

## 진균감염의 분자생물학적 진단

영남대학교 의과대학 피부과학교실

최 종 수

### 서 론

최근 악성종양, 장기이식자에 대한 면역억제제 사용, 부신피질호르몬제의 장기간 전신투여, 후천성면역결핍증의 확산 등으로 면역이 저하된 환자가 증가하고 있다 (Walsh 등, 1994; Ampei, 1996; Fridkin과 Jarvis, 1996; Gordon 등, 1977). 이런 환자들에서 발생하는 진균증들 중 칸디다증이 가장 흔하지만 (Anaissie 등, 1989), *Aspergillus*, *Fusarium*, *Trichosporon*, *dematiaceae* 등의 감염도 증가하고 있다 (Walsh 등, 1994). 부생성 (saprophytic) 진균은 우리 생활 주변에서 흔히 볼 수 있으며, 병원성이 낮아서 인체감염을 일으키는 일이 매우 드물지만, 면역이 저하된 사람에 감염되면 중증 감염이 전격성으로 발생하며, 사망률도 매우 높다 (Fisher 등, 1981; Kappe와 Seeliger, 1993; Walsh 등, 1994; Warnock, 1995; Denning, 1996; Kremery 등, 1996).

빠른 진단과 알맞은 항진균제의 투여가 필요하지만 전통적인 진균학적 방법, 항원, 항체 반응 등 기존의 진단방법으로는 한계가 있으며, 중합효소연쇄반응(Polymerase Chain Reaction, 이하 PCR로 약함)을 이용한 분자생물학적 진단법은 매우 빠르고 감수성이 높으며, 진균학적 지식 없이도 시행할 수 있는 장점이 있다. 기존 진단방법의 문제점

을 검토하고, PCR과 probe를 이용한 분자생물학적 진단방법을 임상에 도입하기 위해 고려하여야 할 사항들에 대하여 문헌고찰을 통해 알아 보고자 한다(Michell 등, 1994; Hopfer, 1995)

### 진균증 진단의 어려움

항진균제에 대한 감수성은 균종에 따라 다양하므로 (Walsh, 1993; Warnock, 1995; Denning, 1996), 빠른 진단과 알맞은 항진균제 선택이 환자의 생명을 구할 수 있으나, 진균증의 진단과 원인균 동정에 시간이 많이 걸리고 어려운 경우가 많다. 진균증들은 임상증상이 대부분 비특이적이고 (Martino와 Girmenia, 1993; Miller 등, 1994; Warnock, 1995; Kappe 등, 1996a; Walsh 등, 1996), 조직병리 소견도 대부분 유사한 형태를 보여 균종을 구분하는데 특이하지 않다(Hung 등, 1994).

진균 특이 항체를 검출하는 방법은 감수성이 낮고(Gordon 등, 1977) 특이하지 못하다. *Candida* 종들은 인체 상재균(normal flora)으로 건강한 사람들이 항체를 보유하고 있으므로 파종성 감염과 구분하기 어렵고, 유사 균종들간에 교차반응을 일으킨다. 다른 균에 비해서 진균의 항원은 면역원성

이 강하지 못한 편이며, 면역반응이 저하된 환자에서 항체형성이 저하되어 있다(Young과 Bennett, 1971; de Repentigny 등, 1994; Andriole, 1996; Kappe 등, 1996a).

진균 항원 검출이 항진균 항체 검출에 비해 진균감염의 여부와 정도를 잘 반영하지만 실제로 감수성은 낮다(de Repentigny 등, 1994; Verweij 등, 1995; Andriole, 1996). Mannan을 비롯한 진균 세포벽의 여러 표면 탄수화물(Herent 등, 1992; Blum 등, 1994), D-arabinitol (Reiss와 Morrison, 1993) 같은 대사산물 등의 항원을 검출하는 방법은 감수성이 70% 이하이고, 환자가 사망하기 2-3일 전에야 비로소 검출되는 경우가 많으므로 환자의 치료에 도움이 되지 못한다. 이는 항원이 순환계로 유출되는 양이 적거나 유출된 후 빨리 제거되기 때문으로 추정된다.

전통적인 진균학적 검사는 포자의 형태와 생화학적 반응을 토대로 하여 균종을 구분한다. 따라서 균종을 동정하는데 수 일내지 수 주일이 필요하며, 포자를 형성하지 않거나, 포자들이 유사한 형태를 보여 구분이 어려운 경우도 많다(Larone, 1995). 또한 침습성이나 파종성 칸디다증에서 혈액배양 양성율은 73%에 불과하고(Telenti와 Roberts, 1989), 환자가 사망하기 직전에 검출되는 경우가 많다.

따라서 기존의 진단법에 비해 빠르고, 감수성과 특이성이 높으며 쉽게 시행할 수 있는 진단 방법이 필요하며, DNA를 이용한 분자생물학적인 진단방법에서 그 해결책을 찾을 수 있다. 높은 감수성을 위해 DNA를 증폭하는 PCR이 주류를 이루고 있으며, 1980년대 말부터 진균증의 PCR을 이용한 진단법이 보고되기 시작하여 진단할 수 있는 진균의 종류가 다양하게 늘고 있으며, 빠르고 간편하며 높은 감수성을 보이는 방법들이 개발되고 있다.

## PCR primer와 DNA probe 제작

DNA를 증폭하여 진단에 사용하려면 유전자의 어느 부위를 목표로 하느냐가 가장 중요하며 유전자의 복제 수(copy number), 증폭할 부위의 크기, 특이성 등을 고려하여야 한다.

1) 복제수(Copy number): 목표로 하는 유전자가 다복제(multi-copy)인 경우 단복제(single-copy)보다 감수성이 높다.

진균을 진단하는데 이용된 지금까지 알려진 DNA 유전자는 표 1과 같다.

2) 증폭할 유전자 부위의 크기: Pershing (1993)은 증폭하는 크기가 작을수록 증폭 효율이 높으며, endonuclease에 손상받을 가능성도 적고, 감수성도 높아질 수 있다고 하였다.

3) 특이성: 생물체가 진화하는 과정에서 DNA 염기서열은 변하며, 각 유전자의 기능과 개체의 필요에 따라 거의 변하지 않거나(highly conserved), 매우 빨리 변화한다(highly variable). 따라서 계통분류상 가까운 두 균종을 구분하거나 동일 균종내 균주들을 구분하려면 highly variable 부위를 비교하고, Aspergillus 속을 효모균이나 다른 사상균들과 구분하려면 variable 부위를 비교하여야 한다. 진균감염 여부를 진단하려면 모든 진균에 공통으로 존재하고 다른 생물체에는 없는 DNA 염기서열을 highly conserved 부위에서 찾아야 한다(White 등, 1990). 원하는 목적과 진단의 효율성을 고려하여 검출할 진균 primer/probe를 (1) 종특이(species-specific) (Buchman 등, 1990; Miyakawa 등, 1993), (2) 속특이(genus specific) (Burgener-Kairuz 등, 1994; Rand 등, 1994), (3) 대부분의 병원성 진균(Makimura 등, 1994), (4) 모든 진균(White 등, 1990; Hopfer 등, 1993)으로 나눌 수 있다.

