

임상에서 분리된 희귀 비결핵 마이코박테리아 5종

대한결핵협회 결핵연구원

박영길, 이영주, 유희경, 정미영, 류성원, 김창기, 김희진

Five Rare Non-Tuberculous Mycobacteria Species Isolated from Clinical Specimens

Young Kil Park, Ph.D., Young Ju Lee, M.S., Heekyung Yu, B.S., Mi Young Jeong, M.S., Sung Weon Ryoo, Ph.D., Chang-Ki Kim, M.D., Hee Jin Kim, M.D.

The Korean Institute of Tuberculosis, The Korean National Tuberculosis Association, Seoul, Korea

Background: Recently, the rate of infections with non-tuberculous mycobacteria (NTM) has been increasing in Korea. Precise identification of NTM is critical to determination of the pathogen and to target treatment of NTM patients.

Methods: Sixty-eight unclassified mycobacteria isolates by *mpoB* PCR-RFLP assay (PRA) collected in 2008 were analyzed by National Center for Biotechnology Information (NCBI) Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) search after sequencing of 16S rRNA, *hsp65*, *mpoB* genes.

Results: Nineteen strains of 68 isolates were specified as species after sequencing analysis of 3 gene types. We found 3 *M. lentifolium*, 5 *M. arupense*, 4 *M. triviale*, 4 *M. parascrofulaceum*, and one *M. obuense*. One *M. tuberculosis* and another *M. peregrinum* were mutated at the *Msp I* recognition site needed for *mpoB* PRA. The remaining 49 isolates did not coincide with identical species at the 3 kinds genes.

Conclusion: Sequencing analysis of 16S rRNA, *hsp65*, *mpoB* was useful for identification of NTM unclassified by *mpoB* PRA.

Key Words: Mycobacteria, Atypical; RNA, Ribosomal, 16S; *mpoB* protein; Heat-Shock Protein 64

서 론

비결핵항산균(non-tuberculous mycobacteria, NTM)은 *Mycobacterium tuberculosis* complex와 *M. leprae*를 제외한 항산균으로서 사람 및 동물에서 질병을 일으킬 수 있는 균이다. NTM은 토양과 물에 존재하고 있어 임상검체에서 분리되었을 때 대부분 오염균으로 간주되어왔다¹. 그러나 후천성 면역결핍증 환자뿐만 아니라 면역기능이

정상적인 사람에서도 *M. avium* complex, *M. ulcerans* 등 NTM이 검출되고 있다^{2,3}.

우리나라에서도 1990년 이후 NTM의 분리율이 증가하고 있으며⁴ 최근 발표에서는 도말양성자에서 10% 내외로 나타나고 있다^{4,5}. NTM은 결핵균에 유효한 항결핵제들이 효과가 없는 경우가 많고, NTM의 종류에 따라 치료가 다른 경우가 많으므로⁶, 임상검체에서 NTM의 신속한 균 동정은 환자의 적절한 진단과 치료방침 수립에 매우 중요하다.

결핵연구원에서는 NTM을 동정하기 위하여 2001년 이래로 *mpoB* 유전자를 대상으로 하는 PCR restriction enzyme pattern analysis (PRA)방법을 사용하고 있다⁷. 본 연구에서는 PRA에서 균 동정이 되지 않았던 균들을 16S rRNA 유전자뿐 아니라, NTM 구별에 주로 사용되고 있는 *mpoB* 유전자와 *hsp65* 유전자 염기서열 분석을 통해 세 가지 유전자에서 같은 균종으로 분리된, 국내에서는 발표

Address for correspondence: Young Kil Park, Ph.D.
Korean Institute of Tuberculosis, The Korean National Tuberculosis Association, 14, Umyeon-dong, Seocho-gu, Seoul 137-900, Korea
Phone: 82-2-576-4986, Fax: 82-2-573-1914
E-mail: ypark7@empal.com

Received: Jul, 27, 2010

Accepted: Oct, 6, 2010

되지 않았던 균종을 발견하여 보고하고자 한다.

