zuvor im Jahr 1832 geprägt, nachdem Thomas Morton 1689 in seiner »Phthisiologia« bei den auffälligen Läsionen in der Lunge der Patienten von »Tuberkeln« gesprochen hatte (7). Seit mehr als 100 Jahren gibt es eine Schutzimpfung zur Prävention der Tuberkulose, basierend auf abgeschwächten Kuh-Tuberkulosebakterien, *M. bovis* Bacille Calmette Guérin (BCG). Diese kann das Auftreten der Tuberkulose nicht vollständig verhindern und wirkt nur bei Kindern bis zum 5. Lebensjahr (8). Die BCG-Impfung ist die häufigste verwendete Schutzimpfung für Kinder. Annähernd 90% aller Neugeborenen auf der Welt werden mit der BCG-Impfung geimpft (9). Antibiotika zur Behandlung der Tuberkulose gibt es erst seit Mitte des letzten Jahrhunderts. Dennoch gibt es heute so viele Menschen auf der Welt, die gleichzeitig an einer Tuberkulose erkrankt sind, wie niemals zuvor (2).

Die Anzahl der gemeldeten Neuerkrankungsfälle sank von 7,1 Mio. im Jahr 2019 auf 5,8 Mio. im Jahr 2020. Im Jahr 2021 wurden 6,4 Mio. Fälle und im Jahr 2022 7,5 Mio. gemeldet (2). Laut WHO hatte die Corona-Pandemie einen wesentlichen Einfluss auf diese Meldezahlen und ist ein Grund für die Differenz zwischen den von der WHO modellierten Schätzwerten und den tatsächlich gemeldeten Fällen. Zwei Drittel der Menschen, die eine aktive Tuberkulose entwickelt haben, kamen aus nur 8 Ländern: Indien, Indonesien, China, die Philippinen, Pakistan, Nigeria, Bangladesch und die Demokratische Republik Kongo (2). Es starben im Jahr 2022 nach Schätzungen der WHO 1,3 Mio. Menschen an einer Tuberkuloseinfektion (2).

In der WHO Europa-Region lag die Inzidenzrate der Tuberkulose im Jahr 2022 bei 25 Fällen pro 100.000 Einwohner (2). Die Mortalitätsrate unter HIV-negativen Patienten lag im Jahr 2022 bei 1,9 Verstorbenen pro 100.000 Einwohnern (2). Aufgrund der COVID-19-Pandemie bedingten Ausfälle von Diagnostik und Therapieangeboten kam es in der WHO-Region Europa in den Jahren 2019/2020 jedoch zu einer Stagnation des kontinuierlichen Abfalls und 2021 und 2022 sogar wieder zu einem Anstieg der Inzidenz und der Mortalitätsrate der Tuberkulose (2). Auch in Europa sind medikamentenresistente Formen der Tuberkulose besonders in osteuropäischen Ländern ein zunehmendes Problem. 9 der 30 Länder mit der höchsten MDR/RR- Tuberkulose-Inzidenz befinden sich in der WHO-Region Europa: Aserbaidschan, Belarus, Kasachstan, Kirgisistan, die Republik Moldau, die Russische Föderation, Tadschikistan, die Ukraine und Usbekistan (2). Die WHO schätzt die MDR/RR-Tuberkulose-Fallzahl in der Region Europa für das Jahr 2022 auf 67.000 (2).

In Deutschland meldete das Robert-Koch-Institut für das Jahr 2022 4.076 Tuberkulose-Fälle. Dies entspricht einer Inzidenz von 4,9 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohnern (10).

8.2 *Mycobacterium tuberculosis* – Der Erreger der Tuberkulose

Bei Mykobakterien handelt es sich um unbewegliche, nicht sporenbildende Stäbchenbakterien, die zur Abteilung der Actinobacteria gehören (1). Sie unterscheiden sich maßgeblich von anderen Bakterien, da sie einen hohen Lipidanteil in ihrer Zellwand aufweisen. Dies verleiht ihnen eine hohe Resistenz gegenüber Umwelteinflüssen, aber auch gegenüber dem Immunsystem und vielen Antibiotika (1,7). Neben Erregern der Tuberkulose, die man im *M. tuberculosis*-complex zusammenfasst (*M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. canettii*, *M. bovis*, *M. caprae*, *M. microti*, *M. pinnipedi*, *M. orygis*, *Dassie bacillus*, *M. suricattae*, *M. mungi* und *M. chimpanzee*) gibt es innerhalb der Gattung der Mykobakterien *M. leprae*, als Erreger der Lepra, und annähernd 200 Arten von Nichttuberkulösen Mykobakterien (NTM), die zum Teil auch humanpathogen sind.

8.3 Übertragung und klinische Manifestation

Tuberkulosebakterien werden von Personen, die an einer Lungentuberkulose erkrankt sind, über Tröpfchen in dem Exhalat ausgeschieden. Andere Personen, welche dieselbe Atemluft teilen, können sich somit durch Inhalation anstecken.

Die häufigste Manifestation ist eine Lungentuberkulose. Durch lymphogene und hämatogene Verbreitung können aber auch andere Organe von der Infektion betroffen sein. Die Entwicklung klinischer Symptome zu Beginn einer Tuberkulose ist oft schleichend (11,12). Häufige Symptome sind Fieber, Nachtschweiß und Gewichtsverlust (7). Je nach Lokalisation kommt es zu unterschiedlichen organspezifischen Symptomen: Im Falle der Lungentuberkulose Husten oder Luftnot, bei Befall des Skeletts Gelenkschmerzen, bei einer Infektion des zentralen Nervensystems Kopfschmerzen, Bewusstseinsstörungen und neurologische Defizite, bei kardialer Beteiligung zu Luftnot und/oder Herzrhythmusstörungen (13). Eine Beteiligung des Urogenitaltrakts bleibt lange symptomfrei (7).

8.4 Diagnose

Das klassische mikroskopische Nachweisverfahren ist die Färbung von Mykobakterien mit der Mischung Ziehl-Neelsen bzw. Kinyoun. Man nutzt hierbei die Eigenschaften der mykolsäurehaltigen Zellwände der Mykobakterien, welche die Farbstoffe (Carbolfuchsin und Methyleneblau (14)) auch nach Säurebehandlung nicht mehr abgeben. Daher spricht man bei Mykobakterien auch von »säurefesten Stäbchen«. Das Vorliegen säurefester Stäbchen in Sputum oder anderen Sekreten/Geweben weist meist auf eine Tuberkulose hin, allerdings imponieren auch nicht tuberkulöse Mykobakterien als säurefester Stäbchen, sodass der mikroskopische Nachweis nicht diagnostisch ist. Molekulare Testverfahren wie die Polymerasekettenreaktion (PCR) können Gensequenzen amplifizieren, die spezifisch für Mykobakterienarten sind. Dafür nutzen diese Verfahren spezifische Primer (7). Das aktuell weltweit am häufigsten verwendete PCR-Verfahren, GeneXpert-Ultra MTB/RIF (Cepheid, Sunnyvale, CA, USA) zeigt eine Sensitivität von 88 % und eine Spezifität von 96% und kann auch bei 63% der Patienten mit einer Lungentuberkulose die Erkrankung diagnostizieren, wenn keine säurefesten Stäbchen nachweisbar sind (15).

Goldstandard für die Tuberkulosedagnostik ist der kulturelle Nachweis der Bakterien in Flüssigkulturen (z.B. Mycobacteria growth indicator tubes [MGIT], Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) oder auf Festmedium (Löwenstein-Jensen). Der kulturelle Nachweis der Bakterien innerhalb weniger Tage ist sehr selten. In Flüssigkulturen dauert der Nachweis meist 2-6 Wochen, in Festkulturen etwas länger (1,16).

Die WHO empfiehlt in ihren neuesten Leitlinien zur schnellen Diagnose der Tuberkulose bereits weitere molekulare Techniken wie Nukleinsäureamplifikationsverfahren für die Erkennung der Erkrankung, aber auch von möglichen Antibiotikaresistenzen (17).

Neben labortechnischen Untersuchungen spielt die bildgebende Diagnostik wie die Röntgen-Thorax-Aufnahme oder die thorakale Computertomografie eine große Rolle für die Diagnose, aber auch für die Klassifikation der Tuberkulose, die Einschätzung der Schwere und das Therapieansprechen der Erkrankung (18,19). Das PET/CT wird selten in der Diagnostik der extrapulmonalen Tuberkulose eingesetzt (20).

8.5 Therapie

Aufgrund der langen Generationszeit der Mykobakterien, im Gegensatz zu anderen Bakterien, ergeben sich Besonderheiten hinsichtlich der Therapie mit Antibiotika. Nach der Entdeckung des Streptomycins, des ersten Antibiotikums gegen die Tuberkulose im Jahr 1946, wurde schnell deutlich, dass die Gabe einer einzelnen Substanz zu Therapieversagen und Medikamentenresistenzen führt (21). Daher wird grundsätzlich eine Kombination mehrerer Wirkstoffe eingesetzt, um die Entstehung von Resistenzen zu verhindern. Schon seit dem Jahr 1970 besteht die aktuelle Standardtherapie der medikamentensensiblen Tuberkulose aus einer 4-fach-Kombination mit den Antibiotika Rifampicin, Isoniazid, Ethambutol und Pyrazinamid für die ersten 2 Monate. Es folgt eine 2-fach-Kombination mit Rifampicin und Isoniazid für weitere 4 Monate (1,21,22). Eine längere Gesamttherapiedauer ergibt sich etwa bei einer Affektion der Knochen auf insgesamt 9 Monate oder dem Befall der Meningen auf mindestens 12 Monate (22).

Für Kinder zwischen dem 3. Lebensmonat und dem 16. Lebensjahr mit einer medikamentensensiblen Tuberkulose wird eine 4-monatige Therapie mit Isoniazid, Rifampicin, Pyrazinamid und Ethambutol in den ersten beiden Monaten und zwei Monate mit Isoniazid und Rifampicin empfohlen. In den USA besteht bei Patienten ab dem 12. Lebensjahr die Möglichkeit eines 4-monatigen Regimes mit Rifapentin, Moxifloxacin, Isoniazid und Pyrazinamid (23). Da Rifapentin in Europa keine Zulassung hat, kommt diese Therapie in Europa aktuell nicht in Betracht (24).

8.6 Antibiotikaresistenzen

Die WHO schätzt, dass im Jahr 2022 in 410.000 Fällen eine Tuberkulose aufgetreten ist, bei der die Bakterien gegen das wirksamste Medikament der Standardtherapie, Rifampicin, resistent sind (Rifampicin-resistente Tuberkulose; RR-Tuberkulose). Bakterien, die gegen Rifampicin und Isoniazid resistent sind, bezeichnet man als multiresistent (engl. multidrug-resistant tuberculosis; MDR-TB). MDR-Tuberkulose und RR-Tuberkulose werden als MDR/RR-Tuberkulose zusammengefasst (25). Nur etwa 43% der an MDR/RR-Tuberkulose erkrankten Menschen erhält aktuell eine Therapie (2). Limitierte Diagnose- und Screeningmöglichkeiten in Schwellenländern aufgrund knapper Personal- und Finanzierungsressourcen sind wichtige Gründe für diese Diskrepanz (26).

Wenn bei einer MDR/RR-Tuberkulose die Bakterien zusätzliche Resistenzen gegenüber Fluorchinolonen haben, spricht man von prä-extensiv-resistenter (XDR)-Tuberkulose (25). Zu den Fluorchinolonen der neueren Generation, die in der Tuberkulosetherapie verwendet werden, gehören Levofloxacin und Moxifloxacin. Wenn zusätzlich noch Resistenzen gegen über Bedaquilin und/oder Linezolid vorliegen, sind die Kriterien für eine extensiv-resistente (XDR)-Tuberkulose erfüllt (25).

Die Medikamente zur Therapie der MDR/RR-Tuberkulose werden von der WHO aktuell in 3 Gruppen eingeordnet: Gruppe A beinhaltet die Fluorchinolone Levofloxacin und Moxifloxacin, Bedaquilin und Linezolid. Diese Medikamente gelten als hocheffektiv und werden in jedem Regime empfohlen, insofern keine Kontraindikation besteht. Gruppe B beinhaltet Clofazimin sowie Cycloserin und Gruppe C beinhaltet Ethambutol, Pyrazinamid, Delamanid, Imipenem oder Meropenem, Amikacin, Ethionamid oder Prothionamid und p-Aminosalicylsäure (PAS) (27).

Mycobacterium tuberculosis-complex besitzt keine Plasmide, daher sind Antibiotikaresistenzen genetisch determiniert und entstehen durch Mutationen im Genom (28). Diese können spontan auftreten oder, nach den Erkenntnissen von Charles Darwin, durch Selektionsdruck auf die Population, etwa bei einer insuffizienten Behandlung, entstehen. Durch diesen Prozess entwickeln sich stetig neue Resistenzen. So auch mittlerweile gegen die modernsten und wirksamsten Substanzen, die derzeit zum Einsatz kommen wie Bedaquilin und Clofazimin (29). Neben der Selektion kommt es durch die Weitergabe zwischen Individuen zu einer globalen Transmission resistenter Stämme (28).

Eine bedeutsame Herausforderung ist die schnelle und zuverlässige Erkennung von Antibiotikaresistenzen, um wirkungsvolle Therapieregime zusammenstellen zu können (30). Bis zum Jahr 2022 lautete die Empfehlung für die Dauer der Therapie der MDR/RR-, prä-XDR- und XDR-Tuberkulose mindestens 18 Monate (31). Basierend auf Ergebnissen klinischer Studien hat sich die präferierte Therapie der MDR/RR-, prä-XDR-Tuberkulose auf 6 Monate verkürzt (32).

Eine besondere Herausforderung stellt nun die rasche Diagnostik von Antibiotikaresistenzen dar, da aktuell verfügbare Testsysteme zur schnellen Erfassung von Antibiotikaresistenzen nur Resistenzen gegenüber einem der vier Komponenten des neuen WHO-Therapieregimes zur Behandlung der MDR/RR-, prä-XDR-Tuberkulose erlauben (33).

8.6.1 Diagnostik von Resistenzen

Mit der Diagnose der Tuberkulose sollte eine Testung der Medikamentenempfindlichkeit der Erreger einhergehen (22), um personalisierte Therapieregime zusammenstellen zu können. Hierbei müssen Wechselwirkungen mit anderen Medikamenten, Unverträglichkeiten und die Resistenzeigenschaften des Bakteriums beachtet werden. Daher ist eine rasche und genaue Identifizierung des Empfindlichkeitsmusters des Mycobacterium-tuberculosis-Infektionsstammes unerlässlich (34).

Hierfür stehen Verfahren der Anzucht der Bakterien in flüssiger oder fester Kultur als Goldstandard zur Verfügung (17). Außerdem kann man anhand von Mutationen im Genom von *M. tuberculosis*-complex Vorhersagen für das Vorliegen von Resistenzen gegenüber einzelnen Antibiotika treffen (35).

8.6.1.1 Phänotypische Resistenztestung

Das derzeitige Standardvorgehen zur Testung der Antibiotikaresistenz besteht in der Anzucht des Bakteriums aus einer Probe des Patienten. Diese Probe besteht meist aus Sputum. Es kann sich aber auch um Ascites, Biopsie-Material, Blut, Eiter, Liquor, Magensaft, Pleuraerguss oder Urin handeln. Diese Probe wird in einem Nährmedium kultiviert, welchem eine bestimmte Konzentration des zu testenden Antibiotikums beigefügt ist. Kommt es zum Wachstum von *M. tuberculosis* in dem Medium, besteht, diesem Testverfahren zufolge, eine Resistenz gegenüber dem getesteten Antibiotikum.

8.6.1.1.1 Mycobacteria Growth Indicator Tube

Dieses Wachstum kann automatisiert in speziellen Maschinen detektiert werden. Das bekannteste System hierfür ist BACTEC MGIT. Neben einem flüssigen Nährmedium enthält das Teströhrchen zusätzlich ein Fluorochrom. Wenn der freie Sauerstoff durch einen wachsenden bakteriellen Organismus verbraucht wird, wird das Fluorochrom nicht mehr gehemmt, was zu einer Fluoreszenz innerhalb des BACTEC MGIT-Röhrchens führt. Diese wird durch das Gerät BACTEC MGIT detektiert. Die Intensität der Fluoreszenz ist direkt proportional zum Ausmaß des Sauerstoffverbrauchs und damit des Wachstums (36).

Die Prüfung der Medikamentenempfindlichkeit wird nach demselben Prinzip durchgeführt. Es handelt sich um eine modifizierte Proportionsmethode (37). Ein Test- sowie ein Kontrollröhrchen werden mit der Testkultur beimpft. Die Bakterienmenge in dem Kontrollröhrchen entspricht 1% der Bakterienmenge derer in dem Teströhrchen. Dem Teströhrchen wird eine bekannte Konzentration der zu prüfenden Substanz zugesetzt und das Wachstum wird mit dem des Kontrollröhrchens (ohne die Substanz = Wachstumskontrolle) verglichen. Wenn das Testmedikament gegen die isolierten Mykobakterien wirksam ist, hemmt es das Wachstum und führt so zu einer Unterdrückung der Fluoreszenz, während die Wachstumskontrolle ungehemmt wächst und eine zunehmende Fluoreszenz aufweist. Das Wachstum wird mit dem Gerät BACTEC MGIT überwacht, welches die Ergebnisse automatisch als empfindlich oder resistent interpretiert (36).

Auf diese Weise können mehrere Medikamente parallel auf ihre Medikamentenresistenz hin in BACTEC MGIT getestet werden. Obwohl es sich hierbei um den derzeitigen Goldstandard der mykobakteriellen Resistenztestung handelt, sind kulturbasierte Verfahren nicht optimal (35). Neben der Notwendigkeit von Hochsicherheitslaboren mit speziellen Anforderungen sind die Testverfahren aufgrund der langen Generationszeit von *M. tuberculosis*-complex sehr langsam (38). Die Interpretation der Ergebnisse kann erst nach mehreren Wochen erfolgen.

8.6.1.1.2 Kritische Konzentration

Die kritische Konzentration (KK) bezeichnet die im Kulturmedium enthaltene Arzneimittelkonzentration. Es handelt sich um die niedrigste Konzentration eines antituberkulösen Wirkstoffs *in vitro*, die das Wachstum von 99 % der phänotypischen Wildtyp-Stämme des *M. tuberculosis*-complex hemmt (39). Diese Konzentrationen beruhen nicht auf pharmakokinetischen oder pharmakodynamischen Untersuchungen, sondern wurden experimentell durch den Vergleich des Wachstums von Wildtyp- und Nicht-Wildtyp-Stämmen bestimmt (38). Die Festlegung der Schwellenwerte der einzelnen Medikamente, welche die Grenze zwischen den medikamentensensiblen und den medikamentenresistenten Populationen definiert, ist Gegenstand aktueller Forschung (40–47).

8.6.1.1.3 Minimale Hemmkonzentration

Eine diffizilere, kulturbasierte und somit phänotypische Methode stellt die sogenannte Minimale Hemmkonzentration (MHK) dar. Diese ist in der Mykobakterien-Diagnostik kein Standard, sondern ein experimentelles Verfahren. Genutzt werden MHK-Platten mit Vertiefungen (engl. wells). Es handelt sich um eine »absolut concentration method«. Das bedeutet, dass sowohl in dem »well« ohne Medikamentenzusatz (Wachstumskontrolle) als auch in den »well« mit Medikamentenzusatz dieselbe Bakterienmenge vorliegt. Die Prüfsubstanz wird, gemeinsam mit dem Nährmedium und den Bakterien, bei diesem Verfahren nicht nur in einer (kritischen) Konzentration eingebracht,

sondern parallel in verschiedenen, aufsteigenden Konzentrationen getestet (35). Die Platten werden bebrütet und das Wachstum wird regelmäßig abgelesen. Die Antibiotikakonzentration in jenem ersten »well« in der Reihe, in dem ein Wachstum ausbleibt, obwohl ein Wachstum in der Kontrollvertiefung sichtbar ist, entspricht der minimalen Hemmkonzentration (35), also die Menge an Antibiotikum, welche das Wachstum des Bakteriums erliegen lässt.

8.6.1.2 Molekulare Testung als Verfahren zur Diagnostik von Resistenzen

Über die Assoziation zwischen der Mutation auf molekularer Ebene und der Resistenz, welche sich im Phänotyp zeigt, ist bereits bekannt, dass die Arzneimittelresistenzen von *M. tuberculosis*-complex-Isolaten durch chromosomale Variationen verursacht werden (28). Diese zeigen sich vorwiegend als Einzelnukleotidpolymorphismen sowie durch Insertionen und Deletionen in bestimmten Positionen, sog. Loci, des Genoms (28). Hierbei führen jedoch nicht alle Mutationen zu phänotypischem Resistenzverhalten, da auch phylogenetische Marker und neutrale Polymorphismen in diesen Regionen gefunden werden können (34).

Molekulare Technologien nutzen dieses Wissen und die WHO empfiehlt in ihren Richtlinien zur Diagnostik der Tuberkulose genotypische Verfahren zur Bestimmung der Resistenzlage (17). Dazu gehören die »line-probe assays« (LPAs), wie etwa GenoType® MTBDRs/ und MTBDRplus von Hain Lifesciences/Bruker. Diese Assays basieren auf der Anheftung von Sonden, welche spezifisch für jene mutierten Regionen auf dem Tuberkulose-Genom sind, die mit Resistenzen gegen bestimmte Medikamente assoziiert sind. MTBDRplus weist Mutationen nach, die Resistenzen gegen Rifampicin und Isoniazid verursachen. MTBDRs/ erkennt zusätzlich Mutationen in Genen, welche für Resistenzen gegen Fluorchinolone und Amikacin verantwortlich sind (34). Nipro Genoscholar PZA-TB II (Nipro Corporation, Osaka, Japan) ist in der Lage, mit Pyrazinamid-Resistenz assoziierte *pncA*-Mutationen nachzuweisen (34).

