大韓癩學會誌 : 第44卷, 第1號 2011
Korean Leprosy Bulletin,
Vol. 44, No. 1 December, 2011

한국에서 발견된 나균의 일렬반복수변이에 대한 연구

한국한센복지협회 연구원
김종필

Abstract

VNTR typing studies of Mycobacterium lepare in Korea

Jong-Pill Kim

Institute for Leprosy Research, Korean Hansen Welfare Association

Leprosy is a chronic disease caused by *Mycobacterium leprae* and is characterized by disfiguring bacterial inclusions in the skin, peripheral nerves, and respiratory mucosa. Despite the success of multidrug therapy, leprosy remains prevalent in several developing countries, and in some regions, the incidence of new cases remains relatively unchanged.

Despite of understanding of the fundamental aspects of leprosy, such as transmission patterns, infectivity, and incubation time, the fundamental information about the epidemiology of *M. leprae* remains unknown. Recently the availability of complete *M. leprae* genome sequences has permitted the identification of over 50 potentially useful VNTR loci, from which a panel of 16, the meaningful epidemiological information of was recently characterized in great detail.

So the author has done the investigation of VNTR typing of Mycobacterium

lepare isolated in Korea.

Key word : VNTR, leprosy, Korea

서 론

한센병은 나균(*Mycobacterium leprae*)에 의한 만성 질환이며, 피부, 말초신경 및 호흡기 점막에 세균성 봉입체가 있는 것이 특징이고, 대식세포와 슈반세포에 굴성을 갖는 절대기생생물이며 말초신경에 감염되는 유일한 마이코박테리아이다. 나균은 기형과 장해가 특징적인 피부와 말초신경의 만성육아종성 감염인 한센병을 일으킨다. 복합요법을 이용한 치료의 성공에도 불구하고, 한센병은 여러 개발도상국에 만연한 채로 있고, 일부 지역에서는 새로운 질병의 발생이 거의 변하지 않은 채로 남아 있다[1]. 세계보건기구는 현재 20여만 건 이상이 국제적으로 발병했을 것으로 추산하고 있지만, 병의 피해 및 예방적 측면에서 근거한 가능한 손실을 포함하면 연간 24만 건 이상의 새로운 발병이 추정되고 있다. 이런 계속되는 숫자는 효과적인 복합요법 치료가 한센병의 전염고리를 방해하는데 실패했다는 것을 말해준다. 병원체의 관점에서 정확한 전염 방법과 사람과 사람 사이의 접촉에 대한 잠재적 중요성을 포함하는 나균의 역학적 관점에 대한 기본적인 정보는 알려지지 않은 채 남아 있다[2].

오랫동안의 유행률과 신환자 발견률 사이의 차이는 한센병의 전파 및 잠복기에 대한 지식의 부족에 의한 것으로 평가된다. 한센병의 역학, 감염원, 전파의 정확한 방식, 접촉 방식의 중요성 등에 대한 기본 지식의 부족에 이러한 문제를 해결하는 방법을 지연시키고 있다. DNA 삽입과 삭제, 단일염기변위(single nucleotide polymorphisms, SNP), 단연쇄반복(short tandem repeats, STRs)와 같은 DNA 구조의 다형성에 기초한 박테리아의 유전자형에 대한 최근의 발전은 약제 내성 및 그의 확산은 물론 질병 기원 및 전파에 대한 획기적인 이해를 가능하게 하였고, 이러한 도구는 질병 발생과 관련 전파 양상에 대한 우리의 이해를 강화시켜 주었다[2]. 나균 전체 게놈 시퀀스의 이용은 잠재적 유전자형 분류 도구로 검증해볼 50 여개의 STR 유전자 좌(loci)의 설명에 가능하게 하였다. 이들 STR 유전자의 최소한 반에서 세계 다양한 지역의 인간, 인간이 아닌 영장류, 아르마딜로 등에서 얻은 나균들에서 다형성을 확인할 수 있었다[3-9]. 유전자형 균주의 중요한 면은 지역 및 국제 수준 모두에서 균주 간의 비교를 위해 명확한 절차와 변수를 정립하는 것이다. 이에 대한 연구와 이에 대한 교류를 통하여 나균 DNA 추출물에서 STR 다형성을 평가하기 위한 컨소시엄을 결성하여 임상가 및 연구자의 공동 노력의 결과를 얻었다[10]. 이의 궁극적 목표는 한센병의 전파 양상과 감염원에 대한 이해의 잠재능력으로 다양한 유행지역의 나균의 지역적 분포를 확인하는 나균의 유전자형 분류 도구를 적용하는 것이다. 그 데이터는 독립적으로 보고되었기 때문에 결과

에 대한 포괄적인 분석은 여태까지는 없었고, 최근 기존의 계통발생학적 분석이 이러한 균주 간의 관계를 평가하는데 부족함이 있다는 보고가 있다. 이에 대해 나균 분리주 간의 거의 유사한 집단이나 소집단의 개체들로부터 신뢰성 있게 구분할 수 있는 새로운 2단계 접근법인 구조-이웃 군집법(structure-beighor clustering)이 개발되었다. 이는 접근성의 정확도를 평가하고 분리 균주가 다른 다양한 조건에 90% 이상의 정확도를

* 교신저자 : 김종필
전자우편 : dr_jpkim@hotmail.com
주　　소 : 경기도 의왕시 오전동 산86
한국한센복지협회(031-452-7094)

가지고 적절한 무리나 소무리로 나열되었는가를 찾아내기 위한 시뮬레이션 연구의 자료를 이용하고 있다. 그러나 Bellingham Research Institute의 웹사이트(http://web.me.com/barrygahall/ Leprosy/Database/Database.html)에 저장되어 데이터베이스 내의 분리주 간의 75% 정도의 군집화가 가능하다. 새로운 군집화 알고리즘이 개발되어야 90% 이상의 군집화가 가능하다. 역학적 연구를 위해 연구자가 데이터베이스 내의 분리주와 새로운 분리주와의 관계 만을 빠르게 알기 위해서는 NearestNeighbor 프로그램을 이용한다[11]. 이를 통하여 나균의 전세계적인 집단 구조와 국가 간의 나균의 전파에 대해서도 전체적으로 평가할 수 있게 되었다.

16개의 일렬반복수변이(Variable Number Tandem Repeat, VNTR)의 loci는 여러 나라에서 조사 연구에 사용되고 있고, VNTR 유전자형의 자료를 이용한 나균의 미생물학적 역학의 포괄적 연구가 조사되었다. 이에 연구자는 한국에서 발견된 나균의 VNTR에 대한 조사하여 분리 균주의 기본적 VNTR을 알아보고, 이 자료에 대한 군집화 평가, 분리 균주 간의 관계성 등을 조사하여 보고한다. 자료 분석의 신뢰성을 높이기 위해 임상 분리 균주와 동일 쥐족저 배양균을 함께 조사하였으며, 제한된 시료 양을 한계성을 극복하여 조사에 필요한 시료 양을 확보하기 위해 다중전위 증폭법(Multiple Displacement Amplification, MDA)을 실시하여 조사를 수행하였다.

