

Application of Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) Assay to Rapid Detection of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* from Blood Cultures

Yun-Hee Baek^{1,§,*}, Mi-Young Jo^{2,3,§,*}, Min-Suk Song^{1,*},
Seung-Bok Hong^{4,*} and Kyeong-Seob Shin^{2,†,*}

Department of Microbiology¹, Laboratory Medicine², Chungbuk National University
College of Medicine, Cheongju 28644, Korea

³Department of Nursing Science, Kyungbuk College of Natural Sciences, Yeongju 36133, Korea

⁴Department of Clinical Laboratory Science, Chungbuk Health & Science University, Cheongju 28150, Korea

We developed the multiplex LAMP assay using 16S rRNA, *femA* and *mecA* genes for direct detection of the methicillin resistance in Staphylococci from positive blood culture. To simultaneously recognize Staphylococci genus, *S. aureus* and methicillin resistance, three sets of six primers for 16S rRNA, *femA* and *mecA* were designed, respectively. The performance of LAMP assay was affirmed using VITEK system for the phenotypic methods of identification and for oxacillin and ceftazidime antimicrobial susceptibility. The optimal condition for LAMP assay was obtained under 64°C for 50 min. The detection limit was determined to be of 20 copies and CFU/reaction (10⁴ CFU/mL). For clinical application of comparison with phenotypic methods, the sensitivity and specificity of the LAMP with *femA* gene for detecting *S. aureus* was 95.31% and 100%, respectively. The sensitivity and specificity of the LAMP with *mecA* gene for detecting methicillin resistance was 98.46% and 100%, respectively. The multiplex LAMP assay with *femA* and *mecA* gene successfully detected all of MRSA (38 isolates) isolates from 103 Staphylococci in blood cultures. The LAMP assay developed in this study is sensitive, specific, and of excellent agreement with the phenotypic methods.

Key Words: Blood culture, Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, 16S rRNA, *femA*, *mecA*, Loop-mediated isothermal amplification

서 론

*Staphylococcus aureus*는 의료기관 연계 감염(hospital associated infection) 뿐만 아니라 지역사회 연계 감염(community associated infection)의 주요한 원인 균으로 모낭염(folliculitis)이나 봉와직염(cellulitis)과 같은 국소 감염부터

심내막염(endocarditis), 패혈증(sepsis) (Lowy, 1998), 그리고 독성 속 증후군(toxic shock syndrome) (Shands et al., 1980)과 같은 전신성 감염도 일으킨다. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)는 *mecA* 유전자를 획득하여 penicillin binding protein 2a (PBP2a)를 발현함으로써 methicillin을 포함한 모든 β-lactam 항균제와의 결합력을 감소시켜 내성을 나타낸다(Hartman and Tomasz, 1984). 또한 MRSA

Received: February 8, 2019 / Revised: March 17, 2019 / Accepted: March 19, 2019

§These authors contributed equally to this study.

*Professor.

†Corresponding author: Kyeong-Seob Shin. Department of Laboratory Medicine, Chungbuk National University College of Medicine, Cheong-ju 28644, Korea.

Tel: +82-43-269-6240, Fax: +82-43-271-5243, e-mail: ksshin@chungbuk.ac.kr

©The Korean Society for Biomedical Laboratory Sciences. All rights reserved.

©This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

는 β -lactam 항균제외에도 여러 종류의 항균제에 내성을 나타내게 되어 사용할 수 있는 항균제가 제한되기 때문에 MRSA에 감염된 환자의 유병률(morbidity)과 사망률(mortality)은 methicillin-susceptible *S. aureus* (MSSA) 감염환자 보다 높다(Cosgrove et al., 2003). 따라서 혈액배양에서 MRSA의 빠르고 정확한 검사는 이들 환자의 적절한 치료에 매우 중요하다.

혈액배양 양성 검체에서 MRSA의 검출을 위해 자동화 기기를 이용한 동정이나 감수성 검사는 검사실에서 가장 흔히 이용하는 방법이지만, 이 방법은 18~36시간 이상이 소요되므로 치료시기가 늦어질 수 밖에 없다. 한편 PCR과 같은 분자유전학적 방법은 빠르고 정확한 검출이 가능하지만 thermocycler나 증폭산물을 검출해야 하는 특별한 장비가 필요하며 경험이 있는 검사자가 필요하다. Notomi 등(Notomi et al., 2000)이 Bst polymerase에 의해 가닥 변위 핵산 자가합성(auto-cycling strand displacement nucleic acid amplification)에 기초한 loop-mediated isothermal amplification (LAMP) 방법을 개발한 이후 이 방법을 이용한 검사가 다양한 균의 동정에 이용되고 있다(Iwamoto et al., 2003; Hara-Kudo et al., 2005; Ito et al., 2006; Curtis et al., 2008; Hara-Kudo et al., 2008; Yamazaki et al., 2008). LAMP 방법은 4~6개의 primer를 이용하여 PCR 보다 특이하며, 등온 조건(isothermal condition)에서 증폭하기 때문에 증폭시간이 더 빠른 장점이 있다. 게다가 증폭산물도 매우 많아 증폭 산물을 검출하는 특별한 방법이 필요치 않으며 pH 지시자(indicator)나 형광을 이용하면 눈으로 증폭산물의 확인이 가능하다(Li et al., 2017).

