

Serological diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* infection: a complicated puzzle

Alessandra Sensini¹, Francesca Zuccherini¹, Giovanni Cerboni¹, Mariapia Galullo¹, Laura Meli², Grazia Dal Maso², Carlo Paoli²

¹ Sezione Microbiologia, Dipartimento di Medicina Sperimentale e Scienze Biochimiche, Università degli Studi di Perugia, S.C. Microbiologia, Ospedale "S. Maria della Misericordia", Località Sant'Andrea delle Fratte-San Sisto, Perugia

² DIESSE S.p.A. Via delle Rose, 10 53035 Monteriggioni (Siena)

Key words: *Mycoplasma pneumoniae*, Atypical pneumonia, Serodiagnosis

Diagnosi sierologica delle infezioni da *Mycoplasma pneumoniae*: un complicato puzzle

SUMMARY

Background. *Mycoplasma pneumoniae* has a prominent role in respiratory tract infections, especially in children and young adults. Serological methods, in particular complement fixation test (CFT) and enzyme immunoassays (ELISA), are most widely used for the diagnosis. However, a reliable diagnosis remains difficult to achieve.

Study Design. The population study was subdivided in 2 groups. Group 1) 52 serum samples from blood donors; group 2) 50 serum samples from 50 patients (23 women, 27 men) affected by atypical pneumonia. The mean age was 29.2 years (1 to 85 years) and 48% was under 20 years. The following commercial products were used: Chorus *M. pneumoniae* ELISA IgG and IgM, Chorus CFT total Ig (DIESSE, Siena, Italy).

Results. Group 1) 67.3% of blood donors resulted positive for IgG and 19.2% positive or equivocal for IgM. Group 2) specific IgG were detected in 70% of the patients and IgM resulted positive or equivocal in 64%. Since the number of IgG positive subjects was similar in the 2 groups, the CFT test was added to better define acute stage of infection. The CFT test resulted positive in 92.3% of the IgG+IgM+, and in 41.7% of the IgG+IgM- serum samples, respectively.

Conclusions. High titers of IgG do not necessarily identify acute or recent infection, as previously suggested. The CFT test showed a good correlation with ELISA test in IgG+IgM+ serum samples. Detection of IgM antibodies is still the most reliable test to define acute infection, especially if confirmed by a positive CFT test.

INTRODUZIONE

Mycoplasma pneumoniae appartiene alla classe dei Mollicutes, batteri caratterizzati dall'assenza della parete cellulare, e causa infezioni delle basse vie respiratorie. Recenti epidemie dovute a questo batterio sono state riportate lo scorso anno nel nord Europa, a dimostrazione della grande diffusione di questo microrganismo e della sua importanza come patogeno umano (3, 6, 9, 10).

La più comune manifestazione clinica è una tracheobronchite lentamente progressiva con malessere e tosse non produttiva. La più grave forma di infezione è la polmonite acquisita in comunità, di cui *M. pneumoniae* può essere l'agente eziologico fino al 40% di tutti i casi, con necessità di ospedalizzazione fino al 18% nei bambini. Raramente sono state osservate manifestazioni neurologiche, come meningite o sindrome di Guillain-Barré (1). I primi studi basati sulla sierologia e sulla coltura identificavano i più colpiti nei soggetti fra 5 e 15 anni, con un declino dell'incidenza nei soggetti adulti e negli anziani (12). Altri studi hanno dimo-

strato che l'incidenza di polmonite da *M. pneumoniae* aumenta con l'età nei pazienti ospedalizzati ed è seconda solo alla polmonite da *S. pneumoniae* nei soggetti anziani (8).

Nella diagnosi microbiologica la coltura rappresenta il *test* di riferimento, ma in questo caso non viene utilizzata nella *routine* in quanto, per le peculiari caratteristiche di questo batterio, risulta lenta, laboriosa e costosa. Infatti, richiede terreni di coltura specifici, un lungo periodo di incubazione e appropriate procedure addizionali per l'identificazione di specie. *Test* molecolari (Polymerase Chain Reaction, PCR) sono stati messi a punto per la ricerca di DNA batterico nei campioni respiratori, ma la persistenza del microrganismo per una lunghezza di tempo variabile dopo l'infezione acuta, rende difficile in alcuni casi determinare il significato di una coltura o di un *test* di PCR positivi senza addizionali *test* di conferma, come la sierconversione (13).