연구방법

1. 대상

2007년부터 2009년 사이에 한국한센복지협회 연구원을 내원한 한센병 환자(신환 및 재발환자 포함)에서 나균을 분리하여 이를 쥐족저접종법에 의해 나균이 증식되었던 증례 9예, 시료 18개를 이용하였다. 대상 균주의 기초자료는 표(Table 1, Table 2)와 같다.

Table 1. Summary of objects(clinical isolated)

ID	nationality	sex	age	type	etc.
H1	thailand	m	28	LL	new case
H2	Korea	m	70	LL	new case
H3	Korea	m	70	LL	new case
H4	Korea	f	64	LL	new case
H5	Korea	m	58	LL	new case
H6	Korea	f	56	LL	new case
H7	srylanka	m	32	TT	new case
H8	Korea	m	70	BL	relapse case
H9	Korea	f	65	LL	new case

Table 2. Summary of objects(nude mouse isolated)

ID	Generation
M1	H1 2nd
M2	H2 3rd
M3	H3 3rd
M4	H4 1st
M5	H5 1st
M6	H6 3rd
M7	H7 2nd
M8	H8 4th
M9	H9 6th

2. 나균 분리 및 나균 DNA 추출

임상 분리 균주 및 쥐족저접종법에 의해 얻은 균주를 이용하였는데, 쥐족저접종법에 의해 얻은 균주는 나균이 증식된 조직을 Nakamura법[12]의 변형된 방법에 따라 처리하였다. 이에 따라 얻은 나균을 QIAGEN DNA mini-prep kits®을 이용하여 제조사가 지정한 방법을 이용하여 나균 DNA을 얻었는데, 9예에서 각 2개씩의 시료를 준비한다.

3. 다중전위증폭법

제한한 시료의 한계를 극복하기 위해 QIAGEN®사의 REPLI-g® Mini Kits을 사용하여 제작사가 권장하는 방법에 따라 MDA를 시행한다. 요약하면 DNA 시료에 Denaturation sloution을 섞은 후 3분간 상온에서 방치한 후 Neutralization buffer을 첨가하여 섞은 후 REPLI-g master mix를 첨가하여 30°C에서 16시간(REPLI-g® Mini Kits) 방치하여 증폭을 시킨다.

4. 중합효소연쇄반응(PCR)에 기초한 증폭검사 및 시퀀싱

MDA의 결과를 확인하기 위해서 나균의 RLEP을 대상으로 하여 중합효소연쇄반응(r1-r4/시발체; R1: CGGGTAGGGGCGTTTTAGT, R2: CTAGAAGGTGCCGTATGTG, R3: GCGTTTAGTGTGCATGTCA, R4: GGATCATCGATGCACTGTT)[13]을 실시한다. 그 결과에 따라 Gillis 등[2]에 의한 방법에 따라 16종의 VNTR loci에 대한 중합효소연쇄반응을 실시한다. 16종의 VNTR loci에 대한 시발체에 이용하여 2.5ul PCR Mastermix(10X Amplitag GOLD, Applied Biosystems, USA), 2.5ul MgCl2 (stock concentration 25mM), 시발체 각각1.25ul (stock concentration 25mM), 시료 5ul을 첨가하여 최종량 25ul로 하여 95°C 5분 초기 변성 후 94°C, 60°C(locus 18-8; 65°C), 72°C 각 15초, 15초, 30초씩 40회 반복 후 72°C에서 7분 간 신장하는 과정을 통하여 증폭하였으며, 최종산물을 전기영동에 의해 확인한 후 BIONICS®사에 시퀀싱을 의뢰하여 결과를 확인한다. 시퀀싱 결과 불충분한 결과를 얻지 못한 경우에는 중합효소연쇄반응을 재차 실시하는데, 이때는 동일한 시발체를 이용하여 Qiagen사의 multiplex-PCR kit를 사용하여 10ul PCR Mastermix (2X Qiagen multiplex-PCR, Qiagen, USA), 2.0ul Q solution, 시발체 각각 1ul(stock concentration 25mM), 시료 2ul을 첨가하여 최종량 20ul로 하여 동일한 과정의 중합효소연쇄반응 하여 최종산물을 전기영동에 의해 확인한 후 BIONICS사에 시퀀싱을 의뢰하여 결과를 확인한다. 16종의 VNTR loci에 대한 사용한 시발체는 Table 3과 같다.

Table 3. Short tandem repeat loci and the primer pairs (forward and reverse) required for PCR amplification and sequencing[2)]

Locus	Forward Primer			Reverse Primer			Total length
	No.	Sequence	Tm	No.	Sequence	Tm	
AC8a	F1	GTGTTACGCGGAACCAGGCA	65.5	R1	CCATCTGTTGGTACTACTGA	53.5	124
AC8b	F2	GATGCGACTATCACTCGCACGCAGTT	68.0	R3	GCTGGTTTCCTTCTAGTCCC	60.1	140
AC9	F2	GCCTGGTGCCCGGACAATGC	69.2	R2	ACATCACACTGATCTCGCCGGCGCT	71.4	145
TA10	F1	TAGATTCAAACGACCATGCA	57.2	R1	TGATAATCACGTGTTTCCGC	58.4	185
AT15	F1	GATCAATATGCGGGTTGGCG	61.8	R1	AGCAAGCAGGTCCAGCAGTG	65.4	199
AT17	F2	GACACACTCGATCTCAGTAG	56.8	R1	TTAGCAGGACGATTGTACAG	57.0	180
TA18	F2	CCGCTAGCAGTCAGCATCGA	64.5	R2	CCCGACTCGCCGAAGCGAAAC	68.0	142
GTA9	F4	CGCAGATGCAACGATCAC	59.3	R4	AATATGCATGCCGGTGGT	60.0	122
GAA21	F1	CTACAGGGGGCACTTAGCTC	62.1	R2	GGACCTAAACCATCCCGTTTT	60.4	201
GGT5	F2	TCACCATCGACGCTCCGGGT	68.4	R1	TCGGCCTGGTTGTCTGCCTT	66.8	161
6-7	F2	CTACTTGCGCGCCACCGCCA	70.6	R2	GCCGTCGCCAGGTTTTGCAG	67.2	191
12-5	F1	CTGGTCCACTTGCGGTACGAC	65.1	R1	GGAGAAGGAGGCCGAATACA	61.4	289
18-8	F1	GCCCGTCTATCCGCATCAA	62.5	R1	GCAAAGATCAGCACGCCAAT	61.8	348
21-3	F2	TGTTGAAATTTGGCGGCCAT	61.5	R3	TGCAAGGAGTGCTCAGCTAT	61.5	180
23-3	F3	CAGTCGCCCGGATACTGTTA	61.5	R2	TAAATCCGCTCCCAAATCTT	57.1	190
27-5	F2	GTGCTGTGCCTGCAGCCGTT	68.8	R2	TCCCCAAAGCCGCCGAATCC	67.9	270

5. 데이터베이스화 및 자료 처리

1) 데이터베이스화

16종의 VNTR loci에 대한 중합효소연쇄반응의 결과물을 시퀀싱을 의뢰하여 결과를 확인한 후, 데이터베이스화를 실시하는데, 데이터베이스는 Microsoft Excel spreadsheet에 나균의VNTR 특성은 각 분리주의 이름(ID), 근원 국가, 14개의 VNTR 반복수 등으로 구성되도록 한다. Structure-neighbor clustering 및 NearestNeighbor을 실시하기 위해 Microsoft Excel spreadsheet의 자료를 일반 text파일로 변환하여 준비한다.

