*Sporothrix schenckii*와 관련주에 대한 Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) 분석

전남대학교 의과대학 피부과학교실

이지범 · 김 민 · 이승철 · 원영호 · 김영표

=Abstract=

Analysis of Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) for *Sporothrix schenckii* and Related Fungi

Jee-Bum Lee, Min Kim, Seung-Chul Lee, Young Ho Won and Young Pio Kim

Department of Dermatology, Chonnam National University Medical School, Kwangju, Korea

Background: Sporotrichosis is a common deep cutaneous fungal disease caused by *Sporothrix* (*S.*) *schenckii*. The recent development of polymerase chain reaction (PCR) technology, in particular, arbitrarily primed PCR (AP-PCR) or random amplified polymorphic DNA (RAPD), has greatly enhanced the molecular detection and identification of various pathogenic agents, including fungi.

Objective: This study was aimed to differentiate *Sporothrix schenckii*, and related fungi such as *S. schenckii* var. *luriei, S. flocculosa, S. nivea, Ophiostoma stenoceras*, and clinical isolates on the basis of distinct DNA band patterns in the RAPD.

Methods: *S. schenckii, S. schenckii* var. *luriei, S. flocculosa, S. nivea, Ophiostoma stenoceras* from ATCC and KCCM, and clinical 10 isolates from Chonnam University Hospital were used for RAPD analysis. For RAPD, 3 random primers were used. Genomic DNA was extracted by Liu method. Amplification reactions were performed in volumes of 50 μL containing 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 1.5 mM $MgCl_2$, 0.1% Triton X-100, 200 μM dNTP mixture, 40 pM primer, 1 U of Taq polymerase, DNA 20 ng.

Results: 3 decamers (5'-TGCCGAGCTG-3', 5'-AGTCAGCCAC-3', 5'-AATCGGGCTG-3') are generated in the RAPD, distinct DNA products from *S. schenckii* forming characteristic band patterns upon gel electrophoresis. Each random primer amplified characteristic same band patterns in DNA from clinical 8 isolates among 10 isolates, 2 isolates have different DNA band patterns. These results suggest of being a *Sporothrix* anamorph different from *S. schenckii* in Korea.

Conclusion: With 2 random primers (5'-TGCCGAGCTG-3', 5'-AGTCAGCCAC-3') *S. schenckii* and related fungi investigated produced distinct DNA band patterns on gel electrophoresis. The RAPD was a very valuable laboratory method for identification of *S. schenckii* isolates.

[Kor J Med Mycol 5(3): 113-119]

Key Words: RAPD, *Sporothrix schenckii*

†별책 요청 저자: 이지범, 501-757 광주광역시 동구 학 1동 8번지 전남대학교 의과대학 피부과학교실
TEL: (062) 220-6684, FAX: (062) 222-4058

서 론

스포로트리쿰증은 *Sporothrix* (*S.*) *schenckii* 원인균에 의해 발생하는 진균증으로 한국에서 관찰되는 가장 흔한 심재성 피부 진균증이다[1]. *S. schenckii*는 성장이 느리고 이상성 (dimorphic) 진균으로 여러 임상 형태 및 분자생물학적 연구에 의해 여러 변종과 아형이 존재한다고 알려져 왔다[2]. 1970년 Taylor[3]는 *S. schenckii*를 배양, 형태, 혈청, 그리고 구강 독성 등의 측면에서 *Ceratocystis C.* 균종들과 비교할 때 서로 차이가 크지 않으므로 이들이 매우 밀접한 균종이라고 주장하였다. 그러나 1988년 Suzuki 등[4]은 mitochondrial DNA에 대한 제한효소 *Hae*III를 사용한 분자생물학적 기법 중 하나인 restriction fragment length polymorphisms (RFLPs)법을 이용하여 *S. schenckii*를 변종인 *S. schenckii* var. *luriei, S. curviconia, S. inflata, Ceratocystis* (*C.*) *stenoceras*, 그리고 *C. minore* 등과 함께 분석한 결과, 서로 다른 균종임을 증명하였고, 또한 *S. schenckii*에는 11개 아형, *C. stenoceras*에는 4개의 아형이 존재함을 증명하였다.

