

иммунобиологические свойства [7], свидетельствует о возможности их использования для конструирования высокоэффективных средств иммунопрофилактики чумы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алексеева Н.Ю. Конструирование вакцин нового поколения против сальмонеллезов и чумы. Иммунология. 1997; 5:14–8.
2. Ашмарин И.П., Воробьев А.А. Статистические методы в микробиологических исследованиях. Л.: Изд-во мед. д-ра; 1962. 180 с.
3. Дальвадянц С.М., Дятлов И.А., Еремин С.А., Кутырев В.В. Исследования по иммунизации против чумы. Сообщение 1. Интегральные показатели противочумного иммунитета у белых мышей, привитых живой, инактивированной или химической вакциной. Пробл. особо опасных инф. 2003; 85:127–35.
4. Долгушин И.И., Зурочка А.В., Власов А.В. Секреторные продукты нейтрофилов и иммунный ответ. Иммунология. 1990; 3:35–7.
5. Домарадский И.В. Чума. М.: Наука; 1998. 148 с.
6. Дубровина В.И. Механизмы фагоцитоза и его роль при формировании резистентности организма к возбудителям чумы, псевдотуберкулеза и туляремии (экспериментальное исследование) [дис. ... д-ра биол. наук]. Иркутск; 2004. 261 с.
7. Марков Е.Ю., Николаев В.Б., Загоскина Т.Ю. и др. Протективная активность субклеточных фракций *Yersinia pestis* при экспериментальной чуме у белых мышей. Бюлл. ВСНЦ СО РАМН. Иркутск, 2004; 2(1):123–7.
8. Медведева С.А., Александрова Г.П., Тюкавкина И.А. и др., изобретатели. Средство, обладающее противоанемической и иммуномодуляторной активностью. Патент РФ № 2208440 РФ, МПК А61 К 31/715, 33/26. Опубл. 20.07.03. Бюлл. № 20.
9. Пигаревский В.Е., Мазинг Ю.А. К методике применения лизосомально-катионного теста в лабораторно-диагностической практике. Лаб. дело. 1981; 10:579–82.
10. Cornelis G.R., Boland A., Boyd A.F. et al. The virulence plasmid of *Yersinia*, an antihost genome. Microbiol. Molec. Biol. Rev. 1998; 62(4):1315–52.
11. Green L.C., Wagner D.A., Glogowski J. et al. Analysis of

nitrate, nitrite and [¹⁵N] in biological fluids. Anal. Biochem. 1982; 126(1):131–8.

12. O'Brien K.K., Higdon M.L., Halverson J.J. Recognition and management of bioterrorism infections. Am. Fam. Physician. 2003; 67(9):1927–34.

13. Park B.H., Firkig S.M., Smithwick E.M. Infection and nitro-blue tetrazolium reduction by neutrophils: a diagnostic aid. Lancet. 1968; 2(7567):532–4.

14. Perry R.D., Fetherston J.D. *Yersinia pestis* – etiologic agent of plague. Clin. Microbiol. Rev. 1997; 10(1):35–66.

15. Williamson E.D., Flick-Smith H.C., Lebutt C. et al. Human immune response to a plague vaccine comprising recombinant F1 and V antigens. Infect. Immun. 2005; 73(6):3598–3608.

V.I. Dubrovina, E.P. Golubinsky, S.A. Vityazeva, E. Yu. Markov, V.B. Nikolayev, T.A. Ivanova, Zh.A. Konovalova, T.T. Shkaruba

Influence of the Complex *Yersinia pestis* EV Antigenic Preparation Upon the Functional Activity of the Phagocytic System Cells Under Experimental Conditions