2) Structure-neighbor clustering

구조-이웃 군집 확인을 위해 MOS용 structure(Bayesian population structure inference program) 프로그램을 이용하여 VNTR 양상에 따라 집단 균주를 파악한다. 과거 연구와 사용서에 제한된 것을 참고하여 실시한다. 시뮬레이션에 어떤 재조합를 포함하지 않기 때문에 비혼합물 모델이 시뮬레이션 데이터에 사용된다. 나균 집단 내의 재조합의 증거가 없고, 데이터의 로그 가능성 (lnL)은 혼합물 모델보다 비혼합물 모델이 높게 나타나서 나균 자료을 위해 비혼합물 모델이 사용한다. 각 실행은 30,000 세대를 포함하는 in-burn과 in-burn 후 100,000 세대에 걸쳐 진행한다. 이후 구조-이웃 군집법에 대한 프로그램의 실행은 스크립트 RunStructure에 의해 중재된다. 분석 이전 40% 이상 누락된 데이터를 포함하는 분리주는 스크립트가 제외된다. 그리고 고려해야 할 클러스터의 최대 개수 (K)를 지정한다. RunStructure 프로그램은 점차적으로 1에서 사용자가 선택한 최대값에 이르기까지 K의 값을 각 실행은 클러스터의 수를 주어진 데이터의 로그 가능성을 고려에 대한 프로그램을 실행한다. RunStructure 프로그램은 이후의 모든 작업을 실행하는 클러스터와 사용의 가장 큰 숫자에 해당하는 가장 높은 로그 가능성을 실현 K 중 어떤 가치를 결정한다. 프로그램은 K의 집단의 각각에 속하는 각 개인의 사후 확률에 대해 표시한다. 클러스터에서 각개를 할당하기 위해 RunStructure 프로그램은 개인의 가능성이 가장 높은 집단에 속해있는 사후 확률이 ≥ 0.8 있어야 한다, 그렇지 않으면 개인은 클러스터에 할당되지 않으며 것으로 보고 있다. 클러스터를 해제한 RunStructure 프로그램은 각 클러스터의 클러스터를 해제한 및 설정하고 각 그것은 할당된 클러스터에 속해있는 가능성에 대한 보고서의 구성을 나열하는 요약 파일을 생성한다.

3) NearestNeighbor

역학적 연구를 위해 연구자가 데이터베이스 내의 분리주와 새로운 분리주와의 관계를 빠르게 알기 위해서는 NearestNeighbor 프로그램을 이용한다. 이 프로그램은 Bellingham Research Institute의 웹사이트(http://web.me.com/barrygahall/Software/Software.html)에서 다운 받아 실시하였다. 관계가 확인된 후에 MOS용 GraphViz(version 2.24)를 이용하여 도포화한다.

연구결과

나균의 VNTR 실험을 위한 나균 DNA 분리(임상균주 및 이에 대한 쥐족저 배양균: 각각 10종)하여 나균의 RLEP을 대상으로 하여 중합효소연쇄반응(r1-r4)을 실시하여 임상균주 및 이에 대한 쥐족저 배양균 각각 9종에서 나균 DNA 분리 결과를 확인하였다. 그 후 Qiagen REPLI-g kit를 이용하여 제조사가 지정한 방법을 이용하여 등온 다변환 증폭을 실시하여 DNA 증폭을 중합효소연쇄반응을 통해 확인하였는데, 대

상 중 1예에서 등온 다변환 증폭이 실패하여 실험에서 제외하고(Fig 1) 다음 과정을 실시하였다.

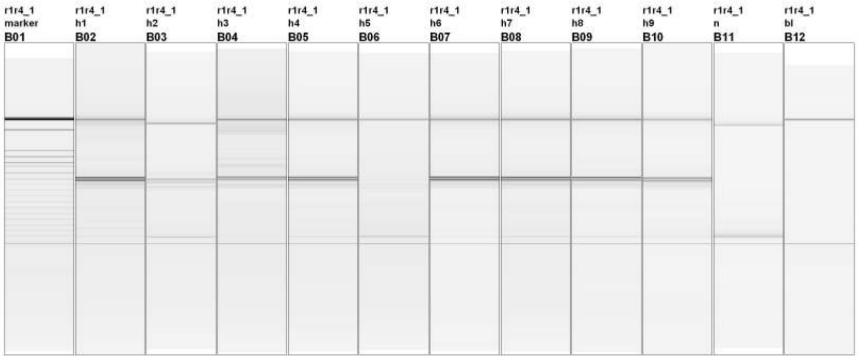

Fig 1. Results of Isothermic multiple-displacement amplification of Genomic DNA

VNTR을 확인하기 위해 16종의 시발체를 이용하여 중합효소연쇄반응 및 시퀀싱을 통해 변이를 평가하였는데, Appiled Biosystems사의 Amplitag Gold kit를 사용한 첫 중합효소연쇄반응에서 11종의 시발체에서는 시퀀싱 상 의미 있는 결과가 보였으나, 5종(at15, at17, ta10, 18-8, 27-5)에서는 의미 있는 결과를 얻지 못하였다. 이에 대해서는 Qiagen사의 multiplex-PCR kit를 사용하여 재검사를 실시하였다. 그 결과는 Table 4와 같다.

