

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., Эддингс 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 сиквенса-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-

тивности выявления возбудителей сапа и мелиоидоза с помощью выбранных специалистами ФГУ «48 ЦНИИ Минобороны России» олигонуклеотидных праймеров, а также оценка возможности дифференциации этих возбудителей на основе описанных в литературе различий в последовательностях генов системы «quorum sensing» и 16S-rРНК [6, 9].

### Материалы и методы

Для идентификации патогенных буркхолдерий использованы выбранные специалистами ФГУ «48 ЦНИИ Минобороны России» олигонуклеотидные праймеры, предназначенные для выявления различных генетических детерминант возбудителей сапа и мелиоидоза.

Оценку возможности дифференциации возбудителей сапа и мелиоидоза проводили с использованием праймеров, описанных в работе P.Oyston и соавт. [6], а также с помощью олигонуклеотидных затравок, выбранных нами на основе различий в последовательностях генов системы «quorum sensing» *Burkholderia mallei* и *Burkholderia pseudomallei* и 16S-rРНК. Праймеры синтезированы специалистами ФГУ «48 ЦНИИ Минобороны России» фосфоамидитным методом с последующей очисткой их методом ВЭЖХ.

Для оценки праймеров в ПЦР использовали препараты ДНК *B. mallei* штаммов Ц-5, 5584, Иванович, Будапешт, *B. pseudomallei* штаммов С-141, Duc-V, Dalat а также 9 штаммов *Burkholderia cepacia*, выделенных от больных людей и 9 штаммов разных видов, принадлежащих к роду *Pseudomonas* (*P. bovisepitum*, *P. aeruginosa*, *P. pseudoalcaligenes*, *P. allicola*, *P. testosteroni*, *P. stutzeri*, *P. putida*, *P. fluorescens*, *P. marginata*).

Обеззараживание исследуемых проб осуществляли в соответствии с требованиями санитарных правил (СП 1.3.1285-03). Подготовку проб для анализа методом ПЦР осуществляли с использованием «Набора для подготовки проб к исследованиям методом ПЦР» производства ФГУ «48 ЦНИИ Минобороны России».

### Результаты и обсуждение

При выборе генетических детерминант, предназначенных для выявления возбудителей инфекционных заболеваний, общепринятым является использование консервативных нуклеотидных последовательностей, а также генов, обеспечивающих проявление микроорганизмами патогенных свойств.

В работах по идентификации возбудителей сапа и мелиоидоза использовали последовательности генов, кодирующих 16S-rРНК и 23S-rРНК, которые, по данным литературы, являются наиболее консервативными участками генома различных микроорганизмов, а также последовательности генов капсулярного полисахарида 1 типа, вклад которого в виру-

лентность возбудителей сапа и мелиоидоза показан в ряде научных публикаций [1, 7].

В ходе исследований было установлено, что использование в ПЦР праймеров, выбранных на основе последовательности генов, кодирующих 16S-rРНК и генов капсулярного полисахарида 1 типа, обеспечивает выявление в анализируемой пробе ДНК возбудителей сапа и мелиоидоза в концентрации, соответствующей  $10^2$  м.к. в 1 мл пробы, при отсутствии ложноположительных реакций с ДНК близкородственных видов микроорганизмов. Аналогичные результаты были получены и при использовании праймеров, выбранных на основе последовательности гена, кодирующего 23S-rРНК. Однако ПЦР с использованием этих праймеров обеспечивала выявление в анализируемой пробе ДНК возбудителей сапа и мелиоидоза в концентрации, соответствующей  $10^3$  м.к. в 1 мл пробы, что согласуется с литературными данными.

Эффективность выявления ДНК возбудителей сапа и мелиоидоза с использованием выбранных праймеров была также подтверждена при исследовании биопроб, взятых от лабораторных животных, зараженных возбудителями сапа. При исследовании в ПЦР проб тканей легких, печени и селезенки инфицированных животных (обезьян *Papio hamadryas*), во всех случаях были получены положительные результаты.