Anti-Plague Research Institute for Siberia and the Far East, Irkutsk

Effects of *Y. pestis* EV antigenic complexes upon the functional activity of the phagocytic cells of guinea pig and white mice were assayed to demonstrate that the preparation constructed on the basis of the F1 antigen, *Y. pestis* EV membrane fraction and the Siberian larch arabinogalactane (AG) used as an immunomodulator, was able to increase the functional activities of the phagocytic system in test animals (guinea pigs), enhancing the adhesive and absorptive activity of the peritoneal macrophages and the intensity of active oxygen and nitrate monoxide production, as well as stimulating the activity of myeloperoxidase and the synthesis of non-enzyme cationic polymorphonuclear leucocytes. The antigenic complex prepared on the basis of the F1 antigen, *Y. pestis* EV membrane fraction and AG, was also shown to exert a stimulating effect on cytokine-inducing function of white-mouse macrophages expressed in the increased production of IL-1, IL-6 and FNO- α cytokines.

Key words: *Yersinia pestis*, antigens, Fraction 1 (F1), cell walls, phagocytosis, non-specific resistance.

Поступила 12.12.07.

ДИАГНОСТИКА

УДК 616-073

Н.П.Коннов¹, Ю.П.Волков², М.Н.Киреев¹, О.С.Кузнецов¹

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ВЕЙВЛЕТ-АНАЛИЗА ДЛЯ ФИЛЬТРАЦИИ ИЗОБРАЖЕНИЙ В ЭЛЕКТРОННОЙ И ЗОНДОВОЙ МИКРОСКОПИИ

¹ФГУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов,

²Саратовский государственный технический университет

Представлены результаты применения программ дискретного и стационарного вейвлет-анализа с целью фильтрации изображения объекта от шумов и повышения его разрешающей способности в электронной и зондовой микроскопии.

Ключевые слова: вейвлет-анализ, электронная и зондовая микроскопия.

Большую роль в расшифровке и визуализации фундаментальных механизмов организации и функционирования живой клетки призвана сыграть электронная и зондовая микроскопия.

При исследовании биологических объектов одним из основных условий является повышенное требование к получению максимально возможного разрешения на микрофотографиях. Однако специфика самих объектов способствует созданию нежелательных помех, вызванных наличием загрязнений раз-

личной природы (остатки питательной среды, конгломераты вещества – контрастера, красок, дефекты подложки, различного рода шумов аппаратуры и др.), присутствующих в исследуемом материале и ухудшающих воспроизведение исследуемых субмикроскопических структур.

Для устранения указанных помех используются различные математические методы обработки изображений, в частности, аппроксимация кривыми 1 и 2-го порядков, преобразования Фурье, а для уда-

ления шума – метод медианной фильтрации и различного рода морфологические фильтры [1]. Однако аппроксимирующие кривые не всегда точно повторяют форму дефекта, что приводит к дополнительным искажениям наноструктуры. Преобразование Фурье позволяет аппроксимировать любую форму дефекта, но вносит мелкомасштабные искажения, которые зачастую ухудшают изображение. Поэтому любое существенное усовершенствование методики, повышающей разрешение исследуемого объекта, заслуживает пристального внимания.

Наиболее многообещающим методом увеличения разрешения изображения в настоящее время считается дискретный вейвлет-анализ, способствующий уменьшению шумов, удалению мелких дефектов, повышению контрастности, сжатию и масштабированию [2]. Дискретный вейвлет-анализ позволяет проводить обработку изображений за счет разделения их на высоко- и низкочастотные составляющие, что делает возможным подавление искажений, не затрагивая при этом исследуемой структуры.

Рассмотрим некоторые особенности вейвлет-анализа для обработки микроскопических изображений объектов.

Основы сигналов вейвлет-анализа [2,3] можно представить как функцию $s(t)$ на заданном уровне разрешения – m' в виде суммы ее усредненных значений:

$$s(t) = \sum_{k=-\infty}^{\infty} c_{m',k} \varphi_{m',k}(t) + \sum_{m=m'}^{\infty} \sum_{k=-\infty}^{\infty} d_{m,k} \psi_{m,k}(t), \quad (1)$$

где $\varphi_{m',k} = 2^{-m'/2} \varphi(2^{-m'} t - k)$, $\psi_{m,k} = 2^{-m/2} \psi(2^{-m} t - k)$.