Table 1. Target genes for detection of fungal DNA sequences by in vitro amplification

Gene	Specific fungi	Reference
<b>Low-copy genes</b>		
14-alpha-lanosterol demethylase	<i>C. albicans</i>	Buchman et al, 1990; Chryssanthou et al, 1994
actin	<i>C. albicans</i>	Kan, 1993
beta tubulin	<i>C. albicans</i>	Muramatsu et al, 1994
heat-shock protein 90	<i>C. albicans</i>	Crampin & Matthews, 1993
secretory aspartate proteinase	<i>C. albicans</i>	Sugita et al, 1993
alkaline proteinase	<i>A. fumigatus</i> , <i>A. flavus</i>	Tang et al, 1993
IgE-binding protein	<i>A. fumigatus</i>	Reddy et al, 1993
thymidylate synthase	<i>P. carinii</i>	Olsson et al, 1993
dihydrofolate reductase	<i>P. carinii</i>	Schluger et al, 1992
chitin synthase	<i>Phialophora verrucosa</i>	Peng et al, 1995;
<b>Muti-copy genes</b>		
mt repetitive DNA sequences	<i>C. albicans</i>	Holmes et al, 1992; Miyakawa et al, 1992; Miyakawa et al, 1993
mt rDNA	<i>P. carinii</i> <i>Ascomycetes</i> Ectomycorrhizal fungi	Leigh et al, 1993; Wakefield et al, 1991 Li et al, 1994 Bruns & Gardes, 1993
5S rDNA and NTS	<i>Candida spp.</i> <i>C. krusei</i> <i>P. carinii</i>	Holmes et al, 1994 Carlotti et al, 1997 Kitada et al, 1991
Intergenic spacer rDNA	<i>A. fumigatus</i>	Spreadbury et al, 1993
28S rDNA	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i> <i>Candida spp.</i>	Sandhu et al, 1995; Sandhu et al, 1997 Haynes & Westerneng, 1996
18S rDNA	<i>C. albicans</i> <i>Candida spp</i> , <i>Aspergillus spp.</i> All fungi	Rand et al, 1994 Einsele et al, 1997 Hopfer et al, 1993; Kappe et al, 1996b
ITS	<i>C. albicans</i> <i>Candida spp.</i> <i>Mucorale</i> Dimorphic fungi	Lott et al, 1993 Elie et al, 1998 Choi et al, 1998 Linsley, 1997

ITS: Internal Transcribed Spacer; mt: mitochondrial; NTS: Non Transcribed Spacer; rDNA: ribosomal RNA gene

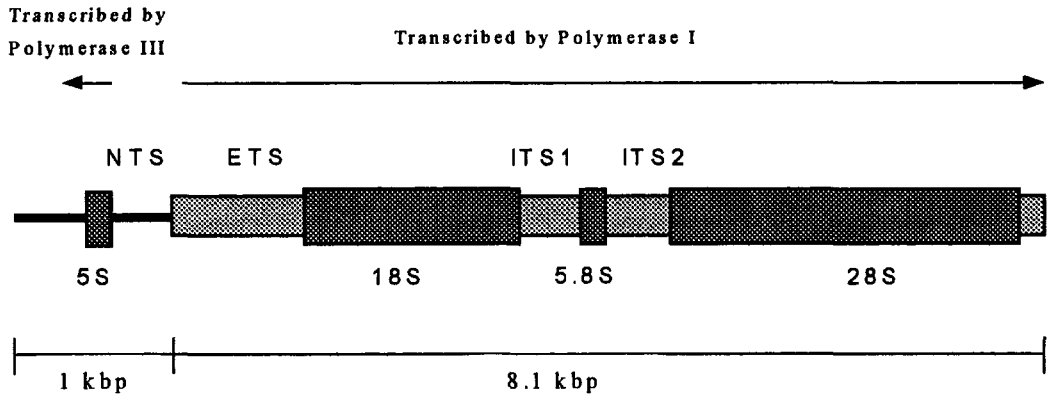


Fig. 1. Arrangements of rRNA gene repeating units in yeast. rDNA is transcribed to rRNA precursor. ETS and ITS are removed by endonuclease and splicing. 18S and ribosomal proteins become SSU. 5.8S, 28S and 5S become LSU (Watson 등, 1987). NTS is not transcribed, and includes promoter and enhancer. NTS: Non Transcribed Spacer; ETS: External Transcribed Spacer; ITS: Internal Transcribed Spacer; SSU: Small Sub Unit of ribosome; LSU: Large Sub Unit of ribosome.

4) 종특이 primer과 범진균 primer/probe

종특이 primer (Miyakawa 등, 1992; Niemiec 등, 1993)는 여러 균종에 오염된 경우 유용하며, 특이성이 높다. 그러나 대부분 단복제이므로 감수성이 낮고, 균종마다 특이 primer/probe를 만들어야 하는 번거로움이 있으며, 알려져 있지 않은 균종에 대해서는 검사를 시행하지 못하는 단점이 있다.

모든 진균을 검출할 수 있는 범진균 universal fungal primer를 이용하여 진균 DNA를 증폭 후 종특이 표식자 (species-specific probe)를 사용하여 균종을 구분하는 것이 임상적용에 적합하고 미지의 균종에 대해서도 종특이 표식자를 제작할 수 있는 기회가 있다(Gardes 등, 1991; Bowman, 1993).

5) Ribosomal RNA gene(rDNA)

이상의 조건을 모두 만족할 수 있는 부위로서 rDNA를 들 수 있다 (그림 1). rDNA에는 highly conserved 부위와 highly variable 부위가 모두 존재하며, 다중복제 유전자(tandem repeat; yeast 140, human 200)이고, 이미 많은 생물체의 염기서열이

보고되어(de Peer 등, 1998; de Rijk 등, 1998) 있으므로, primer와 probe를 제작하기에 적합하다. 핵 rDNA의 18S, 5S 및 28S는 상대적으로 느리게 진화하며, 계통적으로 거리가 먼 균들을 연구하는데 알맞다. Mitochondrial rDNA는 좀더 빨리 진화하므로 목(order)이나 과(family)의 연구에, 핵 rDNA의 ITS(internal transcribed spacer) 및 intergenic spacer는 가장 빨리 진화하므로 속이나 종의 연구에 적합하다 (White 등, 1990).

