

Improved Detection of *Mycobacterium leprae* by One-tube Nested Polymerase Chain Reaction

Hye-Young Wang¹, Joo-Hwan Whang¹, Jong-Pill Kim², Jang-Eun Cho¹,
Hyeeun Bang¹, Hyeyoung Lee^{1,†} and Sang-Nae Cho^{3,†}

¹Department of Biomedical Laboratory Science, College of Health Sciences, Yonsei University 234 Maeji-ri, Heungup-myun, Wonju-si, Kangwon 220-710; ²Affiliated Hospital, Korean Leprosy Control Association, Euiwang City, Kyunggi-Do, 437-823; ³Department of Microbiology, Yonsei University College of Medicine, 134 Shinchon-dong, Seoul 120-752, South Korea

One-tube nested polymerase chain reaction (PCR) was evaluated for its efficacy in detecting *Mycobacterium leprae* in biopsy samples from leprosy patients. Primers were derived from the *M. leprae*-specific element (RLEP) sequences which yield a 230 bp fragment. The specificity and the sensitivity of the one-tube nested PCR were compared with those of single PCR for detecting *M. leprae*. The results showed that the one-tube nested PCR was about 100 times more sensitive than that of the single indicating the one-tube nested primer sets developed in this study can be an effective screening tool for the detection of *M. leprae* in clinical diagnostic laboratories.

Key Words: *Mycobacterium leprae*, Repetitive element sequence (RLEP), One-tube nested PCR

서 론

나병의 진단을 위해서는 나균인 *Mycobacterium leprae*의 검출이 중요하지만, 나균은 인공적으로 배양 증식이 되지 않는다. 따라서 나병 진단을 위한 실험실적 검사법으로는 피부도말을 항산성균 염색하여 현미경상에서 균이 존재하는지의 여부를 확인하는 방법을 사용하고 있으며 염색결과는 세균지수 (bacterial index, BI) 및 형태지수 (morphological index, MI)로 표시되어 감염의 정도를 나타낸다. 세균지수인 BI는 항산성균 염색 후 유침 검정한 결과로, 1~3은 100시야, 10시야, 또는 한 시야에서 각각 평균적으로 나균이 1에서 10개가 관찰될 때, 4~6은 10에서 1000개 이상의 나균이 평균시야에서 관찰될 때

판정하는 수치이다. 이 같은 실험실적 검사결과와 피부 병변 및 신경손상 등의 임상소견을 기초로 한센병을 확진하게 된다 (Kampirapap et al., 1998). 그러나 균을 관찰할 수 있는 최소한의 균수가 피부조직의 10⁴/g 정도로 상당히 많은 양이 존재해야 하며, 항산성 염색에서 양성을 나타내는 균일지라도 비결핵마이코박테리아 (nontuberculous mycobacteria, NTM)처럼 항산성균 염색에 양성인 다른 항산균이 섞여있을 경우에는 현미경상에서 나균으로 확정짓기 어렵다 (Donoghue et al., 2001; Kang et al., 2003; Kurabachew et al., 1998; Yoon et al., 1994). 그러므로 조직학적 검사에서 균이 발견되지 않고 염증성 반응이 비특이적이며, 신경 내 염증소견이 나타나지 않는 경우에는 진단은 많은 어려움을 겪고 있다.

따라서 최근에는 이러한 문제점을 극복하기 위해서 나균의 특정한 DNA 염기서열을 증폭시켜 조직 또는 조직 내의 나균의 유무를 확인하는 중합효소 연쇄반응 (polymerase chain reaction: PCR)을 이용하고 있다. 한편, PCR을 두 번 연속 사용하는 방법인 이중 중합효소 연쇄반응 (nested PCR)은 증폭하려는 유전자 부분을 먼저 1차 primer로 증폭하고 여기서 얻어진 반응 산물을 주형으로 하여 2차 primer로 증폭하는 방법으로 환자로부터 분리된 검체를 대상으로 한 실험결과 적은 수의 나균도 신속하고 정확하게 검출할 수 있는 진단방법으로 특이성과

*논문 접수: 2007년 11월 5일

수정재접수: 2007년 12월 3일

†Equally contributed corresponding authors: Hyeyoung Lee, Department of Biomedical Laboratory Science, College of Health Sciences, Yonsei University, 234 Maeji-ri, Heungup-myun, Wonju-si, Kangwon 220-710, Korea.