По мере возрастания значения m увеличивается уровень детализации (разрешения) функции $s(t)$.

Таким образом, выражение (1) показывает возможность аппроксимации любой произвольной функции $s(t)$ набором простых локальных функций $\varphi_{m,k}(t)$ и $\psi_{m,k}(t)$. Первая сумма выражения (1), сумма скейлинг-функций, дает «сглаженные средние» значения функции $s(t)$ на разных масштабных уровнях, вторая сумма вейвлетных функций добавляет к «грубой» аппроксимации сигнала все более подробные детали.

Для дальнейшего проведения анализа необходимо вычислить коэффициенты $c_{m',k}$ и $d_{m,k}$ для чего используется форма быстрых итерационных вычислений (алгоритм Мала [3]):

$$c_{m+1,k} = \sum_n h_n c_{m,2k+n}, \quad (2)$$

$$d_{m+1,k} = \sum_n g_n c_{m,2k+n}, \quad (3)$$

При этом явный вид вейвлета при самом преобразовании не используется, а применяются только значения коэффициентов h_n и g_n (приводимые в таблицах [3]). В качестве начальных значений $c_{0,k}$ обычно принимаются исходные данные $c_{0,k} = s(t)$.

Алгоритм обработки изображений состоит в

вейвлет-разложении исходного изображения до заданного уровня и изменения детализирующих коэффициентов (уменьшение – для фильтрации шума и увеличение – для подчеркивания границ), после чего производится обратная операция вейвлет-синтеза изображения. Обратное быстрое вейвлет-преобразование представляет собой последовательную сборку сигнала от больших m к меньшим:

$$c_{m-1} = \sum_{n \in I} c_{m,n} h_{k-2n} + \sum_{n \in I} d_{m,n} g_{k-2n}, \quad (4)$$

и обеспечивает реконструкцию функции по значениям ее вейвлет-коэффициентов с любого уровня разрешения.

Для обработки микроскопических изображений с учетом особенностей выявления наноразмерных структур применяют различные типы вейвлет-анализа. В данной работе приведены результаты применения ортогональных и стационарных вейвлетов на основе вейвлетов Добеши [2, 3]. Для этого нами были написаны программы в среде Matlab [1, 2] (тексты программ приведены ниже), которые способствовали проведению фильтрации шумов и повышению контрастности электронно- и зондово-микроскопических изображений.

%Программы дискретного вейвлет-анализа для фильтрации изображения объекта от шумов и повышения его контраста с использованием вейвлетов Добеши.

%Программа ортогонального вейвлет-анализа

%В программе %вместо xxx необходимо вставить %название файла с исходным изображением (формат изображения может быть jpg, bmp, tif). Желательно, чтобы размер файла %изображения был равен 2 в целой %степени.

%Параметр Deep- задает глубину фильтрации изображения. Обычно Deep- целое %число больше 1 %и меньше уровня вейвлет-разложения- N.

%Параметр coeff- задает величину преобразования данных вейвлет-анализа.

%При coeff <1 происходит уменьшение данных вейвлет-анализа (снижение шумов и %сглаживание резких перепадов% в изображении), при coeff > 1 происходит %обратный процесс, способствующий повышению контраста изображения. %При coeff=1 данные не изменяются (изображение остается прежним)

X=imread('xxx'); %Загрузка обрабатываемого

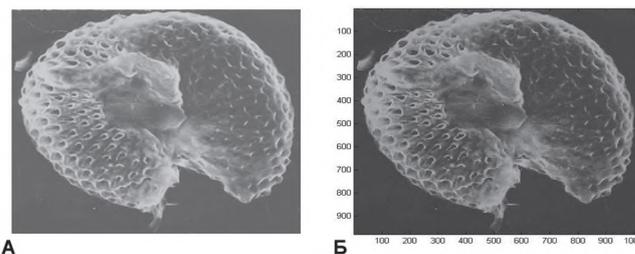


Рис. 1. Преджелудок блохи *Leptopsylla segnis*: А – до обработки, Б – после обработки программой ортогонального вейвлет-анализа. $\times 500$