특히 ITS 부위는 종특이 probe를 제작하는데 알맞다. 5종의 *Candida*에서 5.8S와 18S의 상동성은 평균 97%로 비교적 차이가 없는데 비해 (Hendriks 등, 1989, Lott 등, 1993), ITS2의 3' 부위는 40%의 상동성을 나타냈으며, *Candida albicans*나(Lott 등, 1993) *Cryptococcus neoformans* (Mitchell 등, 1992)의 동일균종내 균주 간에는 차이가 없었다. Duggal 등(1997)은 6 종의 *Fusarium*에서 18S와 28S에 비해 ITS에 더 많은 다형성(polymorphism)이 있으며, ITS 부위의 염기

Table 2. The list of species-specific DNA probes from ITS for detecting fungi

Genus	Species
<i>Candida</i> spp. <sup>a</sup>	<i>C. albicans</i> , <i>C. dubliniensis</i> , <i>C. glabrata</i> , <i>C. guilliermondii</i> , <i>C. haemulonii</i> , <i>C. kefyr</i> , <i>C. krusei</i> , <i>C. lambica</i> , <i>C. lusitaniae</i> , <i>C. norvegensis</i> , <i>C. norvegica</i> , <i>C. parapsilosis</i> , <i>C. pelloculosa</i> , <i>C. rugosa</i> , <i>C. tropicalis</i> , <i>C. utilis</i> , <i>C. viswanathii</i> , <i>C. zeylanoides</i>
Dimorphic fungi <sup>b</sup>	<i>Histoplasma capsulatum</i> , <i>Blastomycosis</i> , <i>Coccidioidomycosis</i> , <i>Cryptococcus neoformans</i> , <i>Sporothrix schenckii</i>
<i>Aspergillus</i> spp. <sup>c</sup>	<i>A. flavus</i> , <i>A. fumigatus</i> , <i>A. niger</i> , <i>A. nidulans</i> , <i>A. terreus</i>
<i>Mucorales</i> spp. <sup>c</sup>	<i>M. racemosus</i> , <i>M. plumbeus</i> , <i>M. rouxii</i> , <i>M. circinelloides</i> , <i>M. indicus</i> , <i>Rhizopus oryzae</i> , <i>R. microsporus</i> , <i>R. circinans</i> , <i>R. stolonifer</i> , <i>Rhizomucor pusillus</i> , <i>Absidia corymbifera</i> , <i>Cunninghamella elegans</i>
<i>Fusarium</i> spp. <sup>c</sup>	<i>F. oxysporum</i> , <i>F. solani</i> , <i>F. moniliforme</i>
<i>Penicillium</i> spp. <sup>c</sup>	<i>Penicillium marneffeii</i> , <i>Penicillium notatum</i> ,
<i>Scedosporium</i> <sup>d</sup>	<i>S. prolificans</i> , <i>Pseudallescheria boydii</i>
<i>Pneumocystis</i> <sup>e</sup>	<i>Pneumocystis carinii</i>

<sup>a</sup>: Elie et al, 1998; <sup>b</sup>: Lindsley, 1997; <sup>c</sup>: Choi et al, 1998; <sup>d</sup>: Wedde et al, 1998; <sup>e</sup>: Jiang et al, 1996.

서열을 비교하여 균종간에 차이가 많음을 밝혔다. 표2는 지금까지 ITS 부위에서 개발된 종특이 probe들이다

## DNA 추출 및 정제

이상적인 DNA 추출방법은 다음의 조건을 만족하여야 한다. 즉 모든 진균에 공통으로 사용될 수 있으며, 단순하고, 빠르고, 재현성이 높으며, 가격이 싸고, phenol 등 독성이 강한 물질을 사용하지 않고, PCR 억제물질 (inhibitor)이 포함되지 않은, 높은 순도와 높은 농도의 DNA를 얻을 수 있어야 한다. 그러나 아직까지 이러한 이상적인 방법은 없으며, 상황에 따라 몇가지 방법을 겸용하여 사용하는 수 밖에 없다.

임상검체에는 진균 농도가 낮고, 진균 DNA가 세포벽에 싸여 있으며, 많은 PCR 억제물질들이 존재하므로 검체를 직접 PCR에 사용하기는 어렵다. 먼저 세척과 원심분리로 진균을 농축하고

PCR 억제물질들을 제거한다. 그 후 세포벽과 세포막을 파괴하여 DNA를 노출시킨 후 추출 정제하여야 한다.

1. 진균 세포벽 처리 : 세포벽은 매우 튼튼하여 파괴시키기 어려우므로 이 단계가 검사의 감수성을 높이는 데 가장 중요한 과정이다.

### 1) 효소처리

Zymolase를 *Candida* 균에 처리하여 세포벽을 녹인 후, proteinase K를 처리하면 DNA를 쉽게 얻을 수 있다. 그러나 사상균은 효모균에 비하여 세포벽이 더 튼튼하고 균종에 따라 세포벽의 구성 성분이 다르므로 일괄적인 효소 처리가 곤란하다. Lyticase, Novozyme, beta-glucuronidase, chitinase 등을 사용할 수 있으나(Bainbridge 등, 1990: Walsh 등, 1995), 너무 많은 효소를 사용하면 처리 시간과 비용이 문제가 된다.

### 2) 물리적인 방법

Glass bead, 가열, microwave, sonication, 동결, 마쇄 등이 있으며, 빠르고, 쉬우며, 저렴하지만 효

율이 높지 않다. 따라서 진균 배양 후 DNA를 추출할 경우에는 유용하지만, 소량의 진균을 포함하는 임상검체에 단독으로 사용하기는 힘들다.

3) 화학적 방법

알칼리 용액, 계면활성제 (sodium dodecyl sulfate, Tween 80, Triton X)등의 처리도 물리적 방법과 마찬가지로 간편하고 저렴하지만 효율이 낮다.

2. DNA 정제

Phenol-chloroform, guanidine thiocyanate 등을 처리하여 단백질을 DNA와 분리한 후 ethanol로 DNA를 침전시키는 방법이 가장 고전적이다. 그러나 독성이 강한 유기용매를 사용하지 않고 시간을 단축하기 위해 silica column이나 chelex 100 (Bernal 등, 1997) 등을 사용할 수 있다.

아직까지 가장 좋은 방법은 없으며, 실험 목적에 따라 여러가지 방법을 조합하여 사용하고 있는 실정이다. Shin 등(1997)은 혈액내 *C. albicans*를 TXTE 완충액(10mM Tris, 1mM EDTA, 1% Triton-X, pH 8.0)으로 세척하고, 15분간 끓인 후 직경 0.5 mm zirconium beads와 함께 20분간 흔들

어서 물리적으로 DNA를 추출하였다. 감수성은 500 cell/ml로 높지 않으나 처리 시간이 1.5시간으로 매우 빠르고 간편하며 경제적이다.

Flahaut 등(1998)은 *C. albicans*의 분비 aspartic proteinase 유전자를 증폭하여 검출하면서 8가지 DNA 추출방법을 비교하여 (표 3) 다음의 결과를 얻었다. 1) Glass bead, 가열, microwave, sonication 등의 물리적인 방법은 DNA 추출 농도를 높이지 못하였다. 2) Proteinase K 단독 처리는 Zymolase와 proteinase K를 동시에 처리한 결과와 같았다. 3) Proteinase K 처리 시간은 1시간이 알맞았다.