M. pneumoniae possiede antigeni lipidici e proteici, che stimolano risposte anticorpali determinabi-

Corresponding author: Alessandra Sensini

Sezione Microbiologia, Dipartimento di Medicina Sperimentale e Scienze Biochimiche, Università degli Studi di Perugia, S.C. Microbiologia, Ospedale "S. Maria della Misericordia",

Località Sant'Andrea delle Fratte-San Sisto, 06132 Perugia - Tel.: 075 5784284 - Fax 075 5784108

E-mail: sensini@unipg.it

li dopo circa una settimana e che raggiungono il picco dopo 3-6 settimane per poi declinare gradualmente nell'arco di mesi o anni. A causa del lungo periodo di incubazione, la risposta anticorpale è spesso evidente alla comparsa dei sintomi. IgM compaiono dopo circa 1 settimana, seguite dopo circa 2 settimane dalla comparsa di IgG. La presenza di IgM viene considerata più significativa nella popolazione pediatrica, per le minori opportunità di ripetute esposizioni. Gli adulti infettati ripetutamente negli anni possono non mostrare una rapida risposta IgM (11) e, in questi casi, la reinfezione determina solamente una risposta IgG. Di conseguenza, l'assenza di IgM non esclude un'infezione acuta.

D'altra parte, quando presente, la risposta IgM può persistere per mesi o anni dopo l'infezione e, in questi casi, la positività per IgM potrebbe non indicare un'infezione acuta o recente. Per molti anni il *test* di Fissazione del Complemento (FCT) è stato l'unico metodo per la diagnosi delle infezioni da *M. pneumoniae*.

Questo *test* determina soprattutto la presenza di IgM e, in minor grado di IgG. Risulta, quindi, particolarmente utile nelle infezioni acute. Successivamente, sono stati messi a punto altri tipi di *test* che permettono la determinazione separata di IgG e IgM per una migliore definizione dello stadio dell'infezione. Fra questi il più usato è il *test* ELISA per la possibilità di automazione e di migliore gestione di un elevato numero di campioni. Tuttavia, poiché a tutt'oggi mancano *test* ben standardizzati, la diagnosi di infezione da *M. pneumoniae* rimane difficile.

MATERIALI E METODI

Sono stati studiati 102 campioni suddivisi in 2 gruppi:

Gruppo 1) 52 campioni di siero provenienti da donatori di sangue

Gruppo 2) 50 campioni provenienti da 50 pazienti, 23 donne e 27 uomini, raccolti al momento della diagnosi di polmonite atipica. L'età media era 29.2 anni (range da 1 a 85 anni) e il 48% di essi aveva un'età inferiore a 20 anni. Nessun altro agente era individuato per una diagnosi eziologica della malattia.

Sono stati utilizzati i prodotti commerciali Chorus *M. pneumoniae* Ig totali FCT e Chorus *M. pneumoniae* ELISA IgG e IgM (DIESSE, Siena, Italia). I due *test* utilizzano come antigene il ceppo ATCC 29342, coltivato in terreno liquido e poi estratto per sonicazione a pH alcalino per il *test* FCT e coltivato in fiasca e successivamente estratto con due detergenti per il *test* ELISA. Per l'esecuzione dei *test* e l'interpretazione dei risultati sono state seguite le istruzioni del produttore.

Per l'elaborazione statistica sono stati utilizzati il *test* del χ quadrato e il t di Student con significatività $p < 0.05$.

RISULTATI

I risultati dei *test* eseguiti sui 52 campioni di siero provenienti da donatori di sangue sono illustrati nella Tabella 1.

Il gruppo 1, costituito da donatori di sangue, una popolazione presumibilmente sana, rappresenta il gruppo di controllo. Di questi, il 67.3% possiede anticorpi di classe G a titolo medio-alto verso *M. pneumoniae* e il 19.2% mostra una risposta dubbia o positiva alla ricerca di IgM. Gli stessi sieri, saggiati con il metodo FCT, dimostrano che nel 74.5% dei casi il *test* è negativo o presenta valori pari alla soglia di positività del *test*.

La popolazione del gruppo 2 è costituita da pazienti, nei quali *M. pneumoniae* potrebbe essere l'agente eziologico della patologia osservata.

I risultati dei *test* eseguiti sui 50 campioni di siero prelevati da pazienti al momento della diagnosi di polmonite atipica sono illustrati nella Tabella 2.

