



Фенотипическое определение спектра лекарственной чувствительности *Mycobacterium tuberculosis* на основе применения микобактериофагов

М.Б. ЛАПЕНКОВА, М.А. ВЛАДИМИРСКИЙ, О.А. РЫБИНА

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр фтизиопульмонологии и инфекционных заболеваний» МЗ РФ, Москва, РФ

РЕЗЮМЕ

В последние годы возрос интерес к фаговым технологиям как к перспективным методам быстрого определения спектра лекарственной чувствительности бактерий, в том числе *Mycobacterium tuberculosis*. Микобактериофаги способны специфически инфицировать *M. tuberculosis*, что дает возможность разработки новых эффективных, экономичных диагностических тестов, а также принципиально новых лекарственных препаратов для лечения туберкулеза. Проанализированы 27 источников, описывающие основные методы, используемые для определения спектра лекарственной чувствительности *M. tuberculosis* с помощью микобактериофагов. Преимуществом этих методов являются: быстрота (получение результатов за 24–96 часов с момента начала анализа); специфичность (основаны на строгом круге хозяев фага). Это позволяет в короткие сроки выявлять наличие возбудителя туберкулеза и его лекарственную чувствительность к противотуберкулезным препаратам.

Ключевые слова: *M. tuberculosis*, микобактериофаги, лекарственная чувствительность, анализ фаговой биологической активности, люциферазные репортерные фаги, флуоресцирующие микобактериофаги, ПЦР-РВ.

Для цитирования: Лапенкова М.Б., Владимирский М.А., Рыбина О.А. Фенотипическое определение спектра лекарственной чувствительности *Mycobacterium tuberculosis* на основе применения микобактериофагов // Туберкулёз и болезни лёгких. – 2025. – Т. 103, № 6. – С. 88–95. <http://doi.org/10.58838/2075-1230-2025-103-6-88-95>

Phenotypic Testing of Drug Susceptibility Spectrum of *Mycobacterium tuberculosis* Based on Mycobacteriophages

M.B. LAPENKOVA, M.A. VLADIMIRSKIY, O.A. RYBINA

National Medical Research Center of Phthisiopulmonology and Infectious Diseases, Russian Ministry of Health, Moscow, Russia

ABSTRACT

In recent years, much attention has been paid to phage technologies as promising methods for rapid testing of drug susceptibility of bacteria, including *Mycobacterium tuberculosis*. Mycobacteriophages are capable to infect specifically *M. tuberculosis*, which makes it possible to develop new effective, cost-efficient diagnostic tests, as well as fundamentally new drugs for tuberculosis treatment. This review analyzes twenty-seven publications describing main methods for testing the spectrum of drug susceptibility of *M. tuberculosis* based in mycobacteriophages. The advantages of these methods are the following: rapidness (results are obtained within 24–96 hours from the test start), and specificity (based on a strict host range of the phage). This allows for the rapid detection of *M. tuberculosis* and its susceptibility to anti-tuberculosis drugs.

Key words: *M. tuberculosis*, mycobacteriophages, drug susceptibility, analysis of phage biological activity, luciferase reporter phages, fluorescent mycobacteriophages, RT-PCR.

For citation: Lapenkova M.B., Vladimirovskiy M.A., Rybina O.A. Phenotypic testing of drug susceptibility spectrum of *mycobacterium tuberculosis* based on mycobacteriophages. *Tuberculosis and Lung Diseases*, 2025, vol. 103, no. 6, pp. 88–95. (In Russ.) <http://doi.org/10.58838/2075-1230-2025-103-6-88-95>

Для корреспонденции:
Лапенкова Марина Борисовна
E-mail: manyshik@list.ru

Correspondence:
Marina B. Lapenkova
Email: manyshik@list.ru

Введение

В связи с распространением во всем мире туберкулеза с лекарственной устойчивостью, включая множественную (МЛУ), пре-широкую (пре-ШЛУ) и широкую (ШЛУ) лекарственную устойчивость,

продолжает оставаться актуальным быстрое определение конкретных противотуберкулезных (ПТП), к которым устойчив выделенный от больного штамм микобактерий туберкулеза (МБТ). В настоящее время спектр лекарственной чувствительности МБТ определяется преимущественно культураль-

ными [1] и молекулярно–генетическим методами (полимеразная цепная реакция в реальном времени (ПЦР-РВ), биочиповые, картриджные технологии и метод геномного секвенирования) [2]. Несмотря на высокую точность, эти методы имеют ряд ограничений. Культуральный метод позволяет получить культуры МБТ на плотных и жидких средах (Bactec MGIT 960). Определение спектра лекарственной чувствительности МБТ (ЛЧ МБТ) после первичного роста на плотных питательных средах занимает 28 дней. При использовании импортной автоматизированной системы Bactec MGIT 960 получение результатов ЛЧ МБТ сокращается до 12 дней, что является более предпочтительным, но метод имеет высокую стоимость импортных расходных материалов. Молекулярно–генетические методы позволяют осуществить определение лекарственной чувствительности МБТ в более короткое время. Кроме того, они указывают на мутации, ассоциированные с лекарственной устойчивостью к ПТП, но могут не выявлять новые или редкие мутации [27].

Быстрое определение спектра лекарственной устойчивости (ЛУ) МБТ имеет важное значение для эффективного лечения больных туберкулезом. Поэтому необходимы новые чувствительные, специфичные и экономически выгодные диагностические методы, которые просты в использовании. Таким методом может стать тест-система, основанная на использовании микобактериофагов.

Принцип методов, основанных на использовании микобактериофагов, заключается в специфическом инфицировании метаболически активных клеток МБТ и анализа их лизиса. В 1947 г. Gardner and Weiser обнаружили первые микобактериофаги, которые могли заражать быстрорастущие сапрофитные микобактерии, такие как *Mycobacterium smegmatis* [17]. А в 1954 г. был открыт микобактериофаг, который был способен инфицировать медленно растущие патогенные бактерии комплекса *M. tuberculosis*, что дало возможность разработки диагностических инструментов [7]. Наиболее перспективными способами для определения спектра фенотипической лекарственной чувствительности на основе микобактериофагов являются: метод фаговой биологической амплификации, метод на основе флуоресцирующих микобактериофагов и молекулярно–генетический метод на основе анализа фаговой ДНК. Эти технологии демонстрируют потенциал для создания тестов, способных дать результат в течение 24–96 часов, что может кардинально изменить подходы к контролю над туберкулезом.