여러 종류의 상품화된 DNA 추출 kit를 이용할 수 있으며, 독성물질에 노출되지 않고, 빠르고 간단한 것이 장점이다. Loeffler 등(1997)은 혈액 속에 있는 *C. albicans*에 proteinase K, 가열한 알칼리 용액(50mM NaOH, 95℃, 10분) 및 Zymolase를 처리하여 spheroplast로 만든 후, 5가지 상품화된 DNA 추출 kit들을 비교하였다(표 4). 이 중 QIAmp Tissue kit (Qiagen, Los Angeles, California)가 가장 높은 감수성과 순도를 보였으나 검체당 2.3불로 가장 비쌌다.

Table 3. Comparison of methods of extracting DNA from diluted cultures of *C. albicans*(Flahaut et al, 1998)

Method	Reference	Sensitivity (cells/ml)	Time (h)	Ease of use	Recovery
Zym, SDS, PK, phenol	Buchman et al (1990)	10 or inhibit	2	Handy	good/inhibit
Zym, PK, phenol, RNase	Holm et al (1986)	10 100	4	Tedious, phenol, 3 enzymes	good
Glass beads, phenol	Sanglard et al (1997)	100	0.75	Handy, phenol	medium
Zym, PK, RNase	Sanglard et al (1992)	1,000,000	2	Handy, 3 enzymes	low
Zym, silica beads	Boom et al (1990)	100	2.5	Handy, 1enzyme,	medium
Zym, PK, silica membrane	Qiagen	100	2	Very handy, 2 enzymes,	good
Zym, PK, silica membrane	Macherey & Nagel	10	2	Very handy, 2 enzymes	good
PK, silica membrane	Qiagen	10	1.5	Simple, rapid, 1 enzyme	good

Ten fold serial dilution of an overnight *C. albicans* culture in water were used for DNA extraction. A 10 ul aliquot of DNA was used for PCR amplification with secretory aspartate proteinase gene primers. The sensitivity was defined as the highest dilution which produced a visible band by ethidium bromide staining after gel electrophoresis of a 10 ul aliquot of PCR product.

PK: proteinase K; SDS: sodium dodecyl sulfate; Zym: Zymolase

Table 4. Comparison of different extraction kits (Loeffler 등, 1997)

Method*	Sensitivity <sup>a</sup>	Duration <sup>b</sup>	Cost/sample <sup>c</sup>
In-house method	1 - 10	8 h	0.10
QIAmp Tissue	1 - 10	4 h	2.30
GeneReleaser	10	3 h 15 min	1.80
Puregene D6000	100	5 h	0.80
Dynabeads	100	4 h	1.10
DNAzol	1000	4 h	1.00

a Fungal cells/ml of blood after PCR-Southern blot with probes

b Total average duration of 12 blood samples for DNA extraction.

c Cost in U.S. dollars calculated for one samples after Zymolase treatment.

\* In-house method : 10 % sodium dodecyl sulfate, 5 M potassium acetate, cold isopropanol, 70% ethanol ;  
 QIAmp Tissue : Qiagen, Los Angeles, California; GeneReleaser : BioVentures, Murfreesboro, Tenn ;  
 Puregene D6000 : Gentra, Minneapolis, Minn; Dynabeads DNA DIRECT: Dynal, Oslo, Norway;  
 DNAzol : Molecular Research Center, Cincinnati, Ohio.

3. 임상검체에 포함된 PCR 억제물질의 제거  
 혈액에 포함된 heme과 그 대사산물들, 항응고제 EDTA나 heparin 등이 PCR 억제물질로 작용한다. 그 외에도 머리카락의 eumelanin, 근육의 myoglobin, 초자체, 뇌척수액, 소변, 대변, polyamines, 객담의 acidic polysaccharides 등도 Taq polymerase에 억제물질로 작용한다. 고정액 중에서 중화되지 않은 formalin, DNA를 추출하는 과정에서 사용하는 여러 화학물질들 (EDTA, sodium dodecyl sulfate, guanidinium, phenol, ethanol, dimethylsulfoxide, urea, formamide 등), 수술용 윤활제, 나무 이쑤시개(Lee와 Cooper, 1995), 살정제 등도 증폭반응을 억제한다.

Flahaut 등(1998)은 혈액에서 적혈구를 제거하기 위한 4가지 용해제들을 비교하여 본 결과, 증류수, 세정제 단독, 세정제와 DNase에 비해 알칼리 citrate-cysteine 용액 (1N NaOH, 0.2M citrate, 0.4M N-acetylcysteine)이 가장 높은 감수성을 보였고 실용적이었다고 보고하였다. 혈액배양액 첨가제인 sodium polyanetholesulfonate는 DNA와 유사

한 물리화학적 특성 때문에 분리가 어려우며 guanidine hydrochloride로 처리하여야 제거할 수 있다(Fredricks과 Eelman, 1998).

### 증폭시킨 DNA 검출

전기영동과 ethidium bromide: 종특이 PCR인 경우 전기영동 후 ethidium bromide 염색하여 증폭 여부와 그 크기를 보고 진균을 동정할 수 있다. 가장 빠르고 간단하지만, blotting 후 probe를 사용하는 것 보다 감수성이 낮다. 범진균 primer를 사용하여 PCR을 하면 전기영동상 증폭된 DNA의 크기가 대부분 비슷하므로 어떤 균종인가를 구분하는 단계가 필요하다.

PCR-DNA 염기서열 분석: 증폭된 DNA의 염기서열을 알 수 있으면 가장 많은 정보를 얻을 수 있는 장점이 있지만 시간과 비용이 가장 많이 든다.

