

Владивосток: Интертех, 2001.

8. Шакиров М.Т., Топоровский Л.М. // *Микробиология*. - 1999. - №1. - С. 31-33.

9. Bersins U., Volkson V., Bersins D. // *Abstract book 16th meeting of the International Association of Forensic Sciences. - Montpellier (France), 2002. - P. 188.*

10. Dmitrieva O.A. // *Abstract book 5th meeting of the ISA-LM. - Takayama (Japan), 2002. - P. 141.*

11. Yavuz M.E., Yavuz M.S., Asikdizer M. // *Abstract book 16th meeting of the International Association of Forensic Sciences. - Montpellier (France), 2002. - P. 189.*

Поступила в редакцию 05.11.02.

#### LAW ASPECTS OF FORENSIC MEDICAL EXAMINATION OF INFECTION WITH STIS

O.A. Dmitrieva, Ya. T. Yutskovskaya, S.N. Anisupov

Vladivostok State Medical University

*Summary* — Forensic medical examination of cases of infection with venereal diseases and HIV infection is rather rare type of medical examination. Persons went through sexual violence are a group of risk of being infected with sexually-transmitted infections, diagnostics of which should be performed as soon as possible. Therefore, in all cases of sexual crimes victims must be examined by venereologist. The authors also cite an instance from their practice.

*Pacific Medical Journal, 2004, No. 4, p. 65-67.*

УДК 616.5-002.511-074

С.Г. Ленкин

### ПРИМЕНЕНИЕ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ ПРИ ДИАГНОСТИКЕ ТУБЕРКУЛЕЗА КОЖИ

Владивостокский государственный медицинский университет

*Ключевые слова:* милиарная диссеминированная волчанка лица, полимеразная цепная реакция, микобактерия туберкулеза.

При анализе литературных данных можно отметить, что на вопрос об этиологии описанной Tilbury Fox в 1878 г. милиарной диссеминированной волчанки лица существует несколько точек зрения. Наряду с отнесением этого заболевания к туберкулезу кожи [1, 9], некоторые исследователи считают его демодекозом [7], мелкоузловым саркоидом [3], вариантом папулезного розацеа [8, 11], реакцией по типу гранулемы инородного тела на кератин, кожное сало, цирконий [4, 10]. Для уточнения нозологического места милиарной диссеминированной волчанки лица для настоящей работы была использована полимеразная цепная реакция (ПЦР).

ПЦР — это метод амплификации (то есть многократного увеличения концентрации) специфичных последовательностей ДНК. В ее основу положено свойство одного из ферментов живых клеток — ДНК-полимеразы — катализировать реакцию полимеризации дезоксирибонуклеотидтрифосфатов с удлинением праймерных молекул ДНК в соответствии с последовательностью матрицы.

ПЦР была изобретена в 1983 г. американским исследователем Карри Муллисом, удостоенным за это Нобелевской премии. Данный метод позволяет избирательно синтезировать *in vitro* относительно небольшие участки ДНК, обычно длиной не более 1000 пар нуклеотидов, используя в качестве матрицы любые образцы ДНК, содержащие амплифицируемую последовательность. Необходимым условием для ПЦР

является знание нуклеотидной последовательности амплифицируемой области, так как специфический выбор этого участка осуществляется путем гибридизации исследуемой ДНК с праймерами — искусственно синтезированными олигонуклеотидными молекулами ДНК (обычно размером около 20 пар нуклеотидов) [2].

Одним из преимуществ данного метода по сравнению с многими другими является то, что для проведения реакции не требуется большого количества материала. Так, ПЦР теоретически позволяет обнаружить в образце даже одну молекулу амплифицируемой ДНК. В реакционную смесь входят дезоксирибонуклеотидтрифосфаты, буферный раствор, содержащий ионы  $Mg^{2+}$ , термофильная ДНК-полимераза, исследуемая ДНК и праймеры. ПЦР — циклический процесс, каждый этап которого представляет собой совокупность из трех температурных режимов инкубации исследуемых образцов:

1. Денатурация — инкубация образцов при температуре 90-95°C в течение нескольких минут. На этой стадии под воздействием повышенных температур происходит денатурация молекул исследуемой ДНК (то есть разрушение водородных связей между ее цепями);
2. Отжиг — инкубация образцов при температуре, оптимальной для гибридизации между одиночными цепями исследуемой ДНК и праймерными молекулами;
3. Синтез — инкубация образцов при температуре 70-75°C, которая соответствует температурному оптимуму используемой при проведении полимеразной цепной реакции термофильной ДНК-полимеразы. На этой стадии и протекает реакция полимеризации.

Таким образом, при каждом цикле происходит двукратное увеличение числа синтезированных копий амплифицируемого фрагмента, содержание продуктов амплификации нарастает в геометрической прогрессии [5]. За 25-30 циклов число новосинтезированных копий ДНК достигает нескольких миллионов, что позволяет анализировать результаты с использованием других, менее чувствительных методов (обычно используют электрофорез в полиакриламидном геле).

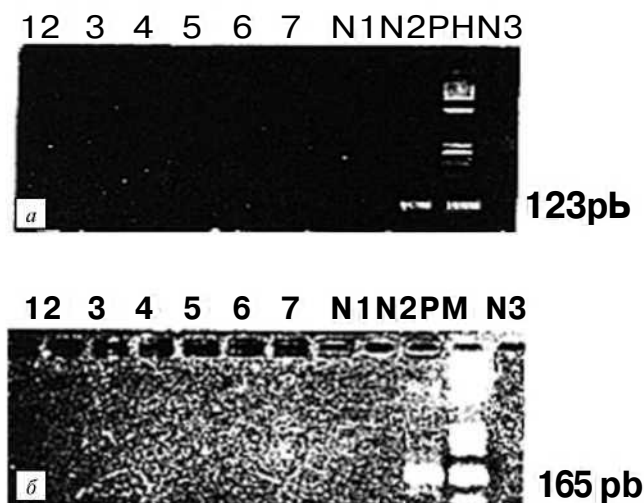


Рис. 1. Результаты ПЦР у больных милиарной диссеминированной волчанкой лица.

