

임상검체에서 PCR을 이용한 헤르페스 바이러스의 검색

전세진 · 김기산 · 백원기* · 서성일* · 서민호*

= 요 약 =

Herpes simplex virus(HSV) 감염을 진단하기 위하여 빠르고 민감도가 높은 방법들이 개발되어 져 왔다. 본 연구에서 저자들은 HSV 각막염이 의심되는 환자의 각막병소 부위를 긁어서 가검물을 채취한 후 HSV DNA를 검색하기 위해 Primer 5 CATCACCGACCCGGAGACGGAC 3를 이용해서 Polymerase chain reaction(PCR)을 시행하였다. PCR의 산물은 agarose gel electrophoresis와 Southern blot hybridization으로 확인하였다. 전형적인 HSV각막염의 병소를 보이는 7안중 4안과 비전형적인 양상을 보이는 17안중 7안에서 PCR양성을 보였고, 후자의 7안중 4안의 경우에는 HSV각막염의 기왕병력이 없었다. 결과적으로 임상양상이나 기왕의 병력만으로 간과될 수 있는 HSV각막염 진단에 PCR을 협조적으로 시행한다면 정확한 진단과 조기에 치료적 방향을 설정할 수 있는 유용한 방법이 될것으로 생각된다(한안지 37:1996~2002, 1996).

= Abstract =

Detection of Herpes Simplex Virus DNA in Clinical specimens by Polymerasde Chain Reaction(PCR)

Jeon, Sae-Jin, M.D., Kim, Ki - San, M.D., Baek, Won-KI, M.D.*,
Seo, Sung-Il, M.D.*, Seo, Min-Ho, M.D.*.

The rapid and sensitive diagnostic methods for herpes simplex virus (HSV) infection have been developed . In this study, we employed the polymerase chain reaction (PCR) technique with primer 5 CATCACCGACCCGGAGACGGAC 3 for detection HSV DNA from specimens obtained from the corneal lesion of patients who were suspected of HSV keratitis. The products of

〈접수일 : 1996년 6월 26일, 심사통과일 : 1996년 11월 4일〉

계명대학교 의과대학 안과학교실

Department of Ophthalmology, College of Medicine, Keimyung University, Taegu, Korea

*계명대학교 의과대학 미생물학교실

*Department of Microbiology, College of Medicine, Keimyung University, Taegu, Korea

본 논문의 요지는 1995년 제 74차 대한 안과학회 춘계 학술 대회에서 구연 발표되었음.

— 전세진 외 : PCR에 의한 HSV각막염의 진단 —

PCR was confirmed with agarose gel electrophoresis and southern blot hybridization. Positive results were obtained 4 of 7 typical lesions(2 of 5 dendritic lesions and 2 of 2 geographic lesions) and 7 including 4 without a history of herpetic keratitis of 17 atypical lesions. With these results we could find that PCR technique would be a useful tool for the detection of HSV DNA in both typical and atypical lesion of herpetic keratitis as well as in cases hard to diagnose clinically (J Korean Ophthalmol Soc 37:1996~2002, 1996).

Key Words : Herpes Simplex Virus, Keratitis, Polymerase chain reaction(PCR)