PCR-RFLP (restriction fragment length polymorphism): 증폭한 PCR 산물을 제한효소 처리

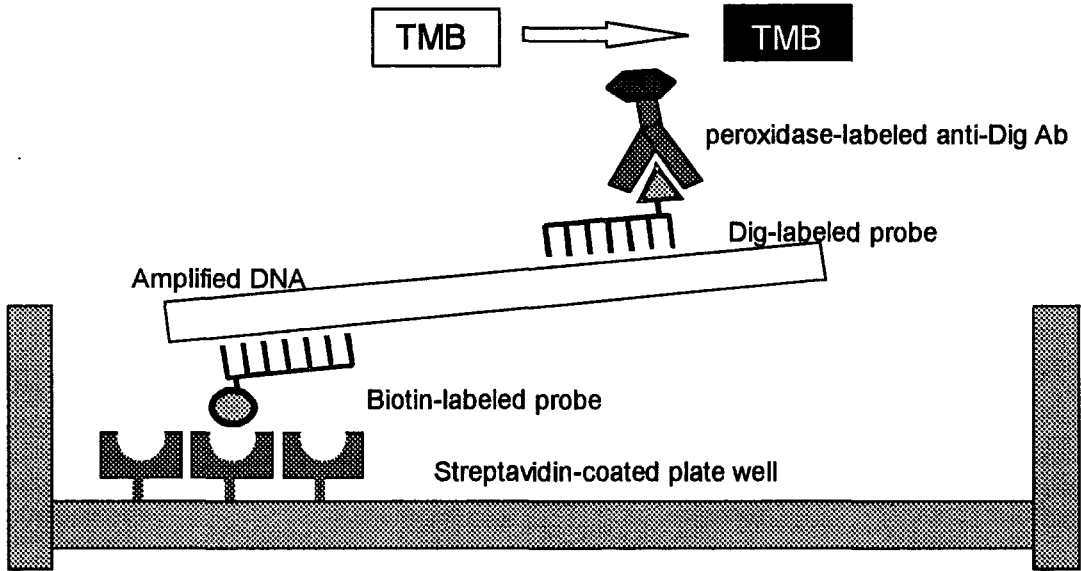


Fig. 2. Diagram of PCR-enzyme immunoassay. 1) Amplified DNA is denatured with heat (95°C, 5 minutes) and stored at 0°C. 2) Hybridize single-stranded DNA with biotin-labeled universal fungal probe and digoxigenin(Dig)-labeled species-specific probe at 37°C for 1 hour. 3) Transfer the hybridized DNA and probes to streptavidin-coated microtitration plate. Biotin-labeled probe immobilizes the DNA on streptavidin-coated microtitration plate. 4) After washing, add the anti-digoxigenin antibody which labeled with is peroxidase, and incubate at 25°C for 1 hour. 5) After washing, add peroxide and a chromogenic substrate, tetramethylbenzidine (TMB), and incubate at 25°C for 30 minutes. The peroxidase and peroxide change colorless TMB to blue. 6) Measure the absorbance at 650 nm with spectrophotometer (Fujita et al, 1995).

후 전기영동하여 절단된 크기를 비교하여 보면 염기서열의 차이를 간접적으로 알 수 있다(Hopfer 등, 1993). 그러나 제한효소를 처리하는 시간과 비용, 높은 순도의 진균 DNA, 많은 양의 PCR 산물 등이 필요하다.

**PCR-SSCP** (single strand conformation polymorphism): DNA의 염기서열이 다른 경우 단일쇄 상태에서 3차원적인 구조가 달라(배열 특이 구조) 전기영동의 속도에 차이가 나게 된다 (Walsh 등, 1995). 염기서열의 조그만 차이까지 쉽게 알 수 있으나, 균종이 다양한 경우에는 적용하기 힘들고, 최종적으로 염기서열 결정을 하여 확

인하여야 하는 단점이 있다.

**RAPD** (Randomly amplified polymorphic DNA): Random primer와 낮은 온도의 결합반응 (annealing)으로 PCR하면 다양한 크기의 DNA를 얻을 수 있다(Lanfranco 등, 1993; Bidochka 등, 1994; Holmberg와 Feroze, 1996; Erjavec 등, 1997). 따라서 염기서열을 알지 못하는 진균들도 균종을 구분할 수 있는 장점이 있으나, 반응 조건에 따라 결과가 달라지는 등 재현성이 높지 않다.

범진균 primer/종특이 probe: PCR 산물을 나일론 막에 고정하거나 (blotting), 액체상태 (예를 들면 enzyme immunoassay 등)에서 probe와 보합



반응(hybridization) 시킨 후 probe를 검출한다. Blotting은 시간과 노력이 많이 들지만 대량의 검체를 동시에 처리할 수 있는 장점이 있다. 액체상태에서 보합반응을 시키는 것은 빠른 반응을 쉽게 얻을 수 있는 장점이 있으나 비용이 비싸다. Probe 검출은 probe에 부착된 방사성 동위원소, 형광색소 (Livak 등, 1995), peroxidase 등의 효소, digoxigenin, biotin 등을 이용한다. 방사성 동위원소는 감수성이 높지만 위험성과 번거로움으로 점차 사용되지 않으며, 색소 변화를 이용하면 싼 비용으로 쉽게 사용할 수 있어 많이 쓰이고 있고, chemiluminescence 반응은 비용이 비싸지만 감수성이 높고 반응속도가 빨라서 장차 널리 쓰일 전망이다. 보합반응은 반응 온도와 pH에 큰 영향을 받으므로 사용할 probe에 따라 적정 반응 조건을 최적화하여야 한다. 그림 2는 간편하게 사용할 수 있는 방법의 하나인 PCR-enzyme immunoassay에 대한 모식도이다.

### 임상검체에 적용할 때의 고려사항

아직까지 분자생물학적 방법을 단독으로 사용하기에는 오류를 범할 가능성이 있으므로 전통적인 진균학적 방법과 함께 사용하여 결과를 재확인 하여야 한다. 임상검체에 대한 결과를 판정할 때 다음 사항들을 유의하여야 한다.

**Colonization과 감염의 구분:** *Histoplasma capsulatum*은 강력한 병원성 진균이므로 어떠한 검체에서라도 발견된다면 임상적으로 의의가 있다. 그러나 *C. albicans*는 구강, 질, 대장 등에서 정상적으로 관찰되므로 침습성 병원균과 단순 colonization을 구분하여야 하며,

혈액이나 세침 생검 등의 무균 조작으로 채취한 검체에서 검출되었을 때에만 임상적으로 의의가 있다.

**위음성 반응과 위양성 반응:** 감염 초기, 국소적인 감염, DNA추출이 안된 경우, PCR 억제물질, primer나 probe의 변성, 균종내 다형성 등으로 위음성 반응이 일어날 수 있다. 한편 계통적으로 가까운 균종끼리는 교차반응이 일어날 가능성이 높다. 다른 진균 DNA에 오염되면 위양성 반응이 일어나며 오염된 DNA는 멸균하더라도 파괴되지 않는다.

**중복감염:** 여러 종류의 진균이 중복감염을 일으키는 경우도 있다. 두 가지 이상의 DNA가 동시에 존재할 때 증폭반응이나 보합반응 과정에 경쟁적 억제제로 작용할 가능성이 있다.

**환자의 상태와 항진균제 치료:** 환자의 상태에 따라 균의 검출율에 차이가 많으며 진신적인 항진균제 치료 여부가 검사 결과에 영향을 줄 수 있다(Yamakami 등, 1998).

## 결 론

최근 DNA를 이용한 진균 감염의 진단은 많은 발전을 이루었다. 기존의 진단방법에 비해 최소한 비슷하거나 우수한 결과를 보인다. 그러나 몇가지 문제점으로 아직까지 널리 쓰이지 못하고 있다. 즉 1) 많은 노동력이 필요하고, 2) 비용이 비싸며, 3) 감수성이 기대보다 높지 않다. 감수성이 낮은 이유는 검체에 진균의 수가 적거나, 진균세포에서 DNA를 추출하는 과정이 어렵고, PCR 억제물질들이 존재하기 때문이다. 이러한 단점들을 극복한다면 가까운 장래에 진균감염증의 진단에 PCR을 이용한 방법이 주류를 이룰 것이다.