Table 4-1. Results of variable-number tandem repeats(1)

case	ID	AC8a	AC8b	AC9	TA10	AT15	AT17	TA18	GTA9
case1	M1	10	7	7	10	12	15	fail	fail
	H1	10	7	7	10	12	15	14	8
case2	M2	7	6	7	10	fail	17	fail	fail
	H2	7	6	7	10	16	17	14	14
case3	M3	7	8	7	14	fail	13	fail	14
	H3	7	8	7	14	fail	13	14	13
case4	M4	7	8	7	14	fail	7	13	13
	H4	7	8	7	14	fail	7	14	11
case5	M5				not done				
	H5				not done				
case6	M6	7	8	7	13	fail	14	19	15
	H6	7	8	7	13	13	14	19	15
case7	M7	10	7	9	fail	fail	7	11	10
	H7	10	7	9	14	13f	7	11	10
case8	M8				13	15f	15	fail	fail
	H8	7	8	7	13	fail	15	15	12
case9	M9	fail	fail	fail	11	15	14	fail	fail
	H9	6	8	7	11	15	14	16	11

Table 4-2. Results of variable-number tandem repeats(2)

case	ID	GAA21	GGT5	6-7	12-5	18-8	21-3	23-3	27-5
case1	M1	fail	fail	fail	fail	8	3	2	5
	H1	11	fail	fail	fail	8	3	2	5
case2	M2	fail	fail	fail	fail	7	fail	2	5
	H2	12	fail	fail	3	7	2	2	5
case3	M3	fail	fail	fail	fail	7	2	2	5
	H3	11	fail	fail	fail	7	2	2	5
case4	M4	12	4	7	3	7	2	2	5
	H4	12	4	7	3	7	2	2	5
case5	M5	not done							
	H5	not done							
case6	M6	11	4	6	3	7	2	2	5
	H6	11	4	6	3	7	2	2	5
case7	M7	fail	fail	fail	fail	8	fail	2	5
	H7	16	5	6	4	8	3	2	5
case8	M8	fail	fail	fail	fail	7	fail	fail	5
	H8	11	4	6	3	7	2	2	5
case9	M9	fail	fail	fail	fail	7	fail	fail	5
	H9	12	4	7	3	7	2	2	5

구조-이웃 군집 확인을 위해 MOS용 structure(Bayesian population structure inference program) 프로그램을 이용하여 VNTR 양상에 따라 집단 균주를 파악하였다. 먼저 자료의 추정 log-normal probability (Ln Prob) 결과(Table 5)에 따라 두 군집(K=2)으로 평가하였다. 그 결과에 따라 두군집으로 나누었을 때 군집1에는 H1 및 H7이, 군집2에는 H2, H3, H4, H6, H8, H9을 포함하는 것으로 확인되었으며(Fig 2, Fig 3), 두 군집의 추론 군집은 0.251, 0.749로, 집단 간의 대립형질 빈도의 불일치도는 각각 0.1703, 0.1703으로, 같은 군집 내에서의 개체간의 기대 이형집합성인 평균 간격은 군집1에서 0.4855, 군집2에서 0.3970으로 확인되었다. 각 개체의 추론 개통 결과는 Table 6과 같다.

Table 5. Results of Estimated Ln Prob of Data

	K=1	K=2	K=3	K=4	K=5	K=6	K=7	K=8
Estimated Ln Prob of Data	-103.6	-82	-83.8	-85	-85.7	-86.7	-87.2	-87.7

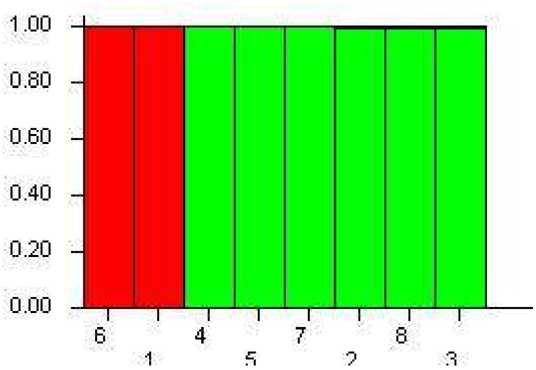

Fig 2. Figure of Bar plot

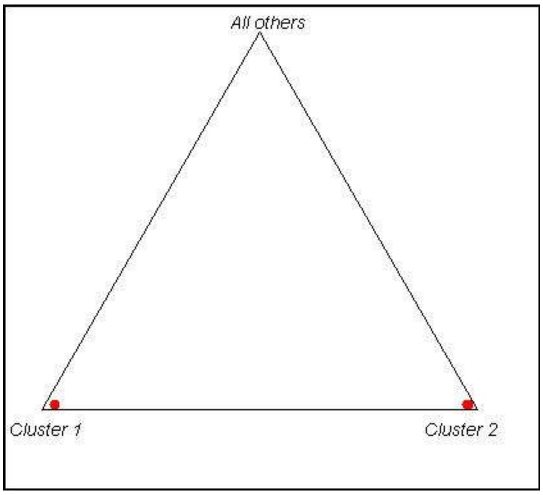

Fig 3. Figure triangle plot

Table 6. Results of Inferred ancestry of individuals

Label	(%Miss)	Inferred clusters	
		1	2
H1	(20)	0.999	0.001
H2	(13)	0.002	0.998
H3	(13)	0.005	0.995
H4	(0)	0.000	1.000
H6	(0)	0.000	1.000
H7	(0)	1.000	0.000
H8	(0)	0.000	1.000
H9	(0)	0.002	0.998

NearestNeighbor 프로그램을 이용한 데이터베이스 내의 분리주와 새로운 분리주와의 관계를 확인하여 H1:H9(1.45454545454545), H1:H8(1.45454545454545), H2:H8(0.666666666666667), H2:H6(0.666666666666667), H3:H6(0.333333333333333), H4:H8 (0.5) H4:H3(0.5), H7: H1 (1.90909090909091), H8:H6(0.357142857142857), H9:H8(0.5)로 확인되었으며, 관계가 확인된 후에 MOS-용 GraphViz(version 2.24)를 이용하여 도포화 결과는 Fig 4와 같다.

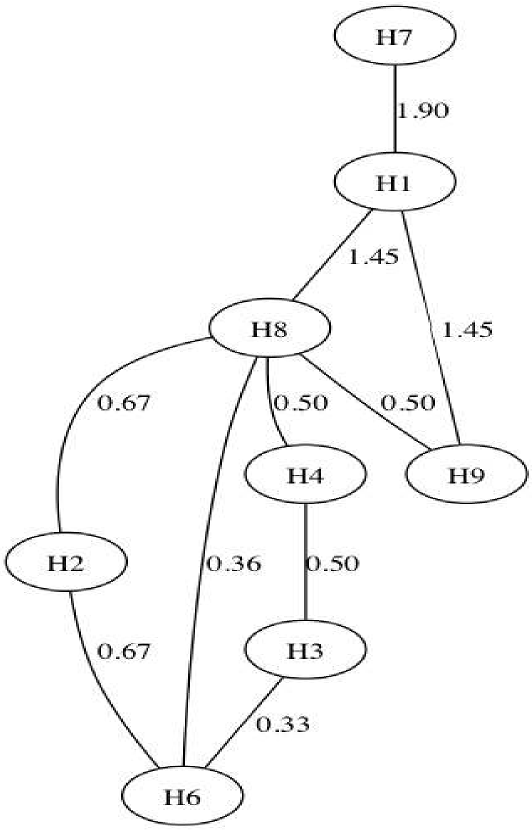

Fig 6. Figure of nearest neighbors

고찰 및 결론

한센병 전파에 대한 잘못된 이해는 나균이 병원균으로서는 1873년 한센에 의해서 발견되었음에도 불구하고[14] 한센병을 퇴치를 어렵게 해왔다. 또한 항생제 치료의 유용성에도 불구하고, 매년 수십만 명의 신환자가 확인되고 있는데 이는 항생제에 기반을 둔 한센병 퇴치전략[9] 환경 내에서도 지속적인 전파가 일어나고 있다는 것을 의미한다. 그래서 한센병 전파 역동을 이해하는 것은 한센병 박멸을 목적으로 하는 새로운 전략 수립에 필수적이다.