Hinzu kommen Nukleinsäureamplifikationsverfahren wie Xpert® MTB/RIF Ultra von Cepheid, Truenat™ MTB von Molbio Diagnostics oder Abbott RealTime MTB RIF/INH von Abbott. Diese Verfahren weisen Resistenzen sowohl bei Erst- als auch einzelnen Zweitlinienmedikamenten innerhalb weniger Minuten bis Stunden nach. Eine vorausgehende Kultivierung der Patientenprobe ist nicht notwendig und die Sicherheitsanforderungen an die Labore sind geringer als bei Anzuchtverfahren (17,48). Ein entscheidender Nachteil dieser molekularen Verfahren ist, dass sie nur auf eine kleine Anzahl von resistenzverursachenden Mutationen abzielen (49,50). So weist das weltweite Standardverfahren Xpert® MTB/RIF Ultra durch die Amplifikation einer 81 Basenpaare langen Sequenz im *rpoB*-Gen binnen 1,5 Stunden Mutationen nach, die eine Aussage über die Antibiotikaresistenz für Rifampicin zulassen. Die häufigste Mutation tritt an der 450. Stelle der

Proteinebene dieses Gens auf. Hier wurde die Aminosäure Serin gegen Leucin ersetzt (34). Das System Xpert® MTB/RIF Ultra erreicht, im Vergleich zum Vorgängermodell Xpert® MTB/RIF, zwar eine geringere Spezifität, aber dafür eine höhere Sensitivität bei der Erkennung einer Tuberkulose. Beide Systeme schnitten bei dem Nachweis der Rifampicin-Resistenz ähnlich gut ab (15). Eine besondere Ausnahme bei der Nutzung von Xpert® MTB/RIF oder Xpert® MTB/RIF Ultra stellt die Mutation I491F dar, welche vor allem bislang in Eswatini beobachtet wurde. Da diese Mutation außerhalb des Bereichs der 81 Basenpaare liegt, wurde sie durch die Xpert® MTB/RIF Systeme nicht erkannt (51,52).

Xpert® MTB/XDR wurde zum Nachweis der Tuberkulose und der Prüfung der Resistenz gegenüber Isoniazid, Fluorchinolone, Ethionamid und Amikacin entwickelt. Dieses Verfahren zeigt eine hohe Sensitivität und Spezifität von >90% bei der Erkennung einer Resistenz gegenüber Isoniazid, Fluorchinolonen und Ethionamid. Die Sensitivität und Spezifität von Xpert MTB/XDR bei der Resistenztestung von Amikacin liegen bei 86,1 % respektive 98,9 % im Vergleich zur phänotypischen Testung (53).

Die neue Therapieempfehlung der WHO zur Behandlung der MDR/RR-Tuberkulose sieht das 6-monatige BPaLM-Schema, bestehend aus Bedaquilin, Pretomanid, Linezolid und Moxifloxacin, vor (54). In der TB PRACTECAL Studie wurde eine Überlegenheit dieses oralen Therapieschemas gegenüber einem 9-monatigen Standard-Therapieschema gezeigt (55).

Weder Xpert® MTB/RIF oder Xpert® MTB/RIF Ultra noch GenoType® MTBDRs/ oder Xpert® MTB/XDR liefern die Möglichkeit, die Wirksamkeit von BPaLM vorherzusagen, da diese Tests nur Vorhersagen für Antibiotikaresistenzen gegenüber Fluorchinolonen als Teil von BPaLM erlauben.

8.6.1.2.1 Next Generation Sequencing (NGS)

Eine umfangreichere Analyse des Genoms ist durch neue Sequenzierungsverfahren einfacher, kostengünstiger und schneller geworden. Den wesentlichen Durchbruch brachte hierbei die Einführung der Technologie NGS (56). NGS bietet sowohl die Möglichkeit der Gesamtgenomsequenzierung als auch die gezielte Sequenzierung einzelner Abschnitte, etwa wenn diese hochspezifisch für resistenzerzeugende Mutationen sind. Dieses Verfahren wird als targeted Next Generation Sequencing (tNGS) bezeichnet.

In den aktuellen Richtlinien der WHO wird NGS als Verfahren genannt und bekommt dadurch einen neuen Stellenwert in der Behandlung der Tuberkulose (27). Im Jahr 2017 führte Public Health

England (PHE) die routinemäßige Nutzung von WGS im klinischen Umfeld des National Health Service (NHS) ein (57); England war somit das erste Land der Welt, welches diese Methode auf Bevölkerungsebene für die Diagnose der Tuberkulose, den Nachweis von Arzneimittelresistenzen und die Typisierung von *M. tuberculosis* einsetzte (57,58).

Obwohl es derzeit noch keinen offiziellen Standard für die Sequenzierung mittels NGS gibt, folgen die Verfahren einem festgelegten Ablauf. (1) Die DNS wird zunächst aus klinischen Proben oder kultivierten Isolaten extrahiert (2) und anschließend einer enzymatischen Verarbeitung unterzogen; (3) mehrere DNS-Fragmente (sogenannte Short-Reads) werden parallel sequenziert, (4) und daraufhin für die bioinformatische Analyse verwendet, um die einzelnen Reads dem Referenzgenom (häufig *M. tuberculosis* Stamm H37Rv) zuzuordnen. Da jede DNS-Base mehrfach sequenziert wird, bietet dieses Verfahren eine hohe Genauigkeit, um verlässliche Daten über das Vorkommen genetischer Polymorphismen zu liefern (39,59).

8.6.1.2.2 Targeted Sequencing

Resistenztestverfahren wie die beschriebenen LPAs oder die Xpert® Verfahren zielen nur auf bestimmte Zielregionen ab, die mit einer Resistenz assoziiert sind. Die Anzahl der Medikamente, die von diesen Tests abgedeckt werden, sind begrenzt und es werden keine Informationen über die genaue Nukleotidveränderung ausgegeben (50).

Beim tNGS werden ausgewählte Bereiche des bakteriellen Genoms sequenziert. Deeplex Myc-TB (Genoscreen, Lille, FR) liefert derzeit Sequenzinformationen über 18 Genloci, in denen Mutationen auftreten, die mit der Resistenz gegenüber 13 Medikamenten assoziiert sind. Diese Substanzen sind Rifampicin, Isoniazid, Bedaquilin, die Fluorchinolone Levofloxacin und Moxifloxacin, Linezolid, Clofazimin, Ethambutol, Pyrazinamid, Streptomycin, Ethionamid, Prothionamid, Kanamycin und Capreomycin (34). Eine zuverlässige direkte Resistenztestung dieser Antibiotika aus klinischen Proben konnte in Studien bereits gezeigt werden, wenn säurefeste Stäbchen unter dem Mikroskop sichtbar waren (60–63). Und dennoch bietet dieses auch vergleichbare tNGS-Verfahren wie Next Gen-RDST (64) oder AmpliSeq TB (65) noch nicht die Möglichkeit zur vollständigen Testung der Substanzen des neuen BPaLM-Schemas (34,66).

8.6.1.2.3 Gesamtgenomsequenzierung

Die Gesamtgenomsequenzierung (engl. whole genome sequencing [WGS]) stellt hingegen Sequenzinformationen des gesamten bakteriellen Genoms zur Verfügung.

Die in den 1970er Jahren entwickelte Sanger-DNS-Sequenzierung ermöglichte die ersten Gen- und Genomsequenzen, blieb jedoch aufgrund der Komplexität und der hohen Sequenzierungskosten

bei der Anwendung auf ausgedehnte Genomregionen in ihrer Anwendung beschränkt (50). Mitte der 2000er Jahren sanken die Kosten durch die Entwicklung der NGS-Methoden signifikant und die Sequenzierungsleistung stieg enorm an. Eine komplette Sequenzierung vor allem kleinerer Genome wie bei Bakterien wurde durch diese neue Technologie kostengünstig (50).

Zu den verfügbaren und weltweit genutzten Plattformen für die Medikamentenresistenztestung gehören MiSeq™ (Illumina, San Diego, CA), Scientific Ion Personal Genome Machine™ (ThermoFisher Scientific; Waltham, Massachusetts, USA), MinION (Oxford Nanopore Sequencing Technologie; Oxford, United Kingdom). Diese Systeme unterscheiden sich sowohl in ihrer Probenkapazität pro Lauf, in den Kosten pro Probe als auch in der Sequenzierungsdauer. So kostet etwa die Sequenzierung einer Probe mit der Plattform MiSeq™ 22,41 \$ bei einer Sequenzierungsdauer von 39 Stunden pro Lauf (39). Im Schnitt benötigt die Erstellung eines Resistenzprofils per NGS für tNGS oder WGS unter Betriebsbedingungen 7-10 Arbeitstage (34).

WGS kann das Vorhandensein oder Fehlen von Insertionen oder Deletionen bestätigen und auch das Auftreten seltener Mutationen im gesamten Genom identifizieren (39). WGS hat daher das Potenzial, alle mit einer Medikamentenresistenz verbundenen Mutationen in einem bestimmten klinischen *M. tuberculosis*-Complex-Isolat zu identifizieren (67) und damit auch die Komponenten neuer Regime wie BPaLM abzudecken. In Mutationskatalogen sind die Stellen des Genoms verzeichnet, welche mit einer resistenzbestimmenden Mutation assoziiert sind. Diese Kataloge werden stetig weiterentwickelt und auch für neuste Medikamente wie Pretomanid liegen bereits Informationen über Mutationen vor, die zu einer phänotypischen Resistenz führen können (68).

8.6.1.2.4 Mutationskataloge

Aufgrund der Klonalität ihrer Genome und ihrer Unfähigkeit zum lateralen Gentransfer erwerben *M. tuberculosis*-complex-Stämme Arzneimittelresistenz hauptsächlich durch Varianten in Kern- oder Promotor-Genen (59). Arzneimittelresistenz- und -empfindlichkeitsprofile können mit hoher Genauigkeit für viele zur Behandlung der Tuberkulose verwendete Arzneimittel bestimmt werden, indem die identifizierten Varianten mit Katalogen von Varianten verglichen werden, die mit hoher Wahrscheinlichkeit eine Resistenz begründen (59). Es sind hochwertige und umfassende Kataloge genetischer Resistenzmarker erforderlich, um signifikante Varianten von solchen zu unterscheiden, die nicht an der Entstehung von Resistenzen beteiligt sind.

Einige Arzneimittel haben komplexere Resistenzeigenschaften als andere. Ein genaues Verständnis der Auswirkungen einer bestimmten Mutation eröffnet nicht nur die Fähigkeit das Vorhandensein

einer Resistenz vorherzusagen, sondern auch dessen Ausmaß in Bezug auf eine erhöhte Minimale Hemmkonzentration oder das Therapieversagen eines bestimmten Medikaments (31,34,69).

Um die phänotypischen Eigenschaften der Bakterienstämme mit den molekularen Informationen zu korrelieren, sind Untersuchungen an Patientenkollektiven notwendig. Erhoben werden die genetischen Abweichungen zu medikamentensensiblen Wildtypstämmen mit den Ergebnissen aus Anzuchtverfahren wie MGIT oder MHK. Studien zeigten eine hohe Übereinstimmung zwischen phänotypischen und genotypischen Vorhersagen, unabhängig von der verwendeten Sequenzierungsplattform (59). In den letzten Jahren wurden mit Hilfe standardisierter statistischer Ansätze große Fortschritte bei der Verknüpfung von Genotyp und Resistenzphänotyp erzielt (31,70). Stetig wird dieses Wissen durch neue Assoziationsstudien ergänzt (71,72) und in Mutationskatalogen gesammelt (39,44,45).

Das CRYPTIC-Konsortium hat das Ziel, in großem Umfang den Zusammenhang zwischen genetischen Variationen und MHK-Veränderungen zu verstehen. In einer Studie des Projekts »Comprehensive Resistance Prediction for Tuberculosis: an International Consortium« (CRYPTIC) aus dem Jahr 2018 konnte die Anwendbarkeit von WGS für die Erstlinienmedikamente bereits gezeigt werden. Die Sensitivität und Spezifität von Resistenzvorhersagen mittels WGS für Rifampicin, Isoniazid, Ethambutol und Pyrazinamid liegen bei über 90 % (73).

Daher wird die Frage umso relevanter, wie gut die Ganzgenomsequenzierung in der Lage ist, die Resistenzlage von Zweilinienmedikamenten vorherzusagen und ob durch diese Informationen die Zusammenstellung eines suffizienten Therapieregimes möglich ist.

In dieser Arbeit wurden genotypische und phänotypische Resistenzprofile von an der Tuberkulose erkrankten Patienten der Medizinischen Klinik Borstel mithilfe von NGS und MGIT erstellt und miteinander verglichen. Zusätzlich wurden mit einem phänotypischen Verfahren MHKs bestimmt. Zeigten sich genotypische und phänotypische Ergebnisse diskrepant, wurden die MHK-Werte für eine diffizilere Betrachtung der Resistenzeigenschaften genutzt.

Es ergeben sich für diese wissenschaftliche Arbeit die folgenden Fragestellungen:

8.7 Fragestellungen dieser Arbeit

1. Kann die Identifizierung von Mutationen im Genom der Tuberkulosebakterien die Ergebnisse der phänotypischen Resistenztestung bei Patienten mit einer MDR/RR-Tuberkulose vorhersagen und wie hoch sind die Übereinstimmungen der Vorhersagen?
2. Wie oft treten diskrepante Ergebnisse auf, bei denen die genotypischen Vorhersagen nicht mit den Ergebnissen der phänotypischen Resistenztestung übereinstimmen?
3. Welchen Stellenwert haben Mutationen, die nicht in dem Mutationskatalog verzeichnet sind?
4. Wie unterscheiden sich Therapieregime zur Behandlung von Patienten mit einer MDR/RR-Tuberkulose basierend auf den Ergebnissen genotypischer Vorhersagen von Antibiotikaresistenzen und tatsächlich gemessenen phänotypisch ermittelten Antibiotikaresistenzen, wenn man für die Ergebnisse beider Verfahren denselben Therapiealgorithmus anwendet?

9 Methoden

9.1 Studiendesign und Studienteilnehmer

Alle Patienten, bei denen zwischen dem 1. Januar 2015 und dem 30. April 2019 in der Medizinischen Klinik Borstel die Diagnose einer MDR/RR-Tuberkulose gestellt wurde, wurden konsekutiv in die Kohorte der vorliegenden Arbeit eingeschlossen. Die Diagnosestellung erfolgte mittels Xpert MTB/RIF oder der phänotypischen Resistenztestung MGIT in dem System BACTEC MGIT 960. Nach der Diagnosestellung erfolgte die Bestimmung der Resistenzmuster mittels MGIT, Next Generation Sequencing (Illumina Technology mit Nextera XT library preparation kits (Illumina, San Diego, CA)) und der minimalen Hemmkonzentration (MHK; TREK Sensititre MYCOTBI und UKMYC (ThermoFisher, Waltham, MA)) aus Sputumproben der Patienten.

Voraussetzung für die Einbindung in die finale Analyse war das Vorhandensein eines vollständigen Datensatzes. Als vollständig galt ein Datensatz, wenn 1. die genomische Resistenztestung erfolgreich mittels NGS durchgeführt wurde und entsprechende Resistenzmuster für alle in dieser Studie betrachteten Medikamente vorlagen; 2. nicht mehr als ein MGIT-Ergebnis und 3. nicht mehr als drei Sensititre MYCOTBI- und UKMYC-Ergebnisse fehlten. Nicht in die Studie eingeschlossen wurden Patienten, welche das 18. Lebensjahr zum Zeitpunkt der Diagnosestellung nicht erreicht hatten.

9.2 Genotypische Resistenztestung

9.2.1 Präanalytische Phase:

Die Gewinnung der Sputumproben sowie deren Transport und Kultivierung erfolgten gemäß des MIQ Tuberkulose Mykobakteriose Qualitätsstandards (16) in dem S3-Labor des Nationalen Referenzzentrums Borstel, wo nach erfolgter Kultivierung auch die DNS nach folgendem Vorgehen extrahiert wurde:

Überführung einer entsprechenden Menge Zellen (so viel wie möglich) mit einer Impföse in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß mit 400 µl 1x Tris-Ethylendiamintetraessigsäure-Puffer (TE-Puffer); Inkubation der Reaktionsgefäße für 20 min bei 80°C im Wasserbad; Zugabe von 50 µl 10 mg/ml Lysozym-Lösung, vortexen und mindestens 1 Stunde (bis über Nacht) bei 37°C im Wasserbad inkubieren; Zugabe von 75 µl Natriumlaurylsulfat (SDS)/ProteinaseK-Lösung (Mix: 5 µl ProteinaseK (10 mg/ml) + 70 µl 10 % SDS für jede Probe), kurz vortexen und 10 min bei 65°C im Wasserbad inkubieren; Zugabe von 100 µl 5M NaCl; Zugabe von 100 µl Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB)/NaCl-

Lösung (vorgewärmt bei 65°C aufgrund der hohen Viskosität), vortexen, bis die Flüssigkeit weiß (milchig) wird, anschließend für 10 min bei 65°C im Wasserbad inkubieren; Zugabe von 750 µl Chloroform/Isoamylalkohol-Lösung (24:1), 10 sec vortexen und bei Raumtemperatur für 15 min mit 12000 g zentrifugieren; Überführen des wässrigen Überstandes in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß; Zugabe von 0,6 Volumen (450 µl) Isopropanol, vorsichtig invertieren und anschließend für mindestens 30 min bei -20°C inkubieren; 15 min bei Raumtemperatur mit 12000 g zentrifugieren; Überstand abgießen und verwerfen und 500 µl kalten 70 % Ethanol zugeben; 5 min bei Raumtemperatur mit 12000 g zentrifugieren; Überstand abgießen und verwerfen; 5 min bei Raumtemperatur mit 12000 g zentrifugieren; Überstand quantitativ steril abziehen; Reaktionsgefäße (offen) für 20 min bei 60°C trocknen (bzw. alternativ für 1 h bei RT); Zugabe von 80 µl TE-Puffer; Reaktionsgefäß schließen und kurz vortexen; geschlossene Reaktionsgefäße für 20 min bei 60°C inkubieren. Die isolierte DNS ist bereit für die Sequenzierung.

9.2.2 Analytische Phase

Die genotypische Vorhersage der Medikamentenempfindlichkeit und -resistenz wurde durch Gesamtgenomsequenzierung mit Illumina-Technologie (MiSeq, NextSeq 500) unter Verwendung Nextera XT library preparation kits (Illumina, San Diego, CA, USA) im Labor für Molekulare und Experimentelle Mykobakteriologie des Forschungszentrums Borstel (Prof. Dr. rer. nat. S. Niemann) durchgeführt.

9.2.3 Postanalytische Phase

Die Fastq-Dateien wurden an das Europäische Nukleotidarchiv unter der Studien-Zugangsnummer PRJEB38780 übermittelt und mit der MTBseq-Pipeline (74) durch einen Referenz-Mapping-Ansatz unter Verwendung des H37Rv-Referenzgenoms (GenBank ID: NC_000962.3) analysiert. Berücksichtigt wurden Varianten (Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNPs), kurze Insertionen und Deletionen) mit einer Mindestabdeckung von vier Reads sowohl in Vorwärts- als auch in Rückwärtsrichtung. Diese vier Reads mussten das Allel mit einem phred-Score von mindestens 20 benennen und eine Allelfrequenz von 75 % aufweisen. Die genotypische Resistenz wurde auf der Grundlage eines Mutationskatalogs abgeleitet, der am Supranationalen Referenzzentrum am Forschungszentrum Borstel auf der Grundlage der am 12.10.19 verfügbaren Informationen verwendet wurde (75). Der Katalog wurde auf der Grundlage der folgenden Voraussetzungen erstellt: 1. Einbeziehung von Mutationen, die im WHO-Bericht »*The use of next-generation*

sequencing technologies for the detection of mutations associated with drug resistance in Mycobacterium tuberculosis complex: technical guide« (39) aufgeführt sind; 2. Einbeziehung des CRyPTIC-Mutationskatalogs (73) unter Ausschluss weniger Gen-Wirkstoff-Verbindungen (75); 3. Einbeziehung des Interpretationskatalogs für pncA-Mutationen, in dem nicht-charakterisierte Aminosäureveränderungen in PncA als Resistenzdeterminante betrachtet wurden (76); 4. einzelne Literaturhinweise für die Interpretation von Mutationen, die mit der Resistenz gegen MDR/RR-Tuberkulose-Medikamente in Verbindung gebracht werden; 5. Informationen über phylogenetisch-informative Mutationen mit wahrscheinlich benignem Charakter (77), und 6. unbekannte Insertionen und Deletionen in den folgenden Genen wurden als Resistenzdeterminanten betrachtet: rpoB (Rifampicin, Rifabutin), katG (Isoniazid), ethA (Prothionamid), pncA (Pyrazinamid), Rv0678c (Bedaquilin, Clofazimin), ald (Cycloserin), tlyA (Capreomycin). Zusätzliche Mutationen, die in 92 zuvor definierten Genen gefunden wurden, die an Resistenzmechanismen gegen 21 Anti-Tuberkulose-Medikamente beteiligt sind (77), wurden als "nicht-charakterisiert" ausgewiesen. Bei Abwesenheit einer Mutation aus dem Mutationskatalog und bei Abwesenheit unbekannter Mutationen wurde die genotypische Suszeptibilität abgeleitet.

Diskrepanzen zu den phänotypischen Testergebnissen wurden weitergehend untersucht, indem die oben genannten Schwellenwerte für die Bestimmung eines Resistenzallels auf eine Mindestabdeckung von einem Read in Vorwärts- und Rückwärtsrichtung geändert wurde. Dieser Read musste das Allel mit einem phred-Score von mindestens 20 bestimmen. Zudem wurde kein Schwellenwert für die Variantenhäufigkeit genutzt.

9.3 Phänotypische Resistenztestung in Flüssigkulturen

Die primäre Isolierung, der Nachweis und die Resistenztestungen wurden unter Routinelaborbedingungen im Deutschen Nationalen Referenzlabor für Mykobakterien in Borstel durchgeführt (Prof. Dr. med. F. Maurer).