바이러스에 의한 안질환의 진단은 일반적으로 임상소견에 바탕을 두고 이루어진다. 진단을 위해서 객관적인 자료를 얻기위한 일반적인 접근방식으로는 피부, 결막, 각막등 병소를 긁어서 검사하는 법¹, 혈중항원, 항체를 검색하는 법², 감염된 조직을 조직병리학적으로 검사하는 법, 그리고 세포배양을 통해 바이러스를 분리해서 직접 확인하는 법^{3,4)} 등이 있다. 직접 원인바이러스를 검색하는 방법으로는 전자현미경을 통한 바이러스검색⁵, 면역형광 염색법², 면역효소법(Immunoperoxidase test)⁶, Nucleic acid hybridization, Polymerase chain reaction(PCR)이 있고 혈청면역학적 검사법들로는 Viral neutralization, Complement fixation, Hemmagglutination inhibition², Enzyme linked immunosorbent assay⁶ 등이 보고되어 있다. 이러한 검사법들은 대개 HSV에 의한 안질환의 진단에 유용하게 이용된다. 최근 면역저하 환자들이 증가하고 HSV 감염에 대한 치료환경의 변화에 따라 빠르고 정확한 진단의 중요성이 더욱 증가하고 있다. HSV 감염의 진단은 임상소견을 중심으로 이루어진다. 전형적인 Dendritic pattern이나 Geographic pattern의 각막상피 미란을 보이는 경우에는 임상소견에 의한 진단률이 상당히 높지만 비전형적인 각막병소를 보이는 경우(Atypical dendrites, Irregular large epithelial defects, Abrasion of the cornea)에는 HSV 감염을 간과할 수 있어서 이 경우 확진을 위해서 여러가지 검사실적 진단법이 요구된다. 그러나 위에서 열거한 여러가지 검사법들은 대부분이 항원, 항체의 검색을 통한 간접적인 검사일뿐이며 검사물이 소량일 경우에는 결과의 정확도가 떨어지고, 검사물의 신선도가 요구되며, 검사과정과 기구의 복잡성등의 문제점들

이 제시되고 있으며 세포배양으로 직접 바이러스를 검색하는 경우에는 시간이 오래 걸린다는 단점이 있다⁶. 최근에 개발된 PCR 법은 찾고자하는 DNA segment를 선택적으로 대량복제 할 수 있어서 검사물의 용량이 적어도 HSV에 선택적인 DNA를 빼르고 특이도와 민감도면에서 우수한 진단이 이루어 질수 있을 것으로 제시되었다^{1,5)}. 저자들은 임상검사상 HSV 각막염이 의심되는 환자의 각막상피세포 검사물을 대상으로 PCR을 통한 HSV DNA의 검색을 실시하여 진단에 도움이 되고자 했다.

재료 및 방법

1. 대상

계명대학교 동산의료원 안과에 내원한 HSV keratitis가 의심되는 전형적인 병소를 보이는 7안과 비전형적인 각막염이 있는 17안, 총 24안을 대상으로 하였다. 이들의 연령분포는 10세에서 78세까지(평균연령 54.1세)였으며 이들은 과거에 HSV Keratitis 경력이 있거나 항바이러스 재제를 사용한 경력이 있는 13안과 그러한 경력이 없는 11안으로 분류되었다. 대상환자들의 각막염양상을 보면 5안이 전형적인 dendritic lesion, 2안이 Geographic lesion, 17안이 Atypical lesion이였다 이들 각막병소의 상피세포층을 Spatula를 이용해서 조심스럽게 scraping한 후 0.9% 생리식염수용액이 담긴 1.5ml의 Eppendorf tube에 검사물을 영하20도로 보관하여 PCR에 사용하였다.

2. 종합효소 연쇄반응(Polymerase chain reaction, PCR)

임상가검물로부터 PCR방법을 이용한 HSV

DNA검출은 Kowalski등의 방법에 준하여 실시하였다". HSV의 DNA를 세포로 부터 추출하기 위해 각막세포가 들어 있는 tube를 12,000 rpm으로 5분간 원침한 후 상층액을 버리고 여기에 lysis buffer(0.32M sucrose, 10mM Tris-HCl, 1% Triton X-100, 및 0.01% EDTA)를 40ul, 증류

수 20ul, 그리고 1ul의 proteinase K(6 mg/ml)을 넣어 섭씨 55도에서 1시간 또는 37도에서 일주일 방치하였다. 그런 후 섭씨 95도에서 10분간 두어 proteinase K의 활성을 제거한 다음 12,000 rpm으로 5분간 원침하여 상층액을 취하여 중합효소 연쇄반응에 이용하였다. 중합효소 연쇄반응은 상기의