Классификация

Микобактериофаги — это вирусы с двухцепочечной ДНК, которые специфически инфицируют микобактерии, включая как *M. smegmatis*, так и *M. tuberculosis* и приводят к их гибели [10]. Инфицирование жизнеспособных МБТ в конечном итоге, в случае литического цикла, приводит к их

лизису с высвобождением нового поколения вирусных частиц. Микобактериофаги были разделены по морфологии и их антигенным свойствам на два семейства: *Siphoviridae* и *Myoviridae* [11]. Большинство *Siphoviridae* содержат изометрические головки диаметром от 48 до 75 нм, но некоторые имеют вытянутые головки [9, 21] и длинные гибкие несократимые хвосты. Длина хвоста *Siphoviridae* варьируется от 110 до 300 нм. Семейство *Myoviridae* относится к кластеру С, с крупными головками диаметром около 80 нм и сократительным хвостом [11]. В обоих семействах *Siphoviridae* и *Myoviridae* хвосты микобактериофагов состоят из сложенных друг на друга колец из шести субъединиц.

На сегодняшний день количество изолированных микобактериофагов составляет 14304, из них 2618 были полностью секвенированы. Микобактериофаги были распределены на 38 кластеров с субкластерами в соответствии с общим сходством их нуклеотидной последовательности. Фаги, не имеющие близких родственников, распределили на 13 синглтонов [24]. Одним из наиболее часто используемых для диагностических тестов микобактериофагов является литический микобактериофаг D29. Он относится к кластеру А, субкластеру А2 и обладает литической активностью. Микобактериофаг D29 относится к семейству *Siphoviridae* и эффективно инфицирует *M. tuberculosis*, непатогенные *M. smegmatis* mc² 155, *Mycobacterium bovis* BCG, а также условно патогенные *M. avium*, *M. scrofulaceum*, *M. fortuitum*, *M. chelonae*, *M. ulcerans* [8, 12].

Анализ фаговой биологической амплификации – PhaB (phage amplified biologically)

В 1997 г. Wilson S.M. и соавторы предложили метод анализа фаговой биологической амплификации (PhaB) для определения лекарственной чувствительности МБТ на основе микобактериофага D29 [26]. Принцип этого метода основан на том факте, что жизнеспособные бактериальные клетки *M. tuberculosis* могут защищать эндогенные фаги от инактивации вирулицидами [16, 23]. Образцы культур *M. tuberculosis* после первичного роста на плотной питательной среде (ППС) инкубируют с ПТП при 37°C в течение 3 дней. Затем добавляют микобактериофаг D29 с активностью 10¹⁰ БОЕ/мл и инкубируют при 37°C в течение 3 часов для инфицирования. Эндогенные фаги защищены бактериями и реплицируются внутри клеток-хозяев, в то время как экзогенные фаги инактивируются добавленным инактивирующим агентом (100 mM двухвалентный сульфат железа аммония). После добавления инактивирующего агента через 5 минут при комнатной температуре инаktivация останавливается путем добавления среды 7H9 с OADC и 1mM CaCl₂, с последующей инкубацией в течение 4 часов при 37°C. После чего освобожденные фаги смешиваются с сенсорными клетками (быстрорастущими микобактериями *M. smegmatis*). Смесь этих клеток

