

## Malignant Catarrhal Fever의 병리조직학적 진단과 혈청학적 진단 및 PCR 진단법의 비교

김옥진\*, Timothy B. Crawford<sup>1</sup>

미국 농무부 동물질병연구소, <sup>1</sup>워싱턴주립대학교 수의과대학  
(게재승인: 2003년 6월 18일)

## Comparison of Histopathology, Serology and PCR for the Diagnosis of Malignant Catarrhal Fever

Ok-jin Kim\* and Timothy B. Crawford<sup>1</sup>

*Department of Agriculture, Animal Disease Research Unit, ARS, USA*

<sup>1</sup>*Department of Veterinary Pathology, College of Veterinary Medicine, Washington State University*

(Accepted: June 18, 2003)

**Abstract:** Malignant catarrhal fever (MCF) is a systemic disease of ruminants caused by ovine herpesvirus 2 (OvHV-2). OvHV-2 is a gamma herpesvirus, which induces frequent latent infection and often difficult to detect its antigens and even specific nucleic acids because of its low viral copies in the infected tissues. Histopathology, serology and polymerase chain reaction (PCR) were compared for the diagnosis of MCF using 10 bison infected with OvHV-2. Histopathological diagnosis was performed using the criteria which was based upon the pathognomic lesions. Serological diagnosis was conducted using its serum with competitive ELISA for the detection of antibodies of OvHV-2. Also, the nest PCR was performed with peripheral blood leukocytes for the detection of OvHV-2-specific DNAs. Primers 556 and 775 were used for the primary amplification, and primers 556 and 555 were used for the secondary amplification. As the results, positive cases were 6 by histopathology, 9 by serology and 10 by PCR. As comparing with other diagnostic methods, PCR was found to be more sensitive than histopathology and serology. The recent development of molecular diagnostic assays has provided powerful tools for investigating how viruses survive in nature. Development of PCR specific for viruses has dramatically improved the accuracy of diagnosis of viruses in clinically infected animals. Furthermore, amplification of viral genomic material by nest PCR represents the most sensitive method for the detection of viruses and might be detected successfully even though very low viral DNA copies. So, it could be used as the first choice for the detection of viral DNAs with low copies such as the status of latent infection. However, it has also some limitation of application like as false negative results by PCR inhibitors and false positive results by contamination. The results of this study suggest that the use of molecular biological methods like PCR may increase the accuracy for the diagnosis of infectious diseases. However, in diagnostic laboratory, it is recommended that PCR assay must be conducted with other diagnostic methods for more reliable diagnosis.

**Key words:** histopathology, serology, PCR, diagnosis

---

\* Corresponding author: Ok-jin Kim  
USDA-ARS, ADRU, 319 Bustad, WSU, Pullman, WA 99164, USA  
Tel: +1-509-335-6046, E-mail: kimoj@netian.com

## 서 론

Malignant catarrhal fever (MCF)는 gamma herpesvirus 인 ovine herpesvirus 2 (OvHV-2)의 감염에 의하여 발생하는 질병으로서, 반추류에 고열과 점막의 염증 및 전신 림프구 증식에 의한 치명적인 임상결과를 초래한다 [15]. OvHV-2 감염은 전세계적으로 발생하고 있으며, 자연숙주로 알려져있는 양에서는 증상이 없으나, 바이러스를 분비하여, 주변의 다른 반추류에 전염원의 역할을 하는 것으로 추정되고 있다. OvHV-2에 감수성이 있는 반추류로는 cattle [3], deer [16], bison [14] 등이 있으며, 최근에는 반추류가 아닌 돼지에도 감수성이 있다고 보고되었다 [12]. 이들 감수성 동물들에서 OvHV-2 감염은 경제적으로 심한 손실을 끼치는 것으로 파악되고 있다 [5]. 임상적으로 증상이 유사하여, 진단이 어려운 질병으로는 mucosal disease, infectious bovine rhinotracheitis, foot-and-mouth disease와 rinder pest 등이 있으며, OvHV-2의 병인론적인 진단은 바이러스를 분리하는 방법이 확립되어있지 않고, 항원을 검출하는 방법은 어렵기 때문에 바이러스 핵산을 검출하는 방법에 의존하고 있다 [1, 13]. 바이러스 핵산을 검출하는 방법으로는 특히 염기서열을 선택적으로 증폭하여 검출할 수 있는 중합효소연쇄반응 (polymerase chain reaction, PCR)이 주로 이용되고 있다. 그러나, 현재까지도 많은 진단 실험실에서 특징적인 병변을 기초로 한 병리조직진단법이 유용하게 이용되고 있으며, 최근에는 혈중 OvHV-2 항체를 특이적으로 검출할 수 있는 competitive enzyme-linked immunosorbent assay (cELISA)가 개발되어 MCF의 혈청학적 진단법으로 사용되고 있다 [10].