Der phänotypische Medikamentenresistenztest, welcher als Referenztest für die spätere Auswertung diente, wurde in MGIT auf der BACTEC™ MGIT™ 960 Plattform (Anweisungen des Herstellers (36,40,78,79) unter Verwendung von kritischen Standardkonzentrationen der Medikamente in den Teströhrchen und einer Bakterienkonzentration in den Wachstumskontrollröhrchen von 10 % für Pyrazinamid und von 1 % für alle anderen Arzneimittel durchgeführt. Das System BACTEC™ MGIT™ 960 gilt in der Praxis für die meisten Anti-Tuberkulose-Medikamente als etabliert und bewährt (16). Da zudem etliche evaluierte Ergebnisse vorliegen, wurde MGIT als Referenzstandard ausgewählt (80). Dennoch gibt es keine zuverlässigen und

reproduzierbaren Resistenzbestimmungs-Methoden für Cycloserin, p-Aminosalicylsäure und Meropenem. Daher wurde Cycloserin mit der indirekten kritischen Proportionsmethode auf Löwenstein-Jensen-Medien getestet (78). Für Cycloserin, welches auf Festmedien getestet wurde, und p-Aminosalicylsäure, die in MGIT getestet wurde, wurden frühere Grenzwerte für die Definition der Resistenz verwendet (78). Meropenem wurde nicht phänotypisch getestet.

Die folgenden kritischen Standardkonzentrationen (in Mikrogramm pro Milliliter, µg/mL) wurden verwendet: Rifampicin (1,0), Rifabutin (0,5), Isoniazid (0,1), Prothionamid (2,5), Levofloxacin (1,5, 1,0 nach Einführung der neuen WHO-Richtlinie am 01.08.2018 (40)), Moxifloxacin (0,5 und 2,0, 0,25 und 1,0 nach Umsetzung der neuen WHO-Richtlinie am 01.08.2018 (40)), Amikacin (1,0), Para-Aminosalicylsäure (4,0), Ethambutol (5,0), Pyrazinamid (100,0), Linezolid (1,0), Bedaquilin (1,0), Clofazimin (1,0), Delamanid (0,06) und Cycloserin (30).

Die Kultursuspensionen für die Inokulation mussten gut dispergiert sein und durften keine großen Klumpen aufweisen, um falsch-resistente Ergebnisse zu vermeiden. Nach gründlichem Mischen und Homogenisieren der Kultursuspensionen wurden die Röhrchen mindestens 15 Minuten lang ruhen gelassen. Anschließend wurde der Überstand zur Beimpfung der arzneimittelhaltigen Medien und der Kontrollröhrchen verwendet. Wenn die Growth Unit (GU) des arzneimittelhaltigen Röhrchens mehr als 100 beträgt, während die GU der Wachstumskontrolle 400 beträgt, werden die Ergebnisse als resistent definiert. Wenn die GU-Werte gleich oder kleiner als 100 sind, werden die Ergebnisse als suszeptibel eingestuft.

9.4 Messung der Minimalen Hemmkonzentrationen

Die Resistenzniveaus wurden anhand der MHKs bestimmt. Die MHKs der oben genannten antimikrobiellen Mittel wurden mittels Broth Microdilution in TREK Sensititre™ MYCOTBI und UKMYC bestimmt [12], [13]. Eine ausführliche Beschreibung des standardisierten Verfahrens zur MHK-Bestimmung für *M. tuberculosis*-Isolaten auf Sensititre™-Platten finden sich in der Validierungsstudie (81).

Die Isolate wurden 20 bis 25 Tage lang auf Loewenstein-Jensen-Medium kultiviert, in normaler Kochsalzlösung geerntet, homogenisiert und durch Messung der Dichte der Suspension mit dem Sensititre™-Trübungsmessgerät (TREK Diagnostic Systems, ThermoFisher Scientific Inc., USA) auf den McFarland-Standard 0,5 eingestellt. Diese Suspensionen wurden im Verhältnis 1:100 in Middlebrook 7H9-Medium, ergänzt mit Ölsäure-Albumin-Dextrose -Katalase (OADC), verdünnt und in Volumina von 100 µl dosiert (entsprechend einem ungefähren Standardinokulum von 1.5×10^5 cfu/ml) in alle 96 Vertiefungen der gebrauchsfertigen Sensititre™ MTB MIC-Platte (MYCOTBI; TREK

Diagnostic Systems, Thermo Fisher, Cleveland OH, USA) und Sensititre™ UKMYC5 und UKMYC6 (nur für Forschungszwecke; CRyPTIC-Projekt; Thermo Fisher, GB) Platten gegeben. Die Platten wurden dann mit transparenten Kunststoffmembranen versiegelt und 21 Tage lang bei 37°C bebrütet.

Die **MYCOTBI**-Platte testet die folgenden Substanzen: Ethambutol, Isoniazid, Rifampicin, Amikacin, Cycloserin, Ethionamid, Kanamycin, Moxifloxacin, Ofloxacin, p-Aminosalicylsäure, Rifabutin und Streptomycin.

Die **UKMYC5**-Platte testet die folgenden Substanzen: Bedaquilin, Ethambutol, Isoniazid, Rifampicin, Amikacin, Levofloxacin, Moxifloxacin, Delamanid, Linezolid, Clofazimin, Ethionamid, Rifabutin, Para-Aminosalicylsäure, Kanamycin.

Die **UKMYC6**-Platte testet die folgenden Substanzen: Bedaquilin, Ethambutol, Isoniazid, Rifampicin, Amikacin, Levofloxacin, Moxifloxacin, Delamanid, Linezolid, Clofazimin, Ethionamid, Rifabutin.

Das Bakterienwachstum wurde mit Hilfe des Sensititre™ Vizion™ Digital MIC Viewing System (TREK Diagnostic Systems, ThermoFisher Scientific Inc., USA) visualisiert und anschließend wurden die MHKs bestimmt. Eine Platte galt als »gültig«, wenn beide arzneimittelfreien Kontrollvertiefungen sichtbares Wachstum aufwiesen. Die MHK-Ergebnisse wurden manuell in digitale Formulare eingetragen, in eine Excel-Datenbank übertragen und von einem anderen Wissenschaftler des Instituts nach dem Vier-Augen-Prinzip doppelt überprüft, um Übertragungsfehler zu vermeiden. Von jeder Platte wurde ein Bild mit dem Vizion™-System aufgenommen und in der lokalen Cloud des Instituts gespeichert.

Wenn verfügbar, wurden Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)-Grenzwerte verwendet (35), andernfalls wurden die neuesten von der WHO empfohlenen kritischen Konzentrationen in Middlebrook 7H9 (MGIT) als Grenzwerte für jedes Medikament verwendet, d. h. die 2018 gemeldeten kritischen Konzentrationen (40), mit Ausnahme von Cycloserin und PAS, für die früher empfohlene kritische Konzentrationen verwendet wurden (78). **Tabelle 1** zeigt die Auflistung der verwendeten kritischen Konzentrationen.

Tabelle 1. Auflistung der kritischen Konzentrationen (KK); MGIT = Mycobacteria Growth Indicator Tube

Medikament	KK in µg/mL	Verfahren
Rifampicin	1	UKMYC
Rifabutin	0,5	UKMYC
Isoniazid	0,1	UKMYC
Pyrazinamid	100	MGIT
Ethambutol	5	UKMYC
Streptomycin	1	MYCOTB
Amikacin	1	UKMYC
Capreomycin	2,5	UKMYC
Kanamycin	2,5	UKMYC
Levofloxacin	1	UKMYC
Moxifloxacin	0,25	UKMYC
Ofloxacin	0,5	MYCOTB
Ethionamid	5	UKMYC
Prothionamid	5	UKMYC
Cycloserin	16	MYCOTB
Terizidon	16	MYCOTB
Paraaminosalicylsäure	4	UKMYC
Bedaquilin	1	UKMYC
Delamanid	0,06	UKMYC
Linezolid	1	UKMYC
Clofazimin	0,5	UKMYC

Die orientierenden MHKs von Pyrazinamid wurden in angesäuertem Middlebrook-7H9-Medium (pH 5,9) in MGIT unter Verwendung der BACTEC™ MGIT™ 960-Plattform bestimmt, indem Konzentrationen von 10 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml und 200 µg/ml im WHO-Supranationalen Tuberkulose-Referenzlabor Gauting getestet wurden. Die Ergebnisse wurden gemäß den entsprechenden Leitlinien der WHO interpretiert (40,78).

9.5 Ethik

Die Studie wurde von der Ethikkommission der Universität zu Lübeck zustimmend beraten. Dies wurde in dem Genehmigungsschreiben der Ethikkommission vom 3. Juli 2015 unter dem Aktenzeichen 15-195A mitgeteilt.

9.6 Behandlungsalgorithmus

Um personalisierte Behandlungsregime für jeden Patienten zusammenzustellen, wurde ein standardisierter Algorithmus genutzt. Dieser basiert auf der abgestuften dreigruppigen Medikamenten-Priorisierung der WHO (82): Gruppe A beinhaltet die Medikamente Levofloxacin *oder* Moxifloxacin, Bedaquilin und Linezolid. Zu der Gruppe B gehören Clofazimin sowie Cycloserin *oder* Terizidon und zu der Gruppe C die Substanzen Ethambutol, Delamanid, Pyrazinamid, Imipenem-Cilastatin *oder* Meropenem, Amikacin *oder* Streptomycin, Ethionamid *oder* Prothionamid sowie p-Aminosalicylsäure.

Die Auswahl der Medikamente basiert auf den Ergebnissen der Untersuchung der Empfindlichkeitstestung durch MGIT, MHK und NGS. Die Medikamente wurden schrittweise hinzugefügt, bis das Regime aus mindestens vier wirksamen und verträglichen Medikamenten bestand (3). **Tabelle 2** zeigt die Auswahl der Medikamente in den einzelnen Stufen des Algorithmus' im Detail.

Tabelle 2. Schrittweiser Aufbau eines MDR/RR-Tuberkulose -Behandlungsschemas (3)

Schritt	Medikamente	Kommentare, die für die Auswahl des Medikaments relevant sind
1	Bedaquilin	Während der ersten 6 Monate der Behandlung geben; einige Experten empfehlen, das Medikament 9 Monate oder länger einzunehmen.
2	Levofloxacin oder Moxifloxacin	Keine Präferenz für eines der Fluorchinolone.
3	Linezolid	Linezolid wird häufig mit unerwünschten Arzneimittelwirkungen in Verbindung gebracht und muss bei einer Langzeitbehandlung sehr genau überwacht werden.
4	Clofazimin, Cycloserin/Terizidon	Diese Medikamente sind wahrscheinlich wirksamer als die Medikamente der Stufe 5, und mindestens eines von ihnen sollte Teil der Behandlung sein, es sei denn, es besteht eine Kontraindikation.
5	Pyrazinamide, Prothionamid/Ethionamid	Hinzufügen, wenn die Schritte eins bis vier nicht zu vier oder mehr aktiven Arzneimitteln führen; Pyrazinamid vor Prothionamid oder Ethionamid verwenden, wenn die Pyrazinamid-Suszeptibilität gewährleistet ist; eine Arzneimittelresistenz gegen Pyrazinamid oder Prothionamid oder Ethionamid muss ausgeschlossen sein.
6	Meropenem/Amoxicillin-Clavulansäure, Amikacin	Hinzufügen, wenn die Schritte eins bis fünf nicht zu vier oder mehr aktiven Arzneimitteln führen und im Falle einer Fluorchinolon-Resistenz; zur besseren Verträglichkeit Meropenem und Amoxicillin-Clavulansäure vor Amikacin verwenden.
7	Delamanid, Para-Aminosalicylsäure, Ethambutol	Eine oder mehrere dieser Substanzen hinzufügen, wenn die Schritte eins bis sechs nicht zu vier oder mehr wirksamen Medikamenten geführt haben.

9.7 Datenauswertung

Konfidenzintervalle für Sensitivität, Spezifität, positiven und negativen prädiktiven Wert wurden auf der Grundlage des Wilson-Scores mit Kontinuitätskorrektur ermittelt (83). Die diagnostischen Genauigkeiten mit Konfidenzintervallen wurden für MDR/RR-Tuberkulose-Medikamente mit ≥ 5 phänotypisch suszeptiblen und resistenten Testergebnissen berechnet. Die MHK-Verteilungen wurden auf den CLSI/WHO-Grenzwert normiert, \log_2 -transformiert und gerundet.

10 Ergebnisse

10.1 Studienteilnehmer

Zwischen dem 1. Januar 2015 und dem 30. April 2019 wurden insgesamt 408 Patienten in die Medizinische Klinik des Forschungszentrums Borstel aufgenommen, bei denen eine Tuberkulose-Erkrankung nachgewiesen wurde.

Bei 89 Patienten wurde *M. tuberculosis*-complex-spezifische DNS im Sputum oder aus anderen Atemwegsmaterialien identifiziert und die automatisierte Sequenzierung eines rpoB Genabschnittes der bakteriellen DNS war nicht deckungsgleich mit der Wildtypsequenz, was eine Rifampicin Resistenz nahelegt. In 13 Fällen, in denen keine *M. tuberculosis*-complex-spezifische DNS identifiziert werden konnte, wurde *M. tuberculosis*-complex im Sputum oder aus anderen Atemwegsmaterialien kulturell angezüchtet und die phänotypische Empfindlichkeitstestung ergab eine Resistenz gegenüber Rifampicin. Resistenztestungen per MGIT, NGS und MHK wurden daher an Proben von diesen 102 Patienten durchgeführt. Nach Abschluss der Resistenztestungen fielen 32 Patienten aus der Analyse der Ergebnisse aus, weil entweder kein NGS-Ergebnis vorlag, kein Wachstum auf den MHK-Platten stattgefunden hatte oder unter den MGIT-Testergebnissen mehr als 1 Ergebnisse pro Patienten-Datensatz fehlte. Abschließend wurden die Datensätze von insgesamt 70 Patienten in die Analyse einbezogen (s. **Abbildung 1**)

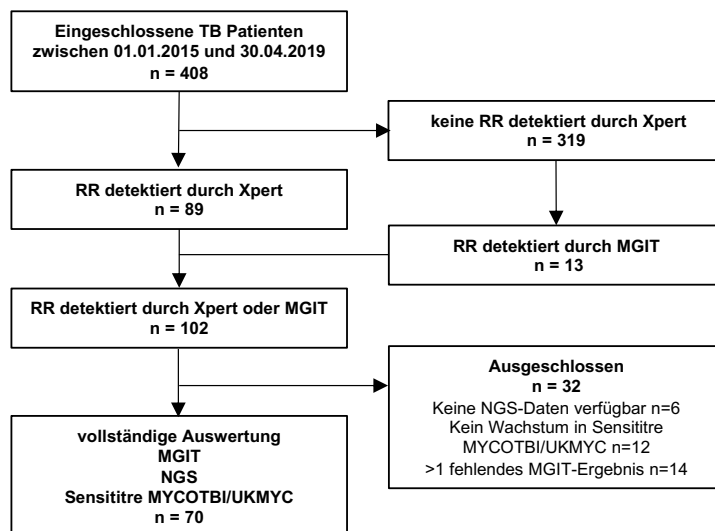


Abbildung 1. Einschluss von Patienten. Flussdiagramm mit den in dieser Studie untersuchten Patienten. TB = Tuberkulose; RR = Rifampicin-Resistenz; MGIT = Mycobacteria Growth Indicator Tube; NGS = Next Generation Sequencing. (75)

10.2 Demografische und klinische Ausgangsmerkmale der Teilnehmer

Tabelle 3 zeigt die demografischen Daten der eingeschlossenen Patienten mit dem durchschnittlichen Alter, dem durchschnittlichen Body Mass Index (BMI), dem Geschlecht und der Verteilung der Resistenzgruppen sowie der Herkunft der Patienten.

Tabelle 3. Demografische Daten der Studienteilnehmer (n = 70) (75)

Median des Alters in Jahren (IQA)	34.2 (27.1-43.7)
Median des Body Mass Index (IQA)	20.2 (18.0-23.2)
Männliches Geschlecht (%)	48 (68.6)
RR-TB (%)	10 (1.4)
MDR-TB (%) [ohne prä-XDR-TB oder XDR-TB]	41 (60.0)
prä-XDR (%)	21 (30.0)
XDR (%)	6 (8.6)
Herkunftsregion:	
Deutschland (%)	2 (2.9)
andere EU-Staaten und EEA (%)	10 (14.3)
andere europäische WHO-Region (%)	35 (50.1)
Afrika (%)	15 (21.4)
Asien (%)	10 (14.3)

Abkürzungen: IQA, Interquartilsabstand; RR-TB, Rifampicin-resistente Tuberkulose; MDR-TB multiresistente Tuberkulose, XDR-TB = extrem-arzneimittelresistente Tuberkulose; EU, Europäische Union; EEA, Europäischer Wirtschaftsraum

10.3 Genotypische Resistenztestung

Es lagen Empfindlichkeitsmuster für 15 antimikrobielle Substanzen (Isoniazid, Rifampicin, Rifabutin, Levofloxacin, Moxifloxacin, Bedaquilin, Linezolid, Clofazimin, Cycloserin, Ethambutol, Delamanid, Pyrazinamid, Amikacin, Prothionamid und Para-Aminosalicylsäure [PAS]) sowohl für die genomische Medikamentenempfindlichkeitstestung (gDST für engl. genomic drug susceptibility testing, ermittelt durch NGS = Index-Test) als auch phänotypische Medikamentenempfindlichkeitstestung (pDST für engl. phenotypic drug susceptibility testing, ermittelt in MGIT = Referenzstandard) und für jeden der 70 Patienten vor. Daher ergaben sich insgesamt 1050 mögliche Ergebnis-Datenpunkte. Im gesamten Datensatz fehlten nur zwei MGIT-Ergebnisse, eines für Rifabutin und eines für Ethambutol.

Somit wurden gDST-Vorhersagen und pDST-Ergebnisse für 1048 von 1050 (99,8 %) Datenpunkten miteinander verglichen (**Abbildung 2**).



Abbildung 2. Daten zu phänotypischen und genomischen Medikamentenempfindlichkeitstests

Ergebnisse der genomischen Vorhersage von Medikamentenempfindlichkeitstests (MET) durch Next Generation Sequencing (NGS), phänotypische MET im MGIT 960 System und phänotypische MET durch Sensititre MYCOTBI und/oder UKMYC-Platten für 70 Patienten. Jede Zeile steht für einen Patienten und jede Spalte für ein Arzneimittel. Resistente Testergebnisse sind in Rot und empfängliche Ergebnisse in grünen Kästen dargestellt. Im Falle von Sensititre MYCOTBI/UKMYC sind die MHKs eine Verdünnungsstufe über dem Cut-off in Hellrot und die MHKs am Cut-off in Hellgrün dargestellt. Polymorphismen ohne eindeutigen Zusammenhang mit der Arzneimittelresistenz werden in Grau dargestellt. In Fällen, in denen kein Ergebnis vorlag, wurde ein weißes Kästchen eingefügt. H=Isoniazid, R=Rifampicin, Rb=Rifabutin, Lfx=Levofloxacin, Mfx=Moxifloxacin, Bdq=Bedaquilin, Lz=Linezolid, Cfz=Clofazimin, Cs=Cycloserin (Terizidone), E=Ethambutol, DLM=Delamanid, Z=Pyrazinamid, Mpm=Meropenem, Am=Amikacin, Pto=Prothionamid, PAS=Para-Aminosallylsäure. (75)

Eine Übereinstimmung zwischen dem Referenzstandard (NGS) und dem Indextest (MGIT) bestand in 904 von 1048 Datenpunkten (86,3 %) und in 76 von 1048 (7,2 %) paarweisen Vergleichen eine Nichtübereinstimmung. 64 dieser 76 Diskordanzen zeigten in MGIT-Suszeptibilität und in NGS eine Resistenz, während 12 der 76 voneinander abweichenden Ergebnisse durch MGIT als resistent und durch NGS als suszeptibel gewertet wurden (**Abbildung 3**).

Nicht-charakterisierbare Polymorphismen fanden sich in 68 von 1048 (6,5 %) gDST-Analysen. Hierbei handelte es sich um Polymorphismen in einem oder mehrerer der 92 abgefragten resistenzimplizierenden Gene, die nicht Mutationskatalog enthalten waren. Ein großer Teil der Stämme mit diesen unbekanntem Polymorphismen, 60 von 68 (88,2%), zeigte sich in der phänotypischen Testung durch MGIT dem entsprechenden Medikament suszeptibel (**Abbildung 4**).

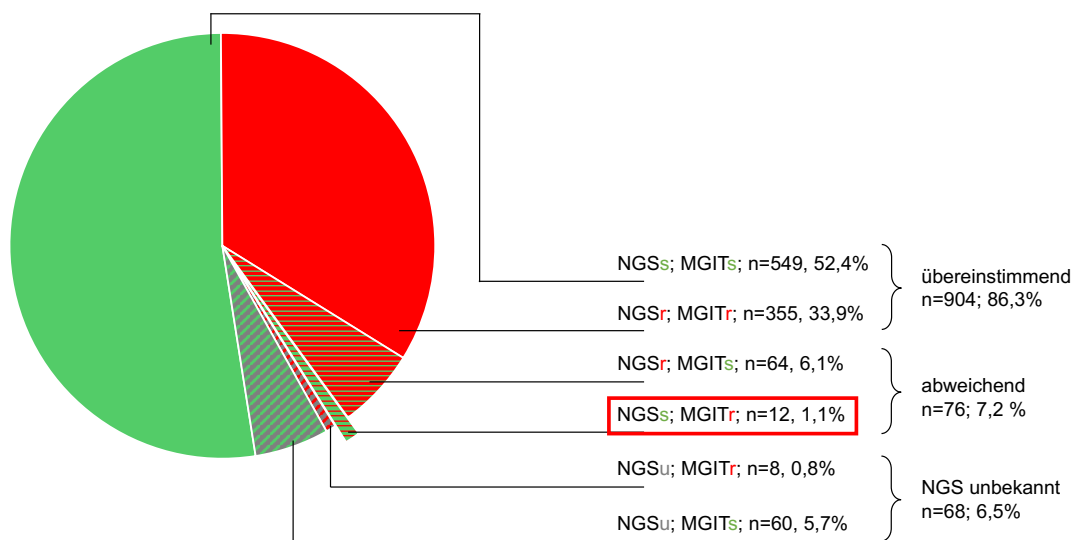


Abbildung 3. Verteilung der Ergebnisse von Medikamentenempfindlichkeitstests durch genomische (Next Generation Sequencing (NGS)) und phänotypische (Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT)) Verfahren

Aufgeführt sind die Anteile der übereinstimmenden und abweichenden Testergebnisse zwischen NGS und MGIT sowie die Anteile der Ergebnisse aus MGIT mit NGS-Ergebnissen unbekannter Relevanz. r=Verfahren zeigt Resistenz an; s=Verfahren zeigt Suszeptibilität an (75).