진균의 분류, 특징 규명 및 역학 조사의 방법으로 최근에는 분자생물학적 기법이 많이 이용되고 있다. 이중 arbitrarily primed polymerase chain reaction (AP-PCR) 또는 random amplified polymorphic DNA (RAPD) 분석법[5,6]은 피부 사상균, 심재성 진균 등의 여러 가지 병원체를 분류하고 신속하게 동정하는데 많이 이용되고 있다[7~11]. RAPD 분석법[5,6]은 target gene sequence에 대해 알고 있어야 되는 기존의 PCR 방법에 비해 사전에 염기 서열에 대한 정보가 필요 없으며, cloning, southern blotting, hybridization, 그리고 제한효소 처리 등의 과정이 생략되어 빠르고 경제적인 방법으로 알려져 있다.

따라서 본 연구에서는 이제까지 RAPD 분석법으로 시도한 바 없는 *S. schenckii, S. schenckii* var. *luriei, S. flocculosa, S. nivea*, 그리고 *Ophiostoma* (*O.*) *stenoceras* 등의 균주들을 대상으로 DNA 양상을 관찰하여 균주간 감별이 가능한지를 알아보고자 하였다. 또한 국내에서 발생한 스포로트리쿰증 양상을 보이는 환자들로부터 분리한 임상 분리주들을 대상으로 DNA 양상을 비교하여 이들 균주를 동정하고 균주간의 차이나 아형을 관찰할 수 있는지 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

1. 재 료

1) 공시 균주

본 실험에 사용된 균주들은 국내외 균주 공시기관인 American Type Culture Collection (ATCC), Korean Culture Center of Microorganism (KCCM)로부터 구입하였다. 사용된 균주로는 *S. schenckii* 2주 (KCCM 60136, ATCC 6243), 그리고 *S. schenckii* var. *luriei* (ATCC 18616), *S. flocculosa* tr. (ATCC 74320), *S. nivea* kreisei (ATCC 76232), *Ophiostoma stenoceras* (ATCC 22063) 등 각각 1주씩 총 6주였다.

2) 임상 분리주

임상 분리주는 전남대학교 병원 피부과에 내원하여 임상 소견상 스포로트리쿰증 양상을 보여 배양, 병리조직학적 검사를 실시하고 항진균제로 치료를 하였던 10명의 환자들의 가검물에서 분리한 균주로 총 10주였다.

3) Primer

본 실험에서 사용한 primer는 10-mer인 Operon primer kit A (Operon Technologies, U.S.A.) 20개를 사용하였다.

2. 방 법

1) Fungal DNA 추출

평판 배지에 배양한 균주의 genomic DNA는 Liu 등[8]의 방법에 따라 추출하였다. Sabouraud dextrose agar (SDA)에 접종하여 25℃에서 2주간 배양된 집락을 SET buffer [75 mM NaCl, 25 mM Ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA), 20 mM Tris-HCl, pH 8.0] 4 ml로 처리하여 40 ml 원심 tube에 수집하고 와류 (vortex)하여 분쇄한 후, lysozyme (2.5 mg/ml) 1 ml을 넣어 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. 이에 RNase (10 mg/ml) 25 μl를 첨가하여 37℃에서 30분 배양시킨 후 10% SDA 500 μl와 proteinase K (10 mg/ml) 50 μl를 처리하여 37℃에서 1시간 배양시킨 다음 6 M NaCl 2 ml과 chloroform 7.5 ml을 넣어 잘 혼합하여 10,000 r.p.m.에서 20분 동안 원심 분리하였다. 원심 분리한 상청액은 새 원심 tube에 옮긴 후 상청액과 동량의 차가운 isopropanol을 넣어 DNA를 침전시키고 70% ethanol로 세척한 후 TE (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA pH 8.0) buffer에 녹여

Table 1. Clinical isolates from 10 patients with sporotrichosis from the 1992 to 1997

No.	Age / Sex	Anatomical site	Clinical classification	Month / Year
1.	56 / F	Lt. forearm	Fixed	4 / 92
2.	17 / F	Lt. leg	Lymphatic	11 / 92
3.	49 / M	Nose	Lymphatic	12 / 92
4.	44 / F	Lt. Cheek	Fixed	3 / 93
5.	35 / F	Rt. arm	Fixed	5 / 93
6.	50 / F	Rt. hand	Fixed	7 / 93
7.	74 / F	Face, arms	Disseminated	7 / 95
8.	45 / M	Rt. dorsal hand	Fixed	3 / 96
9.	53 / F	Rt. hand, arm	Lymphatic	3 / 97
10.	20 / F	Rt. forearm	Lymphatic	5 / 97

분광 광도계상의 260 nm에서 농도를 측정하였다.