이 연구에서 저자들은 혈액배양에서 *S. aureus*와 methicillin 내성을 직접 검출하기 위해 3가지 유전자를 이용한 다중(multiplex) LAMP 방법을 개발하였고 이 방법의 성능을 평가하고자 하였다.

재료 및 방법

대상균주

충북지역 한 대학병원의 미생물 검사실에서 혈액배양 양성 검체를 대상으로 하였다. 또한 16S rRNA의 특이도를 평가하기 위해 10개의 그람양성 표준균주(*Staphylococcus aureus* [ATCC 25923, ATCC 25913], *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus bovis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus salivarius*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus casseliflavus*), 6개의 그

람 음성 표준균주(*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*), 그리고 1개의 진균(*Candida albicans*) 등 총 17개의 표준균주를 이용하였다.

혈액배양 및 혈액배양 양성균주의 전처리

환자로부터 10 mL의 혈액을 무균적으로 채혈하여 BacT/ALERT SA standard aerobic bottle (bioMérieux Inc., Marcy-I Étoile, France)과 BacT/ALERT SN standard anaerobic bottle에 각각 5 mL씩 넣었다. 배양은 BacT/ALERT 3D 자동혈액배양기(bioMérieux Inc., Durham, NC, USA)에서 5일까지 시행하였다. 배양 양성 신호가 나올 경우 그람염색을 시행한 후 혈액우무배지(Blood agar plate, Asan, Korea) 및 MacConkey 우무배지(Asan, Korea)에 계대배양하여 균의 동정 및 항균제 감수성 검사에 이용하였다. 그람염색에서 *Staphylococcus species*가 관찰될 경우 혈액배양 병에서 혈액 5 mL를 취하여 혈청분리관(serum separator tube)에 옮긴 후 3,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상층액을 버리고 겔 바로 위에 있는 균침사를 면봉으로 eppendorf 튜브에 옮겨 시험을 할 때까지 -20°C에 보관하였다.

균의 동정 및 methicillin 감수성 검사

균의 동정은 생화학적 검사로 catalase, coagulase, mannitol 검사를 포함하였고 VITEK 2 자동미생물분석기(bioMérieux Inc., Hazelwood, MO, USA)로 확인하였다. Methicillin 항생제 감수성 검사는 Vitek system (bioMérieux)을 이용하여 oxacillin과 cefoxitin 감수성 검사를 시행하였다(CLSI, 2018).

LAMP primer의 설계 및 최적 반응 조건

Staphylococcus species, *S. aureus* 및 methicillin 내성 유전자를 검출하기 위해 16S rRNA, *femA* 및 *mecA* 유전자를 GenBank에서 검색하였고 각각의 염기서열을 결정하였다. 이후 LAMP assay를 위한 primer 설계프로그램인 Primer Explorer V5 software (<http://primerexplore.jp/e/index.html>; Eiken chemical Co. Ltd, Japan)를 사용하여 각 유전자 별로 2종의 외부 primer (F3와 B3), 2종의 내부 primer (FIP와 BIP) 및 2종의 loop primer (F loop primer (LF)와 B loop primer (LB)) 등 총 6종의 primer를 설계하였다(Table 1 & Fig. 1).

LAMP assay 반응은 primer (FIP & BIP, 40~80 pmol; F3 & B3, 5~10 pmol; LF & LB, 20 pmol) 3 μ L, genomic DNA 2 μ L, WarmStart colorimetric LAMP master mix (New England Biolabs Inc., MA, USA) 5 μ L를 더하여 최종 용량을 10 μ L

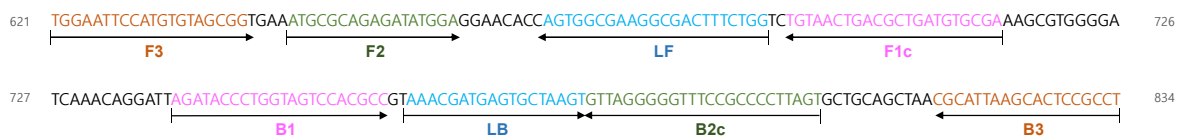
Table 1. The sequences of primers for LAMP assay used in this study