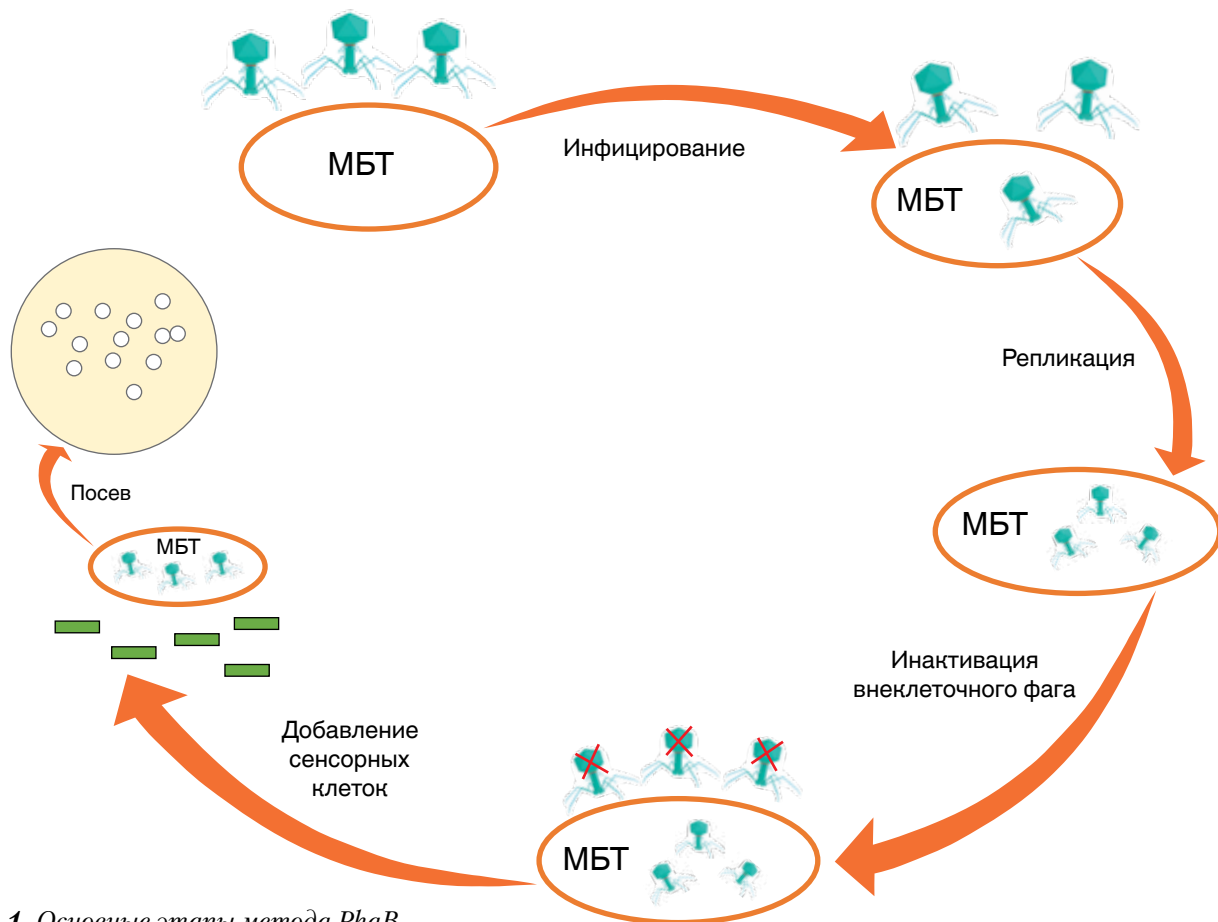


Рис. 1. Основные этапы метода PhaB

Fig. 1. The main stages of the PhaB method

высеваются на 0,75% Бакто-агар (Difco), и после инкубации подсчитываются их плаки (бляшкообразующие единицы – БОЕ) [26]. На рис. 1 представлены основные этапы метода PhaB. Количество плаков в исследуемом образце связано с количеством эндогенных микобактериофагов, которое зависит от количества жизнеспособных *M. tuberculosis* после инкубации с ПТП.

Метод PhaB описан для двух ПТП: рифампицина и изониазида. Получение результатов определения лекарственной чувствительности занимает 3-4 дня. Метод PhaB высокочувствительный (10^2 КОЕ/мл) и специфичный, так как основан на круге хозяина микобактериофага. Данный метод простой и экономичный, не требует приобретения дорогостоящего оборудования. На основе метода PhaB компанией Biotech Labs Ltd. (Великобритания) были разработаны коммерческие наборы FASTPlaqueTBTM для обнаружения *M. tuberculosis* [15] и FASTPlaque-Response для обнаружения устойчивости к рифампицину [14].

Анализ FASTPlaque-Response включает предварительную 24-часовую инкубацию суспензий *M. tuberculosis* в присутствии и в отсутствие рифампицина в критической концентрации перед добавлением фага для обнаружения жизнеспособных клеток. Оценка результатов производится че-

рез 48 часов после начала процедуры, и они готовы для клинического использования. Отсутствие необходимости в приобретении специального оборудования дает возможность широкого применения в лабораториях, использующих традиционные методы культивирования МБТ. При этом необходимо обучение персонала, чтобы снизить вероятность ошибок и ложных результатов.

Люциферазные репортерные фаги

Еще одним способом определения спектра ЛУ МБТ является метод на основе применения люциферазных репортерных фагов (ЛРФ). Это генетически сконструированные репортерные фаги, несущие ген люциферазы светлячка, которые позволяют визуализировать жизнеспособные микобактерии, оценивая количество определяемого света при инфицировании ЛРФ. Количество излучаемого света выражается в относительных световых единицах – RLU. При активации образца (взаимодействие АТФ с ферментом люциферазой) происходит биолуминесцентная реакция, в ходе которой образуется свечение. Интенсивность этого свечения в RLU измеряют с помощью люминометра, представляя количественные данные анализа. Если рост бактерий подавляется лекарственным препаратом, образец считается чувствительным, и это проявля-

ется в снижении интенсивности свечения (RLU) по сравнению с контрольным образцом без препарата. И наоборот, повышение RLU по сравнению с контролем указывает на устойчивость культуры, так как бактерии продолжают активно размножаться, несмотря на присутствие препарата.

Начиная с 1993 г., были разработаны ЛРФ, phAE40 (10) первого поколения из микобактериофага TM4, которые были способны обнаруживать 10^4 бактерий/мл [13]. ЛРФ, phGS18, второго поколения были сконструированы из умеренного фага L5. Они показали лучшую чувствительность с *M. smegmatis*, но оказались неэффективными в отношении *M. tuberculosis* из-за отсутствия возможности их инфицировать и лизировать [22]. В качестве альтернативы для разработки конструкций ЛРФ был выбран литический микобактериофаг D29, демонстрирующий близкую гомологию его ДНК с фагом L5 [18]. Эти конструкции показали логарифмическое увеличение выхода RLU, но все еще не достигли такого уровня чувствительности, чтобы использоваться для диагностики. Низкая чувствительность может быть связана с литической природой выбранных фаговых конструкций, которые лизируют бактерии, что приводит к быстрому распаду АТФ. Для преодоления низкой чувствительности был выбран умеренный фаг Che12, способный инфицировать *M. tuberculosis* и задерживать лизис клетки-хозяина [6]. Разработанные ЛРФ на основе Che12 показали многообещающие результаты в диагностике туберкулеза [5, 4]

Принцип метода заключается в инкубировании микобактерий с ПТП. Устойчивые к лекарственным препаратам микобактерии сохраняют свою жизнеспособность, а подвергаясь инфицированию ЛРФ, вырабатывают флуоресценцию, которую количественно оценивают и определяют ЛУ исследуемых изолятов.

Для данной методики используют культуры МБТ после роста на среде с ПТП в критических концентрациях, таких как (рифампицин (RIF), стрептомицин (STR), изониазид (INH), этамбутол (EMB)), которые инкубируют 40 часов при 37°C. Затем культуру МБТ инфицируют ЛРФ и повторно инкубируют при 37°C. После 3 часов и 6 часов инфицирования ЛРФ отбирают аликвоты из каждой лунки планшета и переносят в одноразовые кюветы для количественного анализа люциферазы с помощью люцинометра TD-20/20 [4].