Tel: 033-760-2740, Fax: 033-760-2195,

e-mail: hyelee@yonsei.ac.kr

Corresponding author: Sang-Nae Cho, Department of Microbiology, Yonsei University College of Medicine, 134 Shinchon-dong, Seodaemun-gu, Seoul 120-752, Korea.

Tel: 02-2228-1819, Fax: 02-392-7088,

e-mail: raycho@yumc.ac.kr

민감도 면에서 1쌍의 primer만을 사용했던 기존의 PCR 반응보다 뛰어나다고 보고된 바 있다 (Chae et al., 2002; Jeon et al., 1997; Kampirapap et al., 1998; Kang et al., 2003; Lee et al., 1993; Patrocinio et al., 2005; Plikaytis et al., 1990; Santos et al., 1993; Scollard et al., 1998; Torres et al., 2003; Yoon et al., 1994). 그러나 이와 같은 nested PCR은 1차 산물을 주형으로 하는 2차 PCR 과정에서 오염에 의한 위양성 결과가 나올 확률이 매우 높아 실험환경이나 실험자에 따라 검사결과의 정확도 크게 달라질 수 있는 가능성이 매우 높아 임상검사 방법으로서는 적합하지 않을 수 있다.

따라서 본 연구에서는 2번의 PCR을 별도로 사용하는 two-tube nested PCR을 변형하여 1번의 PCR을 수행하되, 2쌍의 primer를 같은 tube 안에 넣어서 순차적으로 증폭시키는 방법인 one-tube nested PCR을 사용한 나균 검출법의 민감도 및 특이도를 기존의 PCR법인 single PCR과 비교함으로써 one-tube nested PCR의 나병의 진단에서의 유용성을 평가하였다.

재료 및 방법

1. 나균 및 생검조직에서 DNA의 추출

표준균주로 사용된 *M. leprae* strain 4264는 Colorado State University에서 정제된 100 mg (평균 2.9×10^9 bacilli/mg 포함)을 제공받아 QIAamp DNA Mini Kit (Tissue protocol; Qiagen GmbH, Hilden, Germany)를 이용하여 DNA를 분리하고, 최종농도를 50 ng/ μ l로 하여 사용하였다. 임상 검체 평가에 이용된 DNA는 한센병연구원에서 나병 환자들로부터 채취한 피부생검조직을 QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany)를 이용하여 추출한 DNA를 제공받아 사용하였다.

2. 항산균에서 DNA의 추출

M. avium (ATCC 25291), *M. kansasii* (ATCC 12478), *M. chelonae* (ATCC 35749), *M. intracellulare* (ATCC 13950), *M. terrae* (ATCC 15755), *M. triviale* (ATCC 23292), *M. scrofulaceum* (ATCC 19981), *M. celatum* (ATCC 51130), *M. szulgai* (ATCC 35799), *M. africanum* (ATCC 25420), *M. marinum* (ATCC 927), *M. mucogenicum* (ATCC 49650), *M. abscessus* (ATCC 19977), *M. tuberculosis* H37RV and *M. fortuitum* (ATCC 6841)은 연세대학교 임상병리학과에서 제공된 균주를 이용하였으며, 배양한 균체에 lysozyme을 5 mg/ml로

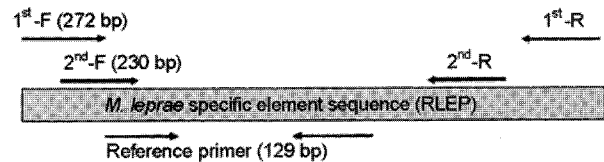


Fig. 1. Relative positions of the nested primer sets for one-tube nested PCR and for single PCR.

가하여 37°C에서 1시간, 1 mg/ml의 proteinase K 및 1% SDS를 가하여 55°C에서 24시간 반응시켰다. Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide (CTAB)를 첨가하여 65°C에서 10분간 반응시키고 페놀 처리 및 에탄올 침전하여 DNA를 얻었다.