Target gene	Primer	Sequence (5' → 3')
16S rRNA	F3*	TGGAATTCATGTGTAGCGG
	B3*	AGGCGGAGTGCTTAATTGC
	FIP	TCGCACATCAGCGTCAGTTACA-ATGCGCAGAGATATGGAGGA
	BIP	AGATACCCTGGTAGTCCACGCC-CACTAAGGGGCGGAAACC
	LF	CCAGAAAAGTCGCCTTCGCCACT
	LB	AAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGG
<i>femA</i>	F3*	CAGAATCAAAAGCTTTTGCTG
	B3*	AAGTTATCTCGCTTGTGTG
	FIP	CTAAAGGTACTAACACACGGTCTTT-TCGTGATGACAAATTTACTACA
	BIP	AAGAACTAAACGAAGAGCGTGAT-CAGGACGTTTTTCAATATCCTT
	LF	GTAATATTTTAAGCGAT
	LB	TAAAGATTTAAATAAAGCGT
<i>mecA</i>	F3*	TGATGCTAAAGTTCAAAAGAGT
	B3*	GTAATCTGGAAGCTTGTGACC
	FIP	AGGTGTGCTTACAAGTGCTAATAAT-CAACATGAAAAATGATTATGGCT
	BIP	TGACGTCTATCCATTTATGTATGGC-GAGGTTCTTTTTTATCTTCGGTTA
	LF	TGAGGGTGGATAGCAGTACC
	LB	TGAGTAACGAAGAATAT

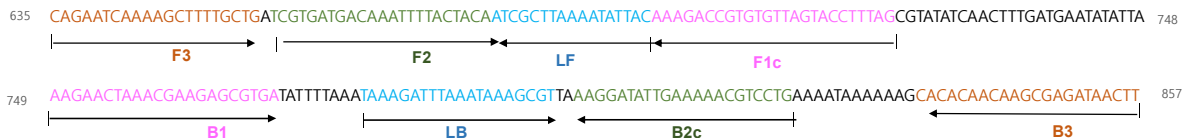
*Two outer primers F3 and B3 were also used as primers for PCR of 16S rRNA, *femA* and *mecA*.

Abbreviations: loop-mediated isothermal amplification; FIP, forward inner primer; BIP, backward inner primer; LF, forward loop primer; LB, backward loop primer

A. 16S rRNA



B. *femA*



C. *mecA*



Fig. 1. Primers designed for 16S rRNA, *femA*, *mecA* loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assays. Nucleotide sequences of 16S rRNA (A), *femA* (B), *mecA* (C) and the location of LAMP primers. The forward and backward inner primers are F1c-F2 and B1c-B2 sequences, respectively. The forward and backward outer primers are F3 and B3, respectively.