전 세계적인 나균의 이동 추정에 대한 기초 및 대륙 수준의 분포를 도표화를 가능하게 한 SNP 차이에 기초한 분류에 나균 TN 균주 전체 게놈 및 소수의 다른 균주의 부분적 게놈의 염기서열이 기여하였다[16]. 또한 나균 TN균주의 완전한 염기 배열의 완성은 분자생물학적 유전자형을 위한 잠재전 VNTR의 구별을 위한 Groathhoust 연구팀[3]에 의해서 사용된 공공재로써 역할을 해온 한센병 연구의 돌파구가 될 것이다. 연쇄반복 염기서열은 보통 satellites(이질염색질과 관련된 많은 염기의 DNA), ministelites (반복되는 염기의 범위가 6~100bp), microsatellites (반복되는 염기의 범위가 1~5bp)로 구별된다[17,18]. microsatellite와 minisatellite loci 둘 다 다형성 loci를 한센병 역학을 위한 분자생물학적 유전자형 분류의 도구로서 사용될 수 있는 물질이라고 증명하기 위한 연구가 있었다. 안정성과 재현성을 시험 받아온 강력한 분별능력을 가진 microsatellite loci는 나균의 유전적 다양성에 대한 가장 그럴듯하고 신뢰성 있는 위치였다[8]. 나균 게놈에서 확인된 50개 이상의 STR 중에서 2 또는 3개의 뉴클레오티드의, ministelites, microsatellites, 및 5개 이상의 반복 뉴클레오티드가 선정되었다[3,8].

한센병 감염의 가장 기본적인 역학을 이해하는 것은 유전적 다양성을 충분하게 밝혀낼 수 있는 비교적 비싸지 않은 분자생물학적 분리주 유전자형 분류 방법의 부재로 어려움이 있었으나, 분리주 간의 관계를 충분한 신뢰성과 정확성을 가진 평가 방법을 통하여 가능하게 되었다[11]. 나균 분리주에서 16개의 VNTR의 loci를 이용하여 분류할 수 있는 방법이 비교적 비싸지 않은 분자생물학적 분리주 유전자형 분류 방법의 전제를 충족시킨다[2]. SNP에 의한 분류에 비해 VNTR의 loci를 이용하는 분류가 나균의 역학연구에 우월한 이유는 여러 가지 있다. 첫째로 VNTR의 loci는 같은 숫자의 SNP를 이용한 실험보다 더 유전적인 다양성을 보이고 있다. 예를 들면 Monet등[19]은 84개의 SNP를 이용한 400개의 나균 분리주 연구에서 단지 16개 만의 SNP 유전자형을 찾아낸 반면 Hall등[11]은 456개체에서 417개의 고유의 VNTR 유전자형을 발견했다. VNTR에서는 locus당 평균 9.5

개의 대립유전자를 가지고 있는 반면 SNP에서는 site당 2개 이상의 대립유전자를 가진 것이 없는 결과는 VNTR에서 더 높은 해상력을 보여준다. 두번째로 locus당 가능한 대립유전자의 수가 또다른 SNP와 VNTR의 구분점이다. Hall연구[11]에 의하면 VNTR에서는 locus당 평균 9.5개의 대립유전자를 보였지만, SNP에서는 2개 이상의 대립유전자를 갖는 것이 없고 최대가 단지 4개의 대립유전자를 가지고 있을 뿐이다. 이러한 이유로 VNTR을 이용하여 유전자형을 분류하는 것이 분리주를 분류 감별하기가 더 쉽다. 또한 비용 측면에서도 전체 VNTR에 따른 분류하는 비용이 84개의 SNP loci를 증폭하여 시퀜싱하는 비용보다 약 6.5배 낮다. 이 비용의 차이는 한센병이 유병지역에서 더욱더 중요한 의미를 갖는다.

종들 간에 진화적 연관성에 대한 연구인 계통발생학적 분석은 어떻게 박테리아종들이 유사한 가계로 서로 관련 지어 졌는지를 아는데 일반적으로 사용되어 왔다[20,21]. 비록 그런 분석이 무언가를 알려줄지라도 계통발생학적 재구성은 각 분리주들을 구별하는 유전적 다양성이 적을 때 적합하지 않거나 잘못될 수 있다[22,23]. 처음의 나균에 대한 계통 발생학적 분석1,[24]은 의미 있는 혹은 신뢰 있는 방법으로 분리균들 간의 관계를 알기 위한 VNTR loci에 유전적 다형성이 부족하였다. 이 발견을 고려해볼 때 만약 그러한 평가를 위한 척도가 높은 수준의 신뢰를 주지 못한다면 발표된 나균의 계통발생론으로부터의 추리를 전개할 때 주의하여야 한다. 나균 관련 업무 시에 걸리는 실질적인 제약들 때문에 더 많은 VNTR loci가 확실하게 가까운 미래에 사용 가능하게 되지는 않을 것 같고 따라서 그러한 관계를 평가하는데 필요한 계통발생학적 분석의 대체방안이 필요 시 되고 있다[11].

제한된 VNTR loci로부터 관련성을 알기 위한 계통발색학적 분석의 대체 방법인 Eburst[22]이 제안되어왔고 이전부터 나균의 연구[25]에 이 접근법 사용이 제안되어왔다. 불행하게도 eBurst는 데이터의 어느 loci라고 소실되는 경우 자료로 적용할 수 없다. Hall 등[11]연구에 의하면 가능한 나균 개체에서 461개의 VNTR 중 단지 178개에만 전체 16개 loci 데이터를 얻어낼 수 있었고, eBURST는 개체들 간의 관계를 설정하기 위해 다름아닌 단 하나의 locus만 달라야 하는데 이런 경우는 나균 개체에서 극히 소수이다. 그래서 eBurst의 제약들은 나균 분리균들 사이의 관계를 평가는 도구로서는 비실용적이게 만든다.