2) Primer 선정

공시 균주에 대한 primer 선정은 random primers 20개를 구입하여 PCR 반응 결과를 비교하여 최적의 3개의 primers [OPA-02 (5'-TGCCGAGCTG-3'), OPA-03 (5'-AGTCAGCCAC-3'), OPA-04 (5'-AATCGGGCTG-3')]를 선정하였다.

3) PCR 반응 조건

10 mM Tris-HCl (pH 9.0), 50 mM KCl, 10 mM NaCl, 1.5 mM $MgCl_2$, 0.1% Triton X-100, 200 μM dNTPs (dATP, dCTP, dGTP and dTTP), 40 pmol primer, 1 U of Taq DNA polymerase (Perkin Elmer, U.S.A.)으로 반응 혼합물이 50 μl가 되도록 하였다. PCR은 thermal cycler (Ericomp, San Diego, CA, U.S.A.)를 사용하였으며, 먼저 DNA denaturation은 94℃에서 2분, annealing은 34℃에서 2분, extention은 72℃에서 4분으로 2회 반복하고, 그 후 denaturation (94℃에서 1분), annealing (34℃에서 1분), extention (72℃에서 2분)의 반응 횟수를 35회 실시한 후 마지막에 extention (72℃에서 10분)을 하였다. 증폭된 DNA는 ethidium bromide가 들어있는 1× TBE buffer에 녹인 1.5% agarose gel에서 90 volt로 90분간 전기영동을 시킨 후 자외선 발광기로 관찰하였다.

결 과

1. 공시 균주에 대한 RAPD 분석

OPA-02 primer를 가지고 *S. schenckii* 2주, 그리고 *S. schenckii* var. *luriei, S. flocculosa, S. nivea, O. stenoceras* 등 각각 1주씩 총 6주를 대상으로 RAPD 분석을 시행한 결과, 이들 균주간에 서로 다른 크기의 DNA 밴드를 보여주었다 (Fig. 1A). OPA-02 primer는 *Sporothrix* 균종들과 *O. stenoceras* 사이에 다양한 RAPD 밴드를 보여줌으로써 균종간의 감별이 가능하였다. 또한 OPA-03 primer는 상기의 표준 균주들을 대상으로 RAPD 분석을 시행한 결과 OPA-02 보다 다양한 DNA 다형성 밴드가 관찰되어 상기 균종간의 감별이 용이하였다 (Fig. 1B).

2. 환자의 임상적 특징

10명의 환자들의 연령은 17세에서부터 74세였으며, 임상 형태는 피부 고정형이 5예, 림프형 4예, 그리고 파종상 1예였다. 임상주들은 1992년부터 1997년까지 6년에 걸쳐서 이들 환자들의 임상 가검물에서 분리되었다. 분리된 시기는 계절에 관계없이 분리되었다 (Table 1).

3. 임상 분리주에 대한 RAPD 분석

임상 분리주 총 10주와 대조 균주로 ATCC 6243을 대상으로 선정된 3개의 decamers을 가지고 RAPD 분석을 시행하였다. OPA-02 primer를 가지고 RAPD 분석한 결과에서 총 10주 중 8주는 대조 균주와 동일한 DNA 밴드들이 관찰되었으며, 그들의 크기는 1.9, 1.6, 0.8, 0.5 kbp였다. 그러나 No. 1과 No. 2 환자에서 분리한 2주는 1.9, 0.65 kbp 크기의 두 개의 DNA 밴드만이 관찰되었으며, 1.9 kbp 크기의 밴드 하나는 대조 균주와 동일하였다