3. PCR

나균 DNA의 repetitive sequence (GenBank Accession No. AL583917) 중에서 National Center for Biotechnology information (NCBI)에서 제공되는 Blast search를 통하여 유사 염기서열을 추출한 후 MultAlin program을 이용하여 분석하였다. 그 결과, 예상되는 증폭산물이 각각 272-bp, 230-bp의 크기가 되도록 R1 (5'-CGGGGTAGGGCGTTT-3')과 R2 (5'-CTAGAAGGTTGCCGTATGTG-3') 그리고 R3 (5'-GCGTTTTAGTGTGCATGTCA-3')와 R4 (5'-GGATCATCGATGCACTGTTTC-3') 2쌍의 primer를 제작하였다 (Bioneer, Daejeon, Korea) (Fig. 1). Two-tube nested PCR 반응액으로는 총 20 μ l 내에 Bioneer premix, 각각 10 pmol의 primer와 주형 DNA 5 μ l를 첨가하였다. PCR 조건은 primer (R1, R2, R3, R4)를 이용하여 pre-denaturation을 94°C에서 5분간 1회 수행한 후에 94°C에서 30초 denaturation, 65°C에서 30초 annealing, 72°C에서 60초 extension으로 15회 실시한 후, 다시 94°C 30초, 52°C 30초, 72°C 60초로 35회 반복하고, 72°C에서 10분간 post-extension을 실시하였다.

비교실험을 위해 이용된 Single PCR은 Touch-Down (TD) PCR로, 예상되는 증폭산물은 129-bp 크기가 되도록 F (5'-TGCATGTCAITGGCCTTGAGG-3')와 R (5'-CACCG-ATACCAGCGGCAGAA-3')의 primer를 이용하였다 (Kang et al., 2003). 반응조건으로는 먼저 pre-denaturation을 94°C에서 5분간 1회 수행한 후에, 94°C에서 45초 denaturation, 64°C에서 58°C까지 1°C씩 감소시키면서 7회 동안 반복 시행한 후에 다시 94°C에서 45초 denaturation, 58°C에서 45초 annealing, 72°C에서 90초 extension으로 35회 실시하였다. 유전자 증폭기는 GeneAmp 2700 (Applied Biosystems,

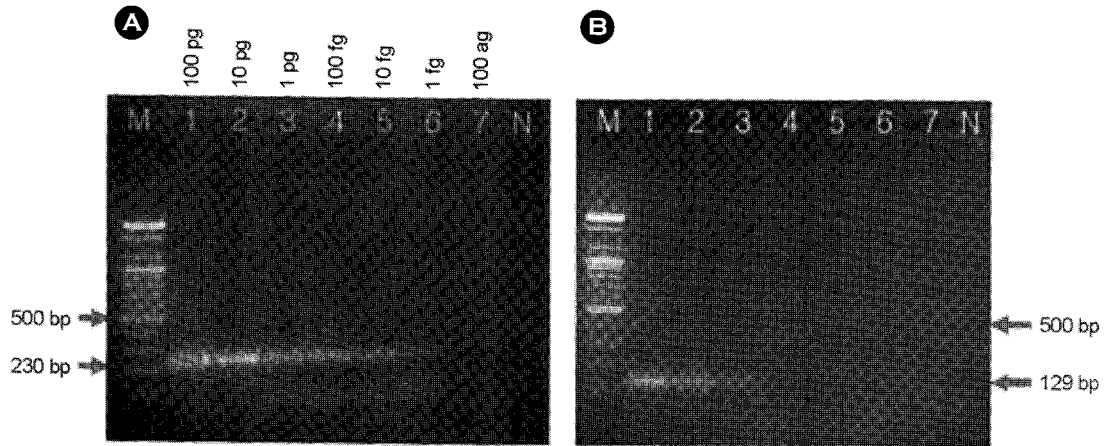


Fig. 2. Comparison of the sensitivity of (A) one-tube nested PCR and (B) single PCR using reference strain of *M. leprae* (strain 4264) DNA. M, 100 bp DNA ladder (Bioneer, Daejeon, Korea), lane 1, 100 pg, lane 2, 10 pg, lane 3, 1 pg, lane 4, 100 fg, lane 5, 10 fg, lane 6, 1 fg, lane 7, 100 ag, N, negative control.