대상 및 방법

1. 사용 균주

결핵연구원에서 2008년에 실시한 균 동정검사서 *ipoB* PRA 방법으로 균종 분류가 되지 않았던 임상 균주 68주를 16S rRNA, *ipoB*, *hsp65* 유전자의 염기서열 분석을 통해 균 동정을 실시하였다. 대상 균은 Lowenstein-Jensen 배지에 접종하여 37°C로 4~6주간 배양하였다.

2. PCR

염색체 DNA는 boiling 방법으로 추출하였다. PCR 증폭을 위해, 16S rRNA primer는 g2R/rM582R을 사용하였고⁸, *hsp65* primer는 Tb11/Tb12를 사용하였으며⁹, *ipoB* primer는 MF/MR을 사용하였다¹⁰. 각 primer의 염기서열, 조건, PCR 산물의 크기는 Table 1에 표시한 바와 같다. PCR 혼합물 조성으로는 10 µL의 pre-mixture가 함유되어 있는 tube (Cosmogene tech, containing *pfu* DNA polymerase 1 U, dNTP 250 µM, 10×reaction buffer 2 µL)에 10 pmole의 primer 1 µL와 template DNA 1 µL, 증류수 7 µL를 첨가하여 부피 20 µL가 되도록 한 후, PCR을 수행하였다.

3. 염기서열 분석(Sequencing) 및 동정

PCR 산물은 1.5% agarose gel에서 전기영동으로 확인 후 염기서열분석을 실시하였다. BigDye Terminator v3.1 Cycle sequencing Kit를 이용하였으며, ABI Prism 3730XL DNA analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)를 사용하여 분석하였다. 그 결과 나타난 염기서열은 균 동정을 위하여 National Center for Biotechnology Information (NCBI)에서 제공하는 Basic Local Alignment

Search Tool (BLAST) 프로그램을 이용하여 염기서열을 비교하였다.

결 과

본 연구 결과, 세 가지 유전자에서 동일한 균종으로 분류된 균 중에서 희귀한 5종 17균주를 발견하였다. 본 연구는 보건소 환자 및 일반 병원 환자에 대한 의뢰서정보 이외에 추가정보를 얻기 위해 추적조사는 하지 않았다.

본 실험에서 *M. lentiflavum*은 3균주가 발견되었다. 16S rRNA, *hsp65*, *ipoB* 유전자 염기서열에서 모두 97% 이상 일치율을 보였다(Table 2). 균주의 색깔은 2균주는 white-yellow였고, 다른 한 균주는 yellow를 띠었다. *M. lentiflavum*은 16S rRNA 유전자 염기서열이 *M. simiae*와 *M. genavense*와 매우 가까운 균으로서 22~37°C에서 3~4주 안에 배양되는 지연발육균에 가깝다¹¹.

우리나라에서 *M. lentiflavum*이 상수도나 강물에서 분리된 바 있다¹². 2006년도에는 폐질환 환자에서 분리된 *M. lentiflavum* 1균주를 발표한 바 있다¹³. 그러나 당시에 *M. lentiflavum* 균종의 *ipoB* 유전자에 대한 대조가 없어서 *ipoB* 유전자의 비교 결과는 없었다.

*M. arupense*는 5균주가 발견되었는데, 집락 색깔은 모두 white-yellow였다. 세 가지 유전자 염기서열 분석에서 일치율은 92% 이상이였다. 이 균주는 스페인에서 처음으로 흙이나 객담에서 발견된 신속발육균이며, *M. terra* complex와 유사한 균으로서 사람에게서는 비병원성인 것으로 알려져 있다¹⁴.