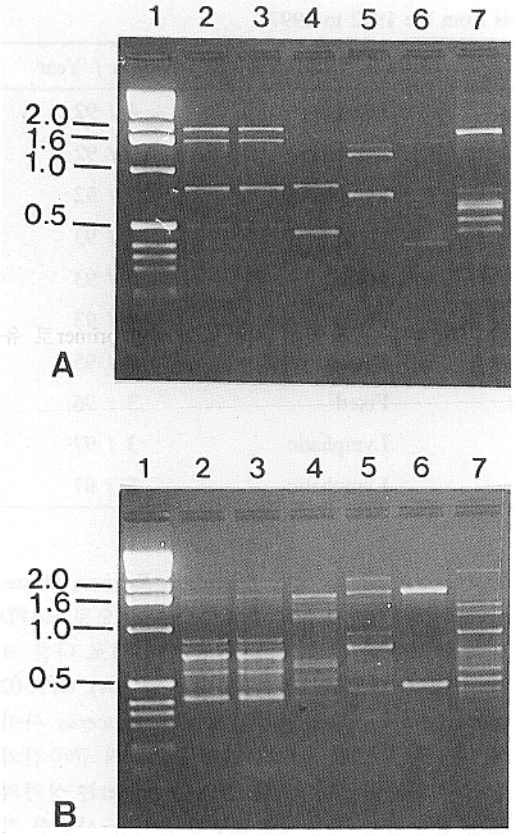

Fig. 1. RAPD patterns of genomic DNA of *S. schenckii* and related fungi using primer OPA-02 (**A**); primer OPA-03 (**B**). lane 1, size marker; lane 2, *S. schenckii* (ATCC 6243); lane 3, *S. schenckii* (KCCM 60136); lane 4, *S. Schenckii* var. *luriei*; lane 5, *S. nivea*; lane 6, *S. flocculosa*; lane 7, *O. stenoceras*.

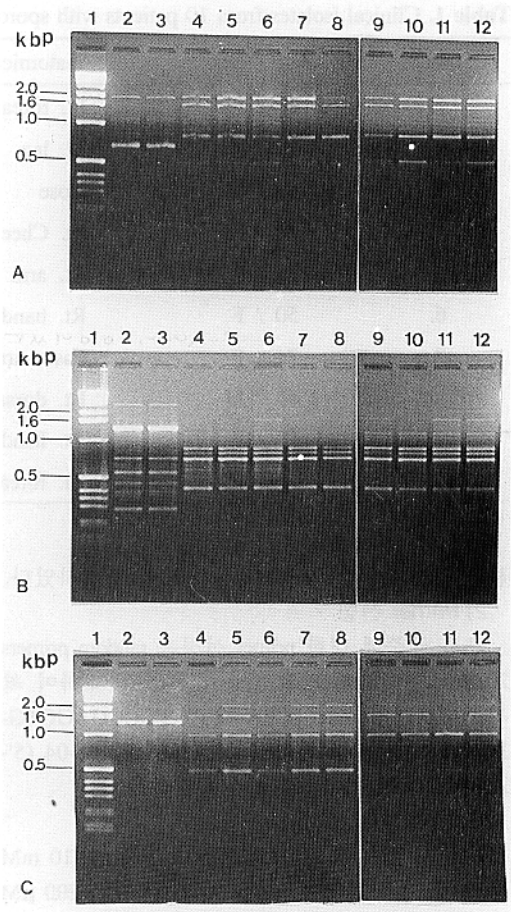

Fig. 2. RAPD patterns of genomic DNA from sporotrichosis isolates using primer OPA-02 (**A**); with primer OPA-03 (**B**); with primer OPA-04 (**C**). lane 1, size marker; lanes 2 through 11, clinical isolates; lane 12. *S. schenckii* (ATCC 6243).

(Fig. 2A). OPA-03 primer를 가지고 RAPD 분석한 결과는 10주 중 8주에서는 대조 균주와 동일한 5개 이상의 DNA 밴드가 관찰되었으나, No. 1과 No. 2 환자에서 분리된 2주는 대조 균주와 일치하지 않는 여러 크기의 다양한 DNA 밴드를 보여주었다 (Fig. 2B). OPA-04 primer를 이용하여 RAPD를 시행한 결과에서도 OPA-02와 OPA-03 primers의 결과와 같이 No. 1과 No. 2 환자에서 분리된 2주는 대조 균주와 8개의 임상 분리주와는 전혀 일치하지 않는 하나의 DNA 밴드만이 관찰되었다 (Fig. 2C). 한편 임상 분리주 8주와는 다른 RAPD 밴드 양상을 보여준 임상 분리주 2주들은 상기의 *Sporothrix* 다른 균종들 및 *O. stenoceras*와 비교하였을 때도 동일한 DNA 밴드 양상을 찾을 수가 없었다 (데이타는 제시하지 않음).