USA)를 사용하였다. 증폭된 유전자 산물은 2% agarose gel 상에서 전기영동을 수행하여 관찰하였고, ethidium bromide (EtBr, Sigma, USA)로 DNA의 염색을 실시하였다. PCR 증폭 여부와 증폭산물의 크기는 Gel Doc EQ (Bio Rad, USA)을 이용하여 관찰하였고, DNA size marker로는 100 bp DNA ladder (Bioneer, Daejeon, Korea)를 사용하였다.

결 과

1. One-tube nested PCR과 Single PCR의 *M. leprae* 검출 민감도

나균 검출을 위한 one-tube nested PCR법과 single PCR법의 민감도를 비교 분석하기 위해 *M. leprae* strain 4264 DNA를 연속적으로 10배씩 희석한 후 PCR의 template DNA로 각각 사용하였다. 그 결과 single PCR에서는 1 pg 이상에서 증폭되었으나, one tube nested PCR에서는 1 fg 이상에서 RLEP 유전자가 증폭되는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 2). 따라서 one tube nested PCR을 이용한 진단법이 single PCR을 이용한 진단법보다 약 100배 이상 민감성이 높은 것을 알 수 있었다.

2. One-tube nested PCR의 *M. leprae* 검출 특이도

나균을 검출하기 위하여 제작된 RLEP primer 쌍이 *M. leprae*에만 특이적으로 반응하는지를 조사하기 위해 15개의 *Mycobacterium* spp.로부터 분리한 대조용 DNA를 대상으로 one-tube nested PCR을 각각 수행하였다. 그 결과 나균에서만 특이적으로 RLEP 유전자 단편이 증폭되었으며, 대조군으로 사용한 DNA에서는 모두 증폭되지 않았

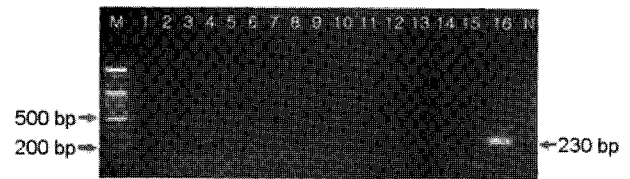


Fig. 3. The specificity of primers targeting RLEP sequence of *M. leprae* in one tube nested PCR. M, 100 bp DNA ladder (Bioneer, Daejeon, Korea), lane 1, H37RV, lane 2, *M. avium*, lane 3, *M. chelonae*, lane 4, *M. intracellulare*, lane 5, *M. kansasii*, lane 6, *M. scrofulaceum*, lane 7, *M. terrae*, lane 8, *M. triviale*, lane 9, *M. africanum*, lane 10, *M. celatum*, lane 11, *M. marinum*, lane 12, *M. szulgai*, lane 13, *M. mucogenicum*, lane 14, *M. abscessus*, lane 15, *M. fortuitum*, lane 16, *M. leprae*, N, negative control.

다 (Fig. 3).

3. 임상시료에서 Single PCR과 One-tube nested PCR의 검출 효율성

나병 환자의 피부조직에서 추출된 DNA로부터 RLEP의 특이 유전자 검출을 실시하였다. 일반적으로 one-tube nested PCR법으로 증폭한 DNA의 양이 single PCR법으로 검출한 것보다 많아 전기영동상에서 증폭한 DNA보다 뚜렷하게 관찰할 수 있었다 (Fig. 4). 비교검사에 이용한 총 76검체에서 single PCR에서는 양성결과가 25 (32.1%)의 검체에서 나온 반면, one-tube nested PCR에서는 70 (92.1%)의 검체에서 양성결과가 나온 것을 확인할 수 있었다 (Table 1). 따라서 one-tube nested PCR을 이용한 방법이 single PCR을 이용한 진단법보다 높은 효율성을 나타내었다.

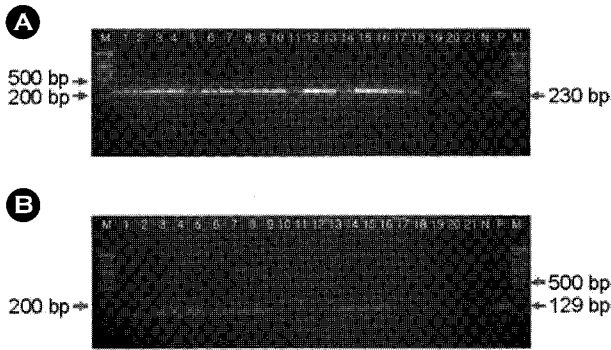


Fig. 4. Detection of *M. leprae* using (A) one-tube nested PCR and (B) single PCR from clinical specimens isolated from leprosy patients (Lane 1~21). N, negative control; P, positive control; M, 100 bp DNA ladder (Bioneer, Daejeon, Korea).