*M. parascrofulaceum*은 4균주가 발견되었는데, 균주의 색깔은 2균주는 yellow, 하나는 orange, 다른 하나는 white-yellow였다. 세 가지 유전자에서 모두 98% 이상의 일치율을 보였다. *M. parascrofulaceum*은 2004년도에 신 균종으로 분류되었는데, 형태학적으로는 *M. scrofulace-*

Table 1. Primer sets for 16S rRNA, *hsp65*, *ipoB* genes

Gene	Primer	Sequence (5'→3')	Annealing TM, °C	Size, bp
16S rRNA	g2R	GAGAATTCGTGCTTAACACATGCAAGTCG	67	564
	rM582R	ATGGATCCGTGAGATTTACGAACAACGC		
<i>hsp65</i>	Tb11	ACCAACGATGGTGTGCCAT	64	439
	Tb12	CTTGTGGAACCGCATACCCT		
<i>ipoB</i>	MF	CGACCACTTCGGCAACCG	58	342
	MR	TCGATCGGGCACATCCGG		

TM: temperature.

Table 2. The five rare species identified by 16S rRNA, *rpoB*, *hsp65* sequencing

KMRC No.	Clinical information		Specimen	Colony color	Species identification	Homology, %		
	Sex/Age	History				16S rRNA	<i>hsp65</i>	<i>rpoB</i>
0020070087	M/80	ND	Sputum	White-yellow	<i>M. lentiflavum</i>	100	99	98
0020070088	M/73	<i>M. intracellulare</i>	Sputum	White-yellow	<i>M. arupense</i>	97	95	96
0020070089	M/58	ND	Sputum	White-yellow	<i>M. triviale</i>	98	94	95
0020070093	F/75	ND	Sputum	White-yellow	<i>M. triviale</i>	93	99	97
0020070094	M/53	ND	Sputum	White-yellow	<i>M. arupense</i>	98	96	94
0020070106	F/64	<i>M. intracellulare</i>	Sputum	White-yellow	<i>M. lentiflavum</i>	99	98	99
0020070116	ND	ND	Sputum	Yellow	<i>M. lentiflavum</i>	97	99	98
0020070122	M/51	ND	Sputum	Yellow	<i>M. parascrofulaceum</i>	100	98	98
0020070123	F/89	ND	Sputum	Orange	<i>M. parascrofulaceum</i>	99	99	98
0020070136	F/68	ND	Sputum	White-yellow	<i>M. arupense</i>	99	96	92
0020070140	M/84	ND	Sputum	White-yellow	<i>M. triviale</i>	99	94	95
0020070148	M/59	<i>M. terrae</i> complex	Sputum	White-yellow	<i>M. triviale</i>	98	94	93
0020070151	ND	ND	Sputum	White-yellow	<i>M. parascrofulaceum</i>	100	99	99
0020070152	M/64	ND	Sputum	White-yellow	<i>M. arupense</i>	100	99	98
0020070153	F/71	ND	Sputum	White-yellow	<i>M. arupense</i>	100	99	99
0020070177	ND	ND	Sputum	Yellow	<i>M. obuense</i>	100	100	97
0020070112	ND	ND	sputum	Yellow	<i>M. parascrofulaceum</i>	99	100	99

KMRC: Korea Mycobacterium Resource Center, ND: not defined.



Figure 1. Comparison of variation region of 16S rRNA according to species. The number is nucleotide order of 16S rRNA gene of *M. tuberculosis* H37Rv.

*um*과 유사하며, 유전자는 *M. simiae*와 가장 유사한 자연 발육균으로 알려졌다¹⁵. 임상검체에서 꾸준히 배양되는 것으로 보아 활동성 임상 질병 원인균으로 간주된다¹⁶.

*M. triviale*는 4균주가 발견되었는데, 이 균종은 *M. terrae* complex로서 Rifampin에 감수성이다¹⁷. 우리나라에서는 *M. terrae* complex 임상균주 18주를 16S rRNA 유전자와 *hsp65* 유전자로 분석한 결과 *M. nonchromogenicum*과 *M. terrae*로 구별이 된 바 있으나 *M. triviale*는 보고된 바 없었다¹⁸.