유전학적으로 유사한 개체들을 집단과 소집단으로 뭉치게 하는 것이 가능하다는 더 일반적인 접근을 Hall 등[11]이 개발하였다. 이 접근을 구조-이웃 군집법(structure-neighbor clustering) 이라고 부른다. 이 접근은 두 나눠진 단계를 필요로 한다. 첫 단계에서는

분리균을 Structure population structure inference program[26]을 사용하여 유전적으로 유사한 개체들을 큰 숫자로 모아둔다. 그리고 두번째 단계에서는 nearest-neighbor networks에 기초하여 각 그룹을 하나씩 소그룹으로 만든다. 관계를 아는 것이 가능한 모의 데이터를 사용하였고 그룹으로 신뢰성 있게 모인 개체들의 일부분이 그들과 적게는 유실된 데이터의 평균치 사이의 유전적 거리의 기능을 한다는 사실을 알아냈다. 분리 균주를 조사하는 조건에서 74% 혹은 그 이상의 분리균들이 성공적으로 그룹으로 모였다. 같은 데이터를 이용한 neighbor-joining phylogenetic reconstructions의 정확도가 73%였던 반면에 각 개체를 집단과 더 나아가서 소집단으로 나누는 것의 정확도는 다양한 조건에서도 평균 95%였다. 소실된 데이터를 포함하는 것이 집단으로 들어올 수 이었던 개체들의 수를 감소시키지만 집단 지어질 수 없는 개체들에 의해서 정확도가 영향을 받지 않는다는 것을 찾아냈다[11]. 구조-이웃 군집법은 작지만 더 신뢰할 수 있는 개체의 구조에 대한 추론을 데이터로부터 만들어 내기 때문에 계통발생학적 분석을 능가한다. 계통발생학적 분석은 가상의 일반적 가계로부터 나온 자료에서 각 개체의 가계의 질서를 알아내기 위한 시도를 한다. 반면에 구조-이웃 군집법은 그저 분리균주들을 공통의 조상으로부터 어떻게 내려왔는지를 알아내기 위한 노력 없이 가장 유사한 유전자형들을 같은 그룹에 배치한다. 물론 어떠한 그룹이라도 공통의 조상으로부터 이어져온 결과물들이 어떤 그룹과도 관련성이 있다는 것을 가정하지만 우리의 접근은 그 조상들을 모른다. 따라서 소집단간의 관계의 점집합론적 방법을 통한 가계의 순서에 대한 어떠한 추론도 있어서는 안된다고 경고한다. 구조-이웃 군집법의 안정성에 기여하는 두번째 요소는 계통발생학적 분석에서는 시행하는 주어진 모든 개체들을 각각 분석을 하려 하지 않는다는 것이다. 대신에 결과인 개인 간의 집단에서의 신뢰도의 최소 평균과 마찬가지로 각 개체로부터 나오는 자료의 손실의 최대량을 필요로 한다. 구조-이웃 군집법은 역학적 목적을 위해서 계통발생학적 분석보다 더 적은 추론을 제공한다. 그러나 대부분의 가장 역학적인 목적을 위해서 주어진 구조-이웃 군집은 어떤 개체들이 밀접하게 관련되어있는지 공통의 조상으로부터 온 정확한 가계의 순서를 걱정하지 않고도 알아내는데 충분하다. 계통발생학적 방법이 부정확하고 잘못된 결과를 포함하는 추가적인 정보를 주는 반면에 구조-이웃 군집법은 신뢰성과 정확성에서 그 요구를 충족한다. 비록 구조-이웃 군집법 접근이 모든 분리균주의 관계를 평가할 수 없지만 집단들간의 관계를 높은 신뢰도를 가지고 평가할 수 있다. 또한 더 많은 개체가 가능한 자료에 추가되면 더 신뢰도 있는 연결이 나타나고 구조-이웃 군집법 접근의 효율성이 현재의 77%를 넘어서 더 올라갈 수 있다. 추가적으로 이후의 진보는

정확성과 해상도를 증가시킬 지도 모른다. Structure 프로그램은 최근에 VNTR 대립유전자가 같은 길이나 혹은 다른 길이를 가지고 있을 것이라고 여겨지고 있다[27]. VNTR loci는 돌연변이가 되는 경향이 있어서 Structure 프로그램의 이진법 적인 데이터 처리법은 염기반복의 수가 유사한 대립유전자가 염기반복의 숫자의 차이가 있다고 알려진 대립유전자보다 유전적으로 유사하다는 것을 사실을 무시한다. 따라서 Structure 프로그램에서 나열된 형질의 수치의 포함은 현재는 연구에서는 초점에서 벗어나 있지만 미래의 분석을 향상 시켜 줄 것이다. 구조-이웃 군집법에 의한 분석에서 질적 문제는 분석에 사용 되는 자료의 질에 달렸다는 것은 분명하고, Hall등[11]은 모든 나균 연구자들이 신뢰할 수 14개의 VNTR loci만을 적용하고 Gillis 등[8]에 의해 만들어진 적절한 질적 검사를 사용하라고 권장하고 있다. 또한 비록 locus 18-8은 신뢰성 있지만 분리균주 종들의 국제적 기준의 군집 평가를 어렵게 만들 수 있다고 하였고, 하나의 나라나 지역에 국한되는 좀 더 지역적인 비교에서 개체 해상도에 긍정적으로 공헌할 수도 있다고 했다. 미래의 연구는 그 문제들을 특별하게 다루고 있고 더 나아가서 설정된 자료에서의 추론을 위한 가장 좋은 loci를 어떻게 선택하여야 하는 지를 고려하여야 한다. 더 나아가서 나균의 분자역학의 가치는 그 자료들 가운데서 접점을 만들 수 있는 능력이 증가하고 있는 개체들의 수가 증가함에 따라 늘어나고 있다. 이를 위해 연구단체들은 대학이나 다른 기관에서 개발되고 만들어진 나균 VNTR 자료들에 대한 공식적 데이터베이스화가 가능할 것이다[11].

나균 VNTR 데이터베이스 사업은 최근 시작되었다. 데이터베이스는 Microsoft Excel spreadsheet에 나균의VNTR 특성은 각 분리주의 이름(ID), 근원 국가, 14개의 VNTR 반복수 등으로 구성되어 있고, 이는 Bellingham Research Institute의 웹사이트(http://web.me.com/ barrygahall/Leprosy/Database/Database.html)에 저장되어 있다. 분리주 간의 관계성은 Structure-neighbor(구조-이웃)법에 의해서 산출할 수 있다. 이 방법은 바람직할 만큼 효율적이지 못한데, 현재 데이터베이스 내로 분리주 간의 75% 정도의 군집화가 가능하다. 새로운 군집화 알고리즘이 개발되어야 90% 이상의 군집화가 가능하다. 역학적 연구를 위해 연구자가 데이터베이스 내의 분리주와 새로운 분리주와의 관계를 빠르게 알기 위해서는 Nearest Neighbor 프로그램을 이용한다. 이 프로그램은 Bellingham Research Institute의 웹사이트(http://web.me.com/barrygahall/Software/Software.html)에 저장되어 있다[28].