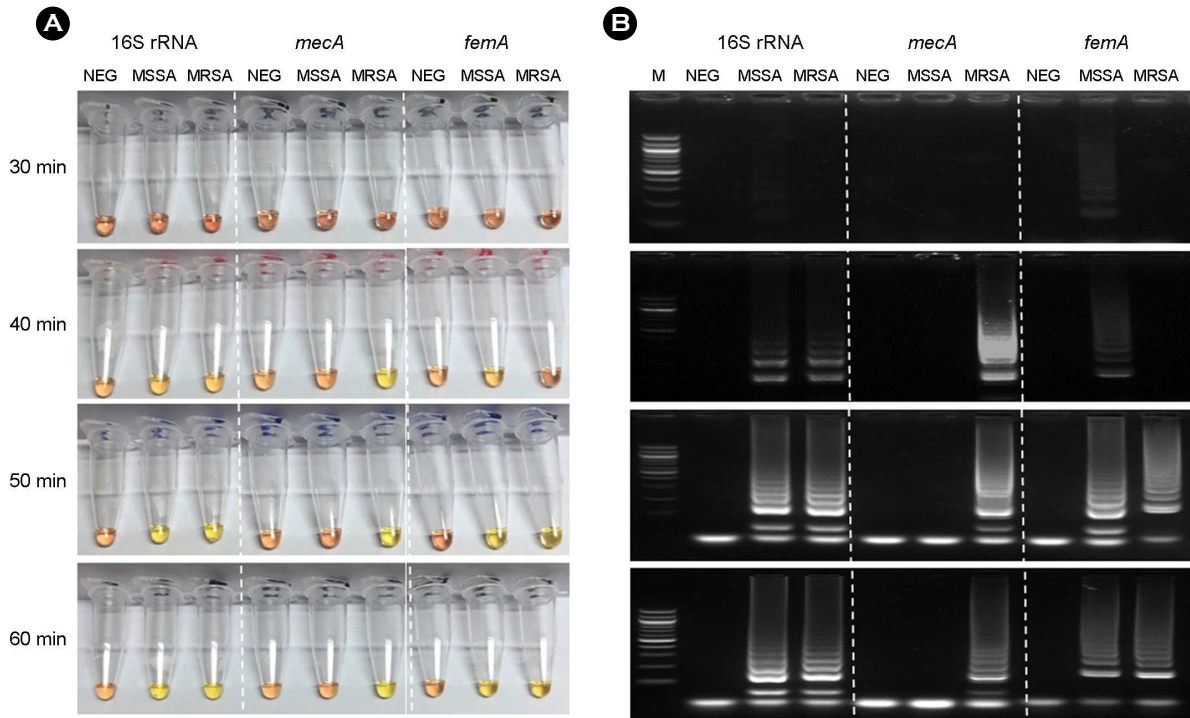


Fig. 2. Visual (A) and agarose gel (B) images of the 16S rRNA, *mecA*, *femA* loop-mediated isothermal amplification (LAMP) product of MSSA and MRSA on various reaction times. The yellow color change of pH indicator was interpreted positive for amplification of DNA (A). The electrophoresis was performed at 2% agarose gel and the amplified products typically showed the ladder like shape (B). The best reaction was obtained at 64°C and 50 min. **Abbreviations:** NEG, negative; MSSA, methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*; MRSA, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; M, molecular size marker

로 하여 시행하였다. LAMP assay의 반응 최적 시간 및 온도를 확인하고자 다양한 시험 조건으로 하였으며, T100™ Thermal cycler (Bio-Rad Laboratories Inc., Foster City, CA, USA)를 이용하여 증폭을 한 후 효소활성을 제거하기 위해 80°C에서 5분간 반응시킨 후 종료하였다. 반응이 끝난 후 튜브의 색 변화를 육안으로 관찰하여 양성 여부를 판독하였고, 동시에 2% agarose gel에서 전기영동을 하여 LAMP assay에서 특이적으로 나타나는 사다리 모양의 증폭 유전자 밴드를 확인하여 양성 여부를 판정하였다.

LAMP, PCR 및 RT-PCR의 검출 한계

MRSA 부유액 (1.0×10^7 CFU/mL)을 1.0×10^1 CFU/mL까지 10배수 단계 희석하여 각 농도에서 16S rRNA, *femA* 및 *mecA*에 대한 LAMP 및 PCR을 시행하였다. 검출 한계 실험은 3회씩 반복 실험하였다.

LAMP assay는 본 연구에서 확립된 표준 조건대로 시행하였으며, PCR은 F3 및 B3 primer를 이용하였으며 DNA 2 µL를 PCR kit (Enzymomics, Daegon)에 섞어 최종 용

량 10 µL가 되게 한 후 시행하였다. PCR 반응은 T100™ Thermal cycler (Bio-Rad)를 이용하여 denaturation (95°C) 30초, annealing (58°C) 30초, elongation (72°C) 60초로 35회 시행하였고 72°C에서 7분간 최종 반응을 시행하였다. 증폭산물은 2% agarose gel에서 전기영동 하였다.

16S rRNA LAMP assay의 특이도

17개의 표준균주를 이용하여 16S rRNA LAMP assay의 특이도를 평가하였다.

임상균주를 이용한 LAMP assay의 성능 평가

혈액배양이 의뢰된 검체 중 균이 증식하였고 그람염색에서 *Staphylococcus* species가 관찰된 103개의 임상 검체를 대상으로 Vitek 2 system에 의한 균의 동정 그리고 감수성 검사를 시행하였고 동시에 16S rRNA, *femA* 및 *mecA*에 대한 multiplex LAMP assay를 시행하여 2가지 검사간의 성능을 비교하였다.