*M. obuense*는 하나의 균주가 발견되었으며, 이 균종은 Scotochromogenic 신속발육균이다¹⁹. *M. obuense*은 형태적으로는 평활균이기도 하고 돌연변이에 의해 rough colony도 발견된다²⁰.

본 실험에서 발견된 희귀종 5종에 대한 염기서열에서

특히 종마다 뚜렷한 차이를 보이고 있는 부분이 있었다. 16S rRNA 염기서열 분석에서는 *M. tuberculosis* H37Rv 16S rRNA (*rrs*) 유전자 261, 263, 305번 뉴클레오티드에서 균종별 polymorphism을 나타냈다(Figure 1). *hsp65* 유전자에서는 *M. tuberculosis* H37Rv *hsp65* 유전자의 292, 294, 297-300, 303, 306, 312, 318, 320, 324, 327, 337, 339, 348번째 뉴클레오티드에서 종간에 많은 polymorphism을 보였다(Figure 2). *rpoB* 유전자에서는 1290-1292, 1296, 1323, 1326, 1327, 1329, 1344번 뉴클레오티드에서 polymorphism이 발생하였음을 발견할 수 있었다(Figure 3).

16S rRNA, *hsp65*, *rpoB* 유전자 염기서열 분석에서 *M. tuberculosis*로 나타난 균이 1주, *M. peregrinum*으로 나타난 균주가 1주 있었다. 염기서열 분석에서는 분명하게 균

	292	297-300	312	318	324	339	348
<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	292	TTGGTT CGCGAGGG CCTGCGCAACGTC CGCGGCCGGCGCCAACCCGCTCGGT CTCAA ACGCGGCAT	356				
<i>M. lentiflavum</i>		C-C -- CAAA -----				G -----	G -----
<i>M. Arupense</i>		C ---- CAAG ---A-----		G-----		G-----	G-----
<i>M. triviale</i>		C ---- GCGT-----	T-----		G---T-----	A-G-----	G-----
<i>M. parascrofulaceum</i>		C ---- GAAA-----	T-----	G-----	G-----	G-----	G-----
<i>M. obuense</i>		C-C -- G-----	A---T-----				G-----

Figure 2. Comparison of variation region of *hsp65* gene according to species. The number is nucleotide order of *hsp65* gene of *M. tuberculosis* H37Rv.

	1,285	1,290-1,292, 1,296	1,323	1,329	1,344	1,348
<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	1,285	CAGCT GAGCCA ATT CATGGACC AGAACA ACCCGCTGT CGGG TTGACCC ACAAGCGCC ACTGT	1,348			
<i>M. lentiflavum</i>		----- TC --G-----		C--C--C-----		C-----
<i>M. Arupense</i>		----- CTC---G-----			C-----	T-----
<i>M. triviale</i>		----- TC --G-----		C--C-----		G-----
<i>M. parascrofulaceum</i>		----- CTC---G-----			TC-----	C-----
<i>M. obuense</i>		----- G-----			CC-----	T-----

Figure 3. Comparison of variation region of *rpoB* gene according to species. The number is nucleotide order of *rpoB* gene of *M. tuberculosis* H37Rv.

동정이 되었는데, *rpoB* PRA 전형적인 균주의 양상이 나타나지 않았다. 그 원인은 PRA 과정에 제한효소 *MSP* I 처리가 필요한데, 이 두 균주는 제한효소 인식 site에 돌연변이가 있기 때문이었다(data not shown).