본 연구는 MCF의 진단법으로 이용되고 있는 병리조직학적 진단과 혈청학적 진단 및 PCR 진단법들의 상관성을 알아보려고 수행되었다.

## 재료 및 방법

### 공시동물

MCF의 발병으로 계속적인 폐사가 발생하는 bison (*Bison bison*) 농장으로부터 MCF로 의심되는 임상증상을 가진 10두의 bison을 부검하여 재료를 채취하고, 본 연구를 수행하였다. 공시동물들에서 관찰된 임상증상은 체중감소, 고열, 식욕상실, 구강 및 비강 분비물, 결막 및 각막의 염증, 설사 등이었다.

### 병리조직학적 검사

공시동물들로부터 간장, 폐, 비장, 부신, 장간막 림프

절, 신장, 식도, 위, 소장, 대장, 방광, 소뇌, 대뇌, 정소 및 병변부 피부 등을 포함하는 전신장기의 일부를 채취하여, 10% 중성 포르말린에 고정 후, 병리조직학적 검사를 위한 통상적인 방법을 사용하여 파라핀포매한 후, 4  $\mu$ m 두께로 절편하여 H&E 염색 후 병리조직학적인 검사를 수행하였다. MCF의 병리조직학적 진단은 기존에 확립된 기준 [14]을 이용하여, 각 조직 소견의 병변에 대한 평가를 수행하고, 최종 MCF 여부를 판단하였다. 검사에 사용된 기준은 관찰된 조직에 혈관의 염증 (vasculitis), 혈관주위 림프구침윤 (perivascular lymphoid infiltration), 소화기계와 비뇨기계의 궤양 (ulcer) 병변, 섬유소성 림프절염 (fibrinoid lymphadenitis), 뇌조직의 혈관주위 세포침윤 (perivascular cuffing) 등의 특징적인 병변의 존재 여부를 관찰한 후, 이들의 정도를 3단계(+, ++, +++)로 나누어 기록하고 종합하여 MCF의 진단을 하였다.

### 혈청학적 검사

공시동물들로부터 부검 전에 혈액 7 cc를 EDTA가 첨가된 tube에 채혈하여, Histopaque (Sigma, St. Louis, Mo)을 사용하여 혈청 및 peripheral blood leukocyte (PBL)를 분리하였다. 분리된 혈청을 사용하여, MCF virus에 대한 항체검사를 실시하였다. 항체검사는 Malignant Catarrhal Fever Virus Antibody Test Kit (VMRD, Pullman, WA)를 이용하여, cELISA를 수행하였다.