Индекс ингибирования рассчитывают по формуле: $(RLU_{ПТП}/RLU_{контроля}) \times 100$. Образцы интерпретируют как чувствительные к ПТП при $RLU < 10\%$, а при $\geq 10\%$ – устойчивыми. Из 50 образцов, протестированных к 3 ПТП (RIF, STR, EMB), было обнаружено 100% совпадение результатов метода ЛРФ и ВАСТЕС. Чувствительность метода составила 100% для RIF, STR и EMB и 85,7% для INH. Специфичность составила 100% для RIF, STR и EMB и 95,3% для INH. Преимуществом описан-

ного метода на основе анализа с использованием флуоресцирующего микобактериофага является короткое время определения лекарственной чувствительности культур (2-4 дня) [4].

Флуоресцирующие микобактериофаги

Была создана новая группа репортерных микобактериофагов (phAE87:Phsp60-egfp и phAE87:Phsp60-ZsYellow), экспрессирующих флуоресцентные белки [20], обладающая потенциалом для быстрой диагностики и определения ЛУ клинических изолятов МБТ. Эти фаги термочувствительны и не лизируют клетки при 37°C. Поскольку лизис отсутствует, флуоресцентные белки остаются внутри бактериальных клеток, что облегчает обнаружение флуоресцирующих микобактериальных клеток с помощью флуоресцентной микроскопии или проточной цитометрии.

Для повышения чувствительности и сокращения времени обнаружения *M. tuberculosis* были созданы флуоресцирующие микобактериофаги второго поколения – *mCherry_{bomb}* [25]. Принцип этого метода заключается в инкубировании МБТ с/без ПТП в течение 96 ч., инфицировании *mCherry_{bomb}*, фиксацией параформальдегидом и исследовании с помощью флуоресцентной микроскопии. Использование параформальдегида при фиксации микобактерий, инфицированных флуоресцирующими микобактериофагами, обеспечивает биологическую безопасность, особенно при работе с МЛУ и ШЛУ МБТ, облегчая анализ образцов и сохраняя флуоресценцию в течение длительного времени. Преимуществом этих фагов является возможность определять лекарственную чувствительность МБТ к любым ПТП из осадка мокроты.

ПЦР в реальном времени

Группой авторов Pholwat S., Ehdaie B., et al. [19] был разработан быстрый способ фенотипического определения спектра лекарственной чувствительности *M. tuberculosis* к основным 13 ПТП без применения сенсорных клеток или сконструированных (рекомбинантных) фагов. Методика заключается в культивировании изолятов МБТ в течение 48 часов с критическими концентрациями исследуемых ПТП и без них, с последующей инкубацией с 10^3 БОЕ/мл микобактериофага D29 в течение 24 часов, а затем постановки ПЦР-РВ. Для препаратов RIF, STR, амикацин (АМК), канамицин (KAN), капреомицин (CAP), офлоксацин (OFX), моксифлоксацин (Mfx), линезолид (LZD) и циклосерин (CS) были получены результаты за 1 день путем совместной обработки ПТП и фагом в течение 24 часов. А для препаратов INH, EMB, этионамид (Ето) и парааминосалициловая кислота (PAS) (использовали критическую концентрацию 2 мкг/мл) потребовалось 48-часовая предварительная обработка ПТП перед инкубацией фага. Такие различия между препаратами могут быть связаны

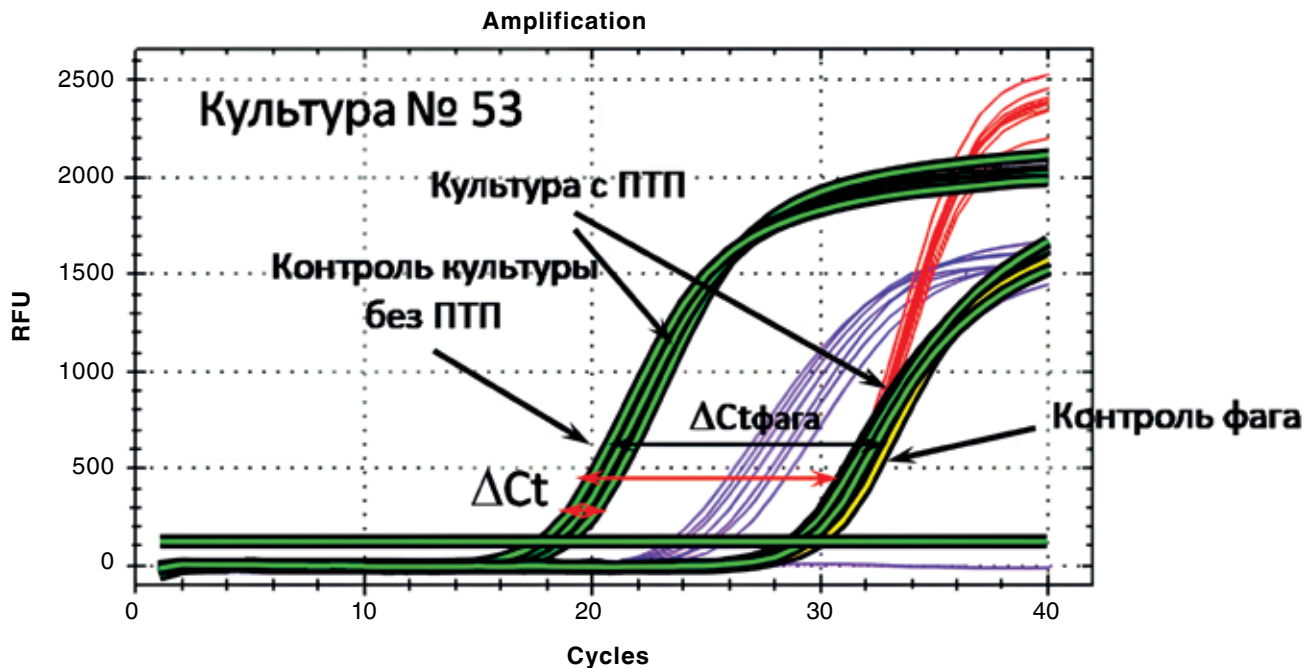


Рис. 2. Результаты анализа культуры МБТ № 53 (полирезистентная культура). Кинетические кривые, соответствующие реакциям обнаружения ДНК микобактериофага D29 (канал FAM, зеленый), обнаружения ДНК МБТ (канал ROX, фиолетовый) и ДНК ВПК (канал HEX, красный) [3]