Il 70% di questi pazienti presenta anticorpi di classe G a titolo medio-alto verso *M. pneumoniae* e il 72% mostra una risposta dubbia o positiva alla ricerca di IgM. Saggiando gli stessi sieri con il metodo CFT, si dimostra che la risposta è negativa nel 34% dei casi.

In Tabella 3 sono riportati a confronto i risultati del *test* ELISA IgG e IgM nei due gruppi. Come si può chiaramente vedere, non ci sono differenze significative fra i 2 gruppi rispetto alla positività per gli anticorpi di classe G a tutte le concentrazioni considerate. Diverso è il quadro relativo alla positività per IgM, che è significativamente più alta nel gruppo 2, mentre rimane costante, con una percentuale pari a circa l'8%, il numero di risultati equivoci.

Il confronto fra i risultati del *test* FCT nei 2 gruppi è riportato in Tabella 4. Differenze statisticamente significative si riscontrano soltanto in caso di negatività del *test*, con una percentuale maggiore nel gruppo 1, o in caso di alto titolo anticorpale ($T \geq 64$), significativamente superiore nel gruppo 2. Simili e non significative sono le percentuali di campioni positivi alle altre diluizioni.

Nella Tabella 5 è stato eseguito il confronto fra le concentrazioni di IgG e IgM al *test* ELISA e l'età dei pazienti. L'età media \pm Deviazione Standard non differiva in maniera significativa per quanto riguarda gli anticorpi IgG, mentre risultava significativamente diversa separando la positività per IgM in dubbio-basso positivo (< 3 campione/*cut off*) e alto positivo (≥ 3 campione/*cut off*).

Nella Tabella 6 è riportata la distribuzione dei titoli anticorpali $T \geq 8$ al *test* FCT in relazione all'età

dei pazienti.

Confrontando l'età media \pm Deviazione Standard dei pazienti con titolo anticorpale $T \geq 64$ con quella dei pazienti che avevano una positività a titoli anticorpali inferiori, si dimostra che ad una più giovane età corrisponde una migliore risposta anticorpale, come evidenziato dalla significatività rispetto ai titoli $T=8$ e $T=16$. Non è significativa, invece, la differenza d'età fra i pazienti con titolo $T=32$ e quelli con $T \geq 64$.

In Tabella 7 sono stati, infine, confrontati i quadri sierologici dei campioni del gruppo 2 ottenuti utilizzando il test ELISA IgG e IgM e il test FCT, escludendo i risultati equivoci. In presenza di positività per IgG e IgM con il test ELISA, il test FCT risulta positivo nel 92.3% dei casi, mentre, in caso di sola presenza di IgG, il test FCT risulta positivo nella metà dei casi. In 3 casi di positività per sole IgM, il test FCT risulta negativo e l'infezione da *M. pneumoniae* poteva essere esclusa in 5 casi per negatività di tutti i test.

DISCUSSIONE

M. pneumoniae rappresenta una comune causa di infezioni delle alte e basse vie respiratorie in bambini e adulti di tutte le età, con la possibilità di reinfezioni. La reale incidenza di tali infezioni è probabilmente sottostimata per il fatto che la maggior parte di esse possono essere gestite a livello ambulatoriale, mentre i casi con manifestazioni cliniche più gravi richiedono ospedalizzazione. Una corretta e rapida diagnosi di queste infezioni è necessaria per poter iniziare una appropriata terapia antibiotica.

Da molti anni i test sierologici vengono utilizzati come principale strumento diagnostico, pur nella consapevolezza dei limiti che essi presentano. Infatti, non devono essere eseguiti troppo presto, cioè prima che la risposta immune abbia avuto il tempo di svilupparsi, e dovrebbero essere sempre saggiati in parallelo e un siero prelevato in fase acuta e uno in fase di convalescenza per poter osservare la sierconversione. Tutto ciò ovviamente ritarda la diagnosi.

Il test di fissazione del complemento determina soprattutto la precoce risposta di anticorpi della classe M ed è, quindi, stato largamente utilizzato. Poiché non permette di discriminare fra le diverse classi anticorpali, molte altre tecniche sono state sviluppate per avere un più definito quadro sierologico: immunofluorescenza indiretta, emoagglutinazione diretta e indiretta, e soprattutto i saggi immunoenzimatici, che permettono la determinazione separata di IgG e IgM e la gestione di un grande numero di campioni contemporaneamente. Molti studi hanno messo a confronto le varie metodiche sviluppate negli anni e tutti concordano

nell'affermare che la sierologia non sia più sufficiente per una rapida e affidabile diagnosi di infezione da *M. pneumoniae*.