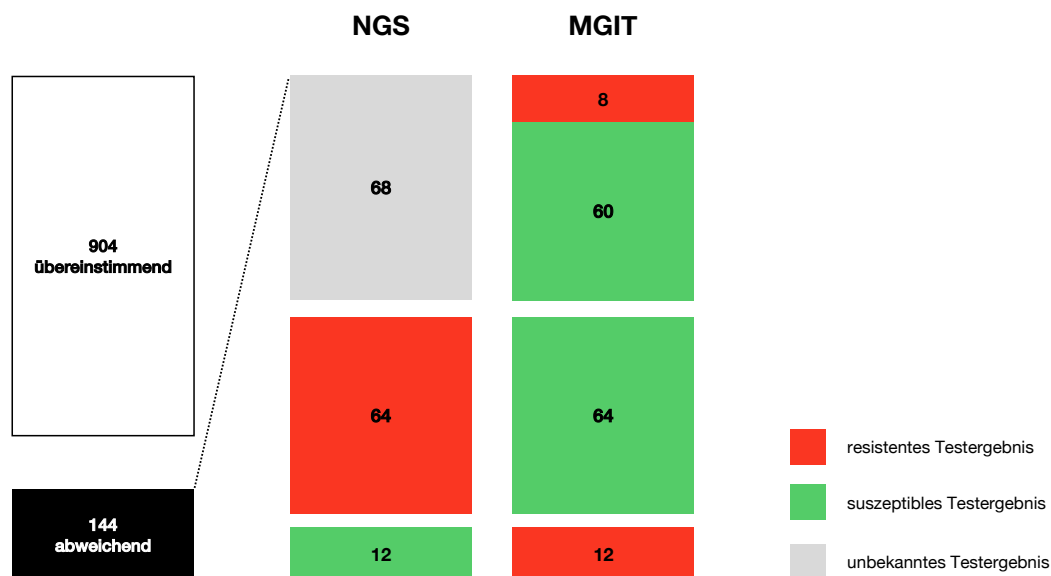


Abbildung 4. Übersicht über abweichende Testergebnisse Medikamentenempfindlichkeit durch NGS (Next Generation Sequencing) und der Medikamentenempfindlichkeitstestung durch MGIT (Mycobacteria Growth Indicator Tube). Suszeptible Testergebnisse sind in Grün und resistente Testergebnisse in Rot dargestellt. Durch NGS identifizierte Mutationen von unbekannter Relevanz sind in Grau dargestellt. (75)

Die **Abbildung 3** und **Abbildung 4** zeigen, dass bei 12 von 1048 (1,1 %) paarweisen Vergleichen falsche gDST-Vorhersagen der Suszeptibilität, d. h. falsch-negative Ergebnisse auftraten. Um jeden möglichen Polymorphismus zu finden und um die Empfindlichkeit des Testverfahrens zu erhöhen, wurden die Sequenzierungsdaten anschließend ohne einen 75 %-Variantenhäufigkeitsfilter erneut ausgewertet. Dieses Vorgehen demaskierte niedrigfrequente Polymorphismen in 5 (41,7 %) dieser 12 abweichenden Fälle, nämlich *ddn* S78P (Delamanid), *ribD* -12 g/a (PAS), *pncA* M175V (Pyrazinamid) und *gyrA* D94G (Levofloxacin und Moxifloxacin) mit relativen Allelhäufigkeiten von respektive 7 %, 3 %, 16 % bzw. 3 %. Bis auf die Mutation *ddn* S78P wurden alle diese Polymorphismen im angewandten Katalog als Resistenz-assoziiert eingestuft. Im Gegensatz dazu konnten bei den übrigen Isolaten in den untersuchten Resistenz-assoziierten Regionen keine genomischen Resistenzdeterminanten identifiziert werden.

Falsche gDST-Vorhersagen der Resistenz bei phänotypisch suszeptiblen Stämmen wurden bei 64 von 1048 (6,1 %) paarweisen Vergleichen festgestellt wie **Abbildung 3** und **Abbildung 4** zeigen. Einerseits sind die Ergebnisse (27 von 64, 45,3 %) auf Mutationen zurückzuführen, von denen bekannt ist, dass sie eine niedrige oder mäßige MHK-Erhöhung vermitteln, z. B. *embB* M306I (Ethambutol, 5 Fälle); *gyrA* A90V, D94A (Fluorchinolone, 3 bzw. 4 Fälle); oder *rpoB* L430P, H445L, D435Y, L452P (Rifampicin, Rifabutin; 4, 5, 2 bzw. 4 Fälle) (39). Darüber hinaus gab es vier kanonische

resistenzvermittelnde Mutationen (zwei embB M306V [Ethambutol] und zwei gyrA D94N [Fluorchinolone]) in phänotypisch suszeptiblen Isolaten (39,84,85).

60 der 68 nicht-charakterisierten Polymorphismen (88,2 % oder 60 von 1048 = 5,7 % der gesamten Testergebnisse) zeigte der pDST-Suszeptibilität an. 32 dieser 60 (53,3 %) Polymorphismen befanden sich in Genen, welche mit einer Resistenz gegen Bedaquilin, Clofazimin, Cycloserin oder Delamanid assoziiert sind (**Anhang-Tabelle 1**).

Bei 8 von 68 (11,8 % oder 8 von 1048 = 0,8 % der gesamten Testergebnisse) nicht-charakterisierten Polymorphismen zeigte sich in der phänotypischen Testung eine Resistenz gegenüber dem entsprechenden Medikament; 1 dieser 8 Polymorphismen befand sich im ethA-Gen von 3 Prothionamid-resistenten *M. tuberculosis*-Complex-Isolaten. Die übrigen Genotypen sind in der **Anhang-Tabelle 1** zu finden.

In der phänotypischen Testung mittels Sensititre MYCOTBI/UKMYC zeigte keines der 68 Isolate mit nicht-charakterisierten Polymorphismen MHK-Werte oberhalb der Grenzwerte des jeweiligen Medikaments. Nicht in das algorithmische Behandlungsschema aufgenommen wurden Medikamente, bei denen ein nicht-charakterisierter Polymorphismus durch gDST identifiziert wurde.

Aufgeschlüsselt auf die verschiedenen Medikamente sagte der gDST die phänotypische Arzneimittelresistenz für resistente Fälle wie folgt korrekt voraus: 100,0 % für Rifabutin (95% Konfidenzintervall [KI in %]: 92,0- 100,0), 89,5 % für Levofloxacin (95% KI: 65,5- 98,2), 88,2% für Moxifloxacin (95% KI: 62,3%-97,9%), 93,8% für Pyrazinamid (95% KI: 81,8-98,4), 100,0 % für Prothionamid (95% KI]: 85,0%-100,0), 87,5 % für Amikacin (95 % KI: 46,7-99,3), 77,8 % für PAS (95 % KI: 40,2-96,1) und 100,0 % für Ethambutol (95 % KI, 89,3-100,0); (**Tabelle 4**).

Die phänotypische Suszeptibilität wurde durch gDST wie folgt korrekt vorhergesagt: 0,0 % für Rifabutin (95% KI: 0,0-28,3), 91,8% für Levofloxacin (95% KI: 79,5-97,4), 88,2% für Moxifloxacin (95% KI: 75,4-95,1), 95,2% für Pyrazinamid (95% KI: 74,1-99,8), 80,8 % für Prothionamid (95 % KI: 60,0-92,7), 95,2 % für Amikacin (95 % KI: 85,6-98,7), 90,6 % für PAS (95 % KI: 78,6-96,5) und 30,4 % für Ethambutol (95 % KI: 14,1- 53,0) (**Tabelle 4**).

Insgesamt zeigte sich für alle 15 Medikamente eine kumulative Sensitivität und Spezifität des gDST von 96,7 % (95 % KI: 94,2-98,2) bzw. 89,6 % (95 % KI: 86,8-91,8). Für die Vorhersage der Resistenz lag der gesamte positive prädiktive Wert bei 84,7 % (95 % KI: 80,8-88,0), der negative prädiktive Wert bei 97,9 % (95 % KI: 96,2-98,8). (**Tabelle 4**).

Um eine Bewertung der diagnostischen Genauigkeit von Sensititre™ MYCOTB/UKMYC als potenziellen Indextest unter Verwendung von MGIT als Referenzstandard vornehmen zu können, zeigt **Tabelle 5** einen Überblick über die folgenden Parameter der diagnostischen Genauigkeit: Sensitivität, Spezifität, positiver prädiktiver Wert und negativer prädiktiver Wert.

Tabelle 4. Diagnostische Genauigkeit von genotypischen Medikamentenresistenztestung mittels Next Generation Sequencing (NGS) im Vergleich zu Flüssigkulturen mittels Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT) als Referenzstandard. (75)

Next Generation Sequencing	resistenter Phänotyp (MGIT)				suszeptibler Phänotyp (MGIT)				Phänotyp n/a				Sensitivität % (95% KI)	Spezifität % (95% KI)	PPW % (95% KI)	NPW % (95% KI)
	R	U	S	Total	R	U	S	Total	R	U	S	Total				
Rifampicin	64	0	0	64	6	0	0	6	0	0	0	0	#	#	#	#
Rifabutin	56	0	0	56	13	0	0	13	1	0	0	1	100.0 (92.0-100.0)	0.0 (0.0-28.3)	81.2 (69.6-89.2)	n/a
Isoniazid	68	0	0	68	1	0	1	2	0	0	0	0	#	#	#	#
Bedaquilin	1	1	0	2	1	6	61	68	0	0	0	0	*	*	*	*
Levofloxacin	17	0	2	19	4	2	45	51	0	0	0	0	89.5 (65.5-98.2)	91.8 (79.5-97.4)	81.0 (57.4-93.7)	95.7 (84.3-99.3)
Moxifloxacin	15	0	2	17	6	2	45	53	0	0	0	0	88.2 (62.3-97.9)	88.2 (75.4-95.1)	71.4 (47.7-87.8)	95.7 (84.3-99.3)
Linezolid	2	0	0	2	1	0	67	68	0	0	0	0	*	*	*	*
Clofazimine	2	1	0	3	0	8	59	67	0	0	0	0	*	*	*	*
Cycloserine [§]	2	0	0	2	2	10	56	68	0	0	0	0	*	*	*	*
Pyrazinamid	45	0	3	48	1	1	20	22	0	0	0	0	93.8 (81.8-98.4)	95.2 (74.1-99.8)	97.8 (87.0-99.9)	87.0 (65.3-96.6)
Prothionamid [§]	28	3	0	31	5	13	21	39	0	0	0	0	100.0 (85.0-100.0)	80.8 (60.0-92.7)	84.8 (67.3-94.3)	100.0 (80.8-100.0)
Amikacin	7	0	1	8	3	0	59	62	0	0	0	0	87.5 (46.7-99.3)	95.2 (85.6-98.7)	70.0 (35.4-91.9)	98.3 (89.9-99.9)
Delamanid	0	0	2	2	0	8	60	68	0	0	0	0	*	*	*	*
PAS [§]	7	2	2	11	5	6	48	59	0	0	0	0	77.8 (40.2-96.1)	90.6 (78.6-96.5)	58.3 (28.6-83.5)	96.0 (85.1-99.3)
Ethambutol [§]	41	1	0	42	16	4	7	27	1	0	0	1	100.0 (89.3-100.0)	30.4 (14.1-53.0)	71.9 (58.3-82.6)	100.0 (56.1-100.0)
Gesamt	355	8	12	375	64	60	549	673	2	0	0	2	96.7 (94.2-98.2)	89.6 (86.8-91.8)	84.7 (80.8-88.0)	97.9 (96.2-98.8)

Nachgewiesene und/oder vorhergesagte Resistenz wird als positives, Suszeptibilität als negatives Testergebnis gewertet. Uncharakterisierte Mutationen wurden bei der Berechnung der Teststärke nicht berücksichtigt.

n = Anzahl, R = resistent, S = suszeptibel, U = unbekannt, n/a = nicht anwendbar, KI = Konfidenzintervall, PPW = positiver prädiktiver Wert, NPW = negativer prädiktiver Wert, PAS = para-Aminosalicylsäure

#) Teststärke nicht berechnet, da Arzneimittelresistenz ein Einschlusskriterium war

*) Teststärke aufgrund der geringen Prävalenz von Resistenzen nicht berechnet

§) Mit Vorbehalt, da keine zuverlässigen kritischen Konzentrationen für Cycloserin und PAS existieren und die Resistenztestung von Ethambutol und Prothionamid durch MGIT nicht empfohlen wird

Tabelle 5. Diagnostische Genauigkeit der Resistenztestung durch die Minimale Hemmkonzentration mittels Sensititre™ MYCOTBI- und UKMYC-Platten im Vergleich zu Flüssigkulturen mittels Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT) als Referenzstandard (75)

Sensititre MYCOTBI/UKMYC	resistenter Phänotyp (MGIT)				suszeptibler Phänotyp (MGIT)				Phänotyp n/a				Sensitivität % (95% KI)	Spezifität % (95% KI)	PPW % (95% KI)	NPW % (95% KI)
	R	U	S	Total	R	U	S	Total	R	U	S	Total				
Rifampicin	59	0	5	64	0	0	6	6	0	0	0	0	#	#	#	#
Rifabutin	46	0	10	56	0	0	13	13	0	0	1	1	82.1 (69.2-90.7)	100.0 (71.7-100.0)	100.0 (90.4-100.0)	56.5 (34.9-76.1)
Isoniazid	66	0	2	68	0	0	2	2	0	0	0	0	#	#	#	#
Bedaquiline	0	0	2	2	0	0	68	68	0	0	0	0	*	*	*	*
Levofloxacin	13	0	6	19	0	0	51	51	0	0	0	0	68.4 (43.5-86.4)	100.0 (91.3-100.0)	100.0 (71.7-100.0)	89.5 (77.8-95.6)
Moxifloxacin	12	0	5	17	3	0	50	53	0	0	0	0	70.6 (44.0-88.6)	94.3 (83.4-98.5)	80.0 (51.4-94.7)	90.9 (79.3-96.6)
Linezolid	2	0	0	2	0	0	68	68	0	0	0	0	*	*	*	*
Clofazimine	0	0	3	3	0	0	67	67	0	0	0	0	*	*	*	*
Cycloserine [§]	0	0	2	2	0	0	62	62	0	0	0	0	*	*	*	*
Pyrazinamid [§]	25	0	17	42	0	0	21	21	0	0	0	0	59.5 (43.3-74.0)	100.0 (80.8-100.0)	100.0 (83.4-100.0)	55.3 (38.5-71.0)
Prothionamid [§]	8	0	23	31	1	0	38	39	0	0	0	0	25.8 (12.5-44.9)	97.4 (84.9-99.9)	88.9 (50.7-99.4)	62.3 (48.9-74.1)
Amikacin	5	0	3	8	0	0	62	62	0	0	0	0	62.5 (25.9-89.8)	100.0 (92.7-100.0)	100.0 (46.3-100)	95.4 (86.2-98.8)
Delamanid	0	0	2	2	0	0	68	68	0	0	0	0	*	*	*	*
PAS [§]	1	0	8	9	0	0	51	51	0	0	0	0	11.1 (0.6-49.3)	100.0 (91.3-100.0)	100.0 (5.5-100.0)	86.4 (74.5-93.6)
Ethambutol	10	0	32	42	0	0	27	27	0	0	1	1	23.8 (12.6-39.8)	100.0 (84.5-100.0)	100.0 (65.5-100.0)	45.8 (32.9-59.2)
Gesamt	222	0	103	325	4	0	633	637	0	0	2	2	68.3 (62.9-73.3)	99.4 (98.3-99.8)	98.2 (98.3-99.8)	86.0 (83.2-88.4)

Nachgewiesene und/oder vorhergesagte Resistenz wird als positives, Suszeptibilität als negatives Testergebnis gewertet

n = Anzahl, R = resistent, S = suszeptibel, U = unbekannt, n/a = nicht anwendbar, KI = Konfidenzintervall, PPW = positiver prädiktiver Wert, NPW = negativer prädiktiver Wert, PAS = para-Aminosalicylsäure

#) Teststärke nicht berechnet, da Arzneimittelresistenz ein Einschlusskriterium war

*) Teststärke aufgrund der geringen Prävalenz von Resistenzen nicht berechnet

§) Mit Vorbehalt, da keine zuverlässigen kritischen Konzentrationen für Cycloserin und PAS existieren und die Resistenztestung von Ethambutol und Prothionamid durch MGIT wird nicht empfohlen wird

§) Die MHKs für Pyrazinamid wurden in MGIT bestimmt und im Gesamtergebnis nicht berücksichtigt

10.4 Algorithmus-basierter Entwurf eines MDR/RR-Tuberkulose- Behandlungsschemas

Sowohl auf die gDST-Vorhersagen als auch auf die pDST-Ergebnisse wurde ein standardisierter MDR/RR-Tuberkulose -Behandlungsalgorithmus angewandt (**Tabelle 2**).

Beim Vergleich des gDST-basierten Schemas mit dem pDST-basierten Schema betrug die Überlappung der für die jeweiligen MDR/RR-Tuberkulose -Behandlungsschemata ausgewählten Medikamente 84,9 % (248 von 292 gDST-basierten Behandlungsentscheidungen; **Abbildung 5**). 38 von 70 (54,3 %) Patienten hätten auf der Grundlage der gDST- bzw. pDST-Ergebnisse genau die gleiche Arzneimittelkombination erhalten.

Es gab keinen relevanten Unterschied in der Gesamtverteilung der Medikamente der WHO-Gruppen A, B und C, die auf der Grundlage der gDST-Vorhersage und des phänotypischen Tests ausgewählt wurden (**Abbildung 5**).

Medikamente mit nachgewiesener phänotypischer Resistenz wären in nur 3 von 292 Fällen (1,0 % der auf der Grundlage von NGS ausgewählten Medikamente) oder bei 3 von 70 (4,3 %) Patienten verabreicht worden. Ein Isolat war resistent gegen PAS, das per NGS als Wildtyp klassifiziert wurde. Zwei Isolate wiesen eine phänotypische Resistenz gegenüber Moxifloxacin/Levofloxacin auf, von denen eines als Wildtyp klassifiziert wurde und in dem anderen Fall retrospektiv eine 3 %ige Niedrigfrequenzmutation (*gyrA* D94G) nachgewiesen wurde.

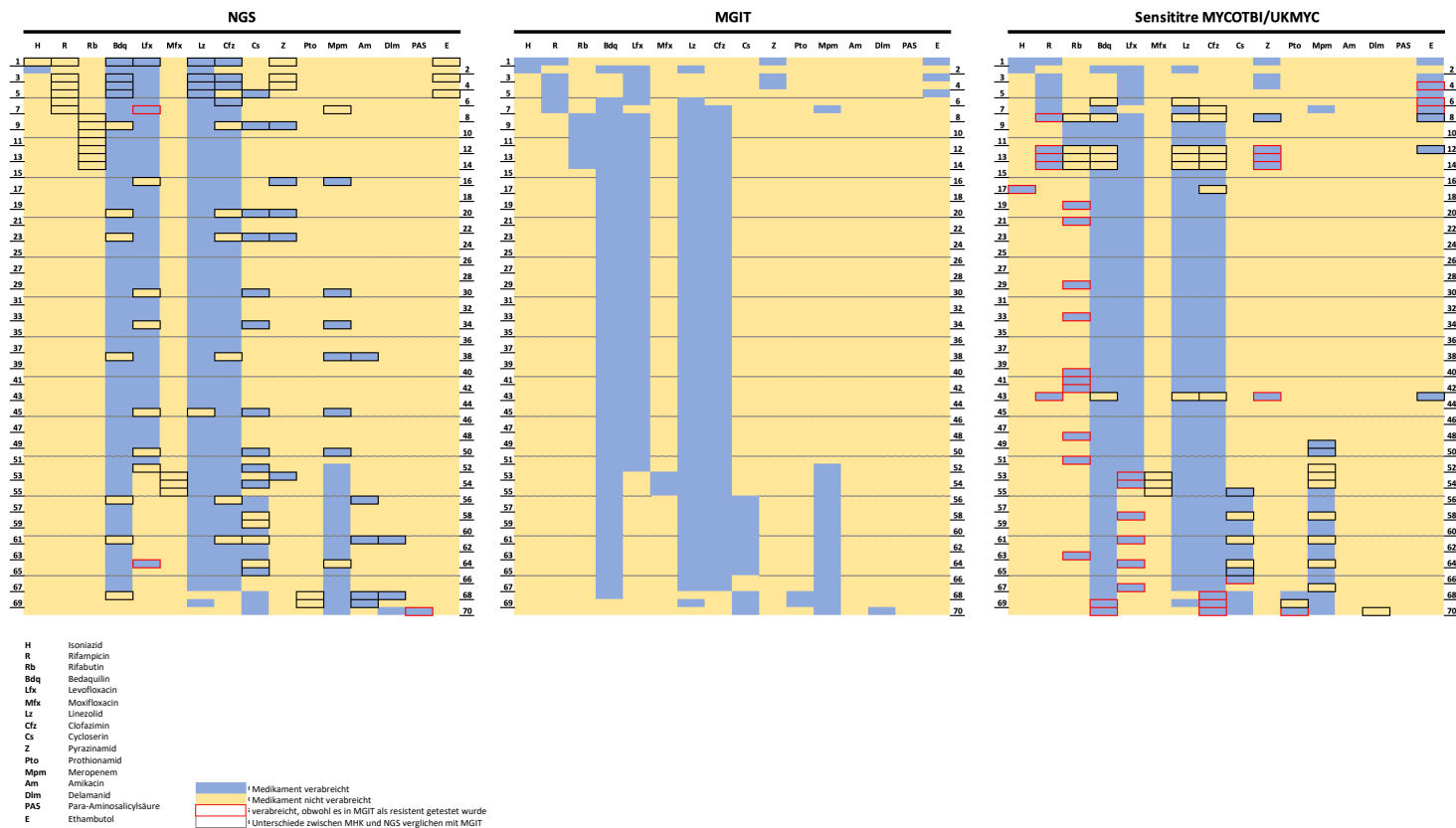


Abbildung 5. Von dem Algorithmus abgeleitete Behandlungsschemata auf der Grundlage verschiedener Methoden zur Prüfung der Empfindlichkeit gegenüber Arzneimitteln

Von dem Standardalgorithmus abgeleitete Behandlungsschemata auf der Grundlage der jeweiligen Ergebnisse von NGS (=Next Generation Sequencing), MGIT (=Mycobacteria Growth Indicator Tube) und MHK (=minimale Hemmkonzentration durch Sensititre™ MYCOTBI und/oder UKMYC). Unterschiede in den sich ergebenden Therapieschemata im Vergleich zu MGIT sind durch schwarze Rahmen hervorgehoben. Rote Rahmen zeigen die Behandlung mit einem Medikament an, das in MGIT als resistent getestet wurde. Die Spalten zeigen die Daten für 16 Medikamente für jeden Patienten von links nach rechts:

H=Isoniazid, R=Rifampicin, Rb=Rifabutin, Lfx=Levofloxacin, Mfx=Moxifloxacin, Bdq=Bedaquilin, Lz=Linezolid, Cfz=Clofazimin, Cs=Cycloserin (Terizidone), DLM=Delamanid, Z=Pyrazinamid, Mpm=Meropenem, Am=Kamikacin, Pto=Prothionamid, PAS=Para-Aminosalicylsäure, E=Ethambutol. (75)

11 Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Stellenwert von Vorhersagen für Antibiotikaresistenzen von Tuberkulosebakterien basierend auf der Identifizierung von Resistenz-assoziierten Mutationen im Erbgut von *M. tuberculosis*-complex zu ermitteln. Basierend auf den genotypischen Vorhersagen wurden in 99,0 % der Fälle Medikamente zur Therapie der MDR/RR-Tuberkulose verabreicht, für welche die betreffenden Stämme von *M. tuberculosis* auch empfindlich waren. Die Kenntnisse über Resistenz-assoziierte Mutationen im Genom von *M. tuberculosis* sind inzwischen so gut bekannt, dass in weniger als 1% der Fälle in der phänotypischen Testung Antibiotikaresistenzen auftraten, welche durch Mutationen im Genom von *M. tuberculosis*-complex nicht vorhergesagt werden konnten. Allerdings wurden in mehr als 6% der Fälle durch das NGS Verfahren Resistenz-assoziierte Mutationen angezeigt, die in phänotypische Testung an der kritischen Konzentration nicht erkannt wurden.