고 찰

스포로트리쿰증은 1898년 Schenck[12]가 처음으로 보고한 이후 아열대 및 우리나라를 포함한 온대 기후 지역에 널리 분포하는 흔한 심재성 진균증이다[1,2]. 원인균인 *S. schenckii*는 온도에 따라 형태학적 변화를 보이는 이상성 진균이고, 여러 변종과 아형이 존재한다고 알려져 있다[4,13~15]. Suzuki 등[4]은 RFLPs법을 이용하여 *S. schenckii*와 *C. stenoceras*의 mitochondrial (mt) DNA를 분석한 결과, mt DNA 분해 산물에 이질성이 관찰되어 이를 근거로 *S. schenckii*는 11개 아형, *C. stenoceras*는 4개

의 아형으로 분류하였고, 또한 *Sporothrix* 관련주들을 다른 균종으로 분류하였다. Cooper 등[16]은 미국의 4개 주에 걸쳐 수집한 임상 분리주 8주의 whole-cell DNA을 대상으로 *Hae*III 이용한 RFLPs법을 분석한 결과, 임상 분리주 8주 모두에서 동일한 DNA 다형성이 관찰되었으며, 이는 Dixon 등[14]이 분리한 Group I의 DNA와 동일하였다고 보고하였다. De Hoog[20]은 *Ceratocystis* 복합체 중에서 세포벽에 rhamnose를 가지고 cycloheximide에 저항하는 균종을 *Ophiostoma* (*O.*)라 명명하였는데, *O. stenoceras*은 *S. schenckii*와 형태 및 현미경학적으로 쉽게 감별되지 않는 균종이다. 따라서 Dixon 등[14]은 *S. schenckii*의 변종으로 간주하고 감별이 요구되는 균종으로 분류하였으며, Berbee 등[21]은 1,700 nucleotides sequences 중 3곳에서만 두 균종간 차이가 있어 이제까지 DNA 구조가 서로 가장 가까운 균종으로 보고하였다.

최근 병원균을 분류하고 감별하는데 분자생물학적 기법이 많이 이용되고 있는 실정이다. 이중 비교적 초기에 이용된 RFLPs은 밴드수가 너무 많고 각 밴드 사이의 해상도가 낮아 결과의 비교 분석이 어렵다는 단점이 있다. 이를 극복하기 위하여 pulse field gel electrophoresis (PFGE) 및 ribotyping 등을 이용하는데, 이들 역시 시간과 비용이 많이 소용되는 단점을 가지고 있다[17]. 1990년 Williams 등[6]에 의해 소개된 RAPD 분석법은 특이한 nucleotide sequence 정보가 없이도 임의의 primer (대개 10-mer)를 가지고 genomic DNA의 변이를 알아내는 방법으로 더욱 신속하고 비교적 쉽게 genotyping을 할 수 있는 방법이다. 이 방법으로 이제까지 dermatophytes[7], *Acremonium*[9], *Cryptococcus neoformans*[11], *Histoplasma capsulatum*[18], *Aspergillus*[10], *Candida*[19] 등 진균증과 관련된 균종들을 동정하는데 그 유용성이 증명되어 왔다. 또한 여러 개의 임의의 primers를 이용하여 균주간 유전적 차이를 검열하는데도 사용될 수 있음이 증명되었다[5,11,18].