L'avvento dei test di amplificazione genica ha permesso di superare le difficoltà legate all'isolamento in coltura di questi batteri e ha fornito un ulteriore prezioso strumento diagnostico. Attualmente, considerando i limiti ben descritti delle due metodologie, si consiglia l'uso combinato della sierologia e della ricerca del genoma per l'identificazione dell'infezione da *M. pneumoniae* (2, 5, 7, 14-16).

Nel nostro studio abbiamo utilizzato il test "storico", la fissazione del complemento, adattato ad uno strumento automatizzato. Infatti, la tradizionale procedura è lunga e indaginoso. Lo strumento Chorus permette di eseguire il test in maniera automatizzata e in 2h circa, agevolando il lavoro dell'operatore e i tempi di refertazione. In parallelo abbiamo utilizzato un test ELISA IgG e IgM, adattato allo stesso strumento, che fornisce risultati in 1h circa.

Il gruppo dei donatori di sangue (gruppo 1) è servito come controllo per una migliore valutazione dei test usati.

La notevole diffusione di questo batterio nella popolazione è dimostrata dal fatto che il 67.3% di essi presentava anticorpi di classe G a concentrazione medio-alta con il test ELISA, un valore assolutamente sovrapponibile al 70% di positività dei pazienti con polmonite atipica.

Risulta, quindi, poco affidabile la scelta di definire una infezione recente in base al solo risultato di IgG. Gli anticorpi di classe M erano presenti nel 19.2% dei soggetti del gruppo 1, un valore simile a quelli riportati in letteratura per questo tipo di popolazione, e significativamente diverso rispetto al 72% dei pazienti del gruppo 2.

Di conseguenza, la presenza di IgM suggerisce un'infezione acuta.

Il test di fissazione del complemento, pur non discriminando le classi anticorpali, evidenzia essenzialmente IgM, ma anche IgG. La differenza tra i due gruppi è significativa solo in caso di negatività o di alto titolo ($T \geq 64$), mentre alle diluizioni più bassi le percentuali di positivi risultano pressoché equivalenti. Un fattore che influenza l'entità della risposta immune è l'età del paziente (4).

Quando abbiamo inserito questa variabile nell'elaborazione dei dati, abbiamo osservato che fra i positivi per le varie concentrazioni di IgG non si osservavano differenze significative d'età, mentre i pazienti con positività per IgM ad alta concentrazione erano significativamente più giovani. Questo dato era confermato anche dai risultati del test di fissazione del complemento, che mostrava

lo stesso fenomeno per i positivi ad alto titolo. I due *test* che abbiamo utilizzato danno nella maggior parte dei casi le stesse indicazioni diagnostiche con il 92.3% di pazienti con un *pattern* sierologico caratterizzato da IgG+, IgM+ e FCT+. Nei 5 casi di FCT+ in assenza di IgM ELISA, si può ipotizzare o una scarsa risposta IgM o tracce di IgG, che sono state rilevate dal *test* FCT. Nei tre casi di IgG-, IgM+ e FCT- la spiegazione più probabile è una aspecificità per IgM del *test* ELISA. L'infezione poteva essere, invece, esclusa, in caso di negatività di tutti i *test*. L'analisi dei dati relativi all'età dei pazienti dimo-

stra che la risposta immune per IgM è più efficiente nei giovani e risulta quindi più facile, definire un'infezione acuta, mentre d'altro canto suggerisce di non trascurare deboli risposte per IgM o un basso titolo al *test* FCT in un soggetto adulto o anziano. In conclusione, la sierologia ha ancora un ruolo ben definito nella diagnosi dell'infezione da *M. pneumoniae* e rappresenta, spesso, il primo approccio. La disponibilità di uno strumento come il *Chorus* rende i *test* che abbiamo utilizzato, accessibili a tutti i laboratori, anche di piccole dimensioni, con refertazioni rapide e senza spreco di reagenti.

Tabella 1. Risultati dei soggetti del gruppo 1, suddivisi in base al tipo di test.