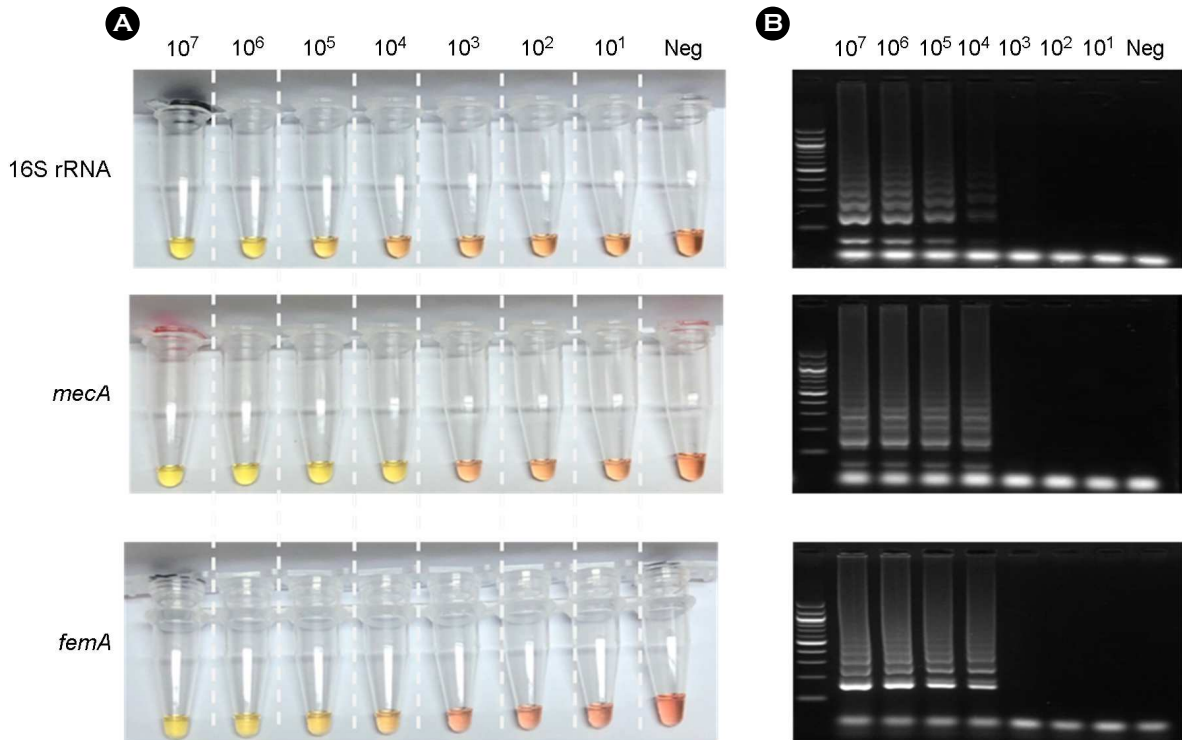


Fig. 3. Visual (A) and agarose gel (B) images of the 16S rRNA, *mecA*, *femA* loop-mediated isothermal amplification (LAMP) product of clinical MRSA isolate at serial diluted concentration ($10^1 \sim 10^7$ CFU/mL). The yellow color change of pH indicator was interpreted positive for amplification of DNA (A). The electrophoresis was performed at 2% agarose gel and the amplified products typically showed the ladder like shape at 10^4 CFU/mL except faint amplification products of 16S rRNA (B). **Abbreviation:** Neg, negative

결 과

MSSA와 MRSA 균을 대상으로 $60 \sim 65^\circ\text{C}$ 와 30, 40, 50, 60분의 반응시간으로 LAMP assay를 시행하여 64°C 50분에서 가장 뚜렷한 결과를 보였으므로 이후의 모든 실험은 64°C 에서 50분으로 진행하였다(Fig. 2).

LAMP assay 검출 민감도 측정

*S. aureus*를 이용한 16S rRNA, *femA*, *mecA* gene에 대한 LAMP과 conventional PCR에 대한 검출 민감도는 Table 2과 같았다(Table 2 & Fig. 3). Conventional PCR은 16S rRNA에서는 10^5 CFU/mL 이상에서 증폭되었고 *femA*와 *mecA*는 10^6 CFU/mL 이상에서 증폭되었지만 LAMP 방법은 3개의 유전자 모두 10^4 CFU/mL 농도에서 증폭되어 conventional PCR에 비해 10~100배 민감하였다.

16S rRNA LAMP assay의 특이도

17개의 표준균주(그람양성알균 10주, 그람음성간균 6주,

Table 2. Detection limits of LAMP assay, conventional PCR for 16S rRNA, *femA* and *mecA* genes of *Staphylococcus aureus*

Gene	Detection limit CFU/mL (copies/run)	
	LAMP	PCR
16S rRNA	10^4 (20 copies)	10^5 (200 copies)
<i>femA</i>	10^4 (20 copies)	10^6 (2,000 copies)
<i>mecA</i>	10^4 (20 copies)	10^6 (2,000 copies)

Abbreviation: CFU, colony forming unit

C. albicans 1주)를 대상으로 한 16S rRNA LAMP 검사에서 모두 일치하는 결과를 보였다(Table 3).

임상 검체를 적용한 LAMP assay의 민감도에 특이도 평가

혈액배양에서 분리된 103개의 포도알균을 대상으로 한 16S rRNA LAMP 검사에서 모두 양성을 보였다. *femA* LAMP 검사는 3개의 MSSA를 검출하지 못하였으나 나머지 100균주는 정확한 결과를 보여 생화학적 동정 및 감

Table 3. Specificity of LAMP assay for detecting the 16S rRNA gene of Staphylococci in reference strains