본 연구에서 구조-이웃 군집법을 위한 Structure 프로그램 수행 결과, 대상 8예에서 두 군집(군집1: H1 및 H7, 군집2:

H2, H3, H4, H6, H8, H9)으로 확인할 수 있었는데, 이는 NearestNeighbor 프로그램에 의한 결과에서 분리주와 분리주와의 관계(거리)를 확인한 결과 H1 및 H7, H1 및 H8, H1 및 H9 간의 거리가 나머지 간의 거리에 비해 2배 이상 먼 것으로 나와 구조-이웃 군집법의 결과와 유사함이 확인되었다. 특히 H1 및 H7은 다른 대상과 달리 국내에 체류하는 외국인(H1: 태국, H7: 스리랑카)로서 국내에서 발견되고 있는 한센병 발생의 역학적 의미를 주고 있다. 이는 한센병 역학의 해석에 도움을 주는 것으로 사료된다. 향후 이에 대한 좀 더 많은 증례에 대한 조사가 시행된다면, 한센병의 전파에 관련되는 귀중한 정보를 도출할 수 있을 것으로 사료된다.

다중변위증폭법 (multiple displacement amplification, MDA)[29,30]은 임위 시발체가 전체 주형 DNA을 대상으로 사용된다. 반응성이 뛰어나고, 강력한 성분변위성을 갖는 Bacillus subtilis bacteriophage Phi 29에서 유래된 Phi 29 DNA 중합효소가 사용된다[31]. 이 중합효소는 시발체 주형에 결합하여 평균 70000개의 뉴클레오티드를 붙이는데[32], 이는 중합효소가 동시에 먼저 확장된 산물이 변위하는 동안 새로운 시발체가 확장하면서 같은 주형에서 여러 번 복사하는 하는 특성에 의한다. 다중변위증폭법에 의해 증폭된 시료를 사용한 DNA 시켄싱에서의 기본적인 오류는 증폭하지 않은 주형에 비해 크게 구분할 수 없었고, 일부 시켄스의 소실이 MDA 중 발생하였으나, 99.8%의 게놈이 존재하며[33,34], 매우 적은 량의 주형 사용은 보다 높은 증폭을 가능케 하지만, 높은 증폭 오류를 야기한다고 한다[35]. 그러나 보고에 의하면 여러 증폭법 중 가장 낮은 오류를 보인다고 한다[36]. MDA은 DNA 시료의 준비와 증폭을 위한 간편한 방법으로 많이 사용되고 있다. 유전자형 분석 부분에서 다양하게 사용되고 있다[36-41]. 한센병 환자의 피부에서 분리한 나균을 게놈 분석을 위해 MDA으로 증폭하였다. 나종형 한센병 환자의 조직에서 분리된 시료를 사용하여, 증폭 정확도, 게놈 회복 정도, 국소 증폭 편중을 평가했다. 증폭된 유전자 물질의 충실도는 변하지 않았고, 비교 미세배열 분석을 통한 전체 증폭 효율성에서 국소적 차이는 증폭된 게놈 DNA의 높은 일치 정도가 관찰되었다. 또 한센병 환자에서 얻은 보관된 조직에 대한 짧은 염기서열 반복에 의한 분자 유형 분류를 목적을 위해 이 방법을 적용하였는데, 그 결과 오류 발생 없이 성공률은 25%에서 92%로 증가되었다고 보고가 있고42), REPLI-g® Mini Kit 및 REPLI-g® Ultrafast Mini Kit을 통한 증폭 실험에서 모두에서 통계적 의의를 보였고, 진단, 역학, 약제 내성에 대한 다양한 과정의 나균 DNA의 중합효소연쇄반응 모두에서 전기영동 상 증폭양상이 관찰되었으나, 시켄싱에 경우에서는 그 판독이 어려움이 있었다는 보고가 있다[43].

본 연구에서 제한된 시료 양을 한계성을 극복하여 조사에 필요한 시료 양을 확보하기 위해 다중전위 증폭법을 실시하여 조사를 수행하였는데, Qiagen REPLI-g kit를 이용하여 제조사가 지정한 방법을 이용하여 등온 다변환 증폭을 실시하여 DNA 증폭을 중합효소연쇄반응을 통해 확인하였는데, 대상 중 1예에서 등온 다변환 증폭이 실패하여 이후 실험에서 제외 되었고, 2차례 각기 다른 제품으로 중합효소연쇄반응 후 시퀀싱을 실시한 결과 75.8%(쥐족저 분리 균주; 60.9%, 임상 분리 균주; 90.6%)로 이는 과거 중합효소연쇄반응 모두에서 전기영동상 증폭양상이 관찰되었으나, 시퀀싱에 경우에서는 그 판독이 어려움이 있었다는 보고와 같은 결과로 사료되었다. 특히 예상과 다르게 등온 다변환 증폭 실시 전 보다 높은 농도로 사료되는 쥐족저 분리 균주에서 성공률이 낮게 나온 것에 대한 이유에 대해서는 향 후 이에 대한 연구가 필요할 것으로 사료된다. 본 실험과정에서 DNA 농도를 각 단계 별로 실시하지 못하여 이에 대한 평가를 하지 못하였는데, 한센병 분자생물학적 연구에서 봉착하는 충분한 시료 확보라는 관점에서 향후 이에 대한 좀 더 체계적인 검토가 있어야 할 것으로 사료된다.

분자생물학적 유형 체계는 빠른 기술의 진보를 겪고 있다. 아종의 단계에서 미생물의 생물학적 다양성의 생물학적 기초를 이해하는 것에 대한 진보는 질병전파의 적절한 역학적 이해에 필요한 개념적 기초를 진보시킬 것이다. 이러한 체계의 더 큰 활용은 확실히 한센병 전염의 역학에 공헌하고 결국 한센병에서 자유로운 세계에 도달하기 위한 효과적인 통제와 예방전략을 가능하게 할 것이다.

참고문헌

1. Cardona-Castro N, Beltran-Alzate JC, Romero-Montoya IM, et al.: Identification and comparison of Mycobacterium leprae genotypes in two geographical regions of Colombia. Lepr. Rev. 2009;80:316-321.
2. Gillis T, Vissa V, Matsuoka M, et al: Characterisation of short tandem repeats for genotyping Mycobacterium leprae. Lepr. Rev. 2009;80:250-260.
3. Groathouse NA, Rivoire B, Kim H et al. Multiple polymorphic loci for molecular typing of strains of Mycobacterium leprae. J Clin Microbiol, 2004; 42: 1666–1672.
4. Matsuoka M, Maeda S, Kai M et al. Mycobacterium leprae typing by genomic diversity and global distribution of genotypes. Int J Lepr Other Mycobact Dis, 2000; 68: 121–128.
5. Shin YC, Lee H, Lee H et al. Variable numbers of TTC repeats in Mycobacterium

leprae DNA from leprosy patients and use in strain differentiation. J Clin Microbiol, 2000; 38: 4535-4538.

6. Truman R, Fontes AB, de Miranda AB et al. Genotypic variation and stability of four variable-number tandem repeats and their suitability for discriminating strains of Mycobacterium leprae. J Clin Microbiol, 2004; 42:2558-2565.