<i>M. pneumoniae</i> ELISA IgG (AU/mL)	N. (%)	<i>M. pneumoniae</i> ELISA IgM (campione/cut off)	N. (%)	<i>M. pneumoniae</i> CFT Ig totali	N. (%)
Negativo (<12)	12 (23.1)	Negativo (<0.9)	42 (80.8)	T<8	30 (58.8)
Titolo basso (≥12-≤18)	5 (9.6)	Dubbio (0.9-1.1)	4 (7.7)	T=8	8 (15.7)
Titolo moderato (>18-<40)	14 (26.9)	Positivo (>1.1)	6 (11.5)	T=16	8 (15.7)
Titolo alto (≥40)	21 (40.4)			T=32	4 (7.8)
				T=64	1 (2)
TOTALE	5 (100)		52 (100)		51 (100)

Tabella 2. Risultati dei pazienti del gruppo 2, suddivisi in base al tipo di test.

<i>M. pneumoniae</i> ELISA IgG (AU/mL)	N. (%)	<i>M. pneumoniae</i> ELISA IgM (campione/cut off)	N. (%)	<i>M. pneumoniae</i> CFT Ig totali	N. (%)
Negativo (<12)	9 (18)	Negativo (<0.9)	14 (28)	T<8	17 (34)
Titolo basso (≥12-≤18)	6 (12)	Dubbio (0.9-1.1)	4 (8)	T=8	5 (10)
Titolo moderato (>18-<40)	14 (28)	Positivo (>1.1)	32 (64)	T=16	4 (8)
Titolo alto (≥40)	21 (42)			T=32	6 (12)
				T≥64	18 (36)
TOTALE	5 (100)		5 (100)		50 (100)

Tabella 3. Confronto dei risultati fra il gruppo 1 e il gruppo 2 al test *Chorus M. pneumoniae* ELISA IgG e IgM.

Tipo di pazienti	ELISA IgG Negativo N. (%)	ELISA IgG Basso N. (%)	ELISA IgG Moderato N. (%)	ELISA IgG Alto N. (%)	ELISA IgM Negativo N. (%)	ELISA IgM Dubbio N. (%)	ELISA IgM Positivo N. (%)
Gruppo 1	12 (23.1)	5 (9.6)	14 (26.9)	21 (40.4)	42 (80.8)	4 (7.7)	6 (11.5)
Gruppo 2	9 (18) ▼	6 (12) ▼	14 (28) ▼	21 (42) ▼	14 (28) *	4 (8) ▼	32 (64) *

* $p < 0.001$ ▼ NS

Tabella 4. Confronto dei risultati fra il gruppo 1 e il gruppo 2 al test *M. pneumoniae* FCT Ig totali.

Tipo di pazienti	FCT T<8 N. (%)	FCT T=8 N. (%)	FCT T=16 N. (%)	FCT T=32 N. (%)	FCT T≥64 N. (%)
Gruppo 1	30 (58.8)	8 (15.7)	8 (15.7)	4 (7.8)	1 (2)
Gruppo 2	17 (34) ■	5 (10) ▼	4 (8) ▼	6 (12) ▼	18 (36) *

* $p < 0.001$ ■ $p = 0.02$ ▼ NS**Tabella 5.** Confronto fra concentrazione anticorpale al test Chorus *M. pneumoniae* ELISA IgG e IgM ed età media dei pazienti.

Tipo di pazienti	ELISA IgG Basso N. (%)	ELISA IgG Moderato N. (%)	ELISA IgG Alto N. (%)	ELISA IgM Dubbio-Basso positivo (0,9-<3 campione/cut off) N. (%)	ELISA IgM Alto Positivo (≥3 campione/cut off) N. (%)
Gruppo 2	6 (12)	14 (28)	21 (42)	19 (38)	17 (34)
Età media ± DS	40±32.857 ▼	23.85±25.773 ▼	31.09±25.139 ▼	30.473±21.800	13.941±14.673*

▼ NS * $p = 0.013$ ELISA IgM Alto Positivo vs ELISA IgM Dubbio-Basso Positivo**Tabella 6.** Correlazione fra titolo anticorpale al test FCT ed età media dei pazienti.

Tipo di pazienti	FCT T=8 N. (%)	FCT T=16 N. (%)	FCT T=32 N. (%)	FCT T≥64 N. (%)
Gruppo 2	5 (10)	4 (8)	6 (12)	18 (36)
Età media ± DS	50.8±29.37 ■	37.75±16.45 ▼	32.5±34.95*	17.61±15.47

■ $p = 0.02$ ▼ $p = 0.03$ * $p = 0.156$ vs CFT T≥64**Tabella 7.** Correlazione fra test ELISA IgG e IgM e test FCT.