Table 1. Comparision between clinical corneal lesion and detection of HSV-1 DNA by PCR

clinical findings	HSV PCR	
	positive	negative
dendritic lesion(N=5)	2	3
geographic lesion(N=2)	2	0
atypical lesion(N=17)	7	10
N = 24	11	13

Table 2. Comparison between past HSV keratitis history and detection of HSV-1DNA by PCR

	HSV PCR	
	positive	negative
Hx of HSV keratitis(N= 13)	7	6
No Hx of HSV keratitis(N= 11)	4	7
N= 24	11	13

Table 3. General patients characteristics

No of cases	Age/Sex	PCR result	Past Hx	Lesion appearance (Typical lesion +) (Atypical lesion -)
1	58/female	+	+ (HSV keratitis 8 times)	- (round epi defect)
2	47/male	+	+ (HSV keratitis 4 times)	+ (geographic ulcer, stromal edema)
3	71/male	+	+ (HSV keratitis 4 times)	+ (dendritic epi defect)
4	55/female	+	- (uncertain Hx)	- (large epi defect, stromal opacity)
5	69/female	+	+ (HSV keratitis 3 times)	- (pseudodendritic epi, defect)
6	47/male	+	+ (HSV keratitis 5 times)	+ (geographic ulcer, stromal infiltration)
7	65/female	+	- (uncertain Hx)	- (round epi defect, stromal infiltration)
8	49/male	+	- (no Hx)	- (round epi defect, stromal opacity)
9	78/male	-	+ (HSV keratitis 1 time)	- (large epi defect)
10	39/male	-	+ (disciform keratitis 1 time)	+ (dendritic epi defect, endothelitis)
11	10/male	-	+ (trophic ulcer 1 time)	- (small round epidefect)
12	64/male	-	+ (disciform keratitis 1 time)	+ (dendritic epi defect)
13	58/male	-	+ (geographic ulcer 1 time)	- (small round epi defect)
14	39/male	+	- (uveitis Hx)	- (central round epi defect)
15	36/female	-	- (no Hx)	- (large epi defect)
16	53/male	-	+ (HSV keratitis 4 times)	+ (dendritic epi defect, stromal opacity)
17	59/male	-	- (no Hx)	- (round epi defect)
18	75/male	-	- (trauma Hx by wood)	- (multiple samll epi defect)
19	20/female	-	- (contact lens induced)	- (large epi defect)
20	48/male	+	+ (HSV keratitis 3 times)	- (small ruond epi defect)
21	40/male	+	- (no Hx)	+ (dendritic epi defect)
22	78/male	-	- (uncertain Hx)	- (small round epi defect)
23	68/female	-	- (no Hx)	- (large epi defect)
24	23/male	-	- (no Hx)	- (large epi defect)

— 전세진 외 : PCR에 의한 HSV각막염의 진단 —

60ul 용액을 template로 이용하여 200uM의 deoxynucleotides(dATP, dCTP, dTTP, 및 dGTP), 6mM의 Tris-HCl(pH 8.3), 30mM의 KCl, 0.6mM의 MgCl₂, 2 unit의 AmpliTaq DNA polymerase(Perkin-Elmer Cetus, Norwalk, CT, USA), 그리고 20 uM의 HSV sense 및 antisense

primer를 넣어 총 100ul 용량으로 하여 실시하였다. 본 실험에서는 HSV-1 및 2의 DNA polymerase gene 절편에 특이하게 결합하는 22 mer의 primer를 미국의 Bio-synthesis회사로 부터 구입하여 사용하였으며 염기서열은 다음과 같다: 5' CATCACCGACCCGGAGAGGGAC3' (sense primer) 및 5' GGGCCAGGCAGTGTTCGTTA3' (antisense primer). 상기의 primer에 의해 증폭되는 산물의 크기는 92bp이다. 중합효소 연쇄반응은 총 40 cycle을 실시하였으며 94도에서 120초, 60도에서 180초, 그리고 72도에서 180초간 시행하였다. 양성대조군으로는 HSV ATTC VR-733을 인간 폐섬유아주 세포인 MRC-5 세포주(ATCC CCL-171)에 감염시킨 후 배양상층액으로부터 HSV를 분리하여 사용하였다. 음성대조군으로는 HSV가 포함되지 않도록 하여 중합효소연쇄반응을 실시하였다.