### Polymerase Chain Reaction

공시동물들의 PBL로부터 PCR 검사를 위한 DNA를 추출하였다. 1 ml의 PBS에 PBL을 부유시킨 후, 부유액에 0.2% SDS와 20 mg/ml proteinase K (Roche, Indianapolis, IN)를 첨가 후 37°C에서 3시간 반응시키고, phenol/chlorform을 사용하여 단백질을 제거한 후 ethanol 침전 과정을 거쳐, DNA를 추출하였다. 추출된 DNA는 100  $\mu$ l의 DEPC 처리된 증류수로 재부유하고, OD<sub>260</sub>에서 정량 후 PCR 검사에 사용하였다. PCR을 이용한 특이 핵산의 증폭은 OvHV-2의 바이러스 핵산 염기서열에 특이적인 primer 755(5'-AAGATAAGCACCAGTTATGCATCTGATAAA-3', Nucleotide position: 121312-121340)와 primer 556 (5'-AGTCTGGGTATATGAATCCAGATGGCTCTC-3', Nucleotide position: 121692-121722)을 사용하여, 1차 증폭을 실시한 후, primer 556과 primer 555 (5'-TTCTGGGGTAGTGGCGAGCGAAGGCTTC-3' (Nucleotide position: 121484-121510)를 사용하여 nest PCR을 수행하였다 [11]. Primer의 nucleotide position은 AIHV-1의 DNA polymerase 염기서열에 기초하였다 [7]. 1차 PCR을 위한 반응조성

물은 1 ug의 template DNA, 10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 400 $\mu$ M의 dATP, dCTP, dGTP, dTTP (Roche), 20 pmol primer 755 및 556, 5 U Taq DNA polymerase (Roche)가 100  $\mu$ l의 반응용량에 각각 포함되도록 하였다. Thermal cycler 9700 (Perkin-Elmer, Foster, CA)을 이용하여 94 $^{\circ}$ C 5분의 denaturation 과정 후, 94 $^{\circ}$ C 30초, 60 $^{\circ}$ C 1min, 72 $^{\circ}$ C 1분의 cycle을 40회 실시한 후 72 $^{\circ}$ C 7분의 최종 extension 단계를 거쳐 OvHV-2에 특이 핵산을 증폭하였다. 1차 PCR 반응물 10  $\mu$ l를 template DNA로 사용하여, primer 556과 555를 사용한 nest PCR을 수행하였다. 반응에 사용된 조성물과 Thermal cycler의 조건은 1차 PCR과 동일하였다. PCR을 수행한 후 ethidium bromide를 함유한 2% agarose gel에서 전기영동을 한 후 UV에서 238 bp 크기의 핵산증폭물의 유무를 확인하였다.

## 결 과

### 병리조직학적 진단

병리조직학적 검사를 실시한 결과 특징적인 병변이 관찰되어, MCF로 진단된 개체는 6두였다 (Table 1). 관찰된 소견들은 개체에 따라 정도의 차이는 있으나, 관찰된 조직에 혈관의 염증, 혈관주위 림프구 침윤, 소화기계와 비뇨기계의 궤양 병변, 섬유소성 림프절염, 뇌조직의 혈관주위 림프구침윤 등이 특징적인 병변이었다. 식도 및 위, 소장과 대장 등의 소화기계 장기와 방광 등의 비뇨기계 장기들의 조직에서는 점막층의 괴사, 림프구 세포들의 침윤 및 혈관염과 고유점막층에 섬유소양 변성 (fibrinoid degeneration) 등이 관찰되었다. 장간막 림프절에서는 림프구의 감소와 섬유소양 변성 소견들이 관찰되었고, 대뇌와 소뇌에서는 혈관주위 림프구침윤 소견이 특징적으로 관찰되었다 (Fig. 1). 부신에서 혈관

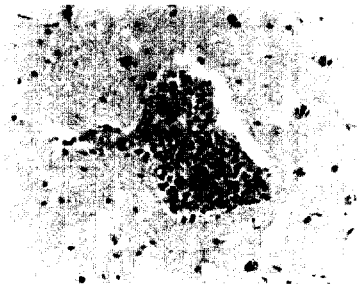


Fig. 1. Histopathological findings of cerebrum. There was a lymphocytic perivascular cuffing lesion. H&E stain,  $\times 400$ .