Microorganisms	Reference strains	Result for 16S rRNA LAMP assay
Gram positive bacteria		
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923	Positive
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25913	Positive
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ATCC 12228	Positive
<i>Streptococcus pyogenes</i>	ATCC 19615	Negative
<i>Streptococcus agalactiae</i>	ATCC 12386	Negative
<i>Streptococcus bovis</i>	ATCC 49147	Negative
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	ATCC 49619	Negative
<i>Streptococcus salivarius</i>	ATCC 40412	Negative
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 29212	Negative
<i>Enterococcus casseliflavus</i>	ATCC 700327	Negative
Gram negative bacteria		
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	Negative
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 700603	Negative
<i>Enterobacter cloacae</i>	ATCC 700323	Negative
<i>Citrobacter freundii</i>	ATCC 8090	Negative
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853	Negative
<i>Acinetobacter baumannii</i>	ATCC 19606	Negative
Fungus		
<i>Candida albicans</i>	TIMM 3316	Negative

수정 검사 결과를 기준으로 평가한 예민도와 특이도는 각각 95.31% (61/64)와 100% (39/39)이었다. *mecA* LAMP 검사는 1개의 MRCoNS를 검출하지 못하였으나 나머지 102개의 검체는 정확한 결과를 보여 예민도와 특이도는 각각 98.46% (64/65)와 100% (38/38)이었다(Tables 4 & 5).

고찰

전통적으로 혈액배양에서 MRSA의 검출은 표현형적 방법(phenotypic method)으로 균을 동정하고 methicillin 감수성 검사를 하는 것이 참고 방법으로 되어 있지만 이 방법은 균의 계대배양, 동정 및 감수성 검사에 36시간 이상 소요된다. 검사시간을 단축하기 위해 혈액배양 양성 검체에서 직접 분자유전학적 검사 방법 또는 MALDI-TOF 등을 이용하는 여러 검사들에 대한 보고들이(Stamper et al., 2007; Stevenson et al., 2010; Clerc et al., 2014; Verroken et al., 2015) 있다. 그렇지만 분자유전학적 방법은 DNA의 증폭 및 검출장비가 필요하며 증폭시간이 3시간 이상 소요되며 batch 방식으로 시행해야 한다. 그리고 MALDI-TOF 방법은 mass spectrophotometry가 필요하며, methicillin 내성을 검출하기 위해서는 특별한 단계가 추가로 필요하다(Opta et al., 2015).

최근에 소개된 LAMP 검사 방법은 6~8개 특이 부위를 인지하는 6개의 primer를 이용하여 Bst DNA 중합효소에 의한 autocycling strand displacement DNA 합성을 통하여 적

Table 4. Results of LAMP assay for detecting *femA* and *mecA* genes in 103 clinical isolates from positive blood culture

Organisms	Multiplex LAMP assay				Number of clinical isolates
	<i>femA+mecA+</i>	<i>femA+mecA-</i>	<i>femA-mecA+</i>	<i>femA-mecA-</i>	
MRSA	38	-	-	-	38
MSSA	-	23	-	3	26
MRCoNS	-	-	26	1	27
MSCoNS	-	-	-	12	12

Abbreviations: MRSA, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; MSSA, methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*; MRCoNS, methicillin-resistant coagulase negative Staphylococci; MSCoNS, methicillin-susceptible coagulase negative Staphylococci

Table 5. Sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV) and negative predictive value (NPV) of LAMP assay with *femA* and *mecA* genes for detection of MRSA 103 clinical isolates from positive blood cultures

Genes	Sensitivity (%)	Specificity (%)	PPV (%)	NPV (%)
<i>femA</i>	61/64 (95.31)	39/39 (100)	61/61 (100)	38/41 (92.68)
<i>mecA</i>	64/65 (98.46)	38/38 (100)	64/64 (100)	38/39 (97.43)

은 양의 DNA도 정확하고 빠르게 증폭시킬 수 있다. 또한 60°C 정도의 등온에서 증폭하기 때문에 온도가 변화하는데 필요한 시간을 절약할 수 있으며 PCR에 비해 검체에 의한 억제 효과도 거의 없다. 게다가 증폭산물을 혼탁도(turbidity)나 색 변화(pH indicator 또는 SYBRE Green I)를 육안으로도 확인할 수 있는 장점이 있다(Li et al., 2017). 한편 몇몇 유전자를 이용한 LAMP 검사가 *S. aureus* 및 MRSA를 검출하는데 이용되었다. *spa* (Misawa et al., 2007), *nuc* (Chen et al., 2017), *femA* (Xihong et al., 2013)가 *S. aureus*를 검출하는데 이용되었고, methicillin 내성을 검출하는데 *mecA*가 이용되었다. 또한 *orfX*는 *S. aureus*와 MRSA를 검출하는데 이용되기도 하였다(Su et al., 2014). 본 연구에서는 16S rRNA, *femA* 및 *mecA* 유전자를 이용한 다중 LAMP 검사를 이용하여 혈액배양 양성 검체에서 *Staphylococcus* species, *S. aureus* 및 methicillin 내성을 동시에 검출하고자 하였다.