## 참 고 문 헌

- Ampel NM: Emerging disease issues and fungal pathogens associated with HIV infection. *Emerg Infect Dis* 2: 109-116, 1996.
- Anaissie E, Bodey GP, Kantarjian H, Ro J, Vartivarian SE, Hopfer R, Hoy J, Rolston K: New spectrum of fungal infections in patients with cancer. *Rev Infect Dis* 11(3): 369-378, 1989.
- Andriole VT: *Aspergillus* infections: problems in diagnosis and treatment. *Infect Agents and Dis* 5: 47-54, 1996.
- Bainbridge BW, Spreadbury CL, Scalise FG, Cohen J: Improved methods for the preparation of high molecular weight DNA from large and small scale cultures of filamentous fungi. *FEMS Microbiol Lett* 66: 113-118, 1990.
- Bernal M, Balquero Mezence MI, Provost F, Laurent F, Martinez Machin G, Boiron P: A one-step *Candida albicans* DNA extraction method using Chelex 100 resin suitable for DNA amplification (PCR). *J Mycol Med* 7: 53-54, 1997.
- Bidochka MJ, McDonald MA, St. Leger RJ, Roberts DW: Differentiation of species and strains of entomopathogenic fungi by random amplification of polymorphic DNA (RAPD). *Curr Genet* 25(2): 107-113, 1994.
- Blum U, Windfuhr M, Buitrago-Tellez C, Sigmund G, Herbst EW, Langer M: Invasive pulmonary aspergillosis. MRI, CT, and plain radiographic findings and their contribution for early diagnosis. *Chest* 106(4): 1156-1161, 1994.
- Boom R, Sol CJA, Salimans MMM, Jansen CL, Wertheim Van Dillen PME, Van der Noordaa J: Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J Clin Microbiol* 28: 495-503, 1990.
- Bowman BH: A model PCR/probe system for the identification of fungal pathogens. *In* Persing DH, Smith TF, Tenover FC, White TJ: *Diagnostic molecular microbiology. Principles and applications.* American Society for Microbiology, Washington, DC, 1993, pp 423-430.
- Bruns TD, Gardes M: Molecular tools for the identification of ectomycorrhizal fungi-taxon-specific oligonucleotide probes for suilloid fungi. *Mol Ecol* 2(4): 233-242, 1993.
- Buchman TG, Rossier M, Merz WG, Charache P: Detection of surgical pathogens by in vitro DNA amplification. Part I. Rapid identification of *Candida albicans* by in vitro amplification of a fungus-specific gene. *Surgery* 108(2): 338-346, 1990.
- Burgener-Kairuz P, Zuber JP, Jaunin P, Buchman TG, Bille J, Rossier M: Rapid detection and identification of *Candida albicans* and *Torulopsis (Candida) glabrata* in clinical specimens by species-specific nested PCR amplification of a cytochrome P-450 lanosterol-alpha-demethylase (L1A1) gene fragment. *J Clin Microbiol* 32(8): 1902-1907, 1994.
- Carlotti A, Chaib F, Couble A, Bourgeois N, Blanchard V, Villard J: Rapid identification and fingerprinting of *Candida krusei* by PCR-based amplification of the species-specific repetitive polymorphic sequence CKRS-1. *J Clin Microbiol* 35(6): 1337-1343, 1997.

- Choi JS, Westman JM, Morrison CJ: Rapid Differentiation of Filamentous Fungi Using Species-Specific DNA Probes. In 98rd General Meeting of the American Society for Microbiology, Atlanta, GA, 17-21 May 1998.. American Society for Microbiology, Washington, DC, 1998. p133
- Chryssanthou E, Andersson B, Petrini B, Lofdahl S, Tollemar J: Detection of *Candida albicans* DNA in serum by polymerase chain reaction. Scand J Infect Dis 26(4): 479-485, 1994.
- Crampin AC, Matthews RC: Application of the polymerase chain reaction to the diagnosis of candidosis by amplification of an HSP 90 gene fragment. J Med Microbiol 39(3): 233-238, 1993.
- Denning DW: Therapeutic outcome in invasive aspergillosis. Clin Infect Dis 23: 608-615, 1996.
- Duggal A, Dumas MT, Jeng RS, Hubbes M: Ribosomal variation in six species of *Fusarium*. Mycopathologia 140: 35-49, 1997.
- Einsele H, Hebart H, Roller G, Loffler J, Rothenhofer I, Muller CA, Bowden RA, van Burik J, Engelhard D, Kanz L, Schumacher U: Detection and identification of fungal pathogens in blood by using molecular probes. J Clin Microbiol 35(6): 1353-1360, 1997.
- Elie CM, Lott TJ, Reiss E, Morrison CJ: Rapid identification of *Candida* species with species-specific DNA probes. J Clin Microbiol 36: 3260-3265, 1998.
- Erjavec Z, Brinker M, Apperloo-Renkema HZ, Arends JP, de Vries-Hospers HG, Ruiters MHJ: Applicability of random primer R143 for determination of *Aspergillus fumigatus* DNA. J Med Vet Mycol 35: 399-403, 1997.
- Fisher BD, Armstrong D, Yu B, Gold JWM: Invasive aspergillosis: progress in early diagnosis and treatment. Am J Med 71: 571-577, 1981.
- Flahaut M, Sanglard D, Monod M, Bille J, Rossier M: Rapid detection of *Candida albicans* in clinical samples by DNA amplification of common region from *C. albicans*-secreted aspartic proteinase genes. J Clin Microbiol 36: 395-401, 1998.
- Fredricks DN, Eelman DA: Improved amplification of microbial DNA from blood cultures by removal of the PCR inhibitor sodium polyanetholesulfonate. J Clin Microbiol 36(10): 2810-2816, 1998.
- Fridkin SK, Jarvis WR: Epidemiology of nosocomial fungal infections. Clin Microbiol Rev 9: 499-511, 1996.
- Fujita S, Lasker BA, Lott TJ, Reiss E, Morrison CJ: Microtitration plate enzyme immunoassay to detect PCR-amplified DNA from *Candida* species in blood. J Clin Microbiol 33(4): 962-967, 1995.
- Gardes M, White TJ, Fortin JA, Bruns TD, Taylor JW: Identification of indigenous and introduced symbiotic fungi in ectomycorrhizae by amplification of nuclear and mitochondrial ribosomal DNA. Canadian J Botany 69: 180-190, 1991.
- Gordon MA, Lapa EW, Kane J: Modified