а — при использовании первого маркера, б — при использовании второго маркера; линии 1-7 — результаты детекции ПЦР больных, линии N1 и N2 — отрицательные контроли, P — положительный контроль, M — маркер микобактерий, N3 — вода.

ПЦР обычно проводят в автоматическом режиме, с использованием специальных приборов — термоциклеров. Высокая чувствительность и специфичность ПЦР обуславливают удобство ее использования для диагностики разнообразных заболеваний.

Одна из попыток разработки такой диагностической системы на основе ПЦР представлена в настоящей работе. Оценивалась диагностическая и патогенетическая значимость обнаружения методом ПЦР ДНК *M. tuberculosis* у больных с диссеминированной милиарной волчанкой. В качестве источника биоматериала использовалась ДНК, выделенная из парафиновых срезов биопсий, взятых у 7 больных. Депарафинизацию срезов проводили ксилолом. Выделение ДНК выполняли по стандартной методике, с использованием протеиназы К и фенольной депротенизации [12]. Для проведения ПЦР использовали две пары праймеров, комплементарных двум различным участкам генома туберкулезной микобактерии:

1. IS1-5'-CCTGCGAGCGTAGGCGTCCGG-3' и IS2-5'-CTCGTCCAGCGCCGCTTCCGG-3' при наличии в реакционной смеси ДНК *M. tuberculosis*, в ходе ПЦР образующей продукт размером 123 пар нуклеотидов;
2. GA-5'-СТАГГТСГГГАСГГТГАГГССАГГ-3' и GB-5'-САТТГСГААГТГАТТССТССГГАТ-3' при наличии в реакционной смеси ДНК *M. tuberculosis*, в ходе ПЦР образующей продукт размером 165 пар нуклеотидов.

Реакцию проводили в объеме 100 мкл в реакционной смеси, содержащей по 5 пМ каждого из пары праймеров, по 200 мМ каждого из дезоксинуклеотидтрифосфатов, 3-5 ед. термофильной полимеразы в буферном растворе (KCl, Tris-HCl и MgCl). Перед началом реакции пробы прогревались при 94°C в тече-

ние 10 мин. для полной денатурации ДНК. После этого было проведено 40 циклов ПЦР со следующими параметрами: денатурация — 94°C — 1 мин., отжиг — 63°C — 30 с, синтез — 72°C — 45 с.

В качестве положительного контроля использовалась ДНК, выделенная из культуры *M. tuberculosis*, в качестве отрицательного контроля — ДНК, полученная из материала парафиновых срезов больных базалиомами. Детекцию результатов реакции проводили методом электрофореза в 1% агарозном геле, визуализируя их в ультрафиолетовом свете после окраски бромистым этидием. При ПЦР у всех больных милиарной диссеминированной волчанкой лица и в отрицательных контролях не было получено продуктов, идентичных маркерным. В то время как в положительных контролях обнаружили вещество, одинаковое с маркерным в обоих случаях (рис. 1).

Таким образом, на основании проведенного исследования можно заключить, что милиарная диссеминированная волчанка лица не является формой гематогенно-диссеминированного туберкулеза кожи.

#### Литература

1. Старченко М.Е., Деменкова Н.В., Данилова Е.Н. // *Вестн. дерматол.* - 1998. - № 5. - С. 57-58.
2. Ben-Ezra J., Johnson D.A., Rossi J. // *J. Histochem. Cytochem.* - 1991. - Vol. 39. - P. 351-354.
3. Berbis P., Privat Y. // *Journal of the American Academy of Dermatology.* - 1987. - Vol. 16, No. 6. - P. 1271-1272.
4. Daroutiel M., Zaher H. // *International journal of dermatology.* - 1993. - Vol. 32, No. 7. - P. 508-511.
5. Degits K. // *Arch. Dermatol.* - 1996. - Vol. 132. - P. 71-75.
6. During L. // *Monatshefte prakt. Dermatol.* - 1888. - Bd 7. - S. 1131-1139.
7. Grosshans E., Kremer M., Maleville J. // *Hausarzt.* - 1974. - Vol. 25. - P. 166.
8. Lever W., Schaumburg-Lever G. // *Histopathology of the skin.* - Philadelphia: JB Lippincott, 1990. - P. 202-218.
9. Maruyama C., Harada S. // *Rinsho Derma.* - 1961. - Vol. 2. - P. 416-418.
10. Pinkus H., Mehregan A.H. *A guide to dermatohistopathology.* - New-York: Appleton-Century-Crofts, 1981.
11. Yamada M., Sugai T. // *Scin Res.* - 1981. - Vol. 23. - P. 229.
12. Walker D.A., Taylor I.K., Mithell D.M., Show R.J. // *Thorax.* - 1992. - Vol. 47. - P. 690-694.

Поступила в редакцию 9.12.02.

#### APPLICATION OF POLYMERASE CHAIN REACTION FOR CUTANEOUS TUBERCULOSIS DIAGNOSTICS

S.G. Lenkin

Vladivostok State Medical University

**Summary** — The paper provides discussion about nosologic place of miliary disseminated lupus of face and diagnostic potential of polymerase chain reaction. The author has made an attempt to detect DNA of *Mycobacterium tuberculosis* by using polymerase chain reaction in patients' skin, but it failed. Tuberculous etiology of miliary disseminated lupus of face still raises doubts.

*Pacific Medical Journal*, 2004, No. 4, p. 67-68.