본 연구는 이제까지 RAPD 분석법을 이용하여 *S. schenckii*와 그와 관련된 균종과 균주들을 분석한 연구 결과가 보고된 바가 없어서 *S. schecnkii*와 관련된 균종들 및 *O. stenoceras,* 그리고 임상 분리주들을 대상으로 본 연구를 시행하였다. RAPD 분석 결과, 선정된 임의의 primers에 서로 다른 크기의 다양한 RAPD 밴드가 관찰되어 *S. schecnkii*는 관련된 균종과는 구별되고, *O. stenoceras*와도 다른 균종임을 분명하게 보여주었다. 본 연구에서 3개의 primers를 이용하여 시행한 RAPD 분석 결과, Suzuki 등[4]의 RFLPs법에 의한 연구와 같이 *S. schenckii*는 *O. stenoceras*을 포함한 그와 관련된 균종들과 서로 차이가 나는 다양한 DNA 다형성 밴드를 보여줌으로써 서로 감별이 가능하였다. 특히 3개 primers 중 OPA-03 (5'-AGTCAGCCAC-3')는 본 실험 대상 균주들에 대해 뚜렷하고 다양한 DNA 밴드들을 보여주어 앞으로 *S. schenckii*와 관련된 균주들을 검열하는데 일차적인 primer로 유용하게 사용될 수 있을 것으로 사료된다. 임상 분리주 10주를 대상으로 선정된 3개의 primers를 사용하여 RAPD 분석을 시행한 결과에서 No. 1과 No. 2 환자에서 분리한 2주를 제외하고 8주는 3개의 primers 모두에서 대조 균주와 동일한 크기의 DNA 밴드들을 관찰할 수 있었다. Suzuki 등[4]은 임상 분리주 총 100주를 대상으로 RFLPs의 분석 결과 11개 아형이 있음을 증명한데 반해 임상 분리주 10주를 대상으로 RAPD을 시행한 본 연구에서는 수적으로 적기 때문에 RAPD에 의한 *S. schenckii* 아형의 존재를 증명하는 밴드는 관찰되지 못했다. 그리고 2명의 환자에서 수집한 임상 분리주 2주는 *S. schenckii* 및 그와 관련된 균종과도 전혀 다른 DNA 밴드가 관찰되어 *Sporothrix*와는 다른 균종으로 간주되었다. 따라서 스포로트리쿰증 양상을 보이는 환자 2명으로부터 분리한 2주는 배양 형태, 현미경학적 측면, 생화학적 방법, 다른 분자생물학적 기법 등의 검사를 더 시행하여 규명해야 할 필요가 있음을 시사하였다. 하지만 흥미로운 점은 3가지 primers를 이용한 임상 분리주들의 RAPD 분석 결과, No. 1 및 No. 2 환자의 임상 분리주 2주는 다른 임상 분리주 8주와 다른 결과를 3 primers 모두에서 일관성 있게 보여주어 primer에 관계없이 재현성이 높음을 알 수 있었다.

본 연구에서 임의의 primer를 선정하여 다양한 DNA 밴드를 형성하는 RAPD 분석법은 *S. schenckii*와 그의 관련종, 그리고 *O. stenoceras*를 쉽게 감별할 수 있는 방법임을 보여주었다. 그리고 국내에서 발생한 스포로트리쿰증 양상을 보이는 환자에서 분리한 임상 분리주를 DNA 차원에서 분석하여 공시 균주와 비교 분석한 연구는 국내에서 처음으로 앞으로 더 많은 임상 분리주들을 대상으로 연구가 이루어져야 할 것으로 사료된다. 본 연구 결과, RAPD 분석법은 제한효소 등이 필요

한 RFLPs법 보다 시간적 및 경제적 측면에서도 신속하고 경제적이어서 *S. schenckii*와 그와 관련된 균주들을 감별하고 분류하는데 유용한 도구로 사용될 수 있음을 시사하였다.

결 론

Random amplified polymorphic DNA (RAPD) 또는 arbitrarily primed PCR (AP-PCR)이라고 불리우는 방법이 피부 사상균을 비롯하여 여러 심재성 진균 등의 여러 진균증 병원체를 분류하고 감별하는데 최근 유용하게 사용되고 있다. 본 연구는 RAPD 분석법을 통해 *S. schenckii*와 관련된 균종들, 국내에서 발생한 스포로트리쿰증 양상을 보이는 환자에서 분리한 임상 분리주들을 동정하고자 하였다. 본 연구에 사용된 대상 균주로는 *S. schenckii* 2주, 그리고 *S. schenckii* var. *luriei, S. flocculosa, S. nivea, Ophiostoma stenoceras* 등 각각 1주씩 총 6주의 대조 균주와 임상 분리주 10주로 총 16주였다. 따라서 상기의 균주들을 대상으로 본 분석법을 시행하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 2개의 primers (5'-TGCCGAGCTG-3', 5'-AGTCAGCCAC-3')가 상기 균주 *S. schenckii, S. schenckii* var. *luriei, S. flocculosa, S. nivea, Ophiostoma stenoceras* 등을 감별할 수 있는 각기 크기가 DNA 다형성 밴드를 보여주었다.

2. 국내에서 발생한 스포로트리쿰증 양상을 보이는 환자로부터 분리한 임상 분리주 10주를 대상으로 선정된 임의의 3 primers를 이용하여 RAPD 분석법을 시행한 결과, 8개 임상 분리주는 3 primers 모두에서 표준 균주와 동일한 DNA 다형성 밴드를 보여주었으나, 다른 2주는 다른 DNA 밴드를 보여주었다. 그러므로 국내에는 스포로트리쿰증 양상을 일으키는 원인균으로 전통적인 *S. schenkii*와는 다른 종이 존재할 수 있음을 시사하였고 따라서 다른 균종에 대해서는 앞으로 연구가 진행되어야 하겠다.