Basierend auf den Vorhersagen der genotypischen Resistenztestung wurden in 99,0 % der Fälle ausschließlich Medikamente zur Therapie der MDR/RR-Tuberkulose mit einem Standard-Therapiealgorithmus ausgewählt, für welche die betreffenden Stämme von *M. tuberculosis* auch sensibel war. Die Grundlage hierfür lieferte die hohe Übereinstimmung von 86,3% zwischen gDST- und pDST-Ergebnissen und der konservativ gestaltete klinische Behandlungsalgorithmus, welcher nur Tuberkulose-Medikamente einschloss, bei denen es keine Hinweise auf eine genotypische Resistenz gab. Auf diese Weise bieten die Ergebnisse aus gDST-Analysen ein hohes Maß an Sicherheit bei der Erstellung von MDR-Tuberkulose-Behandlungsschemata, solange sie Arzneimittel verabreichen, für die kein genetischer Resistenzmarker identifiziert wurde. In der praktischen Anwendung bedeutet dies neben der zuverlässigen Entscheidungsgrundlage für die Auswahl geeigneter Medikamente auch eine schnellere Verfügbarkeit der Ergebnisse als bei kulturbasierten Verfahren (86,87). Insbesondere in Hochinzidenzländern könnte die schnelle Bereitstellung individualisierter Therapien ein wichtiger Schritt gegen die Entwicklung weiterer Antibiotikaresistenzen von *M. tuberculosis* complex darstellen (88). Dem kommt entgegen, dass bei der Anwendung molekularbiologischer Verfahren ein geringeres Infektionsrisiko vorliegt und somit niedrige Sicherheitsstandards notwendig sind, als sie für kulturelle Verfahren aufgewendet werden müssen (17,48). Gemeinsam mit sinkenden Kosten für Genomsequenzierungen und einem früheren Therapiestart aufgrund des schnellen Vorliegens der Testresultate führt dies zu einer finanziellen Entlastung bei der Therapie einer Tuberkulose (56).

In insgesamt 68 gDST-Ergebnissen konnten die detektierten Polymorphismen nicht in einen eindeutigen Zusammenhang mit einer Arzneimittelresistenz gebracht werden. Im Vergleich mit den korrespondierenden pDST-Ergebnissen durch MGIT zeigte sich ein suszeptibles Ergebnis in 60 von 68 Fällen und ein resistentes Ergebnis in 8 von 86 Fällen. Dies entspricht nur 0,8 % aller Testergebnisse. In den entsprechenden MHK-Testungen zeigte sich kein Medikament oberhalb des resistenzdefinierenden Schwellenwertes. Dies weist darauf hin, dass der verwendete Mutationskatalog die relevanten, resistenzerzeugenden Mutationen in hohem Maße abbildet und zusätzlich detektierte Mutationen in den 92 zuvor definierten resistenzerzeugenden Genen wahrscheinlich nicht im Zusammenhang mit phänotypischer Resistenz stehen.

Eine Herausforderung stellt die Erkennung von Mutationen dar, die nur eine geringe oder moderate MHK-Erhöhung bewirken und in der Regel in der phänotypischen Testung zu dem Ergebnis „empfindlich“ führen (38). Dies ist von besonderer Bedeutung für Mutationen, die erhöhte MHKs unterhalb der aktuellen CCs bewirken, die jedoch mit einem schlechteren klinischen Behandlungserfolg der Tuberkulose verbunden sein können (89–91). Auch frühere Ergebnisse bestätigen die Beobachtungen dieser Studie, dass Mutationen, welche Resistenzen nahe der kritischen Konzentration erzeugen oder sich mit der MHK-Verteilung der Wildtyp-Stämme überschneiden, mit höherer Wahrscheinlichkeit durch die phänotypische Testung als sensibel eingestuft werden und damit fehlklassifiziert werden (92). Ein Beispiel hierfür ist die Mutation *gyrA* A90V. Sie führt bekanntermaßen zu einer geringgradigen Resistenz gegenüber Fluorchinolonen (93). Es zeigte sich eine hohe Spezifität bei einer kritischen Konzentration von 0,5mg/L auf dem Agar-Nährmedium 7H10, aber nicht bei 2 mg/L auf 7H10 (35). Wird hingegen eine stufenweise Charakterisierung der Suszeptibilität herangezogen, eröffnet dies auch die Möglichkeit, die Dosierung von Arzneimitteln anzupassen, anstatt sie gänzlich aus den Therapieschemata auszuschließen (38,94,95). Diese diffizilere Graduierung des Resistenzniveaus könnte auch durch NGS möglich werden. Die klinischen Auswirkungen einer geringgradigen Resistenz auf das Behandlungsergebnis sind jedoch nur für wenige Mutationen überzeugend untersucht worden. Jüngste Berichte über das Auftreten von Resistenzen gegen Bedaquilin, Clofazimin und Delamanid deuten jedoch darauf hin, dass Resistenzen auf niedrigem Niveau zu einer immer wichtigeren Herausforderung sowohl für die Medikamentenresistenztestung als auch für die klinische Interpretation werden (29,96–98).

In dieser Arbeit waren Mutationen, die nur moderate MHK-Erhöhrungen unterhalb oder in der Nähe der kritischen Konzentration verursachen, die Hauptursache für die Diskrepanzen zwischen gDST und pDST. Ob die phänotypische Testung für einige Medikamente mit den aktuellen kritischen

Konzentrationen weiterhin als "Goldstandard" zuverlässig genug eine Bestimmung der Suszeptibilität gewährleistet, wird durch die Ergebnisse dieser Arbeit in Frage gestellt.

11.1 Limitierungen

Diese Studie hat mehrere Einschränkungen. Mit der Anzahl von nur 70 Patienten ist die Größe der Kohorte für eine detaillierte Bewertung der Sensitivität und Spezifität, insbesondere für seltener eingesetzte Medikamente, zu gering. Zudem erfolgte die Rekrutierung der Patienten aus nur einem Zentrum in Deutschland. Ob die Ergebnisse auf andere Regionen der Welt, in denen die Population der *M. tuberculosis*-Complex-Stämme, die MDR/RR-Tuberkulose verursachen, unterschiedlich sein könnte, übertragen werden können, bleibt trotz der internationalen Patientenpopulation (>90 % der Patienten waren im Ausland geboren) daher unklar. Inzwischen konnten die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit jedoch mittels einer internationalen multizentrischen Studie bestätigt werden. Es zeigten sich die Bedeutung und das Potenzial von gDST für die individualisierte Therapie mit Erst- und Zweitlinienmedikamenten (67).

Die entscheidende Herausforderung bei der binären phänotypischen Empfindlichkeitstestung bleibt die Festlegung einer kritischen Konzentration. So musste in dieser Studie neben aktuellen Werten auch auf historische Konzentrationen zurückgegriffen werden. So etwa bei den Substanzen Cycloserin, PAS und Prothionamid. Dass die Erkenntnisse um die kritischen Konzentrationen weiter im Fluss sind, zeigen neueste Untersuchungen in Bezug auf die beiden wichtigsten Anti-Tuberkulose-Medikamente Isoniazid und Rifampicin (43) oder eine Studie über die Diskrepanzen zwischen aktuellen kritischen Konzentrationen und den sogenannten ECOFFs (Epidemiological cut-off values), in welcher die Autoren aufzeigten, welche Konsequenzen eine zu hohe kritische Konzentration haben kann. Genannt werden etwa die Unterversorgung der Patienten mit wirksamen Therapeutika sowie eine wissenschaftlich falsche Interpretation von Daten für die Identifizierung neuer resistenzerzeugender Kandidatengene (99). Auch die WHO veröffentlichte mehrere Publikationen, welche die aktuellen Schwellenwerte zu den wichtigsten Therapeutika zur Behandlung der sensiblen und multiresistenten Tuberkulose überprüften (40–45). Das Hauptziel bestand darin, die verfügbaren Daten zur minimalen Hemmkonzentration (MHK) zu bewerten, um festzustellen, ob die bestehenden CCs den epidemiologischen Cut-off-Werten (ECOFF) entsprechen, die das obere Ende der MHK-Verteilung der phänotypischen Wildtyppopulation darstellen. Dabei zeigte sich, dass sowohl die Qualität als auch die Quantität der verfügbaren Tuberkulose-MHK-Daten im Gegensatz zu vielen anderen wichtigen bakteriellen Krankheitserregern begrenzt sind. Tatsächlich entsprachen die Daten für die meisten

Kombinationen von Medikamenten und Wirkstoffen nicht den Kriterien, die der Europäische Ausschuss für die Prüfung der Empfindlichkeit gegenüber antimikrobiellen Mitteln (EUCAST) für die Festlegung von ECOFFs aufgestellt hat (99,100). Auch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sind sehr wahrscheinlich von zu hohen kritischen Konzentrationen beeinflusst worden. So ist ein Teil der Stämme in der phänotypischen Testung als sensibel eingestuft, jedoch genetisch als resistent gewertet worden, weil eine Mutation gefunden wurde, die auf eine Resistenz hindeutete.

MHK-Daten wurden verwendet, um die Binärität der MGIT-Ergebnisse auszugleichen. Dies war gut geeignet, um Verschiebungen im absoluten Niveau der Arzneimittelresistenz anzuzeigen. Doch auch bei diesem Verfahren gibt es Schwachstellen: Einerseits mangelt es auch bei der Bestimmung der MHKs an offiziellen Kritischen Konzentrationen und ECOFFs, denn die für MGIT existierenden kritischen Konzentrationen können eigentlich nicht direkt auf die MHK-Testung übertragen werden. Eine sichere Unterscheidung zwischen resistent und sensibel war dadurch noch nicht möglich. Aktuelle wissenschaftliche Veröffentlichungen benennen jedoch nun auch neue Grenzwerte für die MHK-Bestimmung auf 96-well-Platten, welche für die vorliegende Arbeit noch nicht genutzt werden konnten (46). Ein anderer wichtiger Aspekt ist die standardisierte Auswertung des Wachstums auf den MHK-Platten. Besonders bei schwachem Wachstum ist die Unterscheidung zwischen Hemmung und Wachstum nicht einfach. Bei der Auswertung der Platten für diese Studie gab es lediglich eine einzelne Ablesung des Wachstums.

Aufgrund der Instabilität des Medikaments in wässriger Lösung waren keine standardisierten Empfindlichkeitstests für Meropenem verfügbar. Pretomanid, ein neues Medikament zur Behandlung der MDR/RR-Tuberkulose, wurde erst nach Abschluss dieser Studie zugelassen und war damit in dieser Studie noch nicht Teil der getesteten Medikamente und der Therapieregime.

Dies Ergebnisse dieser Dissertationsschrift bestätigen die hohe Vorhersagegenauigkeit von gDST in Bezug auf Erst- und Zweitlinienmedikamente zur Behandlung der Tuberkulose sowie die Notwendigkeit einer Re-Evaluation der kritischen Konzentrationen für phänotypische Resistenztestungen (67).

12 Fazit

Trotz dieser Einschränkungen sind die vorgelegten Daten sehr aussagekräftig und unterstützen nachdrücklich die Eignung der molekularen Resistenztestung für die Zusammenstellung von Medikamentenregimen zur Behandlung der MDR/RR-Tuberkulose.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass Vorhersagen für das Auftreten von Antibiotikaresistenzen gegenüber 16 Medikamenten durch Identifizierung von Resistenz-assoziierten Mutationen in 99,0 % der Therapieentscheidungen zur korrekten Wahl der Medikamente führt.

Die molekulare Resistenztestung hat das Potenzial, schneller und günstiger als herkömmliche kulturbasierte Methoden, insbesondere in Hochinzidenzländern, eine umfassende Aussage über Antibiotikaresistenzen zu liefern (56,86,87).

13 Ausblick

13.1 Herausforderungen bei der Etablierung von molekularer Resistenztestung

Kürzlich wurde gezeigt, dass gDST die phänotypische Suszeptibilität für Erstlinien-Anti-Tuberkulose-Wirkstoffe mit einer Genauigkeit von mehr als 98 % vorhersagen kann (73). Die diagnostische Genauigkeit des gDST bei der Vorhersage von pDST-Ergebnissen für Zweitlinien-Antibiotika hat jedoch noch nicht die von der WHO für das Produktprofil geforderten Werte von 95 % Spezifität und 90 % Sensitivität erreicht (101–104). Die Gründe hierfür sind vielfältig: Einerseits ist bekannt, dass die derzeit gültigen Mutationskataloge noch Wissenslücken aufweisen (31,39,102). So sind etwa weitere Assoziationsstudien notwendig, um die Relevanz von Mutationen für die phänotypische Resistenz bei neuen oder wiederverwendeten Anti-Tuberkulose-Medikamenten zu verstehen (45).

Sequenzierungstechnologien sind nur begrenzt in der Lage, niedrige Frequenzen (<10-20 %) resistenter Stämme in einer Mischung mit suszeptiblen Stämmen zu erkennen, während phänotypische Tests resistente Stämme erkennen können, die nur 1 % der Gesamtpopulation ausmachen, was bei einigen Medikamenten, insbesondere den Fluorchinolonen, zu Diskordanzen zwischen dem erkannten Genotyp und dem resistenten Phänotyp führt (39).

Wie sich auch in den Daten der vorliegenden Arbeit zeigte, spielen sogenannte »Breakpoint-Artefakte« eine entscheidende Rolle bei dem Vergleich genotypischer und phänotypischer Resistenztestungen (31,94,105). Es gibt etwa für das Antibiotikum Capreomycin in einer Arbeit aus dem Jahr 2015 Belege, dass die verwendete kritische Konzentration zur phänotypischen Testung zu

hoch angesetzt war und dadurch der Stamm, auch bei Vorliegen einer Mutation (rrsA 1401G), die mit hoher Wahrscheinlichkeit für eine Resistenz assoziiert war, in der phänotypischen Testung als suszeptibel gegenüber Capreomycin eingestuft wurde (106). Es kommt hinzu, dass sich einzelne Vorhersagen phänotypischer Testungen schlecht reproduzieren lassen (79,95). Eine mögliche Lösung besteht in einem konservativen Vorgehen, bei dem ein Antibiotika für die Therapie nur dann empfohlen wird, wenn keine potenzielle genomische Resistenzdeterminante vorhanden ist. In der Studie zu der vorliegenden Arbeit ermöglichte dieses Vorgehen die vollständige Abdeckung der Tuberkulose-Medikamente der Gruppen A und B der WHO-Prioritätenliste, zu der Moxifloxacin, Levofloxacin, Bedaquilin, Linezolid, Clofazimin und Cycloserin gehören. Es wurde die NGS-basierte Erstellung von Resistenzgenprofilen in klinisch sinnvolle Behandlungsschemata umgesetzt, die auf standardisierten Algorithmen basieren. Problematisch bei einem, wie in dieser Studie, konservativ konstruierten Algorithmus ist die mögliche Verschiebung der Medikamentenauswahl zu weniger empfohlenen Substanzen, welche in erhöhtem Maß mit unerwünschten Arzneimittelwirkungen einhergehen, und dabei Medikamente nicht genutzt würden, die weniger toxisch und dennoch wirksam sind.

In Bezug auf neue oder wiederverwendete Medikamente stehen die Resistenztestungsmethoden vor der dringenden Herausforderung, zuverlässige Aussagen über die Suszeptibilitätsmuster für aktuelle Behandlungsregime wie das neue „BPaLM“-Schema, bestehend aus Bedaquilin, Pretomanid, Linezolid und Moxifloxacin, zu treffen, um die Entstehung von neuen Resistenzen dieser wichtigen Substanzen zu verhindern oder so lang wie möglich hinauszuzögern (88,107). Das BPaLM-Schema ist Teil der neuen Therapieempfehlung der WHO zur Behandlung der MDR/RR-Tuberkulose (54).

13.2 Zukunft der genotypischen Medikamentenresistenztestung

Auch wenn bei der klinischen Nutzung von NGS noch offene Herausforderungen bestehen, zeichnen sich große Fortschritte bei der Etablierung ab. So gelingt mittlerweile die direkte Resistenztestung aus klinischen Proben (62,87,108). NGS hat das Potenzial, vor allem nach der Einführung preisgünstigerer und schnellerer Sequenziermaschinen, etwa durch Nutzung von targeted NGS, umfassende klinische Anwendung zu finden (109). Neue Mutationskataloge verbessern die Vorhersagekraft von NGS für bestehende, aber ebenso neue oder wiederverwendete Medikamente (44,45). So bestätigte sich jüngst auch die Anwendbarkeit der molekularen Resistenztestung für Linezolid (110).

Auch dies bekräftigt die Einführung genotypischer Medikamentenempfindlichkeitstestungen in Ländern mit niedrigem und mittlerem Einkommen und selbst in den Ländern der WHO-Region Europa stehen phänotypische Resistenztestungen für die Gruppe A-Medikamente Levofloxacin und Linezolid nicht zur Verfügung (111). Für Bedaquilin sind es weniger als die Hälfte der Länder der Region, in denen eine Resistenztestung möglich ist, obwohl alle 3 Medikamente auf der WHO-Liste der essentiellen Medikamente stehen (111). Der Mangel an diagnostischer Infrastruktur für umfassende, schnelle und zuverlässige Resistenztestungen für die Zweitlinienbehandlung von Tuberkulose erzeugt in vielen Ländern eine hohe Belastung und steht nachweislich im Zusammenhang mit einer hohen Prävalenz von MDR-Tuberkulose oder unzureichenden Therapieerfolgen von Patienten mit MDR-Tuberkulose (112).

Neben diesem geografischen Ausbau der vorhandenen DST-Infrastruktur wird die zügige technologische Weiterentwicklung der Methoden eine wesentliche Herausforderung. Aktuell befinden sich 17 neue Substanzen zur Behandlung der Tuberkulose in der klinischen Entwicklung (113). Die technische Möglichkeit einer schnellen genotypischen Vorhersage von Antibiotikaresistenzen sollte spätestens zur Markteinführung dieser neuen Therapeutika vorliegen, um die Möglichkeit einer effektiven personalisierten Therapie zu gewährleisten und um der Entstehung neuer Resistenzen vorzubeugen (88).