4. 임상시료에서 *M. leprae*의 검출을 위한 세균학적 검사와 PCR법에 의한 비교

조직병리 소견에 따라 세균지수가 0인 경우 19예와 1~3인 경우 23예와 4~6인 경우 34예로 구분된 총 76검체를 PCR 결과와 비교해 보았다. 그 결과 single PCR에서는 세균지수가 0인 경우 5 (23.8%)에서, 1~3인 경우 4 (17.4%), 4~6인 경우 16 (47.1%)에서 양성을 보인 반면, one-tube nested PCR에서는 세균지수가 0인 경우 16 (84.2%), 1~3인 경우 21 (91%), 4~6인 경우 33 (97.1%)의 모두에서 양성결과를 나타냄을 확인할 수 있었다 (Table 1).

고찰

지금까지 나병의 진단은 임상소견과 항산성균 염색에 주로 의존하여 왔으며, 나균을 시험관 내에서 배양할 수 없기 때문에 감염병의 진단에 필수적인 실험실내에서 균 증식과 동정을 거치지 못하는 것이 나병 진단의 가장 큰 취약점이었다.

나병 진단에 있어서 혈청학적 방법 serological test (Buhrer-Sekula et al., 2003)과 분자 표식방법 hybridization method with DNA probe (Clark-Curtiss and Docherty, 1989)을 이용하여 환자에서 나균의 검출과 분리를 시도했으나, 어떤 잠재적인 체내의 면역 방어 상태에 따라 검출, 동정할 수 있기 때문에 나균의 검출이 어렵고, 조직학적 발견도 비특이적이다 (Martinez et al., 2006). 이 방법은 특이도와 민감도 부분에서 낮기 때문에 (Kang et al., 2003), 최근에는 적은 균체수가 존재할 경우 나균을 검출하기 위하여 다양한 계놈 염기서열, 즉, 나균에 특이하다고 알려진 65

Table 1. Comparison of PCR methods for detecting *M. leprae* in biopsy samples from leprosy patients

BI (No. of sample)	PCR	Single PCR positive	One-tube nested PCR positive
0 (19)		5 (23.8%)	16 (84.2%)
1~3 (23)		4 (17.4%)	21 (91%)
4~6 (34)		16 (47.1%)	33 (97.1%)
Total (76)		25 (32.1%)	70 (92.1%)

kDa 항원 유전자 gene encoding 65 kDa antigen (Plikaytis et al., 1990), 18 kDa 항원 유전자 (Kim et al., 1996; Williams et al., 1990), 36 kDa 항원 유전자 (Parkash et al., 2004), repetitive sequences (Wood and Cole, 1989; Yoon et al., 1993) 등을 중합효소 연쇄반응을 통하여 DNA를 증폭시키는 방법이 널리 사용되고 있다 (Jeon et al., 1997).

나균 유전자의 repetitive sequence (RLEP)는 다른 항산균이나 세균에는 존재하지 않는 특이 염기서열로 알려져 있으며, repetitive sequence가 하나의 나균 유전자에 약 28 copy가 존재하기 때문에 (Clark-Curtiss and Docherty, 1989; Wood and Cole, 1989) 한 개의 세포에 1 copy가 존재하는 18 kDa, 65kDa 항원 유전자, 16S rRNA 유전자보다 훨씬 높은 민감도를 보였다 (Donoghue et al., 2001; Kang et al., 2003). 또한 PCR을 시행하여 전기영동 또는 dot blot hybridization으로 1개의 나균까지도 검출하여 다른 표적 유전자를 이용할 때에 비하여 높은 민감도를 유지하는 것으로 보고되었다 (Yoon et al., 1994).