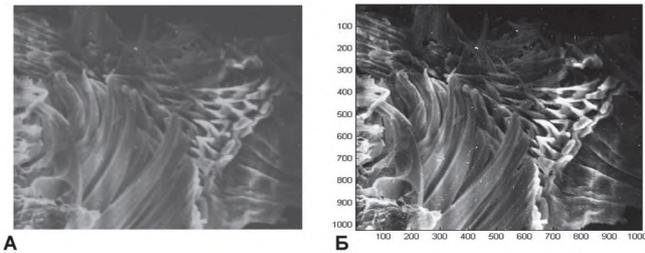


Рис. 2. Аканты разорванного желудка блохи *Leptospylla segnis*:

А – до обработки, Б – после обработки программой стационарного вейвлет-анализа. $\times 500$

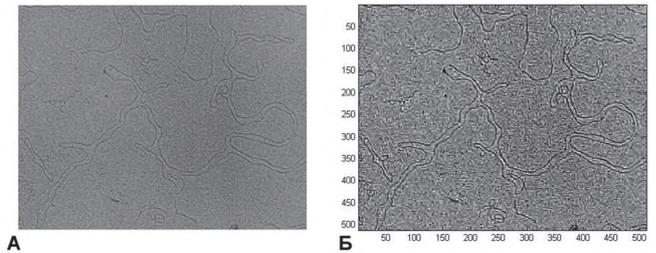


Рис. 3. Молекулы ДНК:

А – до обработки, Б – после обработки программой стационарного вейвлет-анализа. $\times 9000$

```

изображения
dwtmode('per'); % Задание режима продолжения
изображения, необходимого для %корректной ра-
боты программы
N=4;%Уровень разложения
wavename='db3'; %Тип вейвлета ( в данном слу-
чае вейвлет Добеши третьего %порядка)
[C1,S]=wavedec2(X,N,wavename);%Разложение
изображения на заданную глубину N с %исполь-
зование вейвлета wavename
A=S(1,1)*S(1,2);%
Deep=2; %Задание глубины фильтрации
N1=N-Deep;
for i = 2: N1
    A=A+ (S(i,1)*S(i,2))*3;%Расчет положения
коэффициентов вейвлет-разложения
end;
B=A+(S((N1+1),1)*S((N1+1),2))*3;%Расчет по-
ложения коэффициентов вейвлет-%разложения
B1=B+(S((N1+2),1)*S((N1+2),2))*3;%Расчет по-
ложения коэффициентов вейвлет-%разложения
%coeff=0;%Коэффициент обработки (при
0<=coeff<1 происходит удаление шумов; %при
coeff>1- повышение контраста)
C1((A+1):B1)=C1((A+1):B1)*coeff;%Фильтрация
коэффициентов вейвлет-разложения %на заданную
глубину
X1=waverec2(C1,S,wavename);%Восстановление
изображения
colormap(gray(256));% Задание цветовой пали-
тры (в данном случае изображение в %градациях
серого цвета)
figure(1); image(wcodemat(X1,256));%Вывод
изображения на экран
    
```

%Программа стационарного вейвлет-анализа

%В программе %вместо xxx необходимо вставить %название файла с исходным изображением (фор- мат изображения может быть jpg, %bmp, tif).