주위 림프구 침윤 소견이 관찰되었으며, 일부 동맥들의 벽은 섬유소성 변성이 관찰되었다 (Fig. 2). 신장은 다수

의 대식구와 림프구의 침윤으로 결절모양의 육아종성 병변이 여러 곳에서 관찰되었으며, 피질과 수질의 경계부의 동맥들에서는 동맥벽의 섬유소성 변성과 림프구 세포들의 침윤 등의 소견이 관찰되었다 (Fig. 3). 정소의 간질 부위에도 많은 림프구의 침윤 소견이 관찰되었다 (Fig. 4). 폐는 세기관지주위 림프구양 증식 (peribronchiolar lymphoid hyperplasia)과 혈관주위 림프구 침윤 소견이 특징적인 병변이었다. 4두의 개체는 병리조직학적으로 MCF의 특징적인 병변들을 관찰할 수 없었다. 병리조직학적 진단 결과가 양성인 6두의 개체가 혈청학적 진단의 양성과 일치하는 경우는 93%이었으며, PCR진단 양성과 일치하는 경우는 100%이었다.

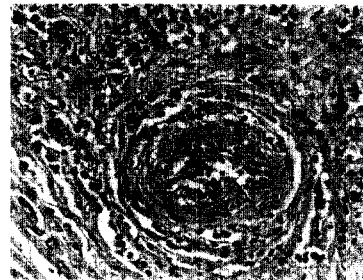


Fig. 2. Histopathological findings of adrenal gland. There was a fibrinoid vascular degeneration and arteritis. H&E stain,  $\times 400$ .

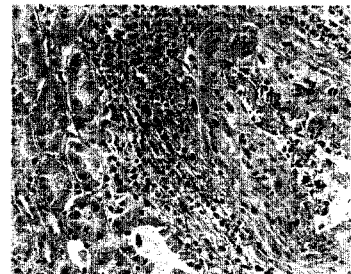


Fig. 3. Histopathological findings of kidney. There was arteritis and infiltration of lymphoid cells. H&E stain,  $\times 400$ .

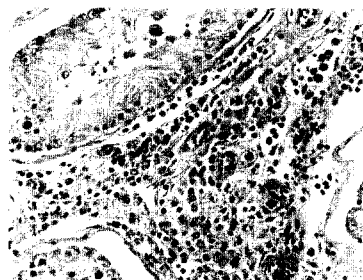


Fig. 4. Histopathological findings of testicle. There was massive infiltration of lymphoid cells. H&E stain,  $\times 400$ .

혈청학적 진단 및 PCR 진단 결과

공시동물들의 혈청을 사용하여 MCF virus에 대한 항체검사를 실시한 결과, 9두의 개체에서 양성 결과를 얻을 수 있었다 (Table 1). 반면, 공시동물의 혈액으로부터 분리한 PBL을 사용하여 PCR 검사를 실시한 결과, 10두의 개체 모두에서 MCF의 원인체인 OvHV-2에 특이적인 염기서열의 핵산가닥을 확인할 수 있었다 (Fig. 5). 혈청학적 진단으로 양성인 9두의 개체가 병리조직학적 진단의 양성 결과와 일치하는 경우는 56%이었으며, PCR진단 양성과 일치하는 경우는 100%이었다.

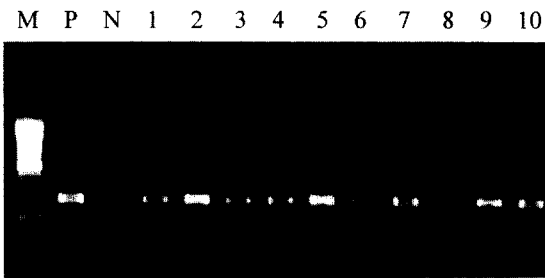


Fig. 5. Detection of OvHV-2 DNAs from peripheral blood leukocytes by PCR. M: 100bp molecular marker, P: positive control, N: negative control, 1: Animal #101 PBL-extracted DNA, 2: Animal #102 PBL-extracted DNA, 3: Animal #103 PBL-extracted DNA, 4: Animal #104 PBL-extracted DNA, 5: Animal #105 PBL-extracted DNA, 6: Animal #106 PBL-extracted DNA, 7: Animal #107 PBL-extracted DNA, 8: Animal #108 PBL-extracted DNA, 9: Animal #109 PBL-extracted DNA, 10: Animal #110 PBL-extracted DNA.