본 연구 결과, RAPD 분석법은 *S. schenckii*와 그의 관련된 균종과 균주를 분석하는데 있어 기존의 RFLPs법보다 더 간단하고 경제적이어서 실제적으로 유용한 도구로 쓰일 수 있음을 시사하였다.

참 고 문 헌

1. 김영표, 전인기, 손형선. 스포로트리쿰증에 대한 임상적 관찰. 대피지 1979; 17: 425-432
2. Rippon JW. Sporotrichosis. In: Medical Mycology. The Pathogenic Fungi and the Pathogenic Actinomycetes. 3rd ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1982; 277-302
3. Taylor JJ. A comparison of some *Ceratocystis* species with *Sporothrix schenckii*. Mycopathol Mycol Appl 1970; 42: 233-240
4. Suzuki K, Kawasaki M, Ishizaki H. Analysis of restriction profiles of mitochondrial DNA from *Sporothrix schenckii* and related fungi. Mycopathologia 1988; 103: 147-151
5. Welsh J, Mclelland M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. Nucleic Acids Res 1990; 18: 7213-7218
6. Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SV. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Res 1990; 18: 6531-6535
7. Gräser Y, Fari ME, Presber W, Sterry W, Tietz HJ. Identification of common dermatophytes (Trichophyton, Microsporum, Epidermophyton) using polymerase chain reactions. Br J Dermatol 1998; 138: 576-582
8. Liu D, Coloe S, Pedersen J, Baird R. Use of arbitrarily primed polymerase chain reaction to differentiate *Trichophyton* dermatophytes. FEMS Microbiol Lett 1996; 136: 147-150
9. Liu D, van Heeswijck R, Latch G, et al. Rapid identification of *Acremonium lolii* and *Acremonium coenophialum* endophytes through arbitrarily primed PCR. FEMS Microbiol Lett 1995; 133: 95-98
10. Aufauvre-Brown A, Cohen J, Holden DW. Use of randomly amplified polymorphic DNA markers to distinguish isolates of *Aspergillus fumigatus*. J Clin Microbiol 1992; 30: 2991-2993
11. Crampin AC, Mathews RC, Hall D, Evan EGV. PCR fingerprinting *Cryptococcus neoformans* by random amplification of polymorphic DNA. J Med Vet Mycol 1993; 31: 463-465
12. Schenck RB. On refractory subcutaneous abscess by fungus possibly related to sporotrica. Bull John Hopkins Hosp 1898; 9: 286
13. Dellatorre DL, Lattanand A, Buckley HR, Ur-

bach F. Fixed cutaneous sporotrichosis of the face. J Am Acad Dermaol 1982; 6: 97-100

14. Dixon DM, Salkin IF, Duncan RA, et al. Isolation and characterization of *Sporothrix schenckii* from clinical and environmental sources associated with the largest U.S. epidemic of sporotrichosis. J Clin Microbiol 1991; 29: 1106-1113
15. Kwon-Chung KJ. Comparison of isolates of Sporothrix schenckii obtained from fixed cutaneous lesions with isolates from other types of lesions. J Infect Dis 1979; 139: 424-431
16. Cooper CR Jr, Breslin BJ, Dixon DM, Salkin IF. DNA typing of isolates associated with the 1988 sporotrichosis epidemic. J of Clin Microbiol 1992; 30: 1631-1635
17. Bostock A, Khattak MN, Mattews R, Brunie J. Comparison of PCR fingerprinting, by ramplification of polymorphic DNA, with other molecular typing methods of *Candida albicans*. J Gen Microbiol 1993; 139: 2179-2184
18. Kersulyte D, Woods JP, Keath EJ, Goldman WE, Berg DE. Diversity among clinical isolates of *Histoplasma capsulatum* detected by polymerase chain reaction with arbitrary primers. J Bacteriol 1992; 174: 7075-7079
19. Schonian G, Meusel O, Tietz HJ, et al. Identification of clinical strains of *Candida albicans* by DNA fingerprinting with the polymerase chain reaction. Mycoses 1993; 36: 171-179
20. De Hoog GS. Ceratocytis versus Ophiostoma: a reappraisal. Mycologia 1984; 76: 292-299
21. Berbee ML, Taylor JW. 18S ribosomal RNA gene sequence characters place the human pathogen *Sporothrix schenckii* in the genus Ophiostoma. Exp Mycol 1992; 16: 87-91