2008년도에 NTM으로 동정된 건수는 2,621건이었고, 그 중에서 *M. intracellulare*는 45%로 가장 많았고, *M. avium*이 18%, *M. abscessus*가 15.6%, *M. kansasii*가 6.6%, *M. fortuitum* complex가 5.7%, *M. gordonae*가 3.6%, *M. terrae* complex가 1.9%, *M. chelonae*가 1.2%, *M. sulgai*가 0.7% 순이었다. *rpoB* 유전자의 PRA 방법으로 동정된 균 중에서 그 빈도가 본 연구에서 나타난 균종들과 비슷한 빈도로 나타난 균종들은 *M. marinum*, *M. wolinskyi*, *M. peregrinum*, *M. neoaurum*, *M. asiaticum*, *M. aubagnense*, *M. malmoense*, *M. parafortuitum*, *M. mucogenicum*, *M. scrofulaceum* 등이며, 1~6균주(0.04~0.2%) 빈도로 발견되었다.

고찰

NTM 감염증의 치료는 동정된 균종과 감염 부위에 따라 임상적 의의가 달라지며, 치료방법과 약제가 달라지게 되므로 무엇보다 정확한 균 동정이 중요하다. NTM 동정에 있어, 고전적인 생화학적 방법은 검사기간이 오래 걸릴 뿐만 아니라 정확하지 않아 150여 종을 구별하는 것이 불가능하게 되었다. 16S rRNA는 세균의 중간 보존 염기서열과 종

특이 염기서열을 함께 지니고 있어서 NTM 뿐만 아니라 다른 세균 동정에 가장 일반적으로 이용되고 있다²¹⁻²³. 16S rRNA 유전자의 염기서열은 약 1,550 bp의 길이를 가지며 보존서열과 다형성을 보이는 서열부위로 구성되어 있어서 염기서열을 이용한 세균의 동정에 유용하다. 16S rRNA 유전자의 염기서열은 많은 균주에서 밝혀져 있는데, 가장 흔히 이용할 수 있는 GenBank에는 90,000가지 이상의 16S rRNA 유전자 염기서열 정보가 저장되어 있어 비교를 통한 세균의 동정이 가능하다. 또한 16S rRNA는 모든 세균에 존재하므로, 이 유전자를 이용한 균 동정법은 거의 모든 세균에 적용할 수 있다²⁴. 따라서 대부분 항산균 동정은 16S rRNA 유전자 염기서열 분석을 기본으로 한다. 그러나 Mycobacterium속 안에서 종내 유사성은 94~100%로 비교적 높다. 어떤 종은 매우 높은 유사성을 지니거나 염기서열이 정확히 일치하기도 한다. 예를 들면, *M. kansasii*와 *M. gastri*, *M. chelonae*와 *M. abscessus* 등을 구별할 수 없다²⁵.

한편 *hsp65* 유전자는 *M. abscessus*로부터 *M. chelonae*를 구별할 수 있는 반면, *M. senegalense*와 *M. farcinogenes*는 동일한 *hsp65* 염기서열을 갖고 있어 구별할 수 없다. 이와 같이 Mycobacterium속의 유전자에서 한 가지를 이용하면 완벽하게 종을 구별할 수 없으므로 여러 유전자의 염기서열을 조합하여 사용하면 정확히 구별할 수 있는 가능성이 높아진다⁸.

본 연구에서는 결핵연구원에서 주로 사용하는 *rpoB*

PRA에서 동정할 수 없었던 NTM을 대상으로 16S rRNA, *rpoB*, *hsp65* 유전자 염기서열 분석을 실시한 바, 그 동안 발표되지 않았던 희귀종을 발견하게 되었다. 이러한 균종이 발견되지 않았던 이유로 생각할 수 있는 것은 결핵연구원에서 주로 사용했던 균 동정 방법인 *rpoB* PRA 방법을 확립할 당시에 표준균주 NTM이 충분하지 못하여 희귀종에 대한 대조를 할 수 있는 자료를 확보하지 못하였기 때문으로 본다⁷.

본 실험에 포함되었던 68균주 중에서 19균주는 3가지 유전자에서 같은 균종으로 나타나 균 동정이 가능하였지만, 나머지 49균주는 2가지 유전자만 같은 종으로 나타나는 경우도 있었고, 3가지 유전자 모두에서 다른 균종으로 나타나는 경우도 있어서 향후 이러한 균주에 대한 균종 분류에 대한 기준을 확립하는 것이 필요하다.