고 찰

MCF는 반추류에서 급성의 치명적인 질병으로, 전 세계적으로 발생이 보고되고있으며, 원인 병원체 OvHV-2는 herpesvirus로서 평생감염을 유발하기 때문에, 외관상

건강하게 보이는 동물들이 바이러스의 재활성기에 다른 동물들에 전파시키기 때문에 MCF의 정확한 진단을 통한 감염동물의 발견은 질병 통제를 위해 가장 중요하다 [6]. MCF의 진단은 병리조직학적 진단과 혈청학적 진단 및 원인 병원체 OvHV-2 바이러스의 특이핵산을 확인하는 PCR 진단이 주로 이용되고 있다 [6, 11]. 본 연구의 결과, 병리조직학적 진단과 혈청학적 진단은 감염개체의 검출에 한계가 있음을 보여주었다. 혈중 항체가 양성인 개체에서 병리조직학적 진단으로는 음성인 개체들이 확인되었는데, PCR 진단의 결과를 통하여 이들 불일치 개체들은 MCF의 원인 병원체 OvHV-2에 감염되어 있음이 확인되었다. 이러한 원인은 OvHV-2에 감염되어 급성의 경과를 취하여 혈중 항체가는 증가하였으나, 장기에서 병변의 형성이 진행 중인 것으로 추정해볼 수 있다. PCR 진단 결과, 모든 공시동물들은 PBL에서 MCF의 원인 병원체 OvHV-2에 특이적인 염기서열이 확인되었으므로 감염되어있음을 말해주고 있다. OvHV-2는 gamma herpesvirus로서 림프구에 감염되어 잠복상태로 유지되다가, 면역저하상태와 같은 요인에 의해서 바이러스가 증식하여 갑작스러운 병증이 발현되는 것으로 알려져 있다. 따라서, 바이러스의 증식이 일어나는 질병의 진행 상태를 제외하고, 조직내 바이러스의 양이 미소량이면 검출이 어렵기 때문에, 민감도가 높은 PCR 방법에 의존하고 있는 실정이다 [6, 11]. 일반적으로 바이러스 감염에 의한 질병의 진단법으로 ELISA 등의 항체검사가 대량의 검체를 동시에 검사할 수 있는 장점 때문에 널리 이용되고 있다. 최근에 MCF의 진단을 위하여 cELISA가 개발되어 혈중 항체 보유율의 검사 및 대규모의 감염의 파악에 효과적으로 사용되고 있다 [6, 11]. 그러나, 본 연구는 항체검사만으로는 MCF 병원체에 감염된 개체의 진단에 한계가 있음을 보여주고 있다. 항체검사로 검출되지 않은 개체는 병리조직학적으로 MCF의 특징적인 병변들을 가지고 있었고, MCF의 병원체 OvHV-2의 증식으로 인한 병변의 유발

Table 1. Results of histopathology, serology and PCR for diagnosis of malignant catarrhal fever

Assay	Animal No.									
	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110
Histopathology <sup>a</sup>	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+
Serology <sup>b</sup>	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
PCR <sup>c</sup>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

<sup>a</sup> After observation of histopathological findings, it was diagnosed following criteria as described [14].

<sup>b</sup> It was conducted using MCF c-ELISA as described [10].

<sup>c</sup> It was performed with PBL-extracted DNAs using OvHV-2 specific primers as described [11].