나균만을 특이적으로 진단하기 위하여 제작된 RLEP primer 쌍은 one-tube nested PCR 모두에서 *M. leprae*에만 특이적으로 반응을 하였고, 대조균으로 사용한 *M. tuberculosis*를 포함한 15종의 *Mycobacterium*과는 반응을 하지 않았다. 이러한 결과로 보아 RLEP primer 쌍을 이용한 PCR법은 나균에 대한 진단의 특이성이 높다는 점을 확인할 수 있었다.

또한, *M. leprae*의 표준균주에 의한 민감성의 비교 분석에서 one-tube nested PCR을 이용한 진단법이 single PCR을 이용한 진단법보다 약 100배 이상 민감도가 높다는 점도 확인할 수 있었다.

Two-tube nested PCR은 보통 시료의 DNA양이 매우 제한되어 있어 한번의 PCR로는 검출할 수 없는 경우에 두 번째 PCR을 보다 내측의 primer를 이용하여 시행하는 방법으로, 원하는 부분이 잘 증폭되기 위해서는 4개의 primers가 부착해야 하고, outer primers를 이용한 첫 번째 중합효소 연쇄반응을 실시하고 여기서 나온 산물로 두

번째 증폭을 할 때에는 다시 새로운 시약을 첨가하기 때문에 반응이 원활하게 일어날 수 있으며, 한 쌍의 primers가 비교적 적은 횟수의 반응을 하여 기존의 PCR에 비해 100배 정도의 민감도와 특이성이 높일 수 있는 장점을 가지고 있다 (Plikaytis et al., 1990). 하지만 tube를 바꾸어 두 번의 증폭과정을 거치면서 오염의 문제가 종종 발생하기도 하는데, 이러한 문제를 해결하고자 하나의 tube에 2쌍의 primer를 같이 넣어 one-tube nested PCR을 시도하여, 오염의 문제를 줄이는 동시에 민감도 부분에서도 기존의 PCR보다 좋은 결과가 나타남을 확인할 수 있었다.

따라서 피부 생검조직에서 항산성 염색으로 균을 검출하지 못한 경우나, 검출하고자 하는 병원체의 수가 소량일 경우, 많은 수의 검체를 동시에 처리해야 하는 경우에 나균의 repetitive sequence를 이용한 one-tube nested PCR 방법은 신속하고 나균에 특이적이며 높은 민감도를 가지고 있어서 나균 진단에 있어서 유용하리라 생각된다.

감사의 글

이 논문은 2007년도에 지원된 한국학술진흥재단의 BK21 사업의 지원에 의하여 이뤄졌으며 이에 감사드립니다.