근래에 NTM 균종을 분류하는데에는 16S rRNA, *rpoB*, *hsp65* 세 가지 유전자의 염기서열을 분석 비교하는 것이 비교적 가장 정확한 것으로 간주되고 있다⁸. 향후 더욱 활발한 균종 분류의 노력으로 NTM 희귀종을 확보하며, 아울러 균종에 따른 임상환자의 증상이나 질병이환 여부, 치료 여부 등의 연구가 지속되어야 한다.

본 실험에서 발견된 희귀종 5종은 그 동안 발표되었던 균종들과²⁶ 더불어 우리나라 임상에서 분리된 자원으로서, 향후 우리나라 임상 NTM의 진단 및 치료 발전에 기여하는 자료로 역할을 하게 될 것이다.

균 집락의 형태를 구별하기가 쉽지 않았고, 색깔도 같은 종에서도 다르게 나타나 생화학적 구별의 어려움을 알 수 있었다. 본 실험에서는 *rpoB* PRA가 균 동정 비용이 저렴하기에 많은 균을 동시에 동정하기에는 적합하다. 그러나 일부 균종에 대한 PRA 자료가 없었고, 균의 제한효소 인식 부위에서 돌연변이가 발생할 경우 다른 양상으로 나타나 정확하게 균종을 분류할 수가 없다. 이런 경우에는 16S rRNA, *hsp65*, *rpoB* 유전자 염기서열 분석을 통하여 정확한 균종을 분류할 수 있었다.

감사의 글

This work was supported by the Korean Centers for Disease Control & Prevention grant (No. 2009-E00584-00).

참고 문헌

1. Wolinsky E. Nontuberculous mycobacteria and asso-

- ciated diseases. *Am Rev Respir Dis* 1979;119:107-59.
2. Primm TP, Lucero CA, Falkinham JO 3rd. Health impacts of environmental mycobacteria. *Clin Microbiol Rev* 2004;17:98-106.
3. Prince DS, Peterson DD, Steiner RM, Gottlieb JE, Scott R, Israel HL, et al. Infection with *Mycobacterium avium* complex in patients without predisposing conditions. *N Engl J Med* 1989;321:863-8.
4. Koh WJ, Kwon OJ, Yu CM, Jeon KM, Suh GY, Chung MP, et al. Recovery rate of nontuberculous mycobacteria from acid-fast-bacilli smear-positive sputum specimens. *Tuberc Respir Dis* 2003;54:22-32.
5. Jeong J, Lee SH, Jeong US, Chang CL, Kim SR. Identification of mycobacteria using high performance liquid chromatography in clinical specimens. *Korean J Clin Microbiol* 2004;7:148-55.
6. Koh WJ, Kwon OJ, Lee KS. Diagnosis and treatment of nontuberculous mycobacterial pulmonary diseases: a Korean perspective. *J Korean Med Sci* 2005;20:913-25.
7. Lee H, Park HJ, Cho SN, Bai GH, Kim SJ. Species identification of mycobacteria by PCR-restriction fragment length polymorphism of the *rpoB* gene. *J Clin Microbiol* 2000;38:2966-71.
8. Devulder G, Pérouse de Montclos M, Flandrois JP. A multigene approach to phylogenetic analysis using the genus *Mycobacterium* as a model. *Int J Syst Evol Microbiol* 2005;55:293-302.
9. Telenti A, Marchesi F, Balz M, Bally F, Böttger EC, Bodmer T. Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. *J Clin Microbiol* 1993;31:175-8.
10. Kim BJ, Lee KH, Park BN, Kim SJ, Bai GH, Kim SJ, et al. Differentiation of mycobacterial species by PCR-restriction analysis of DNA (342 base pairs) of the RNA polymerase gene (*rpoB*). *J Clin Microbiol* 2001;39:2102-9.
11. Springer B, Wu WK, Bodmer T, Haase G, Pfyffer GE, Kroppenstedt RM, et al. Isolation and characterization of a unique group of slowly growing mycobacteria: description of *Mycobacterium lentiflavum* sp. nov. *J Clin Microbiol* 1996;34:1100-7.
12. Lee ES, Lee MY, Han SH, Ka JO. Occurrence and molecular differentiation of environmental mycobacteria in surface waters. *J Microbiol Biotechnol* 2008;18:1207-15.
13. Shin S, Kim EC, Yoon JH. Identification of nontuberculous mycobacteria by sequence analysis of the 16S ribosomal RNA, the heat-shock protein 65 and the RNA