7. Matsuoka M, Zhang L, Budiawan T et al. Genotyping of Mycobacterium leprae on the basis of the polymorphism of TTC repeats for analysis of leprosy transmission. J Clin Microbiol, 2004; 42: 714-745.

8. Zhang L, Budiawan T, Matsuoka M. Diversity of potential short tandem repeats in Mycobacterium leprae and application for molecular typing. J Clin Microbiol, 2005; 43: 5221-5229.

9. Young SK, Taylor GM, Jain S et al. Microsatellite mapping of Mycobacterium leprae populations in infected humans. J Clin Microbiol, 2004; 42: 4931-4936.

10. Dockrell HM, Oskam L, Richardus JH. Global collaborations in leprosy research – the future is connected. Lepr Rev, 2008; 79: 358-360.

11. Hall BG, Salipante SJ. Molecular epidemiology of Mycobacterium leprae as determined by structure-neighbor clustering. J Clin Microbiol. 2010 Jun;48(6):1997-2008.

12. Nakamura M: Elimination of contaminants ina homogenate of nude-mouse footpad experimentally infected with Mycobacterium leprae. Jpn J Lepr 1994;64:47-50.

13. Wang HY, Whang JH, Kim JP et al: Improved Detection of Mycobacterium lepra by One-tube Nested Ploymerase Chain Reaction. J. Exp. Biomed. Sci. 2007;13:319-324.

14. Rees, R. J. W., and D. B. Young. 1994. The microbiology of leprosy, 49-83. In R. C. Hastings (ed.), Leprosy. Churchill Livingstone, New York, N.Y.

15. WHO: Global leprosy Situation beginning of 2008. WHO Weekly epidemiological Record 2008; 83: 293-300.

16. Monot M, Honore´ N, Garnier T et al. On the origin of leprosy. Science, 2005; 308: 1040-1042.

17. Cole ST, Supply P, Honore N.: Repetitive sequences in Mycobacterium leprae and their impact on genome plasticity. Lepr. Rev. 2001;72:449-461.

18. Fleche PL, Hauck Y, Onteniente L, et al: A tandem repeats database for bacterial genomes: application to the genotyping of Yersinia pestis and Bacillus anthracis. BMC Microbiol. 2001;1:2.

19. Monot M, Honore N, Garnier T, et al: Comparative genomic and phylogeographic analysis of Mycobacterium leprae. Nat. Genet. 2009;41:1282-1289.

20. Diamant E, Palti Y, Gur-Arie R, et

al: Phylogeny and strain typing of Escherichia coli, inferred from variation at mononucleotide repeat loci. Appl. Environ. Microbiol. 2004;70:2464-2473.

21. Hall BG, Barlow M et al: Phylogenetic analysis as a tool in molecular epidemiology of infectious diseases. Ann. Epidemiol. 2006;16:157-169.

22. Feil EJ, Li BC, Aanensen DM, et al: eBURST: inferring patterns of evolutionary descent among clusters of related bacterial genotypes from multilocus sequence typing data. J. Bacteriol. 2004;186:1518-1530.

23. Salipante SJ, Thompson JM, Horwitz MS: Phylogenetic fate mapping: theoretical and experimental studies applied to the development of mouse fibroblasts. Genetics 2008;178:967-977.

24. Sakamuri RM, Kimura M, Li W, et al: Population-based molecular epidemiology of leprosy in Cebu, Philippines. J. Clin. Microbiol. 2009;47:2844-2854.

25. Hall BG: Molecular epidemiology of Mycobacterium leprae: a solid beginning. Lepr. Rev. 2009; 80:246-249.

26. Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P: Inference of population structure using multilocus genotype data. Genetics 2000;155:945-959.

27. Boyer JC, Yamada NA, Roques CN, et al: Sequence dependent instability of mononucleotide microsatellites in cultured mismatch repair proficient and deficient mammalian cells. Hum. Mol. Genet. 2002;11:707-713.

28. Hall BG: A Mycobacterium leprae VNTR database. Lepr. Rev. 2010;81:96-98.

29. Dean FB, Nelson JR, Giesler TL et al: Rapid amplification of plasmid and phage DNA using φ29 DNA polymerase and multiply-primed rolling circle amplification. Genome Res. 2001:11; 1095–10994

30. Dean FB, Hosono S, Fang L, et al: Comprehensive human genome amplification using multiple displacement amplification. Proc. Natl. Acad. Sci. 2002:99;5261–52665.

31. Blanco L, Salas M: Characterization and purification of a phage φ29-encoded DNA polymerase required for the initiation of replication. Proc. Natl. Acad. Sci. 1984:81;5325–5329

32. Blanco L, Bernad A, Lazaro JM, et al: Highly efficient DNA synthesis by the phage φ29 DNA polymerase: symmetrical mode of DNA replication. J. Biol. Chem. 1989:264;8935–8940

33. Paez JG, Lin M, Beroukhim R, et al: Genome coverage and sequence fidelity of φ29 polymerase-based multiple-strand displacement whole-genome amplification. Nucleic Acids Res. 2004:32;e71

34. Zhang K, Martiny AC, Reppas NB, et al: Sequencing genomes from single cells by polymerase cloning. Nat. Biotechnol. 2006:24;680–686

35. Binga EK, Lasken RS, Neufeld LD: Something from (almost) nothing: the impact of multiple displacement amplification on microbial ecology. ISME J. 2008:2; 233–241
36. Hosono S, Faruqi AF, Dean FB, et al: Unbiased whole-genome amplification directly from clinical samples. Genome Res. 2003:13;954–964
37. Lasken RS, Egholm M: Whole genome amplification: abundant supplies of DNA from precious samples or clinical specimens. Trends Biotechnol. 2003:21; 531–535
38. Nelson JR, Cai YC, Giesler TL, et al: TempliPhi, φ29 DNA polymerase based rolling circle amplification of templates for DNA sequencing. BioTechniques 2002: 32(Suppl.);44–47
39. Detter JC, Jett JM, Lucas SM, et al: Isothermal strand-displacement amplification applications for high-throughput genomics. Genomics 2002:80; 691–698
40. Barker DL, Hansen MS, Faruqi AF et al: Two methods of whole-genome amplification enable accurate genotyping across a 2320-SNP linkage panel. Genome Res. 2004:14;901–907
41. Spits C, Le Caignec C, De Rycke M, et al: Optimization and evaluation of single-cell whole-genome multiple displacement amplification. Hum. Mutat. 2006:27; 496–503
42. Groathouse NA, Brown SE, Knudson DL, et al: Isothermal amplification and molecular typing of the obligate intracellular pathogen Mycobacterium leprae isolated from tissues of unknown origins. J. Clin. Microbiol. 2006:44; 1502–1508
43. Kim JP. The usefulness of multiple displacement amplification in the molecular studies in Hansen's disease. Korean Leprosy Bulletin, 2010;43:3-13.