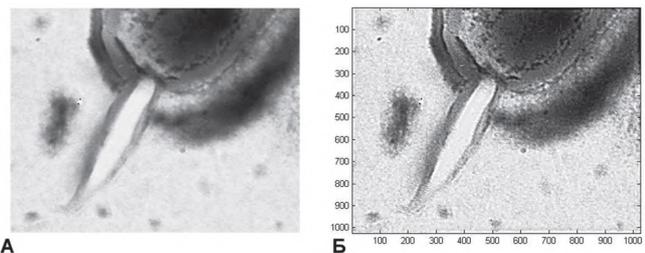


Рис. 4. Жгутик холерного вибриона:

А – до обработки, Б – после обработки программой стационарного вейвлет-анализа. $\times 90000$

```

Размер файла изображения должен быть равен 2
в целой степени.
%Параметр Deep- задает глубину фильтрации
изображения. Обычно Deep- целое %число больше
1 %и меньше уровня вейвлет-разложения- N.
%Параметр coeff- задает величину преобразова-
ния данных вейвлет-анализа.
%При coeff <1 происходит уменьшение данных
вейвлет-анализа (снижение шумов и %сглажи-
вание резких перепадов% в изображении), при
coeff > 1 происходит %обратный процесс, спо-
собствующий повышению контраста изображения.
%При coeff=1 %данные не изменяются (изображе-
ние остается прежним)
X=imread('xxx'); %загрузка изображения
dwtmode('per');% задание моды преобразования
N=5;%Уровень разложения
wavename='sym2'; %Тип вейвлета
[ca, chd, cvd, cdd]=swt2(X,N,wavename);% вейвлет
разложение
Deep=3; % задание глубины преобразования ко-
эффициентов (N1 должно быть не %больше N)
coeff=3; % задание коэффициента преобразова-
ния (coeff>1- усиление контраста, %coeff<1-
сглаживание изображения)
for k=1:Deep % выполнение преобразования ко-
эффициентов на заданную глубину N1
    ca(:,:,k)=ca(:,:,k);
    chd(:,:,k)=chd(:,:,k)*coeff;
    cvd(:,:,k)=cvd(:,:,k)*coeff;
    cdd(:,:,k)=cdd(:,:,k)*coeff;
end;
X=iswt2(ca,chd,cvd,cdd,wavename); %обратное
вейвлет преобразование
colormap(gray(256)); % задание цветовой гаммы
изображения (в данном случае- %градации серо-
го)
figure(1); image(X); %вывод преобразованного
изображения
    
```

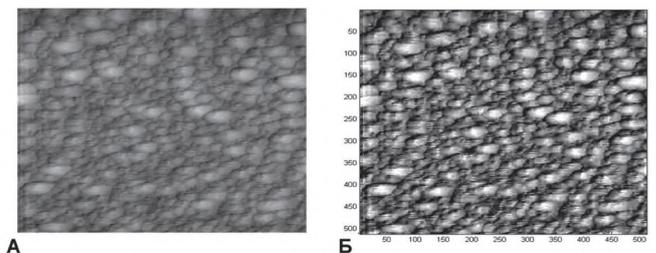


Рис. 5. Изображение кластеров алюминиевой пленки на поверхности полированного кремния, полученное методом зондовой микроскопии, после обработки программой стационарного вейвлет-анализа:

А – до обработки, Б – после обработки (размер скана 6×6 мкм)

Итак, на примере применения вейвлет-анализа показаны некоторые возможности этого математического аппарата, позволяющего выявить и наглядно показать улучшение разрешающей способности изображения наноструктур при электронной и зондовой микроскопии.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гонсалес Р., Вудс Р., Эддинс С. Цифровая обработка изображений в среде MATLAB. М.: Техносфера; 2006. 616 с.
2. Смоленцев Н.К. Основы теории вейвлетов. Вейвлеты в MATLAB. М.: ДМК Пресс; 2005. 304 с.
3. Добеши И. Десять лекций по вейвлетам. Ижевск: НИЦ «Регулярная и хаотическая динамика»; 2001. 464 с.