14 Quellenverzeichnis

1. Hof H, Schlüter D, Georg Thieme Verlag KG. Medizinische Mikrobiologie [Internet]. Hof H, Schlüter D, Dörries R, Herausgeber. Bd. Auflage 7. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2019 [zitiert 18. September 2022]. 373–383 S. Verfügbar unter: <https://eref.thieme.de/10.1055/b-006-163249>
2. World Health Organization. Global tuberculosis report 2023 [Internet]. 2023 [zitiert 9. November 2023]. Verfügbar unter: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240083851>
3. Lange C, Dheda K, Chesov D, Mandalakas AM, Udwadia Z, Horsburgh CR. Management of drug-resistant tuberculosis. *The Lancet* [Internet]. 2019 [zitiert 6. April 2020];394(10202):953–66. Verfügbar unter: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673619318823>
4. Wirth T, Hildebrand F, Allix-Béguec C, Wölbeling F, Kubica T, Kremer K, van Soolingen D, Rüscher-Gerdes S, Locht C, Brisse S, Meyer A, Supply P, Niemann S. Origin, spread and demography of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *PLoS Pathog*. 2008;4(9).
5. Junger E, Wallner G. Die Tuberkulosebekämpfung im Wandel der Zeiten. *Imago Hominis* [Internet]. 2004 [zitiert 26. Januar 2023];11(3):193–206. Verfügbar unter: https://www.imabe.org/fileadmin/imago_hominis/pdf/IH011_193-206.pdf
6. Koch R. Die Ätiologie der Tuberkulose. *Berliner Klinische Wochenschrift* [Internet]. 1882 [zitiert 16. Oktober 2022]; Verfügbar unter: <https://edoc.rki.de/bitstream/handle/176904/5163/428-445.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
7. Bange FC, Hahn H, Kaufmann SHE, Lange C, Ulrichs T. Mykobakterien. In: *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie* [Internet]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2020 [zitiert 16. Oktober 2022]. S. 447–65. Verfügbar unter: http://link.springer.com/10.1007/978-3-662-61385-6_42
8. Martinez L, Cords O, Liu Q, Acuna-Villaorduna C, Bonnet M, Fox GJ, Carvalho ACC, Chan PC, Croda J, Hill PC, Lopez-Varela E, Donkor S, Fielding K, Graham SM, Espinal MA, Kampmann B, Reingold A, Huerga H, Villalba JA, Grandjean L, Sotgiu G, Egere U, Singh S, Zhu L, Lienhardt C, Denholm JT, Seddon JA, Whalen CC, García-Basteiro AL, Triasih R, Chen C, Singh J, Huang LM, Sharma S, Hannoun D, del Corral H, Mandalakas AM, Malone LSL, Ling DL, Kritski A, Stein CM, Vashishtha R, Boulahbal F, Fang CT, Boom WH, Netto EM, Lemos AC, Hesselning AC, Kay A, Jones-López EC, Horsburgh CR, Lange C, Andrews JR. Infant BCG vaccination and risk of

- pulmonary and extrapulmonary tuberculosis throughout the life course: a systematic review and individual participant data meta-analysis. *Lancet Glob Health*. 2022;10(9):e1307–16.
9. Lange C, Aaby P, Behr MA, Donald PR, Kaufmann SHE, Netea MG, Mandalakas AM. 100 years of *Mycobacterium bovis* bacille Calmette-Guérin. Bd. 22, *The Lancet Infectious Diseases*. Elsevier Ltd; 2022. S. e2–12.
 10. Robert Koch-Institut. *Epidemiologisches Bulletin* 11/2023 [Internet]. Berlin; 2023 März [zitiert 22. April 2023]. Verfügbar unter: https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Archiv/2023/Ausgaben/11_23.pdf?__blob=publicationFile
 11. Boom WH, Schaible UE, Achkar JM. The knowns and unknowns of latent *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Journal of Clinical Investigation* [Internet]. 2021 [zitiert 18. Oktober 2022];131(3). Verfügbar unter: <https://www.jci.org/articles/view/136222>
 12. Drain PK, Bajema KL, Dowdy D, Dheda K, Naidoo K, Schumacher SG, Ma S, Meermeier E, Lewinsohn DM, Sherman DR. Incipient and Subclinical Tuberculosis: a Clinical Review of Early Stages and Progression of Infection. *Clin Microbiol Rev* [Internet]. 2018 [zitiert 18. Oktober 2022];31(4). Verfügbar unter: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/CMR.00021-18>
 13. Ntsekhe M, Mayosi BM. Tuberculous pericarditis with and without HIV. *Heart Fail Rev*. 2013;18(3):367–73.
 14. Bhumbla U. Ziehl-Neelsen's Staining. In: *Workbook for Practical Microbiology* [Internet]. Jaypee Brothers Medical Publishers (P) Ltd.; 2018 [zitiert 23. April 2023]. S. 66–66. Verfügbar unter: <https://www.jaypeedigital.com/book/9789352703098/chapter/ch10>
 15. Dorman SE, Schumacher SG, Alland D, Nabeta P, Armstrong DT, King B, Hall SL, Chakravorty S, Cirillo DM, Tukvadze N, Bablishvili N, Stevens W, Scott L, Rodrigues C, Kazi MI, Joloba M, Nakiyingi L, Nicol MP, Ghebrekristos Y, Anyango I, Murithi W, Dietze R, Lyrio Peres R, Skrahina A, Auchynka V, Chopra KK, Hanif M, Liu X, Yuan X, Boehme CC, Ellner JJ, Denkinger CM, Dorman SE, Schumacher SG, Alland D, Nabeta P, Armstrong DT, King B, Hall SL, Chakravorty S, Cirillo DM, Tukvadze N, Bablishvili N, Stevens W, Scott L, Rodrigues C, Kazi MI, Joloba M, Nakiyingi L, Ghebrekristos Y, Anyango I, Murithi W, Dietze R, Peres RL, Skrahina A, Auchynka V, Chopra KK, Hanif M, Liu X, Yuan X, Boehme CC, Ellner JJ, Denkinger CM, Manabe YC, Hom D, Aspindzelashvili R, David A, Surve U, Kamulegeya LH, Nabweyambo S, Surtie S, Hapeela N, Cain KP, Agaya J, McCarthy KD, Marques-Rodrigues P, Schmidt Castellani LG, Almeida PS, de Aguiar PPL, Solodovnikova V, Ruan X, Liang L, Zhang G, Zhu H, Xie Y. Xpert MTB/RIF Ultra for detection of *Mycobacterium tuberculosis* and rifampicin resistance: a prospective multicentre diagnostic accuracy study. *Lancet Infect Dis*. 2018;18(1):76–84.

16. E. Richter, S. Andres, R. Diel, H. Hoffmann, S. Hofmann-Thiel, M. Klotz, H. Mauch NS. MIQ 05: Tuberkulose Mykobakteriose: Qualitätsstandards in der mikrobiologisch-infektiologischen Diagnostik. In: Mikrobiologisch-infektiologische Qualitätsstandards (MIQ). 3. Aufl. 2019.
17. World Health Organization. WHO consolidated guidelines on tuberculosis – Module 3: Diagnosis WHO consolidated guidelines on tuberculosis Rapid diagnostics for tuberculosis detection [Internet]. 2021 [zitiert 3. Oktober 2022]. Verfügbar unter: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240029415>
18. Lee JJ, Chong PY, Lin C bin, Hsu AH, Lee CC. High resolution chest CT in patients with pulmonary tuberculosis: Characteristic findings before and after antituberculous therapy. *Eur J Radiol.* 2008;67(1):100–4.
19. Bhalla AS, Goyal A, Guleria R, Gupta AK. Chest tuberculosis: Radiological review and imaging recommendations. *Indian Journal of Radiology and Imaging.* 2015;25(3):213–25.
20. Bomanji J, Sharma R, Mittal BR, Gambhir S, Qureshy A, Begum SMF, Paez D, Sathekge M, Vorster M, Saranovic DS, Pusuwan P, Mann V, Vinjamuri S, Zumla A, Pascual TNB. PET/CT features of extrapulmonary tuberculosis at first clinical presentation: A cross-sectional observational 18F-FDG imaging study across six countries. *European Respiratory Journal.* 2020;55(2).
21. Zumla A, Nahid P, Cole ST. Advances in the development of new tuberculosis drugs and treatment regimens. Bd. 12, *Nature Reviews Drug Discovery.* 2013. S. 388–404.
22. World Health Organization. WHO operational handbook on tuberculosis Module 4: Treatment – drug-susceptible tuberculosis treatment [Internet]. Geneva; 2022 [zitiert 19. Oktober 2022]. Verfügbar unter: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240050761>
23. World Health Organization. WHO consolidated guidelines on tuberculosis – Module 4: Treatment Drug-susceptible tuberculosis treatment [Internet]. 2022 [zitiert 3. Oktober 2022]. Verfügbar unter: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240048126>
24. Guglielmetti L, Günther G, Leu C, Cirillo D, Duarte R, Garcia-Basteiro AL, Goletti D, Jankovic M, Kuksa L, Maurer FP, Méchai F, Tiberi S, van Leth F, Veziris N, Lange C. Rifapentine access in Europe: growing concerns over key tuberculosis treatment component. *European Respiratory Journal* [Internet]. 2022 [zitiert 23. April 2023];59(5):2200388. Verfügbar unter: <http://erj.ersjournals.com/lookup/doi/10.1183/13993003.00388-2022>
25. World Health Organization. Meeting report of the WHO expert consultation on the definition of extensively drug-resistant tuberculosis, Meeting report of the WHO expert consultation on the definition of extensively drug-resistant tuberculosis [Internet]. 2020

- [zitiert 18. September 2022]. Verfügbar unter: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240018662>
26. Mnyambwa NP, Philbert D, Kimaro G, Wandiga S, Kirenga B, Mmbaga BT, Muttamba W, Najjingo I, Walusimbi S, Nuwarinda R, Okelloh D, Semvua H, Ngocho J, Senkoro M, Stephen O, Castelnuovo B, Wilfred A, Mgina E, Sanga C, Aman F, Kahwa A, Mfinanga S, Ngadaya E. Gaps related to screening and diagnosis of tuberculosis in care cascade in selected health facilities in East Africa countries: A retrospective study. *J Clin Tuberc Other Mycobact Dis*. 2021;25.
 27. World Health Organization. WHO consolidated guidelines on tuberculosis. Module 4, Treatment : drug-resistant tuberculosis treatment. [Internet]. 2020 [zitiert 12. Juli 2022]. 98 S. Verfügbar unter: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/332397>
 28. Zhang Y, Yew WW. Mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: Update 2015. Bd. 19, *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*. International Union Against Tuberculosis and Lung Disease; 2015. S. 1276–89.
 29. Andres S, Merker M, Heyckendorf J, Kalsdorf B, Rumetshofer R, Indra A, Hofmann-Thiel S, Hoffmann H, Lange C, Niemann S, Maurer FP. Bedaquiline-Resistant Tuberculosis: Dark Clouds on the Horizon. *Am J Respir Crit Care Med* [Internet]. 2020 [zitiert 13. Mai 2022];201(12):1564–8. Verfügbar unter: <https://www.atsjournals.org/doi/10.1164/rccm.201909-1819LE>
 30. Wells WA, Boehme CC, Cobelens FGJ, Daniels C, Dowdy D, Gardiner E, Gheuens J, Kim P, Kimerling ME, Kreiswirth B, Lienhardt C, Mdluli K, Pai M, Perkins MD, Peter T, Zignol M, Zumla A, Schito M. Alignment of new tuberculosis drug regimens and drug susceptibility testing: A framework for action. Bd. 13, *The Lancet Infectious Diseases*. 2013. S. 449–58.
 31. Miotto P, Tessema B, Tagliani E, Chindelevitch L, Starks AM, Emerson C, Hanna D, Kim PS, Liwski R, Zignol M, Gilpin C, Niemann S, Denkinger CM, Fleming J, Warren RM, Crook D, Posey J, Gagneux S, Hoffner S, Rodrigues C, Comas I, Engelthaler DM, Murray M, Alland D, Rigouts L, Lange C, Dheda K, Hasan R, Ranganathan UDK, McNerney R, Ezewudo M, Cirillo DM, Schito M, Köser CU, Rodwell TC. A standardised method for interpreting the association between mutations and phenotypic drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *European Respiratory Journal* [Internet]. 2017 [zitiert 28. Mai 2022];50(6):1701354. Verfügbar unter: <http://erj.ersjournals.com/lookup/doi/10.1183/13993003.01354-2017>
 32. World Health Organization. WHO consolidated guidelines on tuberculosis Module 4: Treatment Drug-resistant tuberculosis treatment 2022 update [Internet]. 2022 [zitiert 22. Januar 2023]. Verfügbar unter: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240063129>

33. Christoph Lange, Niklas Köhler, Gunar Günther. Regimens for Drug-Resistant Tuberculosis. *New England Journal of Medicine* [Internet]. 2023 [zitiert 30. April 2023];388(2):189–91. Verfügbar unter: <http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMc2213970>
34. Domínguez J, Boeree MJ, Cambau E, Chesov D, Conradie F, Cox V, Dheda K, Dudnyk A, Farhat MR, Gagneux S, Grobusch MP, Gröschel MI, Guglielmetti L, Kontsevaya I, Lange B, van Leth F, Lienhardt C, Mandalakas AM, Maurer FP, Merker M, Miotto P, Molina-Moya B, Morel F, Niemann S, Veziris N, Whitelaw A, Horsburgh CR, Lange C, Domínguez J, Boeree MJ, Cambau E, Chesov D, Conradie F, Cox V, Dheda K, Dudnyk A, Farhat MR, Gagneux S, Grobusch MP, Gröschel MI, Guglielmetti L, Kontsevaya I, Lange B, van Leth F, Lienhardt C, Mandalakas AM, Maurer F, Merker M, Miotto P, Molina-Moya B, Morel F, Niemann S, Veziris N, Whitelaw A, Horsburgh CR, Lange C. Clinical implications of molecular drug resistance testing for *Mycobacterium tuberculosis*: a 2023 TBnet/RESIST-TB consensus statement. *Lancet Infect Dis.* 2023;
35. Woods GL, Brown-Elliott BA, Conville PS, Desmond EP, Hall GS, Lin G. M24 Susceptibility Testing of Mycobacteria, Nocardiae, and Other Aerobic Actinomycetes. Bd. Second Edi, Approved Standard (Clinical and Laboratory Standards Institute;). 2011. M24-A2 S.
36. Salman HSiddiqi, Rüsç-Gerdes S. MGIT Procedure Manual. *Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT) Culture and Drug Susceptibility Demonstration Projects* [Internet]. 2006 [zitiert 20. November 2021];(July):pp24-40. Verfügbar unter: http://www.finddiagnostics.org/export/sites/default/resource-centre/find_documentation/pdfs/mgit_manual_nov_2007.pdf
37. World Health Organization. Technical manual for drug susceptibility testing of medicines used in the treatment of tuberculosis. 2018.
38. Schön T, Miotto P, Köser CU, Viveiros M, Böttger E, Cambau E. *Mycobacterium tuberculosis* drug-resistance testing: challenges, recent developments and perspectives. *Clinical Microbiology and Infection* [Internet]. 2017 [zitiert 1. September 2019];23(3):154–60. Verfügbar unter: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmi.2016.10.022>
39. World Health Organization. The use of next-generation sequencing technologies for the detection of mutations associated with drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* complex: technical guide. WHO [Internet]. 2018 [zitiert 20. November 2021];44(4):433–48. Verfügbar unter: <https://www.who.int/publications/i/item/WHO-CDS-TB-2018.19>
40. World Health Organization. Technical report on critical concentrations for TB drug susceptibility testing of medicines used in the treatment of drug-resistant TB. Who. 2018;1–106.

41. World Health Organization. Technical report on the pharmacokinetics and pharmacodynamics (PK/PD) of medicines used in the treatment of drug-resistant tuberculosis [Internet]. 2018 [zitiert 4. Oktober 2022]. Verfügbar unter: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/260440/WHO-CDS-TB-2018.6-eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
42. Ahmad N, Ahuja SD, Akkerman OW, Alffenaar JWC, Anderson LF, Baghaei P, Bang D, Barry PM, Bastos ML, Behera D, Benedetti A, Bisson GP, Boeree MJ, Bonnet M, Brode SK, Brust JCM, Cai Y, Caumes E, Cegielski JP, Centis R, Chan PC, Chan ED, Chang KC, Charles M, Cirule A, Dalcolmo MP, D'Ambrosio L, de Vries G, Dheda K, Esmail A, Flood J, Fox GJ, Fréchet-Jachym M, Fregona G, Gayoso R, Gegia M, Gler MT, Gu S, Guglielmetti L, Holtz TH, Hughes J, Isaakidis P, Jarlsberg L, Kempker RR, Keshavjee S, Khan FA, Kipiani M, Koenig SP, Koh WJ, Kritski A, Kuksa L, Kvasnovsky CL, Kwak N, Lan Z, Lange C, Laniado-Laborín R, Lee M, Leimane V, Leung CC, Leung ECC, Li PZ, Lowenthal P, Maciel EL, Marks SM, Mase S, Mbuagbaw L, Migliori GB, Milanov V, Miller AC, Mitnick CD, Modongo C, Mohr E, Monedero I, Nahid P, Ndjeka N, O'Donnell MR, Padayatchi N, Palmero D, Pape JW, Podewils LJ, Reynolds I, Riekstina V, Robert J, Rodriguez M, Seaworth B, Seung KJ, Schnippel K, Shim TS, Singla R, Smith SE, Sotgiu G, Sukhbaatar G, Tabarsi P, Tiberi S, Trajman A, Trieu L, Udwadia ZF, van der Werf TS, Veziris N, Viiklepp P, Vilbrun SC, Walsh K, Westenhouse J, Yew WW, Yim JJ, Zetola NM, Zignol M, Menzies D. Treatment correlates of successful outcomes in pulmonary multidrug-resistant tuberculosis: an individual patient data meta-analysis. *The Lancet*. 2018;392(10150):821–34.
43. World Health Organization. Technical Report on critical concentrations for drug susceptibility testing of isoniazid and the rifamycins (rifampicin, rifabutin and rifapentine) [Internet]. Geneva; 2021 [zitiert 12. Juli 2022]. Verfügbar unter: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/339275>
44. World Health Organization. Catalogue of mutations in Mycobacterium tuberculosis complex and their association with drug resistance [Internet]. 2021 [zitiert 12. Juli 2022]. Verfügbar unter: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/341981>
45. Walker TM, Miotto P, Köser CU, Fowler PW, Knaggs J, Iqbal Z, Hunt M, Chindelevitch L, Farhat MR, Cirillo DM, Comas I, Posey J, Omar S V, Peto TE, Suresh A, Uplekar S, Laurent S, Colman RE, Nathanson CM, Zignol M, Walker AS, Crook DW, Ismail N, Rodwell TC, Walker AS, Steyn AJC, Lalvani A, Baulard A, Christoffels A, Mendoza-Ticona A, Trovato A, Skrahina A, Lachapelle AS, Brankin A, Piatek A, Gibertoni Cruz A, Koch A, Cabibbe AM, Spitaleri A, Brandao AP, Chairprasert A, Suresh A, Barbova A, Van Rie A, Ghodousi A, Bainomugisa A, Mandal A, Roohi A, Javid B, Zhu B, Letcher B, Rodrigues C, Nimmo C, NATHANSON CM,

Duncan C, Coulter C, Utpatel C, Liu C, Grazian C, Kong C, Köser CU, Wilson DJ, Cirillo DM, Matias D, Jorgensen D, Zimenkov D, Chetty D, Moore DA, Clifton DA, Crook DW, van Soolingen D, Liu D, Kohlerschmidt D, Barreira D, Ngcamu D, Santos Lazaro ED, Kelly E, Borroni E, Roycroft E, Andre E, Böttger EC, Robinson E, Menardo F, Mendes FF, Jamieson FB, Coll F, Gao GF, Kasule GW, Rossolini GM, Rodger G, Smith EG, Meintjes G, Thwaites G, Hoffmann H, Albert H, Cox H, Laurenson IF, Comas I, Arandjelovic I, Barilar I, Robledo J, Millard J, Johnston J, Posey J, Andrews JR, Knaggs J, Gardy J, Guthrie J, Taylor J, Werngren J, Metcalfe J, Coronel J, Shea J, Carter J, Pinhata JM, Kus J V, Todt K, Holt K, Nilgiriwala KS, Ghisi KT, Malone KM, Faksri K, Musser KA, Joseph L, Rigouts L, Chindelevitch L, Jarrett L, Grandjean L, Ferrazoli L, Rodrigues M, Farhat M, Schito M, Fitzgibbon MM, Loembé MM, Wijkander M, Ballif M, Rabodoarivelo MS, Mihalic M, WILCOX M, Hunt M, ZIGNOL M, Merker M, Egger M, O'Donnell M, Caws M, Wu MH, Whitfield MG, Inouye M, Mansjö M, Dang Thi MH, Joloba M, Kamal SM, Okozi N, ISMAIL N, Mistry N, Hoang NN, Rakotosamimanana N, Paton NI, Rancoita PM V, Miotto P, Lapierre P, Hall PJ, Tang P, Claxton P, Wintringer P, Keller PM, Thai PVK, Fowler PW, Supply P, Srilohasin P, Suriyaphol P, Rathod P, Kambli P, Groenheit R, Colman RE, Ong RTH, Warren RM, Wilkinson RJ, Diel R, Oliveira RS, Khot R, Jou R, Tahseen S, Laurent S, Gharbia S, Kouchaki S, Shah S, Plesnik S, Earle SG, Dunstan S, Hoosdally SJ, Mitarai S, Gagneux S, Omar S V, Yao SY, Grandjean Lapierre S, Battaglia S, Niemann S, Pandey S, Uplekar S, Halse TA, Cohen T, Cortes T, Prammananan T, Kohl TA, Thuong NTT, Teo TY, Peto TEA, Rodwell TC, William T, Walker TM, Rogers TR, Surve U, Mathys V, Furió V, Cook V, Vijay S, Escuyer V, Dreyer V, Sintchenko V, Saphonn V, Solano W, Lin WH, van Gemert W, He W, Yang Y, Zhao Y, Qin Y, Xiao YX, Hasan Z, Iqbal Z, Puyen ZM. The 2021 WHO catalogue of Mycobacterium tuberculosis complex mutations associated with drug resistance: a genotypic analysis. *Lancet Microbe*. 2022;3(4):e265–73.

46. The CRyPTIC Consortium. Epidemiological cutoff values for a 96-well broth microdilution plate for high-throughput research antibiotic susceptibility testing of *M. tuberculosis*. *European Respiratory Journal* [Internet]. 2022 [zitiert 21. Juni 2022];2200239. Verfügbar unter: <http://erj.ersjournals.com/lookup/doi/10.1183/13993003.00239-2022>
47. Fröberg G, Maurer FP, Chryssanthou E, Fernström L, Benmansour H, Boarbi S, Mengshoel AT, Keller PM, Viveiros M, Machado D, Fitzgibbon MM, Mok S, Werngren J, Cirillo DM, Alcaide F, Hyyryläinen HL, Aubry A, Andres S, Nadarajan D, Svensson E, Turnidge J, Giske CG, Kahlmeter G, Cambau E, van Ingen J, Schön T. Towards clinical breakpoints for non-tuberculous mycobacteria – Determination of epidemiological cut off values for the Mycobacterium avium complex and Mycobacterium abscessus using broth microdilution.