- indirect fluorescent antibody test for aspergillosis. *J Clin Microbiol* 6: 161-165, 1977.
- Haynes KA, Westerneng TJ: Rapid identification of *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* and *C. krusei* by species-specific PCR of large subunit ribosomal DNA. *J Med Microbiol*. 44(5): 390-396, 1996.
- Hendriks LA, Goris J, Neefs Y, van de Peer G, de Wachter R: The nucleotide sequence of the small ribosomal subunit RNA of the yeast *Candida albicans* and the evolutionary position of the fungi among the eukaryotes. *Syst pl Microbiol* 12: 223-229, 1989.
- Herent P, Stynen D, Hernando F, Fruit J, Poulain D: Retrospective evaluation of two latex agglutination tests for detection of circulating antigens during invasive candidosis. *J Clin Microbiol* 30(8): 2158-2164, 1992.
- Holm C, Meeks-Wagner DW, Fangman WL, Botstein D: A rapid efficient method for isolating DNA from yeast. *Gene* 42: 169-173, 1986.
- Holmberg K, Feroze F: Evaluation of an optimized system for random amplified polymorphic DNA (RAPD)-analysis for genotypic mapping of *Candida albicans* strains. *J Clin Lab Anal* 10(2): 59-69, 1996.
- Holmes AR, Lee YC, Cannon RD, Jenkinson HF, Shepherd MG: Yeast-specific DNA probes and their application for the detection of *Candida albicans*. *J Med Microbiol* 37(5): 346-351, 1992.
- Holmes AR, Cannon RD, Shepherd MG, Jenkinson HF: Detection of *Candida albicans* and other yeasts in blood by PCR. *J Clin Microbiol* 32(1): 228-231, 1994.
- Hopfer RL, Walden P, Setterquist S, Highsmith WE: Detection and differentiation of fungi in clinical specimens using polymerase chain reaction (PCR) amplification and restriction enzyme analysis. *J Med Vet Mycol* 31(1): 65-75, 1993.
- Hopfer RL: Use of molecular biological techniques in the diagnostic laboratory for detecting and differentiating fungi. *Arch Med Res* 26: 287-292, 1995.
- Hung CC, Chang SC, Yang PC, Hseigh WC: Invasive pulmonary pseudallescheriasis with direct invasion of the thoracic spine in an immunocompromised patient. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 13: 749-751, 1994.
- Jiang B, Lu JJ, Li B et al: Development of type-specific PCR for typing *Pneumocystis carinii f. sp. Hominis* based on nucleotide sequence variations of internal transcribed spacer regions of rRNA genes. *J Clin Microbiol* 34(12): 3245-3248, 1996.
- Kan VL: Polymerase chain reaction for the diagnosis of candidemia. *J Infect Dis* 168(3): 779-783, 1993.
- Kappe R, Seeliger HP: Serodiagnosis of deep-seated fungal infections. *Curr Topics Med Mycol* 5: 247-280, 1993.
- Kappe R, Schulze-Berge A, Sonntag HG: Evaluation of eight antibody tests and one antigen test for the diagnosis of invasive aspergillosis. *Mycoses* 39: 13-23, 1996a.
- Kappe R, Fauser C, Okeke CN, Maiwald M: Universal fungus-specific primer systems and group-specific hybridization oligonucleotides for 18S rDNA. *Mycoses* 39(1-2): 25-30, 1996b.

- Kitada K, Oka S, Kimura S, Shimada K, Serikawa T, Yamada J, Tsunoo H, Egawa K, Nakamura Y: Detection of *Pneumocystis carinii* sequences by polymerase chain reaction: animal models and clinical application to noninvasive specimens. *J Clin Microbiol* 29(9): 1985-1990, 1991.
- Kremery V Jr, Kunova E, Jesenska Z, Trupl J, Spanik S, Mardiak J, Studena M, et al.: Invasive mold infections in cancer patients: 5 years' experience with *Aspergillus*, *Mucor*, *Fusarium* and *Acremonium* infections. *Support Care Cancer* 4(1): 39-45, 1996.
- Lanfranco L, Wyss P, Marzachi C, Bonfante P: DNA probes for identification of the ectomycorrhizal fungus *Tuber magnatum Pico*. *FEMS Microbiol Lett* 15; 114(3): 245-251, 1993.
- Larone DH: Medically important fungi: A guide to identification. 3rd ed, ASM Press, Washington, D.C., 1995.
- Lee AB, Cooper TA: Improved direct PCR screen for bacterial colonies: Wooden toothpicks inhibit PCR amplification. *Bio Techniques* 18: 225-226, 1995.
- Leigh TR, Kangro HO, Gazzard BG, Jeffries DJ, Collins JV: DNA amplification by the polymerase chain reaction to detect sub-clinical *Pneumocystis carinii* colonization in HIV-positive and HIV-negative male homosexuals with and without respiratory symptoms. *Respir Med* 87(7): 525-529, 1993.
- Li KN, Rouse DI, German TL: PCR primers that allow intergeneric differentiation of *ascomycetes* and their application to *Verticillium spp.* *Appl Environ Microbiol* 60(12): 4324-4331, 1994.
- Lindsley MI: personal communication, 1997.
- Livak K, Flood S, Marmaro J, Guisti W, Deetz K: Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR Methods and Applications* 4: 357-362, 1995.
- Loeffler J, Hebart H, Schumacher U, Reitze H, Einsele H: Comparison of different methods for extraction of DNA of fungal pathogens from cultures and blood. *J Clin Microbiol* 35: 3311-3312, 1997.
- Lott TJ, Kuykendall RJ, Reiss E: Nucleotide sequence analysis of the 5.8S rDNA and adjacent ITS2 region of *Candida albicans* and related species. *Yeast* 9(11): 1199-206, 1993.
- Martino P, Girmenia C: Diagnosis and treatment of invasive fungal infections in cancer patients. *Supportive Care in Cancer* 1: 240-244, 1993.
- Makimura K, Murayama SY, Yamaguchi H: Detection of a wide range of medically important fungi by the polymerase chain reaction. *J Med Microbiol* 40(5): 358-364, 1994.
- Miller WT Jr, Sais GJ, Frank I, Gefter WB, Aronchick JM, Miller WT: Pulmonary aspergillosis in patients with AIDS. Clinical and radiographic correlations. *Chest* 105(1): 37-44, 1994.
- Mitchell TG, White TJ, Taylor JW:

- Comparison of 5.8S ribosomal DNA sequences among the basidiomycetous yeast genera *Cystofilobasidium*, *Filobasidium* and *Filobasidiella*. *J Med Vet Mycol* 30: 207-218, 1992.
- Mitchell TG, Sandin RL, Bowman BH, Meyer W, Merz WG: Molecular mycology: DNA probes and applications of PCR technology. *J Med Vet Mycol* 32 Suppl 1: 351-366, 1994.
- Miyakawa Y, Mabuchi T, Kagaya K, Fukazawa Y: Isolation and characterization of a species-specific DNA fragment for detection of *Candida albicans* by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 30(4): 894-900, 1992.
- Miyakawa Y, Mabuchi T, Fukazawa Y: New method for detection of *Candida albicans* in human blood by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 31(12): 3344-3347, 1993.
- Muramatsu H, Wada C, Kume H, Ohtani H: Detection of *Candida albicans* by PCR. *Rinsho Byori* 42(9): 961-965, 1994.
- Niemiec J, Bowman BH, Young KKY: Sensitive, specific identification of *Pneumocystis carinii* by PCR amplification and microwell detection. In 93rd General Meeting of the American Society for Microbiology, Atlanta, GA, 16-20 May 1993. American Society for Microbiology, Washington, DC, 1993, pp 133.
- Olsson M, Elvin K, Lofdahl S, Linder E: Detection of *Pneumocystis carinii* DNA in sputum and bronchoalveolar lavage samples by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 31(2): 221-226, 1993.
- De Peer YV, Caers A, de Rijk P, de Wachter R: Data base on the structure of small ribosomal subunit RNA. *Nuc Acids Research* 26(1): 179-182, 1998.
- Peng M, Karuppaiyl SM, Mendoza L, Levins TA, Szaniszlo PJ: Use of the polymerase chain reaction to identify coding sequences for chitin synthase isozymes in *Phialophora verrucosa*. *Curr Genet* 27(6): 517-523, 1995.
- Pershing DH: Target selection and optimization of amplification reactions. In Pershing DH, Tenover FC, White TJ: Diagnostic molecular microbiology: Principles and applications. American Society for Microbiology, Washington, DC, 1993, pp 88-104.
- Rand KH, Houck H, Wolff M: Detection of candidemia by polymerase chain reaction. *Mol Cell Probes* 8(3): 215-221, 1994.
- Reddy LV, Kumar A, Kurup VP: Specific amplification of *Aspergillus fumigatus* DNA by polymerase chain reaction. *Mol Cell Probes* 7(2): 121-126, 1993.
- Reiss E, Morrison CJ: Nonculture methods for diagnosis of disseminated candidiasis. *Clin Microbiol Rev* 6(4): 311-323, 1993.
- De Repentigny L, Kaufman L, Cole GT, Fruse D, Latge JP, Matthews RC: Immunodiagnosis of invasive fungal infections. *J Med Vet Mycol* 32 Suppl 1: 239-252, 1994.
- De Rijk P, Caers A, de Peer YV, de Wachter R: Data base on the structure of large ribosomal subunit RNA. *Nuc Acids Research* 26(1): 183-186, 1998.
- Sandhu GS, Kline BC, Stockman L, Roberts GD: Molecular probes for diagnosis of fungal infections. *J Clin Microbiol* 33(11): 2913-2919, 1995.
- Sandhu GS, Aleff RA, Kline BC, da Silva-Lacaz

- C: Molecular detection and identification of *Paracoccidioides brasiliensis*. J Clin Microbiol 35(7): 1894-1896, 1997.
- Sanglard D, Togni G, de Viragh P, Monod M: Disruption of the gene encoding the secreted acid protease (ACP) in the yeast *Candida tropicalis*. FEMS Microbiol Lett 95: 149-156, 1992.
- Sanglard D, Ischer F, Monod M, Bille J: Cloning of *Candida albicans* genes conferring resistance to azole antifungal agents: characterization of CDR2, a new multidrug ABC transporter gene. Microbiology 143: 405-416, 1997.
- Schluger N, Godwin T, Sepkowitz K, Armstrong D, Bernard E, Rifkin M, Cerami A, et al.: Application of DNA amplification to pneumocystosis: presence of serum *Pneumocystis carinii* DNA during human and experimentally induced *Pneumocystis carinii* pneumonia. J Exp Med 176(5): 1327-1333, 1992.
- Shin JH, Nolte FS, Morrison CJ: Rapid identification of *Candida* species in blood cultures by a clinically useful PCR method. J Clin Microbiol. 35(6): 1454-1459, 1997.
- Spreadbury C, Holden D, Aufauvre-Brown A, Bainbridge B, Cohen J: Detection of *Aspergillus fumigatus* by polymerase chain. J Clin Microbiol 31(3): 615-621, 1993.
- Sugita Y, Kanaizuka I, Nakajima H, Ibe M, Yokota S, Matsuyama S: Detection of *Candida albicans* DNA in cerebrospinal fluid. J Med Vet Mycol 31: 353-358, 1993.
- Tang CM, Holden DW, Aufauvre-Brown A, Cohen J: The detection of *Aspergillus spp.* by the polymerase chain reaction and its evaluation in bronchoalveolar lavage fluid. Am Rev Respir Dis 148(5): 1313-1317, 1993.
- Telenti A, Roberts GD: Fungal blood cultures. Eur Clin Microbiol Infect Dis 8: 825-831, 1989.
- Verweij PE, Latge JP, Rijs AJ, Melchers WJ, De Pauw BE, Hoogkamp-Korstanje JA, Meis JF: Comparison of antigen detection and PCR assay using bronchoalveolar lavage fluid for diagnosing invasive pulmonary aspergillosis in patients receiving treatment for hematological malignancies. J Clin Microbiol 33(12): 3150-3153, 1995.
- Wakefield AE, Guiver L, Miller RF, Hopkin JM: DNA amplification on induced sputum samples for diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia. Lancet 337(8754): 1378-1379, 1991.
- Walsh TJ: Management of immunocompromised patients with evidence of an invasive mycosis. Hemat Oncol Clin N Amer 7: 1003-1026, 1993.
- Walsh TJ, De Pauw B, Anaissie E, Martino P: Recent advances in the epidemiology, prevention and treatment of invasive fungal infections in neutropenic patients. J Med Vet Mycol 32 Suppl 1: 33-51, 1994.
- Walsh TJ, Francesconi A, Kasai M, Chanock SJ: PCR and single-strand conformational polymorphism for recognition of medically important opportunistic fungi. J Clin Microbiol. 33(12): 3216-3220, 1995.

- Walsh TJ, Gonzalez C, Lyman CA, Chanock SJ, Pizzo P: Invasive fungal infections in children: recent advances in diagnosis and treatment. *Adv Pediatr Infect Dis* 11: 187-290, 1996.
- Warnock DW: Fungal complications of transplantation: diagnosis, treatment and prevention. *J Antimicrob Chemother* 36 Suppl B: 73-90, 1995.
- Watson JD, Hopkins NH, Roberts JW, Steitz JA, Weiner AM: *Molecular biology of the gene*. 4th ed, Benjamin/Cummings Publishing Co, California, 1987, pp652-653.
- Wedde M, Mueller D, Tintelnot K, de Hoog GS, Stahl U: PCR-based identification of clinically relevant *Pseudallescheria/Scedosporium* strains. *Med Mycol* 36: 61-67, 1998.
- White TJ, Burns T, Lee S, Tayler J: Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *In* Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ: *PCR protocols: A guide to methods and application*. Academic Press, San Diego, 1990, pp 315-322.
- Yamakami Y, Hashimoto A, Yamagata E, Kamberi P, Karashima R, Nagai H, Nasu M: Evaluation of PCR for detection of DNA specific for *Aspergillus* species in sera of patients with various form of pulmonary aspergillosis. *J Clin Microbiol* 36(12): 3619-3623, 1998.
- Young RC, Bennett JE: Invasive aspergillosis: absence of detectable antibody response. *Am Rev Respir Dis* 104: 710-716, 1971.