3. 중합효소연쇄반응 산물의 검색

1) 전기영동에 의한 검색

중합효소연쇄반응 산물을 10ul를 2ul의 gel loading buffer(TypeI)와 섞은 후 ethidium bromide가 들어 있는 3% metaphor agarose gel(FMC Bioproducts, ME, USA)에 접종 후 1X TAE buffer(0.04 M Tris-acetate 및 0.001 M EDTA)를 이용하여 전기영동 하였다. 그런 후 UV-transilluminator에서 polaroid camera를 이용하여 사진 촬영하였다. 이때 DNA size marker로는 미국 Bethesda Research Laboratory사의 123 DNA ladder 및 100bp ladder를 사용하였다⁹.

2) Southern blot에 의한 중합효소연쇄반응 산물의 검색

중합효소연쇄반응 산물을 보다 자세히 그리고 정

확히 증폭되었는지를 알아보기 위해서 Southern blot hybridization을 실시하였다.

먼저 전기영동된 gel을 denaturation solution(0.2 N NaOH 및 1.5 M NaCl)에서 15분간 친탕 후 neutralization buffer(1.5 M NaCl 및 1 M Tris-HCl, pH 7.0)에서 15분간 둔 다음 nitrocellulose(NC) filter로 중합효소 연쇄반응 산물을 전이시켰고, 그리고 섭씨 80도에서 90분간 두어 고정시킨 후 hybridization을 실시하였다. Prehybridization은 50%(V/V) formamide, 0.1% sodium dodecyl sulfate(SDS), 5% Denhardts 용액(0.1% polyvinylpyrrolidone, 0.1% bovine serum albumin, 및 0.1% ficoll), 5 mM EDTA, 75 mM NaCl, 250mg/ml salmon sperm DNA가 함유된 용액에서 섭씨 42도에서 16시간 시행하였으며, hybridization은 중합효소 연쇄반응으로 방사선 동위원소(32P-dCTP)를 표시한 HSV DNA polymerase gene을 상기용액에 혼합하여 섭씨 42도에서 18시간 실시하였다. 그런 후 NC-filter를 2 X standard saline citrate(pH 7.2) 및 0.1% SDS 용액으로 60도에서 5분간 세척후 Kodak X-Omat(Eastman Kodak Co., Rochester, NY, USA)을 이용하여 autoradiography를 실시하였다^{7,8}.

결 과

본 실험에 사용한 PCR용 primer가 특이하게 HSV를 증폭하는지를 알아보기 위하여 HSV-1을 비롯하여 cytomegalovirus(CMV), varicella-zoster virus(VZV), hepatitis B virus(HBV), 및 Epstein-Barr virus(EBV)의 DNA를 이용하여 PCR법의 특이도 있음을 안 후 실험을 진행하였다(Fig. 1). 또한, 본 실험의 PCR법의 민감도를 알아보기 위하여 TCID50(tissue culture infective dose 50)에 따라 계산된 viral particle을 회석하여 PCR을 실시한후 Southern blot analysis를 한 결과 2ul의 TCID50/0.2ml(약 virus particle = 5 개)까지 검출 가능하였다(Fig. 2).