Fig. 2. Results of testing *M. tuberculosis* culture no. 53 (polyresistant culture). Kinetic curves corresponding to the reactions of detection of mycobacteriophage D29 DNA (FAM channel, green), detection of *M. tuberculosis* DNA (ROX channel, purple), and DNA of the internal positive control (HEX channel, red) [3]

с механизмами их действия и с их способностью влиять на репликацию фагов. Этот метод определения спектра фенотипической лекарственной чувствительности МБТ к препаратам первого и второго ряда является быстрым (1-3 дня) и точным, он позволяет назначить своевременную схему лечения туберкулеза с множественной и широкой лекарственной устойчивостью. Однако разработанный метод не привел к созданию тест-системы для применения на практике. Эта технология была нами модернизирована и усовершенствована [3] за счет сокращения количества необходимых процедур и изменения формата проведения исследований (24-луночный планшет), а также разработкой мультиплексной ПЦР-РВ-системы, включающей две независимые реакции в одной пробирке для обнаружения специфических фрагментов нуклеиновых кислот микобактериофага D29 (канал FAM) и МБТ

(канал ROX). Чувствительность клинических изолятов МБТ определялась путем сравнения значений пороговых циклов флуоресценции в ПЦР-РВ, соответствующих количеству микобактериофага D29 в образцах между контрольной пробой (контролем роста (КР) культуры без ПТП) и опытной – с использованием критической концентрации ПТП. Образец интерпретируется как чувствительный, если разница в значениях пороговых циклов между контролем без ПТП (КР) и исследуемым образцом в присутствии конкретного ПТП составляла 3 и более циклов: $\Delta Ct = |Ct_{ПТП} - Ct_{КР}| \geq 3$. Образец интерпретируется как устойчивый, если разница в значениях пороговых циклов между контролем без ПТП (КР) и исследуемым образцом в присутствии конкретного ПТП составляла менее 3 циклов: $\Delta Ct = |Ct_{ПТП} - Ct_{КР}| < 3$. Пример интерпретации результатов представлен на рис. 2. и в табл. 1.

Таблица 1. Результаты анализа ускоренного определения спектра лекарственной чувствительности МБТ к 10 ПТП с помощью микобактериофага D29 [3]

Table 1. Results of rapid drug susceptibility testing of *M. tuberculosis* to 10 anti-tuberculosis drugs using mycobacteriophage D29 [3]

№ культуры	Контр. фага	Контр. без ПТП	ΔCt фага	ΔCt= Ct _{проба с ПТП} - Ct _{КР}									
				STR	INH	RIF	EMB	Kan	Amk	Mfx	Lfx	Eto	Cap
53	30,00	18,88	11,12	0,71	0,68	1,22	9,79	10,25	9,94	10,42	10,5	8,3	7,5

Примечание: жирный шрифт – пороговые циклы при лекарственной устойчивости к препаратам.
Note: Bold font indicates threshold cycles for drug resistance.

Культура МБТ № 53 (рис. 2, табл. 1) устойчива к 3 ПТП (STR, INH, RIF), разница в пороговых циклах ПЦР-PB ΔC_t составляет от 0,71 до 1,22, и чувствительна к 7 ПТП (EMB, KAN, AMK, Mfx, Lfx, Eto, CAP), разница в пороговых циклах ПЦР-PB ΔC_t составляет от 7,5 до 10,42.

Разработанная технология дает возможность определения фенотипической лекарственной чувствительности к 10 ПТП (STR, INH, RIF, EMB, AMK, Mfx, левофлоксацину (Lfx), Eto, KAN, CAP) для культур МБТ после культивирования в автоматизированной системе Bactec MGIT. Чувствительность для исследуемых препаратов составила 86-100%, а специфичность 94,5-100% [3]. Разработанная технология позволяет получить результаты в короткие сроки (5 дней), в отличие от традиционных методов. Использование фагов обеспечивает высокую специфичность определения чувствительности. Эта технология может быть адаптирована для любых ПТП.

Заключение

Альтернативой традиционным культуральным методам определения лекарственной чувствительности МБТ является использование литических микобактериофагов. Этот фенотипический подход основан на способности микобактериофагов специфически инфицировать метаболически активные МБТ с последующим их лизисом и высвобождением нового потомства фагов. При определении спектра лекарственной чувствительности микобактериофаги используют для выявления лекарственно-устой-

чивых МБТ, способных поддерживать репликацию фага в присутствии ПТП.

Одним из преимуществ фагового метода по сравнению с традиционными культуральными методами является более быстрое получение результатов. Благодаря высокой скорости репликации фага результаты могут быть получены в течение 24-96 часов от момента начала анализа, что значительно ускоряет подбор адекватной схемы лечения больных туберкулезом. Все методы на основе фагов обладают высокой специфичностью, обусловленной строгим кругом хозяев конкретного фага, что минимизирует риск ложноположительных реакций.

Несмотря на потенциал этих методов, на сегодняшний день единственной коммерческой тест-системой остается набор FASTPlaque-Response, основанный на методе фаговой биологической амплификации (PhaB). Однако широкого внедрения его в практику не произошло, возможно, это связано с растущей конкуренцией со стороны молекулярно-генетических методов. Тем не менее, применение микобактериофагов продолжает оставаться мощным и развивающимся инструментом в современной микробиологии и биотехнологии.

С развитием технологий секвенирования и геномики можно более точно идентифицировать конкретные типы фагов, понимать механизм действия фагов, выявлять полезные свойства фагов и модифицировать фаги для достижения желаемых результатов. Это открывает новые перспективы в области создания фагов с улучшенными свойствами для повышения эффективности диагностики и лечения.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии у них конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declare there is no conflict of interest.