Исследования генетической организации 16S-rРНК различных штаммов возбудителей сапа и мелиоидоза, проведенные зарубежными исследователями, позволили выявить различия в нуклеотидных последовательностях *B. mallei* и *B. pseudomallei* [2]. Выявленные различия незначительны, тем не менее авторы предложили использовать их для дифференцирования *B. mallei* и *B. pseudomallei*.

Выбранные с учетом этих различий праймеры В16-1, 2 не позволяли дифференцировать *B. mallei* и *B. pseudomallei*. Образование специфического амплификата наблюдали при проведении ПЦР с ДНК как возбудителя сапа, так и возбудителя мелиоидоза.

Большой, по нашему мнению, интерес представляет одна из последних работ F.M.Thibault и соавт., посвященная изучению генетической организации системы «quorum sensing» возбудителей сапа и мелиоидоза [8]. Авторами показано, что организация этой части генома сапного микроба в значительной мере отлична от системы «quorum sensing» возбудителя мелиоидоза. Главное отличие заключается в отсутствии у возбудителя сапа генов bpmI2 и bpmR2, присутствующих в геноме возбудителя мелиоидоза [8].

Для оценки возможности использования указанных различий в структуре геномов возбудителей сапа и мелиоидоза для дифференциации этих видов микроорганизмов нами были выбраны и синтезированы праймеры, комплементарные последовательностям генов bpmI2 и bpmR2, а также 16S-rРНК. Результаты исследований, проведенных с использованием синтезированных праймеров, представлены в таблице,

Оценка специфичности праймеров с использованием препаратов ДНК, выделенных из различных видов микроорганизмов

Штаммы	Наличие амплификата при проведении ПЦР с праймерами ...					
	B16-1 B16-2	BpmI2-11 BpmI2-12	BpmI2-21 BpmI2-22	BpmI2-31 BpmI2-32	BpmI2-f BpmI2-r	BpmR2-f BpmR2-r
<i>B. mallei</i> Ц-5	+	-	-	-	-	-
<i>B. mallei</i> 5584	+	+	+	+	+	+
<i>B. mallei</i> Иванович	+	+	+	+	+	+
<i>B. mallei</i> Будапешт	+	-	-	-	-	-
<i>B. pseudomallei</i> C-141	+	+	+	+	+	+
<i>B. pseudomallei</i> Duc-V	+	+	+	+	+	+
<i>B. pseudomallei</i> Dalat	+	+	+	+	+	+
<i>B. cepacia</i> Б-306	-	-	-	-	-	-
<i>B. cepacia</i> Б-506	-	-	-	-	-	-
<i>B. cepacia</i> Б-402	-	-	-	-	-	-
<i>B. cepacia</i> Б-0499	-	-	-	-	-	-
<i>B. cepacia</i> L-14	-	-	-	-	-	-
<i>B. cepacia</i> L-98	-	-	-	-	-	-
<i>B. cepacia</i> L-95	-	-	-	-	-	-
<i>B. cepacia</i> L-97	-	-	-	-	-	-
<i>B. cepacia</i> L-89	-	-	-	-	-	-
<i>P. bovisepitum</i>	-	-	-	-	-	-
<i>P. aeruginosa</i>	-	-	-	-	-	-
<i>P. pseudoalcaligenes</i>	-	-	-	-	-	-
<i>P. allicola</i>	-	-	-	-	-	-
<i>P. marginata</i>	-	-	-	-	-	-
<i>P. testosteroni</i>	-	-	-	-	-	-
<i>P. stutzeri</i>	-	-	-	-	-	-
<i>P. putida</i> 1	-	-	-	-	-	-
<i>P. putida</i> 2	-	-	-	-	-	-
<i>E. coli</i> 803	-	-	-	-	-	-

из которой видно, что праймеры, комплементарные последовательностям генов *brmI2* и *brmR2* не позволяют достоверно дифференцировать возбудителей сапа и мелиоидоза, поскольку специфический амплификат образуется не только при использовании ДНК возбудителя мелиоидоза, но и ДНК штаммов возбудителя сапа. Однако использованные праймеры позволяют дифференцировать отдельные штаммы возбудителя сапа, в том числе и высоковирулентный штамм Ц-5 *B. mallei*, который широко используется при проведении экспериментальных исследований. При анализе проб ДНК близкородственных и гетерологичных видов микроорганизмов образования специфических амплификатов не наблюдали, а чувствительность ПЦР с использованием данных праймеров составляла  $10^2$  м.к. в 1 мл исследуемой пробы.