Herpetic keratitis로 의심되는 환자의 각막으로부터 Kowalski등의 PCR방법에 따라 HSV감염여

부를 조사한 결과 총 26개 가검물 중 12개에서 HSV가 증폭되었다(Fig. 3, 4). PCR산물을 전기 영동하여 관찰한 경우와 Southern blot analysis 를 실시한 경우의 민감도가 비슷하였다(Fig. 3). 임상적 소견과 비교해 보면 전형적인 HSV 각막염병 소를 보인 7안중 4안(57%)에서 PCR 양성을 보였고 비전형적인 병소를 보인 17안중 7안(41%)에서 PCR양성을 보였다. 그리고, 과거 HSV 각막염 병력이 있었던 13안중 7안(64%)에서 PCR 양성을 보였고 과거병력이 없었던 11안중 4안(36%)에서 PCR양성을 보였다. 또한 전형적인 병소와 과거병력이 동시에 있었던 6안중 3안(50%)에서만 PCR양성을 보였다.

고 칠

HSV는 large DNA Virus로서 감염율이 높아서 일반적인 인구중 90% 가량에서 혈청항체 양성을 보인다. 일차감염후 virus 병소부위의 감각신경 수초를 따라 올라가서 신경절에서 잠재상태로 있다가 잠재상황이 역전되는 시기에 다시 신경 수초를 따라 와서 병소를 나타내게 된다. 대부분의 경우는 임상적인 증상을 나타내지 않는 잠재 상태이지만 근래에 AIDS 환자, 암환자, 장기이식환자 등 신체 방어기능이 저하된 환자가 증가하여 그 발병가능성이 점차 높아지고 HSV에 대한 보다 나은 치료법이 개발되는 등의 환경변화에 따라 정확하고 빠른 진단의 중요성이 더욱 커지고 있다. 이러한 HSV Keratitis

Fig. 1. Specificity of RCR detection of HSV DNA polymerase gene from various viral DNAs. Lane 1-6 and M represent negative control, HSV-1 DNA, cytomegalovirus DNA, varicella-zoster viral DNA, hepatitis B viral DNA, Epstein-Barr viral DNA, and 123 base pair(BP) molecular size marker, respectively. Amplified band of the appropriate size(92BP) are seen only in the HSV-1(lane2).

Fig. 2. Sensitivity of PCR detection of HSV DNA polymerase gens from MRC-5 cell suspensions by Southern blot analysis.

- Lane 1: 4ul of $10^{8.75}$ TCID₅₀/0.2ml(about 10^5 viral particle),
- Lane 2: 4ul of $10^{7.75}$ TCID₅₀/0.2ml(about 10^4 viral particle),
- Lane 3: 4ul of $10^{6.75}$ TCID₅₀/0.2ml(about 10^3 viral particle),
- Lane 4: 4ul of $10^{5.75}$ TCID₅₀/0.2ml(about 10^2 viral particle),
- Lane 5: 3ul of $10^{4.75}$ TCID₅₀/0.2ml(about 7.5×10^1 viral particle),
- Lane 6: 2ul of $10^{3.75}$ TCID₅₀/0.2ml(about 5×10^1 viral particle),
- Lane 7: 2ul of $10^{2.75}$ TCID₅₀/0.2ml(about 2.5×10^1 viral particle),
- Lane 8: 4ul of $10^{1.75}$ TCID₅₀/0.2ml(about 101 viral particle),
- Lane 9: 3ul of $10^{0.75}$ TCID₅₀/0.2ml(about 0.75×10^1 viral particle),
- Lane 10: 2ul of $10^{-0.75}$ TCID₅₀/0.2ml(about 0.5×10^1 viral particle),
- Lane 11: 1ul of $10^{-1.75}$ TCID₅₀/0.2ml(about 0.25×10^1 viral particle),
- Lane 12: negative control. Last positive dilution was lane 10(about 0.5×10^1 viral particle).