ЛИТЕРАТУРА

1. Беляев Д.В., Вахрушева Д.В., Винокуров А.С. и др. Тестирование лекарственной чувствительности клинических изолятов *Mycobacterium tuberculosis* методом пропорций: методические рекомендации. Москва: РОФ, 2022.
2. Елисеев П.И., Байракова А.Л., Ганджальян Т.А., Зорина В.В., Баланцев Г.А., Марьяндышев А.О. Мониторинг мутаций, ассоциированных с устойчивостью *Mycobacterium tuberculosis* к противотуберкулезным препаратам // Туберкулез и болезни легких. – 2025. – Т. 103, № 1. – С. 45-53. <https://doi.org/10.58838/2075-1230-2025-1031-45-53>
3. Лапенкова М.Б., Арустамова Г.А., Аляпкина Ю.С., Филиппов П.Н., Лазебный С.В., Владимирский М.А. Тест-система для фенотипического определения лекарственной чувствительности клинических изолятов микобактерий туберкулеза на основе применения микобактериофагов // Туберкулез и болезни легких. – 2020. – Т. 98, № 8. – С. 14-22. <https://doi.org/10.21292/2075-1230-2020-98-8-14-22>
4. Banaiee N., Bobadilla-Del-Valle M., Bardarov S. Jr., Riska P.F., Small P.M., Ponce-De-Leon A., Jacobs W.R. Jr., Hatfull G.F., Sifuentes-Osornio J. Luciferase reporter mycobacteriophages for detection, identification, and antibiotic susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* in Mexico // J Clin Microbiol. – 2001. – Vol. 39, № 11. – P. 3883-3888. <https://doi.org/10.1128/JCM.39.11.3883-3888.2001>

REFERENCES

1. Belyaev D.V., Vakhrusheva D.V., Vinokurov A.S. et al. *Testirovaniye lekarstvennoy chuvstvitel'nosti klinicheskikh izolyatov Mycobacterium tuberculosis metodom proporsiy: metodicheskiye rekomendatsii*. [Testing drug susceptibility of clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* by the proportion method: guidelines]. Moscow, ROF Publ., 2022.
2. Eliseev P.I., Bayrakova A.L., Gandzhalyan T.A., Zorina V.V., Balantsev G.A., Maryandyshev A.O. Monitoring of mutations associated with drug resistance of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis and Lung Diseases*, 2025, vol. 103, no. 1, pp. 45-53. (In Russ.) <https://doi.org/10.58838/2075-1230-2025-1031-45-53>
3. Lapenkova M.B., Arustamova G.A., Alyapkina Yu.S., Filippov P.N., Lazebny S.V., Vladimirovskiy M.A. Mycobacteriophage-based test system for phenotypic drug sensitivity of clinical isolates of tuberculous mycobacteria. *Tuberculosis and Lung Diseases*, 2020, vol. 98, no. 8, pp. 14-22. (In Russ.) <https://doi.org/10.21292/2075-1230-2020-98-8-14-22>
4. Banaiee N., Bobadilla-Del-Valle M., Bardarov S. Jr., Riska P.F., Small P.M., Ponce-De-Leon A., Jacobs W.R. Jr., Hatfull G.F., Sifuentes-Osornio J. Luciferase reporter mycobacteriophages for detection, identification, and antibiotic susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* in Mexico. *J. Clin. Microbiol.*, 2001, vol. 39, no. 11, pp. 3883-3888. <https://doi.org/10.1128/JCM.39.11.3883-3888.2001>