REFERENCES

- Buhrer-Sekula S, Smits HL, Gussenhoven GC, van Leeuwen J, Amador S, Fujiwara T, Klatser PR, Oskam L. Simple and fast lateral flow test for classification of leprosy patients and identification of contacts with high risk of developing leprosy. *J Clin Microbiol.* 2003. 41: 1991-1995.
- Chae GT, Kim MJ, Kang TJ, Lee SB, Shin HK, Kim JP, Ko YH, Kim SH, Kim NH. DNA-PCR and RT-PCR for the 18-kDa gene of *Mycobacterium leprae* to assess the efficacy of multi-drug therapy for leprosy. *J Med Microbiol.* 2002. 51: 417-422.
- Clark-Curtiss JE, Docherty MA. A species-specific repetitive sequence in *Mycobacterium leprae* DNA. *J Infect Dis.* 1989. 159: 7-15.
- De wit MYL, Feber WR, Krieg SR. Application of a polymerase chain reaction for the detection of *Mycobacterium leprae* in skin tissues. *J Clin Microbiol.* 1991. 29: 906-910.
- Donoghue HD, Holton J, Spigelman M. PCR primers that can detect low levels of *Mycobacterium leprae* DNA. *J Med Microbiol.* 2001. 50: 177-182.
- Jeon JH, Oh JC, Ko YH. Diagnostics of *Mycobacterium leprae* of Molecular genetics. *Kor Leprosy Bulletin* 1997. 30: 81-87.
- Kampirapap K, Singtham N, Klatser PR, Wiriyawipart S. DNA amplification for detection of leprosy and assessment of efficacy of leprosy chemotherapy. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.* 1998. 66: 16-21.
- Kang TJ, Kim SJ, Lee SB, Chae GT, Kim JP. Comparison of Two different PCR amplification products (the 18-kDa protein gene vs. RLEP repetitive sequence) in the diagnosis of *Mycobacterium leprae*. *Clin Exp Dermatol.* 2003. 28: 420-424.
- Katoch VM, Girdhar BK. Detection of *Mycobacterium leprae* DNA for 36 kDa protein in urine from leprosy patients: a preliminary report. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2004. 46: 275-277.
- Kim MJ, Chae GT, Kim SK, Cheon JH, Ko YH, Kim NH, Kim SH. Optimization of the method of DNA preparation and PCR-mediated amplification of *M. leprae* 18 kDa gene for the diagnosis of leprosy. *Kor Leprosy Bulletin* 1996. 29: 29-38.
- Kurabachew M, Wondimu A, Ryon JJ. Reverse transcription-PCR detection of *Mycobacterium leprae* in clinical specimens. *J Clin Microbiol.* 1998. 36: 1352-1356.
- Lee TK, Moon DC, Kwon KS, Jeong TA. Detection of *Mycobacterium leprae* using Polymerase Chain Reaction from Paraffin-embedded skin tissue samples. *J Pusan Medical College.* 1993. 33: 265-274.
- Martinez AN, Britto CF, Nery JA, Sampaio EP, Jardim MR, Sarno EN, Moraes MO. Evaluation of real-time and conventional PCR targeting complex 85 genes for detection of *Mycobacterium leprae* DNA in skin biopsy samples from patients diagnosed with leprosy. *J Clin Microbiol.* 2006. 44: 3154-3159.
- Parkash O, Singh HB, Rai S, Pandey A, Katoch VM, Girdhar BK. Detection of *Mycobacterium leprae* DNA for 36 kDa protein in urine from leprosy patients: a preliminary report. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2004. 46: 275-277.
- Patrocinio LG, Goulart IM, Goulart LR, Patrocinio JA, Ferreira FR, Fleury RN. Detection of *Mycobacterium leprae* in nasal mucosa biopsies by the polymerase chain reaction. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2005. 44: 311-316.
- Plikaytis BB, Gelber RH, Shinnick TM. Rapid and sensitive detection of *Mycobacterium leprae* using a nested-primer gene amplification assay. *J Clin Microbiol.* 1990. 28: 1913-1917.

- Santos AR., De Miranda AB, Sarno EN, Suffys PN, Degrave WM. Use of PCR-mediated amplification of *Mycobacterium leprae* DNA in different types of clinical samples for the diagnosis of leprosy. *J Med Microbiol.* 1993. 39: 298-304.
- Scollard DM, Gillis TP, Williams DL. Polymerase chain reaction assay for the detection and identification of *Mycobacterium leprae* in patients in the United States. *Am J Clin Pathol.* 1998. 109: 642-646.
- Torres P, Camarena JJ, Gomez JR, Nogueira JM, Gimeno V, Navarro JC, Olmos A. Comparison of PCR mediated amplification of DNA and the classical methods for detection of *Mycobacterium leprae* in different types of clinical samples in leprosy patients and contacts. *Lepr Rev.* 2003. 74: 18-30.
- Williams DL, Gillis TP, Booth RJ, Looker D, Watson JD. The use of a specific DNA probe and polymerase chain reaction for the detection of *Mycobacterium leprae*. *J Infect Dis.* 1990. 162: 193-200.
- Woods SA, Cole ST. A rapid method for the detection of potentially viable *Mycobacterium leprae* in human biopsies: a novel application of PCR. *FEMS Microbiol Lett.* 1989. 53: 305-309.
- Yoon KH, Cho SN, Lee MK, Abalos RM, Cellona RV, Fajardo Jr TT, Guido LS, Dela Cruz EC, Walsh GP, Kim JD. Evaluation of polymerase chain reaction amplification of *Mycobacterium leprae*-specific repetitive sequence in biopsy specimens from leprosy patients. *J Clin Microbiol.* 1993. 31: 895-899.
- Yoon KH, Cho SN, Gerald PW, Lee JB, Kim JD. Detection of *Mycobacterium leprae* in Skin Biopsy Specimens From Leprosy Patients by Polymerase Chain Reaction. *Kor J Dermatol.* 1994. 32: 409-415.
-