- Clinical Microbiology and Infection [Internet]. 2023 [zitiert 5. Mai 2023]; Verfügbar unter: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1198743X23000605>
48. World Health Organization. Line probe assays for detection of drug-resistant tuberculosis Interpretation and reporting manual for laboratory staff and clinicians [Internet]. 2022 [zitiert 3. Oktober 2022]. Verfügbar unter: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240046665>
 49. Makhado NA, Matabane E, Faccin M, Pinçon C, Jouet A, Boutachkourt F, Goeminne L, Gaudin C, Maphalala G, Beckert P, Niemann S, Delvenne JC, Delmée M, Razwiedani L, Nchabeleng M, Supply P, de Jong BC, André E. Outbreak of multidrug-resistant tuberculosis in South Africa undetected by WHO-endorsed commercial tests: an observational study. *Lancet Infect Dis* [Internet]. 2018 [zitiert 2. August 2022];18(12):1350–9. Verfügbar unter: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1473309918304961>
 50. Cabibbe AM, Walker TM, Niemann S, Cirillo DM. Whole genome sequencing of *Mycobacterium tuberculosis*. *European Respiratory Journal*. 2018;52(5).
 51. Beckert P, Sanchez-Padilla E, Merker M, Dreyer V, Kohl TA, Utpatel C, Köser CU, Barilar I, Ismail N, Omar SV, Klopper M, Warren RM, Hoffmann H, Maphalala G, Ardizzoni E, de Jong BC, Kerschberger B, Schramm B, Andres S, Kranzer K, Maurer FP, Bonnet M, Niemann S. MDR *M. tuberculosis* outbreak clone in Eswatini missed by Xpert has elevated bedaquiline resistance dated to the pre-treatment era. *Genome Med*. 2020;12(1).
 52. Sanchez-Padilla E, Merker M, Beckert P, Jochims F, Dlamini T, Kahn P, Bonnet M, Niemann S. Detection of Drug-Resistant Tuberculosis by Xpert MTB/RIF in Swaziland. *New England Journal of Medicine* [Internet]. 2015 [zitiert 30. Juli 2023];372(12):1181–2. Verfügbar unter: <http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMc1413930>
 53. Pillay S, Steingart KR, Davies GR, Chaplin M, De Vos M, Schumacher SG, Warren R, Theron G. Xpert MTB/XDR for detection of pulmonary tuberculosis and resistance to isoniazid, fluoroquinolones, ethionamide, and amikacin. *Bd*. 2022, *Cochrane Database of Systematic Reviews*. John Wiley and Sons Ltd; 2022.
 54. World Health Organization. Rapid communication: key changes to the treatment of drug-resistant tuberculosis. [Internet]. Geneva; 2022 [zitiert 7. Mai 2023]. Verfügbar unter: <https://www.who.int/publications/i/item/WHO-UCN-TB-2022-2>
 55. Nyang'wa BT, Berry C, Kazounis E, Motta I, Parpieva N, Tigay Z, Solodovnikova V, Liverko I, Moodliar R, Dodd M, Ngubane N, Rassool M, McHugh TD, Spigelman M, Moore DAJ, Ritmeijer K, du Cros P, Fielding K, TB-PRACTECAL Study Collaborators. A 24-Week, All-Oral Regimen for Rifampin-Resistant Tuberculosis. *N Engl J Med* [Internet]. 2022 [zitiert 21.

- Januar 2023];387(25):2331–43. Verfügbar unter: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/36546625>
56. Mugwagwa T, Abubakar I, White PJ. Using molecular testing and whole-genome sequencing for tuberculosis diagnosis in a low-burden setting: a cost-effectiveness analysis using transmission-dynamic modelling. *Thorax* [Internet]. 2021 [zitiert 2. August 2022];76(3):281–91. Verfügbar unter: <https://thorax.bmj.com/lookup/doi/10.1136/thoraxjnl-2019-214004>
 57. Walker TM, Cruz ALG, Peto TE, Smith EG, Esmail H, Crook DW. Tuberculosis is changing. *Lancet Infect Dis* [Internet]. 2017 [zitiert 16. Oktober 2022];17(4):359–61. Verfügbar unter: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1473309917301238>
 58. Satta G, Lipman M, Smith GP, Arnold C, Kon OM, McHugh TD. Mycobacterium tuberculosis and whole-genome sequencing: how close are we to unleashing its full potential? Bd. 24, *Clinical Microbiology and Infection*. Elsevier B.V.; 2018. S. 604–9.
 59. Meehan CJ, Goig GA, Kohl TA, Verboven L, Dippenaar A, Ezewudo M, Farhat MR, Guthrie JL, Laukens K, Miotto P, Ofori-Anyinam B, Dreyer V, Supply P, Suresh A, Utpatel C, van Soolingen D, Zhou Y, Ashton PM, Brites D, Cabibbe AM, de Jong BC, de Vos M, Menardo F, Gagneux S, Gao Q, Heupink TH, Liu Q, Loiseau C, Rigouts L, Rodwell TC, Tagliani E, Walker TM, Warren RM, Zhao Y, Zignol M, Schito M, Gardy J, Cirillo DM, Niemann S, Comas I, van Rie A. Whole genome sequencing of Mycobacterium tuberculosis: current standards and open issues. Bd. 17, *Nature Reviews Microbiology*. Nature Publishing Group; 2019. S. 533–45.
 60. Sibandze DB, Kay A, Dreyer V, Sikhondze W, Dlamini Q, DiNardo A, Mtetwa G, Lukhele B, Vambe D, Lange C, Glenn Dlamini M, Ness T, Mejia R, Kalsdorf B, Heyckendorf J, Kuhns M, Maurer FP, Dlamini S, Maphalala G, Niemann S, Mandalakas A. Rapid molecular diagnostics of tuberculosis resistance by targeted stool sequencing. *Genome Med* [Internet]. 2022 [zitiert 7. Mai 2023];14(1):52. Verfügbar unter: <https://genomemedicine.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13073-022-01054-6>
 61. Cabibbe AM, Spitaleri A, Battaglia S, Colman RE, Suresh A, Uplekar S, Rodwell TC, Cirillo DM. Application of targeted next-generation sequencing assay on a portable sequencing platform for culture-free detection of drug-resistant tuberculosis from clinical samples. *J Clin Microbiol*. 2020;58(10).
 62. Feuerriegel S, Kohl TA, Utpatel C, Andres S, Maurer FP, Heyckendorf J, Jouet A, Badalato N, Foray L, Fouad Kamara R, Conteh OS, Supply P, Niemann S. Rapid genomic first- and second-line drug resistance prediction from clinical Mycobacterium tuberculosis specimens using Deeplex-MycTB. *European Respiratory Journal* [Internet]. 2021 [zitiert 13. Mai 2022];57(1):2001796. Verfügbar unter: <http://erj.ersjournals.com/lookup/doi/10.1183/13993003.01796-2020>

63. Jouet A, Gaudin C, Badalato N, Allix-Béguet C, Duthoy S, Ferré A, Diels M, Laurent Y, Contreras S, Feuerriegel S, Niemann S, André E, Kaswa MK, Tagliani E, Cabibbe A, Mathys V, Cirillo D, de Jong BC, Rigouts L, Supply P. Deep amplicon sequencing for culture-free prediction of susceptibility or resistance to 13 anti-tuberculous drugs. *European Respiratory Journal*. 2021;57(3).
64. Colman RE, Anderson J, Lemmer D, Lehmkuhl E, Georghiou SB, Heaton H, Wiggins K, Gillece JD, Schupp JM, Catanzaro DG, Crudu V, Cohen T, Rodwell TC, Engelthaler DM. Rapid Drug Susceptibility Testing of Drug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Isolates Directly from Clinical Samples by Use of Amplicon Sequencing: a Proof-of-Concept Study. Land GA, Herausgeber. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2016 [zitiert 13. Mai 2023];54(8):2058–67. Verfügbar unter: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/JCM.00535-16>
65. Park J, Shin SY, Kim K, Park K, Shin S, Ihm C. Determining Genotypic Drug Resistance by Ion Semiconductor Sequencing With the Ion AmpliSeq™ TB Panel in Multidrug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Isolates. *Ann Lab Med* [Internet]. 2018 [zitiert 13. Mai 2023];38(4):316–23. Verfügbar unter: <http://annlabmed.org/journal/view.html?doi=10.3343/alm.2018.38.4.316>
66. World Health Organization. Use of targeted next-generation sequencing to detect drug-resistant tuberculosis: rapid communication [Internet]. Geneva; 2023 [zitiert 26. August 2023]. Verfügbar unter: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240076372>
67. Finci I, Albertini A, Merker M, Andres S, Bablishvili N, Barilar I, Cáceres T, Crudu V, Gotuzzo E, Hapeela N, Hoffmann H, Hoogland C, Kohl TA, Kranzer K, Mantsoki A, Maurer FP, Nicol MP, Noroc E, Plesnik S, Rodwell T, Ruhwald M, Savidge T, Salfinger M, Streicher E, Tukvadze N, Warren R, Zemanay W, Zurek A, Niemann S, Denkinger CM. Investigating resistance in clinical *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates with genomic and phenotypic antimicrobial susceptibility testing: a multicentre observational study. *Lancet Microbe* [Internet]. 2022 [zitiert 9. August 2022]; Verfügbar unter: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2666524722001161>
68. Koehler N, Andres S, Merker M, Dreyer V, John A, Kuhns M, Krieger D, Choong E, Verougstraete N, zur Wiesch PA, Wicha SG, König C, Kalsdorf B, Sanchez Carballo PM, Schaub D, Werngren J, Schön T, Peloquin CA, Schönfeld N, Verstraete AG, Decosterd LA, Aarnoutse R, Niemann S, Maurer FP, Lange C. Pretomanid-resistant tuberculosis. *Journal of Infection*. 2023;
69. Shea J, Halse TA, Kohlerschmidt D, Lapierre P, Modestil HA, Kearns CH, Dworkin FF, Rakeman JL, Escuyer V, Musser KA. Low-Level Rifampin Resistance and *rpoB* Mutations in *Mycobacterium tuberculosis*: an Analysis of Whole-Genome Sequencing and Drug

- Susceptibility Test Data in New York. Diekema DJ, Herausgeber. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2021 [zitiert 27. Oktober 2022];59(4). Verfügbar unter: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/JCM.01885-20>
70. Coll F, McNerney R, Preston MD, Guerra-Assunção JA, Warry A, Hill-Cawthorne G, Mallard K, Nair M, Miranda A, Alves A, Perdigão J, Viveiros M, Portugal I, Hasan Z, Hasan R, Glynn JR, Martin N, Pain A, Clark TG. Rapid determination of anti-tuberculosis drug resistance from whole-genome sequences. *Genome Med* [Internet]. 2015 [zitiert 9. Juni 2022];7(1):51. Verfügbar unter: <http://genomemedicine.com/content/7/1/51>
71. Coll F, Phelan J, Hill-Cawthorne GA, Nair MB, Mallard K, Ali S, Abdallah AM, Alghamdi S, Alsomali M, Ahmed AO, Portelli S, Oppong Y, Alves A, Bessa TB, Campino S, Caws M, Chatterjee A, Crampin AC, Dheda K, Furnham N, Glynn JR, Grandjean L, Minh Ha D, Hasan R, Hasan Z, Hibberd ML, Joloba M, Jones-López EC, Matsumoto T, Miranda A, Moore DJ, Mocillo N, Panaiotov S, Parkhill J, Penha C, Perdigão J, Portugal I, Rchiad Z, Robledo J, Sheen P, Shesha NT, Sirgel FA, Sola C, Oliveira Sousa E, Streicher EM, Helden P van, Viveiros M, Warren RM, McNerney R, Pain A, Clark TG. Genome-wide analysis of multi- and extensively drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Nat Genet*. 2018;50(2):307–16.
72. Farhat MR, Freschi L, Calderon R, Ioerger T, Snyder M, Meehan CJ, de Jong B, Rigouts L, Sloutsky A, Kaur D, Sunyaev S, van Soolingen D, Shendure J, Sacchettini J, Murray M. GWAS for quantitative resistance phenotypes in *Mycobacterium tuberculosis* reveals resistance genes and regulatory regions. *Nat Commun*. 2019;10(1).
73. The CRyPTIC Consortium. Prediction of Susceptibility to First-Line Tuberculosis Drugs by DNA Sequencing. *New England Journal of Medicine* [Internet]. 2018 [zitiert 20. November 2021];379(15):1403–15. Verfügbar unter: <http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa1800474>
74. Kohl TA, Utpatel C, Schleusener V, De Filippo MR, Beckert P, Cirillo DM, Niemann S. MTBseq: a comprehensive pipeline for whole genome sequence analysis of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates. *PeerJ* [Internet]. 2018 [zitiert 20. November 2021];6(11):e5895. Verfügbar unter: <https://peerj.com/articles/5895>
75. Grobbel HP, Merker M, Köhler N, Andres S, Hoffmann H, Heyckendorf J, Reimann M, Barilar I, Dreyer V, Hillemann D, Kalsdorf B, Kohl TA, Sanchez Carballo P, Schaub D, Todt K, Utpatel C, Maurer FP, Lange C, Niemann S. Design of Multidrug-Resistant Tuberculosis Treatment Regimens Based on DNA Sequencing. *Clin Infect Dis*. 2021;73(7):1194–202.
76. Yadon AN, Maharaj K, Adamson JH, Lai YP, Sacchettini JC, Ioerger TR, Rubin EJ, Pym AS. A comprehensive characterization of PncA polymorphisms that confer resistance to

- pyrazinamide. *Nat Commun* [Internet]. 2017 [zitiert 8. November 2021];8(1). Verfügbar unter: <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-017-00721-2>
77. Merker M, Kohl TA, Barilar I, Andres S, Fowler PW, Chryssanthou E, Ängeby K, Jureen P, Moradigaravand D, Parkhill J, Peacock SJ, Schön T, Maurer FP, Walker T, Köser C, Niemann S. Phylogenetically informative mutations in genes implicated in antibiotic resistance in *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Genome Med.* 2020;12(1):1–8.
 78. World Health Organization. Companion handbook to the WHO guidelines for the programmatic management of drug-resistant tuberculosis [Internet]. World Health Organization. 2014 [zitiert 9. November 2023]. Verfügbar unter: <https://www.who.int/publications/i/item/9789241548809>
 79. World Health Organization. Technical manual for drug susceptibility testing of medicines used in the treatment of tuberculosis [Internet]. World Health Organization; 2018 [zitiert 2. August 2019]. 430–439 S. Verfügbar unter: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/275469/9789241514842-eng.pdf>
 80. Horne DJ, Pinto LM, Arentz M, Lin SYG, Desmond E, Flores LL, Steingart KR, Minion J. Diagnostic Accuracy and Reproducibility of WHO-Endorsed Phenotypic Drug Susceptibility Testing Methods for First-Line and Second-Line Antituberculosis Drugs. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2013 [zitiert 21. Februar 2022];51(2):393–401. Verfügbar unter: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/JCM.02724-12>
 81. Rancoita PMV, Cugnata F, Gibertoni Cruz AL, Borroni E, Hoosdally SJ, Walker TM, Grazian C, Davies TJ, Peto TEA, Crook DW, Fowler PW, Cirillo DM. Validating a 14-drug microtiter plate containing bedaquiline and delamanid for large-scale research susceptibility testing of *mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2018;62(9).
 82. World Health Organization. WHO consolidated guidelines on drug-resistant tuberculosis treatment [Internet]. WHO consolidated guidelines on drug-resistant tuberculosis treatment. 2019 [zitiert 9. November 2023]. Verfügbar unter: <https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/311389/9789241550529-eng.pdf?sequence=1>
 83. Julious SA. Two-sided confidence intervals for the single proportion: comparison of seven methods by Robert G. Newcombe, *Statistics in Medicine* 1998;17:857–872. *Stat Med.* 2005;24(21):3383–4.
 84. Safi H, Lingaraju S, Amin A, Kim S, Jones M, Holmes M, McNeil M, Peterson SN, Chatterjee D, Fleischmann R, Alland D. Evolution of high-level ethambutol-resistant tuberculosis through interacting mutations in decaprenylphosphoryl- β -D-Arabinose biosynthetic and utilization pathway genes. *Nat Genet.* 2013;45(10):1190–7.

85. Walker TM, Kohl TA, Omar S v., Hedge J, del Ojo Elias C, Bradley P, Iqbal Z, Feuerriegel S, Niehaus KE, Wilson DJ, Clifton DA, Kapatai G, Ip CLC, Bowden R, Drobniewski FA, Allix-Béguec C, Gaudin C, Parkhill J, Diel R, Supply P, Crook DW, Smith EG, Walker AS, Ismail N, Niemann S, Peto TEA, Davies J, Crichton C, Acharya M, Madrid-Marquez L, Eyre D, Wyllie D, Golubchik T, Munang M. Whole-genome sequencing for prediction of *Mycobacterium tuberculosis* drug susceptibility and resistance: A retrospective cohort study. *Lancet Infect Dis.* 2015;15(10):1193–202.
86. Domínguez J, Boettger EC, Cirillo D, Cobelens F, Eisenach KD, Gagneux S, Hillemann D, Horsburgh R, Molina-Moya B, Niemann S, Tortoli E, Whitelaw A, Lange C. Clinical implications of molecular drug resistance testing for *Mycobacterium tuberculosis*: a TBNET/RESIST-TB consensus statement. *Int J Tuberc Lung Dis* [Internet]. 2016 [zitiert 28. November 2017];20(1):24–42. Verfügbar unter: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26688526>
87. Doyle RM, Burgess C, Williams R, Gorton R, Booth H, Brown J, Bryant JM, Chan J, Creer D, Holdstock J, Kunst H, Lozewicz S, Platt G, Romero EY, Speight G, Tiberi S, Abubakar I, Lipman M, McHugh TD, Breuer J. Direct whole-genome sequencing of sputum accurately identifies drug-resistant mycobacterium tuberculosis faster than MGIT culture sequencing. *J Clin Microbiol.* 2018;56(8).
88. Nimmo C, Millard J, Faulkner V, Monteserin J, Pugh H, Johnson EO. Evolution of *Mycobacterium tuberculosis* drug resistance in the genomic era. Bd. 12, *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology.* Frontiers Media S.A.; 2022.
89. Gygli SM, Keller PM, Ballif M, Blöchliger N, Hömke R, Reinhard M, Loiseau C, Ritter C, Sander P, Borrell S, Loo JC, Avihingsanon A, Gnokoro J, Yotebieng M, Egger M, Gagneux S, Böttger EC. Whole-Genome Sequencing for Drug Resistance Profile Prediction in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2019;63(4).
90. Ruesen C, Riza AL, Florescu A, Chaidir L, Editoiu C, Aalders N, Nicolosu D, Grecu V, Ioana M, van Crevel R, van Ingen J. Linking minimum inhibitory concentrations to whole genome sequence-predicted drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* strains from Romania. *Sci Rep.* 2018;8(1).
91. Miotto P, Cabibbe AM, Borroni E, Degano M, Cirillo DM. Role of Disputed Mutations in the *rpoB* Gene in Interpretation of Automated Liquid MGIT Culture Results for Rifampin Susceptibility Testing of *Mycobacterium tuberculosis*. Land GA, Herausgeber. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2018 [zitiert 13. Mai 2022];56(5). Verfügbar unter: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29540456>

92. Maurer FP, Courvalin P, Böttger EC, Hombach M. Integrating forecast probabilities in antibiograms: A way to guide antimicrobial prescriptions more reliably? *J Clin Microbiol.* 2014;52(10):3674–84.
93. Willby M, Sikes RD, Malik S, Metchock B, Posey JE. Correlation between GyrA substitutions and ofloxacin, levofloxacin, and moxifloxacin cross-resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015;59(9):5427–34.
94. Heyckendorf J, Andres S, Köser CU, Oлару ID, Schön T, Sturegård E, Beckert P, Schleusener V, Kohl TA, Hillemann D, Moradigaravand D, Parkhill J, Peacock SJ, Niemann S, Lange C, Merker M. What is resistance? Impact of phenotypic versus molecular drug resistance testing on multi- and extensively drug-resistant tuberculosis therapy. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 2017 [zitiert 27. November 2017];(November):AAC.01550-17. Verfügbar unter: <http://aac.asm.org/lookup/doi/10.1128/AAC.01550-17>
95. Ängeby K, Juréen P, Kahlmeter G, Hoffner SE, Schönd T. Challenging a dogma: antimicrobial susceptibility testing breakpoints for *Mycobacterium tuberculosis*. *Bull World Health Organ.* 2012;90(9):693–8.
96. Hoffmann H, Kohl TA, Hofmann-Thiel S, Merker M, Beckert P, Jatón K, Nedialkova L, Sahalchik E, Rothe T, Keller PM, Niemann S. Delamanid and bedaquiline resistance in mycobacterium tuberculosis ancestral Beijing genotype causing extensively drug-resistant tuberculosis in a tibetan refugee. *Bd. 193, American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine. American Thoracic Society; 2016. S. 337–40.*
97. Almeida D, Ioerger T, Tyagi S, Li SY, Mdluli K, Andries K, Grosset J, Sacchettini J, Nuermberger E. Mutations in *pepQ* confer low-level resistance to bedaquiline and clofazimine in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2016;60(8):4590–9.
98. Polsfuss S, Hofmann-Thiel S, Merker M, Krieger D, Niemann S, Rüssmann H, Schönfeld N, Hoffmann H, Kranzer K. Emergence of Low-level Delamanid and Bedaquiline Resistance during Extremely Drug-resistant Tuberculosis Treatment. *Clinical Infectious Diseases.* 2019;69(7):1229–31.
99. Georghiou SB, Rodwell TC, Korobitsyn A, Abbadi SH, Ajbani K, Alffenaar JW, Alland D, Alvarez N, Andres S, Ardizzoni E, Aubry A, Baldan R, Ballif M, Barilar I, Böttger EC, Chakravorty S, Claxton PM, Cirillo DM, Comas I, Coulter C, Denkinge CM, Derendinger B, Desmond EP, de Steenwinkel JEM, Dheda K, Diacon AH, Dolinger DL, Dooley KE, Egger M, Ehsani S, Farhat MR, Fattorini L, Finci I, Le Ray LF, Furió V, Groenheit R, Gumbo T, Heysell SK, Hillemann D, Hoffmann H, Hsueh PR, Hu Y, Huang H, Hussain A, Ismail F, Izumi K, Jagielski T, Johnson JL, Kambli P, Kaniga K, Eranga Karunaratne GHR, Sharma MK, Keller PM, Kelly EC, Kholina M, Kohli M, Kranzer K, Laurenson IF, Limberis J, Grace Lin SY, Liu Y, López-Gavín A, Lyander A,