Дифференцировать *B. mallei* и *B. pseudomallei* на основе описанных в литературе различий в последовательностях генов *16S-rRNA* и системы «quorum sensing» нам не удалось. Данные о специфичности праймеров, выбранных на основе нуклеотидных последовательностей системы бактериального кворума генов *B. mallei* и *B. pseudomallei* указывают на значительные отличия в организации системы бактериаль-

ного кворума у разных штаммов *B. mallei*.

В результате выполненных исследований была показана возможность использования для идентификации возбудителей сапа и мелиоидоза нуклеотидных последовательностей генов *16S-rRNA* и генов, кодирующих капсулярный полисахарид 1 типа *B. mallei* и *B. pseudomallei*. Чувствительность ПЦР-анализа с выбранными праймерами составляет  $10^2$  м.к. в 1 мл исследуемой пробы. Выбранные праймеры перспективны для включения в состав тест-системы, предназначенной для выявления ДНК возбудителей сапа и мелиоидоза в пробах из окружающей среды и в биологических материалах.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Мелиоидоз. Сб. науч. тр. под ред. акад. Н.Г. Тихонова. Волгоград: Ниж.-Волж. кн. изд-во; 1995. 224 с.
2. Godoy D., Randle G., Simpson A.J. et al. Multilocus sequence typing and evolutionary relationships among the causative agents of melioidosis and glanders, *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia mallei*. J. Clin. Microbiol. 2003; 41:2068–79.
3. Haase A., Melder A., Smith-Vaughan H., Kemp D., Currie B. RAPD analysis of isolates of *Burkholderia pseudomallei* from patients with recurrent melioidosis. Epidemiol. Infect. 1995; 115(1):115–21.
4. Inglis T.J., O'Reilly L., Foster N., Clair A., Sampson J. Comparison of rapid, automated ribotyping and DNA macrorestriction analysis of *Burkholderia pseudomallei*. J. Clin. Microbiol. 2002;



40(9):3198–203.

5. Leelayuwat C., Romphruk A., Lulitanond A., Trakulsomboon S., Thamlikitkul V. Genotype analysis of *Burkholderia pseudomallei* using randomly amplified polymorphic DNA (RAPD): indicative of genetic differences amongst environmental and clinical isolates. *Acta Trop.* 2000; 77(2):229–37.

6. Oyston P., Ulrich R., Jeddelon J. Пат. No. 60/396 WO2004006857. Glanders/Melioidosis Vaccines. CIIA.

7. Reckseidler S.L., DeShazer D., Sokol P.A., Woods D.E. Detection of Bacterial Virulence Genes by Subtractive Hybridization: Identification of Capsular Polysaccharide of *Burkholderia pseudomallei* as a Major 'Virulence' Determinant. *Infect. Immun.* 2001; 69(1):34–4.

8. Thibault F.M., Valade E., Vidal D.R. Identification and discrimination of *Burkholderia pseudomallei*, *B. mallei*, and *B. thailandensis* by real-time PCR targeting type III secretion system genes. *J. Clin. Microbiol.* 2004 Dec;42(12):5871–4.

9. Tyler S.D., Strathdee C.A., Rozee K.R., Johnson W.M. Oligonucleotide primers designed to differentiate pathogenic pseudomonads on the basis of the sequencing of genes coding for 16S-23S rRNA internal transcribed spacers. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 1995; 2(4):448–53.