— 전세진 외 : PCR에 의한 HSV각막염의 진단 —

환자의 확진을 위해 임상소견과 함께 과거병력이 진단에 도움이 되며 이와 함께 검사실적 진단이 필요하다. HSV Keratitis의 검사실적 진단방법으로는

감염된 조직을 생검하여 조직병리학적 변화를 보는 Giemsa 염색법, 형광항체를 이용해서 감염된 조직의 세포핵과 세포질의 HSV Ag을 검색하는 형광항체법(FAMA), 효소를 이용해서 검사물로부터 HSV Ag을 검색하는 Immunoperoxidase test가 있으며 혈청 면역학적인 진단방법으로는 HSV Ag로 도포된 시험판을 사용하여 HSV Ag을 검색하는 Herpcheck (HC)과 1 Hour enzyme-linked immunoassay (IEIA)가 있고 HSV에 감염된 세포를 filter를 이용해서 검색하는 Enzyme immunofiltration (IF), 그리고 HSV Ag으로 도포된 Latex를 이용해서 HSV Ag을 검색하는 Latex agglutination (AGG)이 있다^{2,9}. 이러한 검사법들은 HSV의 Ag이나 Ab을 검색하는 간접적인 검사법이며 직접 원인 바이러스를 확인하는 방법이 아니라는 단점이 있으며 여러가지 기구들이 필요하며 정확하고 숙련된 기술을 필요로하는 단점이 있다. 결정적인 진단법으로는 검체를 분리해서 세포 배양을 통해 HSV 자체를 확인하는 방법이 있으나 이를 위해서 2~7일씩 시간이 소요되는 단점이 있다⁶. 최근에 고온에서도 안정한 Taq DNA polymerase와 자동 온도 순환장치(Thermal cycler)를 이용해서 선택적으로 DNA 합성 반응을 가능케 한 PCR 법이 개발되었다.

그 과정을 간략하게 설명하면, 우선 검사물을 denaturation시킨 후 찾고자하는 DNA에 특이하게 결합하는 Oligonucleotide primer를 연결(annealing)시킨다. 여기에 고온에서 안정한 DNA polymerase를 가하면 primer elongation이 일어난다. 이러한 과정을 반복적으로 시행하면 primer에 결합

- Fig. 3.** (A) Electrophoretic analysis of PCR amplification products from specimens obtained from patients who were suspected of herpetic keratitis. N, M, and P represent negative control, 123 base pair(BP) size marker, and positive control, respectively.
(B) Southern blot analysis of the gel in panel A. Amplified band of the appropriate size(92 BP)are seen in all of the lanes.

- Fig. 4.** Electrophoretic analysis of PCR amplification products from specimens obtained from patients who were suspected of herpetic keratitis. N, M, and P represent negative control, 123 base pair(BP) size marker, and positive control, respectively. Amplified band of the appropriate size(92 BP)are seen in lane 4- 8, 14, 20, and 21.

된 특정 DNA segment가 증폭되어 합성되게 된다. 합성된 DNA segment는 전기영동과 Ethium Bromide 염색을 통해 검색 할 수 있다^{6,7,9,10,11)}. PCR법은 검사물 내의 극소량의 DNA를 단시간에 대량의 DNA로 증폭시켜 합성할수 있어서 HSV 진단에 큰 도움을 줄 가능성을 제시하게 되었다. 본 연구의 대상이 된 17안의 atypical lesion 의 경우 7례(41%) 가 HSV DNA 양성을 나타내어 임상소견만으로는 간과 될수 있는 진단을 도와줄 수 있는 것으로 보여진다. 과거병력이 없는 3안이 HSV DNA 양성이었고 과거병력의 유무에 따른 일관성 있는 PCR 결과는 나오지 않았다. 그러므로 과거병력 만으로는 진단에 신뢰성을 높일 수 없는 것으로 사료되며, PCR 검색을 통해 진단의 정확도를 높일 수 있을 것이다. 이와 같이 PCR 검사법이 HSV DNA 를 검색하는데 빠르고 간단하며 민감도와 특이도면에서 우수한 방법이고 HSV에 의한 각막병소의 조기진단과 치료에 도움을 줄것으로 사료된다. 특히 임상소견만으로는 진단이 어려운 비전형적인 병소의 진단에 협조적으로 시행하여 진단과 치료에 도움을 주리라고 생각한다. 반면에 HSV Keratitis 의 전형적인 Dendritic lesion을 보였던 5안중 3안에서 PCR음성의 결과를 보였으나, 항바이러스제제인 3% Acyclovir안연고와, 1% Triflorthymidine 안약을 단독 혹은 병용투여하여 치료한 결과, 반응을 보여 각막병소의 치유가 이루어졌다. 이는 검체의 채취와 검사과정중에 검체가 오염되었거나 PCR 위음성을 의미할 수 있으며 이것의 원인으로 생각해 볼 수 있는 것은 검체의 저장액내에 바이러스의 회석이 너무 많이 되었거나 이미 검체를 채취한 병소부위에 바이러스개체수가 너무 적었을 가능성이 있다. 아직까지는 PCR 법이 복잡한 과정과 전문적인 기술이 필요하는 단점이 있고 검사중 검사물의 오염에 의한 위양성 결과를 완전히 배제 할 수 없다는 점도 지적되고 있으나 일단 적절한 Primer 와 적정반응조건이 설정된다면 임상적으로 활용해도 좋을것으로 생각된다⁷⁾.