- Machado D, Martinez E, Masood F, Mitarai S, Mvelase NR, Niemann S, Nikolayevskyy V, Maurer FP, Merker M, Miotto P, Omar S V., Otto-Knapp R, Palaci M, Palacios Gutiérrez JJ, Peacock SJ, Peloquin CA, Perera J, Pierre-Audigier C, Pholwat S, Posey JE, Prammananan T, Rigouts L, Robledo J, Rockwood N, Rodrigues C, Salfinger M, Schechter MC, Seifert M, Sengstake S, Shinnick T, Shubladze N, Sintchenko V, Sirgel F, Somasundaram S, Sterling TR, Spitaleri A, Streicher E, Supply P, Svensson E, Tagliani E, Tahseen S, Takaki A, Theron G, Torrea G, Van Deun A, van Ingen J, Van Rie A, van Soolingen D, Vargas Jr R, Venter A, Veziris N, Villellas C, Viveiros M, Warren R, Wen S, Werngren J, Wilkinson RJ, Yang C, Yilmaz FF, Zhang T, Zimenkov D, Ismail N, Köser CU, Schön T. Updating the approaches to define susceptibility and resistance to anti-tuberculosis agents: implications for diagnosis and treatment. *European Respiratory Journal* [Internet]. 2022 [zitiert 28. Mai 2022];59(4):2200166. Verfügbar unter: <http://erj.ersjournals.com/lookup/doi/10.1183/13993003.00166-2022>
100. Schön T, Köser CU, Werngren J, Viveiros M, Georghiou S, Kahlmeter G, Giske C, Maurer F, Lina G, Turnidge J, van Ingen J, Jankovic M, Goletti D, Cirillo DM, Santin M, Cambau E. What is the role of the EUCAST reference method for MIC testing of the *Mycobacterium tuberculosis* complex? Bd. 26, *Clinical Microbiology and Infection*. Elsevier B.V.; 2020. S. 1453–5.
 101. Faksri K, Kaewprasert O, Ong RTH, Suriyaphol P, Prammananan T, Teo YY, Srilohasin P, Chaiprasert A. Comparisons of whole-genome sequencing and phenotypic drug susceptibility testing for *Mycobacterium tuberculosis* causing MDR-TB and XDR-TB in Thailand. *Int J Antimicrob Agents*. 2019;54(2):109–16.
 102. Hunt M, Bradley P, Lapierre SG, Heys S, Thomsit M, Hall MB, Malone KM, Wintringer P, Walker TM, Cirillo DM, Comas I, Farhat MR, Fowler P, Gardy J, Ismail N, Kohl TA, Mathys V, Merker M, Niemann S, Omar SV, Sintchenko V, Smith G, van Soolingen D, Supply P, Tahseen S, Wilcox M, Arandjelovic I, Peto TEA, Crook DW, Iqbal Z. Antibiotic resistance prediction for *Mycobacterium tuberculosis* from genome sequence data with mykrobe [version 1; peer review: 2 approved, 1 approved with reservations]. *Wellcome Open Res*. 2019;4.
 103. World Health Organization. High-priority target product profiles for new tuberculosis diagnostics: report of a consensus meeting [Internet]. 2014 [zitiert 12. Juli 2022]. Verfügbar unter: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/135617>
 104. World Health Organization. Target product profile for next-generation drug-susceptibility testing at peripheral centres [Internet]. Geneva; 2021 [zitiert 20. Mai 2023]. Verfügbar unter: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240032361>

105. Schön T, Juréen P, Chryssanthou E, Giske CG, Kahlmeter G, Hoffner S, Ängeby K. Rifampicin-resistant and rifabutin-susceptible mycobacterium tuberculosis strains: A breakpoint artefact? *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2013;68(9):2074–7.
106. Reeves AZ, Campbell PJ, Willby MJ, Posey JE. Disparities in capreomycin resistance levels associated with the rrs A1401G mutation in clinical isolates of mycobacterium tuberculosis. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015;59(1):444–9.
107. Dheda K, Lange C. A revolution in the management of multidrug-resistant tuberculosis. *The Lancet* [Internet]. 2022 [zitiert 21. Januar 2023];400(10366):1823–5. Verfügbar unter: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673622021614>
108. Brown AC, Bryant JM, Einer-Jensen K, Holdstock J, Houniet DT, Chan JZM, Depledge DP, Nikolayevskyy V, Broda A, Stone MJ, Christiansen MT, Williams R, McAndrew MB, Tutill H, Brown J, Melzer M, Rosmarin C, McHugh TD, Shorten RJ, Drobniewski F, Speight G, Breuer J. Rapid whole-genome sequencing of mycobacterium tuberculosis isolates directly from clinical samples. *J Clin Microbiol*. 2015;53(7):2230–7.
109. Mohamed S, Köser CU, Salfinger M, Sougakoff W, Heysell SK. Targeted next-generation sequencing: a Swiss army knife for mycobacterial diagnostics? Bd. 57, *European Respiratory Journal*. European Respiratory Society; 2021.
110. Kadura S, King N, Nakhoul M, Zhu H, Theron G, Köser CU, Farhat M. Systematic review of mutations associated with resistance to the new and repurposed Mycobacterium tuberculosis drugs bedaquiline, clofazimine, linezolid, delamanid and pretomanid. *J Antimicrob Chemother*. 2020;75(8):2031–43.
111. Günther G, Guglielmetti L, Leu C, Lange C, van Leth F, Hasan Hafizi, Khachatryan N, Aroyan H, Kabasakalyan E, Knappik M, Skrahina A, Klimuk D, Nikolenka A, Muylle I, Milanov V, Velkovska D, Tarinska N, Bachiyska E, Jankovic M, Pieridou D, Adamide T, Nicolaou N, Vasakova M, Sukholytka M, Kopeckà E, Folkvardsen DB, Svensson E, Danilovits M, Kummik T, Vasankari T, Fréchet-Jachym M, Nahmiash A, Togonidze T, Avaliani Z, Kinkladze I, Aspindzelashvili R, Bichashvili T, Losaberidze G, Merabishvili T, Kalsdorf B, Manika K, Tsiakitzis K, Bakos A, Ægisdóttir TR, Michelsen GS, Karlsdóttir K, McLaughlin AM, Fitzgibbon M, Chemtob D, Codecasa LR, Ferrarese M, Torri S, Gjocaj M, Kuksa L, Davidaviciene E, Wirtz G, Perrin M, Asciak AP, Chesov D, de Lange W, Akkerman O, Poposka BI, Mack U, Jensenius M, Kvalvik L, Mengshoel AT, Kruczak K, Duarte R, Ribeiro N, Ibraim E, Kaluzhenina A, Barkanova O, Pesut D, Solovic I, Svetina P, Souza-Galvão ML de, Millet JP, Casas X, Vives M, Bruchfeld J, Dalemo P, Jonsson J, Aeschbacher K, Keller P, Özkara S, Tiberi S, Chen C, Terleeva Y, Dudnyk A. Availability and costs of medicines for the treatment of tuberculosis in Europe. *Clinical Microbiology and Infection*. 2022;

112. Butov D, Lange C, Heyckendorf J, Kalmykova I, Butova T, Borovok N, Novokhatskaya M, Chesov D. Multidrug-resistant tuberculosis in the Kharkiv Region, Ukraine. *Int J Tuberc Lung Dis* [Internet]. 2020 [zitiert 13. Mai 2023];24(5):485–91. Verfügbar unter: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32398197>
113. Working Group on New TB Drugs [Internet]. [zitiert 26. August 2023]. Verfügbar unter: <https://www.newtbdrugs.org/>

15 Anhang

Anhang-Tabelle 1: Einzelheiten zu Diskrepanzen zwischen den Ergebnissen des Next Generation Sequencing (NGS) und der Flüssigkultur (MGIT – Mycobacteria Growth Indicator Tube), einschließlich der entsprechenden Polymorphismen

NGS	MGIT	Polymorphismus	Antibiotikum		
unbekannt	resistent	Rv0678: R89L (cgg/cTg)	Bedaquilin		
		Rv067829: R89L (cgg/cTg)	Clofazimin		
		embB: Y319C (tat/tGt) ubiA: V55G (gtg/gGg)	Ethambutol		
		dfrA: -50 C/A	PAS		
		dfrA: -50 C/A	PAS		
		ethA: N379D (aac/Gac)	Prothionamid		
		Rv0565c: R54C (cgc/Tgc) ethA: A335D (gct/gAt)	Prothionamid		
		ethA: N379D (aac/Gac)	Prothionamid		
		suszeptibel		mmpL5: large_del	Bedaquilin
				mmpL5: M655T (atg/aCg)	Bedaquilin
mmpL5: G748D (ggc/gAc)	Bedaquilin				
mmpS5: _143_ (tga/tAa)G130D (ggc/gAc)	Bedaquilin				
mmpL5: G748D (ggc/gAc)	Bedaquilin				
mmpR: -74 C/A	Bedaquilin				
mmpL530: large_del	Clofazimin				
serB2: G13G (ggc/ggT)	Clofazimin				
Rv1979c: V423A (gtg/gCg)	Clofazimin				
mmpL530: M655T (atg/aCg)	Clofazimin				
mmpL530: G748D (ggc/gAc)	Clofazimin				
mmpS531: _143_ (tga/tAa)G130D (ggc/gAc)	Clofazimin				
mmpL530: G748D (ggc/gAc)	Clofazimin				
mmpR32: -74 C/A	Clofazimin				
ald: D198G (gac/gGc)	Cycloserin				
ddlA: Q75E (cag/Gag)	Cycloserin				
alr: T247M (acg/aTg)	Cycloserin				
ald: F92L (ttc/ttG)	Cycloserin				
cycA: L360R (ctc/cGc) ald: -24 C/T	Cycloserin				
cycA: N248S (aat/aGt)	Cycloserin				
cycA: V453A (gtg/gCg) alr: K157E (aag/Gag)	Cycloserin				
alr: T247M (acg/aTg)	Cycloserin				
cycA: A350A (gct/gcC)	Cycloserin				
fbiC: D616G (gat/gGt)	Delamanid				
fbiC: W678G (tgg/Ggg)	Delamanid				

		ddn: P6T (ccg/Acg)	Delamanid
		fbiC: W678G (tgg/Ggg)	Delamanid
		fbiB: A31T (gcc/Acc)	Delamanid
		ddn: P6T (ccg/Acg)	Delamanid
		fbiC: G445G (ggc/ggT) fbiB: R157R (cgC/cgG)	Delamanid
		fbiA: -213 C/A fbiB: T92T (acg/acC)E138K (gag/Aag)	Delamanid
		aftA: P575L (ccc/cTc)	Ethambutol
		aftA: M14L (atg/Ttg)	Ethambutol
		embB: L74R (ctg/cGg)D328G (gat/gGt)	Ethambutol
		embC: P707L (ccg/cTg)	Ethambutol
		gyrA: I189M (atc/atG)	Levofloxacin
		gyrB: I84V (att/Gtt) eccB5: S196R (agt/Cgt)	Levofloxacin
		gyrA: I189M (atc/atG)	Moxifloxacin
		gyrB: I84V (att/Gtt) eccB5: S196R (agt/Cgt)	Moxifloxacin
		thyA: P253A (ccg/Gcg)	PAS
		dfrA: V54G (gtc/gGc)	PAS
		folC: D135G (gac/gGc)	PAS
		udgB24: P43L (ccg/cTg)	PAS
		folC: V202I (gtc/Atc)	PAS
		folC: E40Q (gag/Cag)	PAS
		Rv308320: large_del	Prothionamid
		ethA: H281P (cac/cCc)	Prothionamid
		mshC18: -23 G/C	Prothionamid
		ethA: T342M (acg/aTg)	Prothionamid
		ethA: G43V (ggc/gTc)	Prothionamid
		mshC18: V79I (gtc/Atc)	Prothionamid
		ethA: P378L (ccc/cTc) Rv308320: Y443Y (tat/taC)	Prothionamid
		ethA: V238G (gta/gGa)	Prothionamid
		mshA19: G292R (ggg/Agg)	Prothionamid
		mshC18: -23 G/C	Prothionamid
		ethA: V188I (gtc/Atc)	Prothionamid
		ethA: T117P (acc/Ccc)	Prothionamid
		ethA: N379D (aac/Gac)	Prothionamid
		pncA: A102V (gcg/gTg) Rv2731: A302S (gcg/Tcg)	Pyrazinamid
resistent	suszeptibel	rrs: 1401 A/G	Amikacin
		eis: -14 c/t	Amikacin
		eis: -14 c/t	Amikacin
		Rv0678: 779130i1_C	Bedaquilin
		alr: D344N (gac/Aac)	Cycloserin

alr: M343T (atg/aCg)	Cycloserin
embB: M306I (atg/atA)	Ethambutol
embB: M306I (atg/atT)	Ethambutol
embA: -16 C/T	Ethambutol
embA: -16 C/T	Ethambutol
embB: M306I (atg/atC)	Ethambutol
embB: M306V (atg/Gtg)	Ethambutol
embB: M306V (atg/Gtg)	Ethambutol
embA: -593 C/A-12 C/T ubiA: L284L (ttg/Ctg)	Ethambutol
embC: I832V (atc/Gtc) embB: M306I (atg/atA)	Ethambutol
embA: -8 C/A	Ethambutol
embB: Q497K (cag/Aag)T1027T (acg/acA)	Ethambutol
embA: -16 C/T	Ethambutol
embB: M306I (atg/atA)	Ethambutol
embB: G406D (ggc/gAc)	Ethambutol
embA: -8 C/A	Ethambutol
embA: -593 C/A-12 C/T ubiA: L284L (ttg/Ctg)	Ethambutol
katG: S315T (agc/aCc)	Isoniazid
gyrA: D94N (gac/Aac)	Levofloxacin
gyrA: D94A (gac/gCc)	Levofloxacin
gyrA: S91P (tcg/Ccg)	Levofloxacin
gyrA: D94A (gac/gCc)R578Q (cgg/cAg)	Levofloxacin
rplC: C154R (tgt/Cgt)	Linezolid
gyrA: D94N (gac/Aac)	Moxifloxacin
gyrA: D94A (gac/gCc)	Moxifloxacin
gyrA: D94A (gac/gCc)R578Q (cgg/cAg)	Moxifloxacin
gyrA: A90V (gcg/gTg)	Moxifloxacin
gyrA: A90V (gcg/gTg)	Moxifloxacin
gyrA: A90V (gcg/gTg)	Moxifloxacin
ribD: -12 g/a	PAS
folC: E40G (gag/gGg)	PAS
folC: I43T (atc/aCc)	PAS
folC: I43T (atc/aCc)	PAS
folC: S150G (agc/Ggc)	PAS
ethA: large_del Rv308320: large_del	Prothionamid
ethA: 4326045i1_CT	Prothionamid
ethA: 4327364_GAP	Prothionamid
inhA16: -15 c/t G3G (gga/ggC)	Prothionamid
ethA: 4327364_GAP	Prothionamid
pncA: 2288850i1_c	Pyrazinamid
rpoB: H445Y (cac/Tac) H445R (cac/cGc)	Rifabutin
rpoB: L430P (ctg/cCg)	Rifabutin

	rpoB: L452P (ctg/cCg)	Rifabutin
	rpoB: H445L (cac/cTc)	Rifabutin
	rpoB: H445L (cac/cTc) rpoC: V1138G (gtc/gGc)	Rifabutin
	rpoB: L452P (ctg/cCg)-577 c/t	Rifabutin
	rpoB: V113I (gtc/Atc)D435V (gac/gTc)H1028D (cac/Gac)	Rifabutin
	rpoB: H445L (cac/cTc) rpoC: V1138G (gtc/gGc)	Rifabutin
	rpoB: R167H (cgt/cAt)D435Y (gac/Tac)	Rifabutin
	rpoB: L430P (ctg/cCg)	Rifabutin
	rpoB: D435Y (gac/Tac)	Rifabutin
	rpoB: H445L (cac/cTc) rpoC: V1130V (gtg/gtA)	Rifabutin
	rpoB: D435V (gac/gTc)	Rifabutin
	rpoB: L430P (ctg/cCg)	Rifampicin
	rpoB: L452P (ctg/cCg)	Rifampicin
	rpoB: L452P (ctg/cCg)-577 c/t	Rifampicin
	rpoB: L430P (ctg/cCg)	Rifampicin
	rpoB: D435Y (gac/Tac)	Rifampicin
	rpoB: H445L (cac/cTc) rpoC: V1130V (gtg/gtA)	Rifampicin

suszeptibel	resistent	WT	Amikacin
		WT	Delamanid
		ddn: 7% S78P (tcc/Ccc)	Delamanid
		WT	Levofloxacin
		gyrA: 3% D94G (gac/gGc)	Levofloxacin
		WT	Moxifloxacin
		gyrA: 3% D94G (gac/gGc)	Moxifloxacin
		WT	PAS
		ribD: 2% -12 g/a	PAS
		WT	Pyrazinamid
		pncA: 16% M175V (atg/Gtg)	Pyrazinamid
		WT	Pyrazinamid

Abkürzungen: PAS = para-Aminosalicylsäure, WT = Wildtyp

16 Danksagung

Ohne die Hilfe und das Engagement vieler Menschen wäre die erfolgreiche Fertigstellung meiner Doktorarbeit nicht möglich gewesen und ich bin dankbar für die große Unterstützung, die ich erfahren habe.

Zunächst möchte ich meinem Doktorvater Christoph Lange für seine wertvolle Anleitung, seine fachliche Expertise und bescheidene Persönlichkeit danken, die mir immer ein großes Vorbild war. Deine konstruktive Kritik und die vielen Ratschläge haben meine Forschung erheblich bereichert und dein Vertrauen in meine Arbeit habe ich immer sehr geschätzt.

Ohne das wunderbare Laborteam der Klinischen Infektiologie wäre die Arbeit an dieser Dissertation zweifelsohne schwerer und trister gewesen. Liebe Pati, deine engagierte und aufmerksame Unterstützung war für mich stets eine große Hilfe. Hab vielen Dank für dein großes Wissen, deine Leidenschaft für die Forschung und konstante Ermutigung bei meiner Arbeit. Vielen Dank auch dir, lieber Niklas, für dein offenherziges, engagiertes Wesen und deine vielen wertvollen Hilfestellungen bei der Analyse der Daten. Ein großer Dank geht auch an Dagmar, Barbara, Jessi, Franzi, Maja und Jan für eure Hilfe, eure vielen Ideen und die wirklich schöne Zeit mit euch.

Ein großer Dank geht an meine lieben Freundinnen und Freunde, insbesondere an Christian, Moritz, Greta, Lennard und Fredo. Die Diskussionen und der Ideenaustausch mit euch haben meine Arbeit bereichert und mich immer wieder persönlich sehr inspiriert.

Meine Familie hat mich stets unterstützt und ermutigt. Ich möchte mich vor allem bei Mama und Papa und unseren Großeltern Opa Heinz, Opa Alfons, Oma Anneliese und Oma Hetti bedanken. Eure liebevolle Fürsorge während unserer Kindheit, eure wertvollen Ratschläge und eure kluge Weitsicht sind die Gründe für unser Urvertrauen und unsere Fähigkeiten.

Ein Dank geht zudem an das Deutsche Zentrum für Infektionsforschung für die finanzielle Förderung meiner wissenschaftlichen Arbeit. Es hat es mir ermöglicht, mich vollkommen auf meine Forschung zu konzentrieren.

Ich möchte betonen, dass meine Doktorarbeit das Ergebnis der Arbeit vieler wunderbarer Menschen ist. Jeder von euch hat Wertvolles dazu beigetragen, und ich bin stolz darauf, von so talentierten und großzügigen Menschen umgeben zu sein.

17 Publikationsliste Hans-Peter Grobbel (Stand: 09.11.2023)

Erstautorenschaft

Grobbel, H.-P.*, Merker, M.*, Köhler, N.*, Andres, S.*, Hoffmann, H.*, Heyckendorf, J., Reimann, M., Barilar, I., Dreyer, V., Hillemann, D., Kalsdorf, B., Kohl, T., Sanchez-Carballo, P., Schaub, D., Todt, K., Utpatel, C., Maurer, F., Lange, C., Niemann, S. (2021). Design of multidrug-resistant tuberculosis treatment regimens based on DNS sequencing. *Clinical Infectious Diseases*. doi:10.1093/cid/ciab359 (IF=8,313); *Gleichrangig beteiligt

Ko-Autorenschaft

Köhler, N.; Karaköse, H.; **Grobbel, H.-P.**; Hillemann, D.; Andres, S.; König, C.; Kalsdorf, B.; Brehm, T.T.; Böttcher, L.; Friesen, I.; et al. A Single-Run HPLC-MS Multiplex Assay for Therapeutic Drug Monitoring of Relevant First- and Second-Line Antibiotics in the Treatment of Drug-Resistant Tuberculosis. *Pharmaceutics* 2023, 15, 2543. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15112543>. (IF=5,4)

Lange C, Aarnoutse R, Chesov D, van Crevel R, Gillespie SH, **Grobbel HP**, Kalsdorf B, Kontsevaya I, van Laarhoven A, Nishiguchi T, Mandalakas A, Merker M, Niemann S, Köhler N, Heyckendorf J, Reimann M, Ruhwald M, Sanchez-Carballo P, Schwudke D, Waldow F, DiNardo AR. Perspective for Precision Medicine for Tuberculosis. *Front Immunol*. 2020 Oct 8;11:566608. doi: 10.3389/fimmu.2020.566608. eCollection 2020. PMID: 33117351. (IF=5,085)

Lange C, Aarnoutse RE, Alffenaar JWC, Bothamley G, Brinkmann F, Costa J, Chesov D, van Crevel R, Dedicoat M, Dominguez J, Duarte R, **Grobbel HP**, Günther G, Guglielmetti L, Heyckendorf J, Kay AW, Kirakosyan O, Kirk O, Koczulla RA, Kudriashov GG, Kuksa L, van Leth F, Magis-Escurra C, Mandalakas AM, Molina-Moya B, Peloquin CA, Reimann M, Rumetshofer R, Schaaf HS, Schön T, Tiberi S, Valda J, Yablonskii PK, Dheda K. Management of patients with multidrug-resistant tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2019 Jun 1;23(6):645-662. doi: 10.5588/ijtld.18.0622. PubMed PMID: 31315696. (IF=2,268)

Lange C, Alghamdi WA, Al-Shaer MH, Brighenti S, Diacon AH, DiNardo AR, **Grobbel HP**, Gröschel MI, von Groote-Bidlingmaier F, Hauptmann M, Heyckendorf J, Köhler N, Kohl TA, Merker M, Niemann S, Peloquin CA, Reimann M, Schaible UE, Schaub D, Schleusener V, Thye T, Schön T. Perspectives for personalized therapy for patients with multidrug-resistant tuberculosis. *J Intern Med*. 2018 May 28. doi: 10.1111/joim.12780. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 29806961. (IF=6,871)

Poster

Grobbel HP, Lange C, Reimann M et al. The sensitive, the specific and the gold standard – Advanced molecular and phenotypic DST diagnostics in M/XDR Tuberculosis. DZIF Jahrestagung 2019