5. Carrière C., Riska P.F., Zimhony O., Kriakov J., Bardarov S., Burns J., Chan J., Jacobs W.R. Jr. Conditionally replicating luciferase reporter phages: improved sensitivity for rapid detection and assessment of drug susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* // *J Clin Microbiol.* – 1997. – Vol. 35, № 12. – P. 3232-3239. <https://doi.org/10.1128/jcm.35.12.3232-3239.1997>
6. Dusthacker A., Kumar V., Subbian S., Sivaramakrishnan G., Zhu G., Subramanyam B., Hassan S., Nagamaiah S., Chan J., Paranj Rama N. Construction and evaluation of luciferase reporter phages for the detection of active and non-replicating tubercle bacilli // *J Microbiol Methods.* – 2008. – Vol. 73, № 1. – P. 18-25. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2008.01.005>
7. Froman S., Will D.W., Bogen E. Bacteriophage active against virulent *Mycobacterium tuberculosis*. I. Isolation and activity // *Am J Public Health Nations Health.* – 1954. – Vol. 44, № 10. – P. 1326-1333. <https://doi.org/10.2105/ajph.44.10.1326>
8. Hatfull G.F. Molecular Genetics of Mycobacteriophages // *Microbiol Spectr.* – 2014. – Vol. 2, № 2. – P.1-36 <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.MGM2-0032-2013>
9. Hatfull G.F. Mycobacteriophages: Genes and genomes // *Annu Rev Microbiol.* – 2010. – № 64. – P. 331-356. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.112408.134233>
10. Hatfull G.F. Mycobacteriophages: windows into tuberculosis // *PLoS Pathog.* – 2014. – Vol. 10, № 3. – P. e1003953. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003953>
11. Hatfull G.F. The Secret Lives of Mycobacteriophages // *Adv Virus Res.* – 2012. – № 82. – P. 179-288. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394621-8.00015-7>
12. Hosseini Porgham S., Sechi L.A. A Review on Mycobacteriophages: From Classification to Applications // *Pathogens.* – 2022. – Vol. 11, № 7. – P. 777. <https://doi.org/10.3390/pathogens11070777>
13. Jacobs W.R. Jr., Barletta R.G., Udani R., Chan J., Kalkut G., Sosne G., Kieser T., Sarkis G.J., Hatfull G.F., Bloom B.R. Rapid assessment of drug susceptibilities of *Mycobacterium tuberculosis* by means of luciferase reporter phages // *Science.* – 1993. – Vol. 260, № 5109. – P. 819-822. <https://doi.org/10.1126/science.8484123>
14. Kisa O., Albay A., Bedir O., Baylan O., Doganci L. Evaluation of FASTPlaqueTB-RIF for determination of rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates // *Int J Tuberc Lung Dis.* – 2003. – Vol. 7, № 3. – P. 284-288.
15. Marei A.M., El-Behedy E.M., Mohtady H.A., Afify A.F. Evaluation of a rapid bacteriophage-based method for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples // *J. Med. Microbiol.* – 2003. – Vol. 52, № Pt 4. – P. 331-335. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.05091-0>
16. McNerney R., Kambashi B.S., Kinkese J., Tembwe R., Godfrey-Faussett P. Development of a bacteriophage phage replication assay for diagnosis of pulmonary tuberculosis // *J Clin Microbiol.* – 2004. – Vol. 42, № 5. – P. 2115-2120. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.5.2115-2120.2004>
17. McNerney R., Wilson S.M., Sidhu A.M., et al. Inactivation of mycobacteriophage D29 using ferrous ammonium sulphate as tool for the detection of viabl *Mycobacterium smegmatis* and *M. tuberculosis* // *Res Microbiol.* – 1998. – Vol. 149, № 7. – P. 487-495. [https://doi.org/10.1016/s0923-2508\(98\)80003-x](https://doi.org/10.1016/s0923-2508(98)80003-x)
18. Pearson R.E., Jurgensen S., Sarkis G.J., Hatfull G.F., Jacobs W.R. Jr. Construction of D29 shuttle plasmids and luciferase reporter phages for detection of mycobacteria // *Gene.* – 1996. – Vol. 183, № 1-2. – P. 129-136. [https://doi.org/10.1016/s0378-1119\(96\)00530-6](https://doi.org/10.1016/s0378-1119(96)00530-6)
19. Pholwat S., Ehdaie B., Foongladda S., Kelly K., Houpt E. Real-time PCR using mycobacteriophage DNA for rapid phenotypic drug susceptibility results for *Mycobacterium tuberculosis* // *J Clin Microbiol.* – 2012. – Vol. 50, № 3. – P. 754-761. <https://doi.org/10.1128/JCM.01315-11>
20. Piuri M., Jacobs W.R. Jr., Hatfull G.F. Fluoromycobacteriophages for rapid, specific, and sensitive antibiotic susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* // *PLoS One.* – 2009. – Vol. 4, № 3. – P. e4870. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004870>
21. Pope W.H., Jacobs-Sera D., Russell D.A., Peebles C.L., Al-Atrache Z., Alcoser T.A., Alexander L. M., Alfano M.B., Alford S.T., Amy N.E., Anderson M.D., Anderson A.G., et al. Expanding the diversity of mycobacteriophages: Insights into genome architecture and evolution // *PLoS One.* – 2011. – Vol. 6, № 1. – P. e16329. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016329>
22. Sarkis G.J., Jacobs W.R. Jr., Hatfull G.F. L5 luciferase reporter mycobacteriophages: a sensitive tool for the detection and assay of live mycobacteria // *Mol Microbiol.* – 1995. – Vol. 15, № 6. – P. 1055-67. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1995.tb02281.x>
5. Carrière C., Riska P.F., Zimhony O., Kriakov J., Bardarov S., Burns J., Chan J., Jacobs W.R. Jr. Conditionally replicating luciferase reporter phages: improved sensitivity for rapid detection and assessment of drug susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.*, 1997, vol. 35, no. 12, pp. 3232-3239. <https://doi.org/10.1128/jcm.35.12.3232-3239.1997>
6. Dusthacker A., Kumar V., Subbian S., Sivaramakrishnan G., Zhu G., Subramanyam B., Hassan S., Nagamaiah S., Chan J., Paranj Rama N. Construction and evaluation of luciferase reporter phages for the detection of active and non-replicating tubercle bacilli. *J. Microbiol. Methods*, 2008, vol. 73, no. 1, pp. 18-25. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2008.01.005>
7. Froman S., Will D.W., Bogen E. Bacteriophage active against virulent *Mycobacterium tuberculosis*. I. Isolation and activity. *Am. J. Public Health Nations Health*, 1954, vol. 44, no. 10, pp. 1326-1333. <https://doi.org/10.2105/ajph.44.10.1326>
8. Hatfull G.F. Molecular genetics of mycobacteriophages. *Microbiol. Spectr.*, 2014, vol. 2, no. 2, pp. 1-36. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.MGM2-0032-2013>
9. Hatfull G.F. Mycobacteriophages: Genes and genomes. *Annu. Rev. Microbiol.*, 2010, no. 64, pp. 331-356. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.112408.134233>
10. Hatfull G.F. Mycobacteriophages: windows into tuberculosis. *PLoS Pathog.*, 2014, vol. 10, no. 3, pp. e1003953. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003953>
11. Hatfull G.F. The secret lives of mycobacteriophages. *Adv. Virus Res.*, 2012, no. 82, pp. 179-288. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394621-8.00015-7>
12. Hosseini Porgham S., Sechi L.A. A review on mycobacteriophages: from classification to applications. *Pathogens*, 2022, vol. 11, no. 7, pp. 777. <https://doi.org/10.3390/pathogens11070777>
13. Jacobs W.R. Jr., Barletta R.G., Udani R., Chan J., Kalkut G., Sosne G., Kieser T., Sarkis G.J., Hatfull G.F., Bloom B.R. Rapid assessment of drug susceptibilities of *Mycobacterium tuberculosis* by means of luciferase reporter phages. *Science*, 1993, vol. 260, no. 5109, pp. 819-822. <https://doi.org/10.1126/science.8484123>
14. Kisa O., Albay A., Bedir O., Baylan O., Doganci L. Evaluation of FASTPlaqueTB-RIF for determination of rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.*, 2003, vol. 7, no. 3, pp. 284-288.
15. Marei A.M., El-Behedy E.M., Mohtady H.A., Afify A.F. Evaluation of a rapid bacteriophage-based method for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples. *J. Med. Microbiol.*, 2003, vol. 52, no. pt 4, pp. 331-335. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.05091-0>
16. McNerney R., Kambashi B.S., Kinkese J., Tembwe R., Godfrey-Faussett P. Development of a bacteriophage phage replication assay for diagnosis of pulmonary tuberculosis. *J. Clin. Microbiol.*, 2004, vol. 42, no. 5, pp. 2115-2120. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.5.2115-2120.2004>
17. McNerney R., Wilson S.M., Sidhu A.M. et al. Inactivation of mycobacteriophage D29 using ferrous ammonium sulphate as tool for the detection of viabl *Mycobacterium smegmatis* and *M. tuberculosis*. *Res. Microbiol.*, 1998, vol. 149, no. 7, pp. 487-495. [https://doi.org/10.1016/s0923-2508\(98\)80003-x](https://doi.org/10.1016/s0923-2508(98)80003-x)
18. Pearson R.E., Jurgensen S., Sarkis G.J., Hatfull G.F., Jacobs W.R. Jr. Construction of D29 shuttle plasmids and luciferase reporter phages for detection of mycobacteria. *Gene*, 1996, vol. 183, no. 1-2, pp. 129-136. [https://doi.org/10.1016/s0378-1119\(96\)00530-6](https://doi.org/10.1016/s0378-1119(96)00530-6)
19. Pholwat S., Ehdaie B., Foongladda S., Kelly K., Houpt E. Real-time PCR using mycobacteriophage DNA for rapid phenotypic drug susceptibility results for *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.*, 2012, vol. 50, no. 3, pp. 754-761. <https://doi.org/10.1128/JCM.01315-11>
20. Piuri M., Jacobs W.R. Jr., Hatfull G.F. Fluoromycobacteriophages for rapid, specific, and sensitive antibiotic susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS One*, 2009, vol. 4, no. 3, pp. e4870. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004870>
21. Pope W.H., Jacobs-Sera D., Russell D.A., Peebles C.L., Al-Atrache Z., Alcoser T.A., Alexander L. M., Alfano M.B., Alford S.T., Amy N.E., Anderson M.D., Anderson A.G. et al. Expanding the diversity of mycobacteriophages: insights into genome architecture and evolution. *PLoS One*, 2011, vol. 6, no. 1, pp. e16329. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016329>
22. Sarkis G.J., Jacobs W.R. Jr., Hatfull G.F. L5 luciferase reporter mycobacteriophages: a sensitive tool for the detection and assay of live mycobacteria. *Mol. Microbiol.*, 1995, vol. 15, no. 6, pp. 1055-67. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1995.tb02281.x>