REFERENCES

- 1) Kowalski RP, Scott I. Portnoy, Lisa M. Karen-

- chak, Robert C. Arffa : *The Evaluation of the Kodak Surcell Test for the Detection of Ocular Herpes Simplex Virus. Am J Ophthalmology* 1991;112:214-5.
- 2) Kowalski RP, Gordon YJ : *Evaluation of Immunologic Tests for the Detection of Ocular Herpes Simplex Virus. Ophthalmology* 96: 1583-1586, 1989.
- 3) Landry ML, Hsiung GD : *primary isolation of viruses. p31-51. In Specter S and Lancz G(ed), clinical virology manual. 1st ed. Elsevier Science Publishing Co. Inc., New York, 1986.*
- 4) Edouard Contin, Jian Chen, Dru E. Willey, Jerry L. Taylor, William J. O'Brient : *Persistence of HSV DNA in Rabbit Corneal Cell. Invest Ophthalmol Vis Sci* 33:2470-2475, 1992.
- 5) Seto E, Yen TSB: *Detection of CMV Infection by means of DNA isolated from paraffin-embbedded tissues and dot hybridization. Am J Pathol* 1987;127:409-13.
- 6) Kowalski RP, Gordon YJ, Romanowski EG, Araullo-Cruz T, Kinchington PR : *A comparison of enzyme immunoassay and polymerase chain reaction with the clinical examination for diagnosing ocular herpetic disease. Ophthalmology* 1993;100:530-532.
- 7) Ming Cao, Xiao Xiao, Barbara Egbert, Teresa M, T.S. Benedict Yen. : *Rapid Detection of Cutaneous HSV Infection with the Polymerase Chain Reaction. J Invent Dermatol* 82: 391-392, 1989.
- 8) Southern EM : *Detection of specific sequence among fragments separated by gel electrophoresis. J Mol Biol* 1975;98:503-518.
- 9) 서민호, 백원기, 이규석 : 임상검체에서 PCR을 이용한 수두-대상포진 바이러스 DNA의 검색. 대한 미생물 학회지 26:5:479-486, 1991.
- 10) Teresa M. Darragh, Barbara M. Egbert, Timothy G. Berger, T.S. Benedict Yen : *Identification of Herpes Simplex Virus DNA in Lesions of erythema multiforme by the polymerase chain reaction. J AM Acad Dermatology* 1991;24:23-6.
- 11) 박건욱, 백성덕, 백원기, 서성일, 박종욱, 서민호, 최병길 : 인간 세포거대바이러스의 배양상 및 PCR에 의한 바이러스 DNA검색 대한 미생물 학회지 29: 3:275-285, 1994.