LAMP assay의 검출 예민도를 conventional PCR과 비교한 결과, Table 2과 같이 LAMP assay에서 3개의 유전자에 대해 검출 예민도는 10⁴ CFU/mL (20 copies)였다. 한편 10⁴ CFU/mL 농도의 MRSA에서 *femA*와 *mecA*의 유전자에 대한 LAMP 검사에서 명확한 사다리 모양의 증폭산물이 관찰되었지만 16S rRNA LAMP 검사는 10⁴ CFU/mL에서는 희미하지만 3회 반복 실험 모두에서 확실하게 증폭되어 3개의 유전자에 대한 LAMP의 검출 예민도를 10⁴ CFU/mL로 결정할 수 있었다. 결론적으로 LAMP 방법은 conventional PCR의 16S rRNA는 10배, *femA*와 *mecA*는 100배 정도 민감하였다. 이는 LAMP assay에서 strand displacement activity가 높고 DNA 손실률이 적어 증폭효율이 높다는 것을 의미한다.

103개의 임상 검체를 대상으로 생화학적 동정 및 항균제 감수성 시험 결과와 비교한 *femA*와 *mecA* LAMP 방법의 민감도와 특이도는 Table 4와 Table 5와 같다. 64개의 *S. aureus* 중 *femA*에 대해 음성인 균이 3균주로 *femA*의 민감도는 95.31% (61/64)였으며 39개의 CNS는 모두 *femA*에 음성이어서 특이도는 100%이었다. *femA* 음성인 *S. aureus*가 3균주가 존재하기 때문에 *S. aureus*의 감별에 *femA* 이외에 *nuc* 등 유전자를 추가해 볼 필요가 있을 것이다. 65개의 MRSA와 MRCoNS 중 1균주를 제외하고 모두 *mecA* LAMP은 양성을 보였고 38 MSSA와 MRCoNS는 음성을 보여 예민도 특이도는 각각 98.46%와 100%이었다. 위음성인 MRCoNS의 경우 methicillin 내성에 관여하는 유전자가 *mecA* 뿐만 아니라, *mecA1*, *A2*, *mecB*, *mecC*와 같은

mec 유전자 유사체(homologues)의 경우 통상적인 *mecA* 증폭에 의해 검출되지 않았을 가능성이 있다(Wu et al., 2001). 한편 혈액배양에서 MRSA와 non-MRSA의 감별이 치료에 가장 중요한데, 본 연구에서 *femA*와 *mecA*를 동시에 검사할 때 MRSA와 이외의 균주와 감별은 100% 가능하였다 (Tables 4 & 5).

LAMP assay 뿐만 아니라 분자검사 방법의 단점은 혈액배양에서 MSSA와 MRCoNS가 동시에 존재하면 MRSA의 위양성(false positive) 결과가 나올 수 있는 것이다(Becker et al., 2006). 혈액배양에서 그런 경우는 매우 드물지만 앞으로 MRSA에 대한 특이 marker의 개발 또는 보완이나 LAMP assay 이후 균의 배양 결과를 확인해야 할 것이다.

결론적으로 위와 같은 분자생물학적 단점에도 불구하고 혈액배양 양성병에서 MRSA의 직접 검출하는데 LAMP assay의 적용은 MRSA 균혈증 환자의 신속한 치료를 가능케 하는데 매우 도움이 될 것으로 사료된다.

ACKNOWLEDGEMENT

이 논문은 2018년도 정부(미래창조과학부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업임(No. NRF-2018M3A9H4055769).

CONFLICT OF INTEREST

The authors have no conflicts of interest to disclose.

REFERENCES

- Becker K, Pagnier I, Schuhen B, Wenzelburger F, Friedrich AW, Kipp F, et al. Does nasal cocolonization by methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* strains occur frequently enough to represent a risk of false-positive methicillin-resistant *S. aureus* determinations by molecular methods? J Clin Microbiol. 2006. 44: 229-231.
- Chen C, Zhao Q, Guo J, Li Y, Chen Q. Identification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) using simultaneous detection of *mecA*, *nuc* and *femB* by loop-mediated isothermal amplification (LAMP). Curr Microbiol. 2017. 74: 965-971.
- Clerc O, Prod'homme G, Senn L, et al. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrophotometry and PCR-based rapid diagnosis of *Staphylococcus aureus* bacteremia. Clin Microbiol Infect. 2014. 20: 355-360.
- Cosgrove SE, Sakaoulas G, Perencevich EN, Schwaber MJ,