23. Símboli N., Takiff H., McNerney R., López B., Martin A., Palomino J. C., et al. In-house phage amplification assay is a sound alternative for detecting rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in low-resource settings // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2005. – Vol. 49, № 1. – P. 425-427. <https://doi.org/10.1128/AAC.49.1.425-427.2005>
24. The Actinobacteriophage Database at PhagesDB.org. Available at: <http://phagesdb.org> [Accessed 27.09.2024]
25. Urdániz E., Rondón L., Martí M.A., Hatfull G.F., Piuri M. Rapid Whole-Cell Assay of Antitubercular Drugs Using Second-Generation Fluoromycobacteriophages // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2016. – Vol. 60, № 5. – P. 3253-3256. <https://doi.org/10.1128/AAC.03016-15>
26. Wilson S.M., al-Suwaidi Z., McNerney R., Porter J., Drobniewski F. Evaluation of a new rapid bacteriophage-based method for the drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* // *Nat Med.* – 1997. – Vol. 3, № 4. – P. 465-468. <https://doi.org/10.1038/nm0497-465>
27. Xiao Y.X., Liu K.H., Lin W.H., Chan T.H. Whole-genome sequencing-based analyses of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* from Taiwan // *Sci Rep.* – 2023. – Vol. 13, № 1. – P. 2540. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-29652-3>
23. Símboli N., Takiff H., McNerney R., López B., Martin A., Palomino J.C. et al. In-house phage amplification assay is a sound alternative for detecting rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in low-resource settings. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2005, vol. 49, no. 1, pp. 425-427. <https://doi.org/10.1128/AAC.49.1.425-427.2005>
24. The Actinobacteriophage. Database at PhagesDB.org. Available: <http://phagesdb.org> Accessed September 27, 2024
25. Urdániz E., Rondón L., Martí M.A., Hatfull G.F., Piuri M. Rapid whole-cell assay of antitubercular drugs using second-generation fluoromycobacteriophages. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2016, vol. 60, no. 5, pp. 3253-3256. <https://doi.org/10.1128/AAC.03016-15>
26. Wilson S.M., al-Suwaidi Z., McNerney R., Porter J., Drobniewski F. Evaluation of a new rapid bacteriophage-based method for the drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nat. Med.*, 1997, vol. 3, no. 4, pp. 465-468. <https://doi.org/10.1038/nm0497-465>
27. Xiao Y.X., Liu K.H., Lin W.H., Chan T.H. Whole-genome sequencing-based analyses of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* from Taiwan. *Sci. Rep.*, 2023, vol. 13, no. 1, pp. 2540. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-29652-3>

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ:

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр фтизиопульмонологии и инфекционных заболеваний» МЗ РФ
127473, Москва, ул. Достоевского, д. 4, к. 2
Тел. +7 (495) 631-15-15

Лапенкова Марина Борисовна

К. м. н., научный сотрудник научной лаборатории
иммунопатологии и иммунодиагностики
туберкулезной инфекции
E-mail: manyshik@list.ru

Владимирский Михаил Александрович

Д. м. н., профессор, заведующий научной лабораторией
иммунопатологии и иммунодиагностики
туберкулезной инфекции
E-mail: mvladimirskij@mail.ru

Рыбина Ольга Александровна

Лаборант-исследователь научной лаборатории
иммунопатологии и иммунодиагностики
туберкулезной инфекции
E-mail: olga.rybin@mail.ru

INFORMATION ABOUT AUTHORS:

National Medical Research Center
of Phthisiopulmonology and Infectious Diseases,
Russian Ministry of Health
Build. 2, 4 Dostoevskiy St., Moscow, 127473
Phone: +7 (495) 631-15-15

Marina B. Lapenkova

Candidate of Medical Sciences, Researcher of Research
Laboratory of Immunopathology and Immunodiagnostics
of Tuberculosis Infection
Email: manyshik@list.ru

Mikhail A. Vladimirovskiy

Doctor of Medical Sciences, Professor, Head of Research
Laboratory of Immunopathology and Immunodiagnostics
of Tuberculosis Infection
Email: mvladimirskij@mail.ru

Olga A. Rybina

Research Assistant of Research Laboratory
of Immunopathology and Immunodiagnostics
of Tuberculosis Infection
Email: olga.rybin@mail.ru

Поступила 16.03.2025

Submitted as of 16.03.2025