후, 형성된 항체들이 시간의 경과에 따라 혈중에서 점차하게 이하로 소멸되었을 것으로 추정할 수 있다. 다른 바이러스의 항체검사에 의한 진단의 경우에도 감염 후기의 혈중 항체 소실에 의한 음성의 결과가 문제가 되고 있으며, 백신접종에 의해 형성된 항체가 자연 감염되어 생긴 항체와의 구별이 어렵기 때문에 제한점이 되고 있다 [9, 17, 18]. 최근에 분자생물학의 발달에 따라 바이러스의 핵산 검출에 기초한 PCR과 같은 진단법들이 높은 민감도와 정확성 때문에 널리 이용되고 있으며, 세포배양에 의한 바이러스의 분리나 항체검사와 같은 진단법들을 대체하여 사용이 점점 증가되고 있는 실정이다 [4, 18]. PCR은 미소량의 바이러스가 존재하더라도 검출할 수 있는 높은 민감도를 가진 방법이지만, 증폭단계에서 미소량의 오염에 의한 위양성 (false positive) 이나 비특이반응 (non-specific reaction)에 의한 위양성이 발생할 확률이 높기 때문에 결과의 해석에 어려움을 갖게 된다 [18]. 샘플 조직으로부터 DNA를 추출하는 과정 중의 실수 또는 추출된 DNA에 포함된 PCR inhibitor들에 의한 PCR 진단법의 위음성 (false negative) 결과도 종종 보고되고 있다 [2, 8, 19]. 이러한 제한점들은 PCR 진단법이 높은 민감도를 가지고 있다는 장점에도 불구하고 주요 진단법으로 이용하는 것을 어렵게 하는 요인이 된다. 본 연구에서는 PCR 진단법이 MCF의 진단법으로서 다른 진단법들과 비교하여 가장 높은 민감도를 보여주었다. 그러나, 진단은 PCR과 같은 분자생물학적 진단법의 사용과 함께 병리조직학적인 진단과 혈청학적인 진단법을 병용하여 수행하여 최종적인 진단이 이루어져야 할 것으로 판단이 된다. 병리조직학적 진단은 검체를 포르말린과 같은 고정제를 사용하여 장기간 보관이 용이하고, 처리과정이 용이하다는 장점을 가지고 있고, 혈청학적인 진단법은 ELISA와 같은 방법을 이용하여 동시에 대량의 검체를 분석할 수 있고, 정량적인 변화를 모니터링할 수 있다는 장점을 가지고 있다. 그러나, 본 연구에서 알 수 있듯이, 이들 진단법 만으로는 급성기 (acute phase) 감염이나, 만성기 (chronic phase)의 감염을 진단하는데 제한점을 보여준다. 따라서, PCR과 같은 분자생물학적인 진단법의 사용이 늘어나야 될 것으로 판단이 된다.

## 결 론

반추류에 급성의 치명적인 결과를 초래하는 MCF의 진단법으로 병리조직학적 진단, 혈청학적 진단 및 PCR에 의한 진단법을 10두의 bison 검체를 사용하여 수행하여 결과를 비교하였다. 병리조직학적 진단으로는 6두,

혈청학적 진단법으로 9두, PCR 진단법으로 10두의 개체가 양성으로 확인되었다. 병리조직학적 검사는 검체의 장기보관과 진단의 수행이 용이하다는 장점을 가지고 있고, 혈청학적 검사는 대량 검체의 동시 분석과 정량적 모니터링이 가능하다는 장점을 가지고 있어, 진단 실험실에서 널리 이용되고 있다. 그러나, 본 연구의 결과는 이들 진단법만으로는 급성기 (acute phase) 감염이나, 만성기 (chronic phase)의 감염을 진단하거나 잠복감염과 같은 미소량의 병원체의 존재를 검출하는데 제한점을 보여준다. 따라서 진단 실험실에서 기존의 병리조직학적 진단법과 혈청학적 진단법과 병행하여, PCR과 같은 분자생물학적인 진단법들의 사용이 늘어나야 될 것으로 판단이 된다.