Risultato	N. (%)	Risultato	N. (%)	Risultato	N.	Risultato	N.
IgG+IgM+	2 (100)	IgG+IgM-	10 (100)	IgG-IgM+	3	IgG-IgM-FC-	5
IgG+IgM+FCT+	24 (92.3)	IgG+IgM-FCT+	5 (50)	IgG-IgM+FCT+	0		
IgG+IgM+FCT-	2 (7.7)	IgG+IgM-FCT-	5 (50)	IgG-IgM+FCT-	3		

BIBLIOGRAFIA

- Atkinson TP, Balish MF, Waites KB. Epidemiology, clinical manifestations, pathogenesis and laboratory detection of *Mycoplasma pneumoniae* infections. *FEMS Microbiol Rev* 2008; 32: 956-73.
- Beersma MFC, Dirven K, van Dam AP, Templeton KE, Claas ECJ, Goossens H. Evaluation of 12 commercial tests and the complement fixation test for *Mycoplasma pneumoniae*-specific immunoglobulin G (IgG) and IgM antibodies, with PCR used as the "golden standard". *J Clin Microbiol* 2005; 43: 2277-85.
- Blystad H, Ånestad G, Vestheim DF, Madsen S, Rønning K. Increased incidence of *Mycoplasma pneumoniae* infection in Norway 2011. *Euro Surveill* 2012; 17(5): pii=20074.
- Daxboeck F, Kircher K, Krause R, Heinzl C, Stanek G. Effect of age on antibody titer to *Mycoplasma pneumoniae*. *Scand J Infect Dis* 2002; 34: 577-9.
- Daxboeck F, Krause R, Wenisch C. Laboratory diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* infection. *Clin Microbiol Infect* 2003; 9: 263-73.
- Lenglet A, Herrador Z, Magiorakos AP, Leitmeyer K, Coulombier D. European Working Group on *Mycoplasma pneumoniae* surveillance. Surveillance status and recent data for *Mycoplasma pneumoniae* infections in the European Union and European Economic Area, January 2012. *Euro Surveill* 2012; 17(5): pii=20075.
- Loens K, Goossens H, Ieven M. Acute respiratory infection due to *Mycoplasma pneumoniae*: current status of diagnostic methods. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2010; 29: 1055-69.
- Marston BJ, Plouffe JF, File TM, et al. Incidence of community-acquired pneumonia requiring hospitalization. Results of a population-based active surveillance study in Ohio. *Arch Intern Med* 1997; 157: 1709-18.
- Polkowska A, Harjunpää A, Toikkanen S, et al. Increased incidence of *Mycoplasma pneumoniae* infection in Finland, 2010-2011. *Euro Surveill* 2012; 17(5): pii=20072.
- Uldum SA, Bangsberg JM, Gahrn-Hansen B, et al. Epidemic of *Mycoplasma pneumoniae* infection in Denmark, 2010 and 2011. *Euro Surveill* 2012; 17(5):

- pii=20073.
11. Waites KB, Bebear CM, Robertson JA, Talkington DF, Kenny GE (ed.). Cumitech 34, Laboratory diagnosis of mycoplasmal infections. American Society for Microbiology, Washington, D.C. 2001.
 12. Waites K B and Talkington D F, *Mycoplasma pneumoniae* and its role as a human pathogen. *Clin Microbiol Rev* 2004; 17: 697-728.
 13. Waites KB, Taylor-Robinson D. Mycoplasma and Ureaplasma. In: Manual of Clinical Microbiology, 9th Edition, Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA Eds, American Society for Microbiology, Washington DC 2007; 1004-20.
 14. Waites KB, Balish MF, Atkinson TP. New insights into the pathogenesis and detection of *Mycoplasma pneumoniae* infections. *Future Microbiol.* 2008; 3: 635-48.
 15. Xu D, Li S, Chen Z, Du L. Detection of *Mycoplasma pneumoniae* in different respiratory specimens. *Eur J Pediatr* 2011; 170: 851-8.
 16. Zhang L, Zong ZY, Liu YB, Ye H, Lv XJ. PCR versus serology for diagnosing *Mycoplasma pneumoniae* infection: a systematic review & meta-analysis. *Indian J Med Res* 2011;134:270-80.