D.A.Chuhlantsev, I.V.Marakulin,  
I.V.Darmov

# **Application of PCR for Identification and Interspecific Differentiation of Glanders and Melioidosis Etiological Agents**

*The 48<sup>th</sup> Central Scientific Research Institute of the RF Ministry of Defense,  
Kirov*

Assessed were possibilities of identification and differentiation of glanders and melioidosis etiological agents by means of PCR method using different nucleotide sequences of the pathogenic *Burkholderia*.

Primers perspective for inclusion in the test-system assigned for detection of glanders and melioidosis etiological agents DNA in environmental samples and biological materials were selected.

*Key words:* glanders, melioidosis, detection, differentiation, PCR.

Поступила 26.02.08.

## **КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ**

УДК 616.981.452

**Л.В.Самойлова**

## **СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ РАЗВИТИЯ КЛИНИЧЕСКИХ ФОРМ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ЧУМЫ ПРИ АЭРОГЕННОМ И ПОДКОЖНОМ ЗАРАЖЕНИИ ВИРУЛЕНТНЫМИ ШТАММАМИ *Y. PESTIS* И ИХ ИЗОГЕННЫМИ ВАРИАНТАМИ С РАЗЛИЧНЫМ ПЛАЗМИДНЫМ ПРОФИЛЕМ**

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

Представлены обобщенные результаты сравнительных исследований по развитию экспериментальной чумы у лабораторных животных после аэрогенного и подкожного заражения вирулентными штаммами *Y. pestis* (pFra<sup>+</sup>, pCad<sup>+</sup>, pPst<sup>+</sup>, pgm<sup>+</sup>) и их изогенными вариантами с утратой pFra и/или pPst. В зависимости от пути передачи инфекции и дозы возбудителя один и тот же штамм и его изогенные варианты вызывает как легочную, так и бубонно-септическую форму чумы у лабораторных животных. Показано, что у лабораторных животных, зараженных аэрогенно и подкожно изогенными вариантами *Y. pestis*, лишенными плазмид pPst или pPst/pFra, выращенными при 28 °C на агаре Хоттингера, развивается затяжной инфекционный процесс.

*Ключевые слова:* чумной микроб, штамм, изогенный вариант, аэрогенное заражение, легочная чума.

В связи с успехами в области молекулярной биологии, расшифровкой генома возбудителя чумы, характеристикой вирулентности в зависимости от генотипа возбудителя стал возникать вопрос, особенно в последние два десятилетия, о роли генотипа возбудителя чумы в развитии той или иной клинической формы болезни. Однако к настоящему времени влияние детерминант вирулентности *Y. pestis* на развитие легочной формы чумы не установлено.

В связи с этим проведено обобщение результатов исследований по определению роли генотипа чумного микроба в развитии легочной формы чумы. Для этого были получены изогенные варианты вирулентных штаммов возбудителя с различными наборами двух собственных плазмид чумного микроба (pFra и pPst) при сохранении всеми вариантами плазмиды pCad.

*Штаммы.* Использовали три вирулентных штамма *Y. pestis* 231, 358, 629М и изогенные варианты штаммов 358 и 629М, утратившие собственные

плазмиды pFra и/или pPst. Изогенные варианты получали путем направленного конструирования в отделе генетики РосНИПЧИ «Микроб». Штаммы выращивали при 28 °C на агаре Хоттингера, pH 7,2±0,2.

Аэрогенно заражали морских свинок весом 300–350 г и беспородных белых мышей весом от 20 до 25 г в аэродинамической камере и рассчитывали аспирационную дозу по методике Л.В. Самойловой и Н.И.Николаева [1, 3]. Подкожное заражение проводили общепринятым методом. После заражения вели наблюдение в течение 14 дней и подсчитывали LD<sub>50</sub> и СТ<sub>50</sub> (50 % летальная доза для аэрогенного заражения) штаммов по формуле Кербера. Бактериологическое, морфологическое и гистологическое исследования проводили общепринятыми методами. Все исследования проводили в соответствии с Инструкцией по режиму работы с аэрозолями возбудителей особо опасных инфекций (1976) и СП 1.3.12.85-03 «Безопасность работы с микроорганизмами».