## 참고문헌

1. Baxter, S. I. F., Pow, I. and Bridgen, A. PCR detection of the sheep-associated agent of malignant catarrhal fever. *Arch. Virol.* 1993, **132**, 145-159.
2. Bezold, G., Volkenandt, M. and Gottlober, P. Detection of herpes simplex virus and varicella-zoster virus in clinical swabs: frequent inhibition of PCR as determined by internal controls. *Mol. Diagn.* 2000, **5**, 279-284.
3. Bridgen, A. and Reid, H. W. Derivation of DNA clone corresponding to the viral agent of sheep-associated malignant catarrhal fever. *Res. Vet. Sci.* 1991, **50**, 38-44.
4. Carman, B. Molecular techniques should now replace cell culture in diagnostic virology laboratories. *Rev. Med. Virol.* 2001, **11**, 347-349.
5. Collyer, P. and Foley, A. An outbreak of malignant catarrhal fever in cattle in the Republic of Ireland. *Vet. Rec.* 1996, **139**, 16-17.
6. Crawford, T. B. and O'Toole, D. Malignant catarrhal fever. *In Current Veterinary Therapy IV: Food Animal Practice.* Howard, J. L. (eds). pp. 306-309. W. B. Saunders, Philadelphia, 1999.
7. Ensser, A. and Pflanz, R. Fleckenstein. Primary structure of the alcelaphine herpesvirus 1 genome. *J. Virol.* 1997, **71**, 6517-6525.
8. Fredriks, D. N. and Relman, D. A. Improved amplification of microbial DNA from blood cultures by removal of the PCR inhibitor sodium polyanethanesulfonate. *J. Clin. Microbiol.* 1998, **36**, 2810-2816.
9. Lager, K. M., Mengeling, W. L. and Brockmeier, S.

- L. Duration of homologous porcine reproductive and respiratory syndrome virus immunity in pregnant swine. *Vet. Microbiol.* 1997, **58**, 127-133.
10. **Li, H., McGuire, T. C. and Muller-Doblies, U. U.** A simpler, more sensitive competitive inhibition enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibody to malignant catarrhal fever viruses. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2001, **13**, 361-364.
  11. **Li, H., Shen, D. T. and O'Tool, D.** Investigation of sheep-associated malignant catarrhal fever virus infection in ruminants by PCR and competitive inhibition enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Clin. Microbiol.* 1995, **33**, 2048-2053.
  12. **Loken, T., Aleksandersen, M. and Reid, H.** Malignant catarrhal fever caused by ovine herpesvirus 2 in pigs in Norway. *Vet. Rec.* 1998, **143**, 464-467.
  13. **Muller-Doblies, U. U., Li, H. and Hauser, B.** Field validation of laboratory tests for clinical diagnosis of sheep-associated malignant catarrhal fever. *J. Clin. Microb.* 1998, **36**, 2970-2972.
  14. **O'Toole, D., Li, H. and Sourk, C.** Malignant catarrhal fever in a bison (*Bison bison*) feedlot, 1993-2000. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2002, **14**, 183-193.
  15. **Plowright, W.** Malignant catarrhal fever virus. *In* Virus Infections of Ruminants, Dinter, Z and Morein, B. (eds). pp. 123-150. Elsevier, New York, 1990.
  16. **Reid, H. W., Buxton, D. and McKelvey, W. A.** Malignant catarrhal fever in Père-Davids deer. *Vet. Rec.* 1987, **121**, 276-277.
  17. **Reischl, U.** Application of molecular biology-based methods to the diagnosis of infectious diseases. *Front. Biosci.* 1996, **1**, 72-77.
  18. **Taylor, G. R. and Logan, W. P.** The Polymerase chain reaction: new variation and an old theme. *Current Opinion in Biotechnology.* 1995, **6**, 24-29.
  19. **Wiedbrauk, D. L., Werner, J. C. and Drevon, A. M.** Inhibition of PCR by aqueous and vitreous fluids. *J. Clin. Microbiol.* 1995, **33**, 2643-2646.