- Karchmer AW, Carmeli Y. Comparison of mortality associated with methicillin-resistant and methicillin susceptible *Staphylococcus aureus* bacteremia: a meta-analysis. *Clin Infect Dis*. 2002. 36: 53-59.
- Curtis KA, Rudolph DL, Owen SM. Rapid detection of HIV-1 by reverse-transcription, llood-mediated isothermal amplification (RT-LAMP). *J Virol Methods*. 2008. 151: 264-270.
- Hara-Kudo Y, Konishi N, Ohtsuka K, Hiramatsu R, Tanaka H, Konuma H, Takatori K. Detection of verotoxigenic *Escherichia coli* O157 and O26 in food by plating methods and LAP method: a collaborative study. *Int J Food Microbiol*. 2008. 122: 156-161.
- Hara-Kudo Y, Yoshino M, Kojima T, Ikedo M. Loop-mediated isothermal amplification for the rapid detection of salmonella. *FEMS Microbiol Lett*. 2005. 253: 155-161.
- Hartman BJ, Tomasz A. Low-affinity penicillin-binding protein associated with beta-lactam resistance in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol*. 1984. 158: 513-516.
- Ito M, Watanabe M, Nakagawa N, Ihara T, Okuno Y. Rapid detection and typing of influenza A and B by loop-mediated isothermal amplification: comparison with immunochromatography and virus isolation. *J Virol Methods*. 2006. 135: 272-275.
- Iwamoto T, Sonobe T, Hayashi K. Loop-mediated isothermal amplification for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex, *M. avium*, and *M. intracellulare* in sputum samples. *J Clin Microbiol*. 2003. 41: 2616-2622.
- Li Y, Fan P, Zhou S, Zhang L. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a novel rapid detection platform for pathogens. *Microb Pathog*. 2017. 107: 54-61.
- Lowy FD. *Staphylococcus aureus* infections. *N Engl J Med*. 1998. 339: 520-532.
- Misawa Y, Yoshida A, Saito R, Yoshida H, Okuzumi K, Ito N, et al. Application of loop-mediated isothermal amplification technique to rapid and direct detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in blood cultures. *J Infect Chemother*. 2007. 13: 134-140.
- Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acid Res*. 2000. 28: e63.
- Opota O, Croxatto A, Prod'hom G, Greub G. Blood culture-based diagnosis of bacteremia: state of the art. *Clin Microbiol Infect*. 2015. 21: 313-322.
- Shands KN, Schmid G, Dan BB, Blum D, Guidotti RJ, Hargrett T, et al. Toxic-shock syndrome in menstruating women-association with Tampon use and *Staphylococcus aureus* and clinical features in 52 cases. *N Engl J Med*. 1980. 303: 1436-1442.
- Stamper PD, Cai M, Howard T, Speser S, Carroll KC. Clinical validation of the molecular BD geneohm staphsr assay for direct detection of *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in positive blood cultures. *J Clin Microbiol*. 2007. 45: 2191-2196.
- Su J, Liu X, Li Y, Chen D, Li Y, Yu G. Rapid and simple detection of methicillin-resistance *Staphylococcus aureus* by *orfX* loop-mediated isothermal amplification assay. *BMC Biotechnology*. 2014. 14: 18.
- Verroken A, Defourny L, Lechgar L, Magnette A, Delmee M, Glupczynski Y. Reducing time to identification of positive blood cultures with MALDI-TOF MS analysis after a 5-h subculture. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2015. 34: 405-413.
- Wu SW, Lencastre H, Tomaz A. Recruitment of the *mecA* gene homologue of *Staphylococcus sciuri* into a resistance determinant and expression of the resistance phenotype in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol*. 2001. 183: 2417-2424.
- Xihong Z, Li Y, Park M, Wang J, Zhang Y, He X, et al. Loop-mediated isothermal amplification assay targeting the *femA* gene for rapid detection of *Staphylococcus aureus* from clinical and food samples. *J Microbiol Biotechnol*. 2013. 23: 246-250.
- Yamazaki W, Seto K, Taguchi M, Ishibashi M, Inoue K. Sensitive and rapid detection of cholera toxin-producing *Vibrio cholerae* using a loop-mediated isothermal amplification. *BMC Microbiol*. 2008. 8: 94.

<https://doi.org/10.15616/BSL.2019.25.1.75>

Cite this article as: Baek YH, Jo MY, Song MS, Hong SB, Shin KS. Application of Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) Assay to Rapid Detection of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* from Blood Cultures. *Biomedical Science Letters*. 2019. 25: 75-82.