УДК 616.982.27+616.982.27-039:616-07

Д.А.Чухланцев, И.В.Маракулин, И.В.Дармов

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПЦР ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ И МЕЖВИДОВОГО ДИФФЕРЕНЦИРОВАНИЯ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ САПА И МЕЛИОИДОЗА

ФГУ «48 ЦНИИ Минобороны России», Киров

Проведена оценка возможности идентификации и дифференцирования возбудителей сапа и мелиоидоза методом ПЦР с использованием различных нуклеотидных последовательностей патогенных буркхолдерий. Выбраны праймеры, перспективные для включения в состав тест-системы, предназначенной для выявления ДНК возбудителей сапа и мелиоидоза в пробах из окружающей среды и в биологических материалах.

Ключевые слова: сап, мелиоидоз, выявление, дифференциация, ПЦР.

Несмотря на успехи практической медицины в борьбе с инфекционными заболеваниями, в природе сохраняются резервуары сапной и мелиоидозной инфекций, а значит и вероятность заражения людей в эндемичных районах.

Симптоматика этих заболеваний, особенно на начальных стадиях болезни, весьма разнообразна и не имеет характерных признаков [4, 5]. В связи с этим клиническая диагностика сапа и мелиоидоза значительно затруднена и должна подтверждаться результатами лабораторных исследований.

Методы лабораторной диагностики сапа и мелиоидоза, основанные на бактериологическом и иммунологических методах исследования, позволяют с высокой достоверностью выявлять возбудителей сапа и мелиоидоза, однако занимают длительное время, либо недостаточно специфичны.

Использование полимеразной цепной реакции позволяет упростить проведение диагностических исследований, а главное, значительно сократить время анализа проб.

Публикации, посвященные разработке тест-систем для выявления возбудителей сапа и мелиоидоза методом ПЦР, появились давно, однако возможности исследователей значительно ограничивала недостаточность информации об организации генома этих возбудителей и близкородственных им микроорганизмов.

В последние годы интерес исследователей к возбудителям сапа и мелиоидоза значительно вырос.

N.P.Konnov, Yu.P.Volkov, M.N.Kireev,
O.S.Kuznetsov
APPLICATION OF WAVELET-ANALYSIS FOR IMAGE FILTRATION IN ELECTRONIC AND PROBE MICROSCOPY
Russian Anti-Plague Research Institute "Microbe", Saratov State Technical University

The review presents the results of application of the programs of discrete and stationary wavelet-analysis for filtration of object image from noise and for the increase of its resolution capability in electronic and probe microscopy.

Key words: wavelet-analysis, electronic and probe microscopy.

Поступила 03.11.07.

Это нашло отражение и в увеличении числа работ по секвенированию геномов этих микроорганизмов и установлению связи отдельных генов с факторами патогенности этих возбудителей. Накопление данных об организации генома микроорганизмов рода *Burkholderia* позволило также ближе подойти к решению вопроса дифференцирования возбудителей сапа и мелиоидоза методом ПЦР.

Достоверные результаты по дифференцированию возбудителей сапа и мелиоидоза могут быть получены при использовании риботипирования, ПЦР с произвольными праймерами, определения полиморфизма длины рестрикционных фрагментов, метода мультилокусного сиквенс-типирования [2, 3, 4, 5]. Тем не менее, сложность и трудоемкость этих исследований не позволяют применять их в обычных диагностических лабораториях.

Дифференциация возбудителей сапа и мелиоидоза методом ПЦР – достаточно сложная задача. Анализ литературных данных показывает, что их генетическое сходство очень велико. Высказывается даже предположение о том, что возбудители сапа и мелиоидоза являются разными штаммами одного вида, а не отдельными видами микроорганизмов [2]. Однако, выявленные к настоящему времени различия в организации генома возбудителей сапа и мелиоидоза позволяют предположить, что решение вопроса дифференцирования патогенных буркхолдерий методом ПЦР возможно [8].

Целью данной работы являлась оценка эффек-