- polymerase beta-subunit genes. *Korean J Lab Med* 2006;26:153-60.
14. Cloud JL, Meyer JJ, Pounder JI, Jost KC Jr, Sweeney A, Carroll KC, et al. *Mycobacterium arupense* sp. nov., a non-chromogenic bacterium isolated from clinical specimens. *Int J Syst Evol Microbiol* 2006;56:1413-8.
 15. Turenne CY, Cook VJ, Burdz TV, Pauls RJ, Thibert L, Wolfe JN, et al. *Mycobacterium parascrofulaceum* sp. nov., novel slowly growing, scotochromogenic clinical isolates related to *Mycobacterium simiae*. *Int J Syst Evol Microbiol* 2004;54:1543-51.
 16. Tortoli E, Chianura L, Fabbro L, Mariottini A, Martín-Casabona N, Mazzarelli G, et al. Infections due to the newly described species *Mycobacterium parascrofulaceum*. *J Clin Microbiol* 2005;43:4286-7.
 17. Molavi A, Weinstein L. In vitro susceptibility of atypical mycobacteria to rifampin. *Appl Microbiol* 1971;22:23-5.
 18. Lee CK, Gi HM, Cho Y, Kim YK, Lee KN, Song KJ, et al. The genomic heterogeneity among *Mycobacterium terrae* complex displayed by sequencing of 16S rRNA and hsp 65 genes. *Microbiol Immunol* 2004;48:83-90.
 19. Tsukamura M, Mizuno S. Numerical analysis of relationships among rapidly growing, scotochromogenic mycobacteria. *J Gen Microbiol* 1977;98:511-7.
 20. Agustí G, Astola O, Rodríguez-Güell E, Julián E, Luquin M. Surface spreading motility shown by a group of phylogenetically related, rapidly growing pigmented mycobacteria suggests that motility is a common property of mycobacterial species but is restricted to smooth colonies. *J Bacteriol* 2008;190:6894-902.
 21. Pace NR. A molecular view of microbial diversity and the biosphere. *Science* 1997;276:734-40.
 22. Thorne JL, Kishino H, Painter IS. Estimating the rate of evolution of the rate of molecular evolution. *Mol Biol Evol* 1998;15:1647-57.
 23. Tortoli E. Impact of genotypic studies on mycobacterial taxonomy: the new mycobacteria of the 1990s. *Clin Microbiol Rev* 2003;16:319-54.
 24. Park Y, Shin HB, Kim CK, Roh KH, Yum JH, Yong D, et al. Identification of bacterial and fungal isolates by sequence analysis of 16S rRNA and internal transcribed spacer. *Korean J Clin Microbiol* 2010;13:34-9.
 25. Cloud JL, Neal H, Rosenberry R, Turenne CY, Jama M, Hillyard DR, et al. Identification of *Mycobacterium* spp. by using a commercial 16S ribosomal DNA sequencing kit and additional sequencing libraries. *J Clin Microbiol* 2002;40:400-6.
 26. Ryoo SW, Shin S, Shim MS, Park YS, Lew WJ, Park SN, et al. Spread of nontuberculous mycobacteria from 1993 to 2006 in Koreans. *J Clin Lab Anal* 2008;22:415-20.