

Atipik Pnömonili Hastalarda *Mycoplasma pneumoniae* İnfeksiyonunun Kültür, Seroloji ve Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Araştırılması

M.Derya Aydın¹, Gülden Yılmaz¹, Salih Türkoğlu¹, Fatma Oğuz², Orhan Arseven³, Özdem Anđ¹, Handan Ağırbaşı⁴, Sevin Karalar⁵, Müjgan Sıdal², Selim Badur¹

Özet: Bu çalışmada klinik ve basit laboratuvar parametrelerle atipik pnömoni tanısı konmuş 126 hastada kültür, ELISA, ve polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemleri ile *Mycoplasma pneumoniae* infeksiyonu varlığı araştırılmıştır. Hastaların 32'sinde (% 25.3) infeksiyona işaret eden mikrobiyolojik bulgular saptanmıştır. Bu oran çocuk hastalarda % 27.2, yetişkin hasta grubunda ise % 22.4 olarak gözlenmiştir. Hastalardan üçünde PCR ve antikor pozitifliğinin yanı sıra *M. pneumoniae* üretilirken, 24 hastada PCR ve antikor pozitifliği, beş hastada da sadece antikor pozitifliği ile tanı konmuştur.

Anahtar Sözcükler: *Mycoplasma pneumoniae*, atipik pnömoni, tanı yöntemleri.

Summary: *Mycoplasma pneumoniae* infection in patients with atypical pneumoniae investigated by culture, serology and polymerase chain reaction. In this study *Mycoplasma pneumoniae* was investigated by culture, ELISA and polymerase chain reaction (PCR) in 126 patients, who were diagnosed according to clinical signs and simple laboratory parameters as having atypical pneumonia. In 32 patients (25.3%), microbiologic evidence for an infection was obtained. Percentage for pediatric patients was 27.2% and for adult patients 22.4%. Three patients were PCR, ELISA and culture-positive, 24 patients were PCR and ELISA positive, and five patients were ELISA-positive alone.

Key Words: *Mycoplasma pneumoniae*, atypical pneumonia, diagnostic methods.

Giriş

Mycoplasma pneumoniae, özellikle çocuk ve gençlerde olmak üzere, toplumda kazanılmış solunum yolu infeksiyonlarının en sık saptanan etkenlerindedir. Epidemilerde saptanma oranı % 50'ye ulaşabilir (1). Solunum yolu infeksiyonlarında sıklıkla kullanılan beta-laktam antibiyotiklere dirençli olan *M. pneumoniae*'nin tanısında çabuk sonuç verecek yöntemlerin uygulanması gerekmektedir.

Günümüzde, serolojik yöntemler, *M. pneumoniae* infeksiyonunun rutin tanısında yaygın olarak kullanılmakta, buna nadiren kültür çalışmaları eklenmektedir. Güç üreyen bir bakteri olan *M. pneumoniae*'nin kültürü, dört haftaya kadar bekleme gerektirmesi ve duyarlılığının düşük olması nedeniyle, yaygın olarak uygulanmamaktadır (2).

Serolojik yöntemlerle ise, tek serumda yüksek düzey pozitiflikle tanı konabilmekle birlikte, genellikle ikinci serumda antikor artışının gösterilmesi gerekmekte, bu da yine zaman kaybına neden olmaktadır. IgM sınıfı antikorlar, genellikle infeksiyonla birlikte hızla yükselip birkaç ay içinde azaldıkları için tek serum örneğinde saptanmaları durumunda akut infeksiyon tanısı koydururlar. Bununla birlikte sadece primer infeksiyonda pozitifleşirler ve yetişkinlerde genellikle negatif olarak bulunurlar

(3). En yaygın kullanılan serolojik yöntem olan kompleman fiksasyon testi ise duyarlılığının ve yol açtığı çapraz reaksiyonlar nedeniyle özgüllüğünün düşük olması gibi dezavantajlara sahiptir. ELISA yöntemi özgüllük ve duyarlılık açısından üstün ise de, yüksek düzey pozitiflik veya IgM varlığı dışında, diğer serolojik yöntemlerde olduğu gibi çift serumla çalışmayı gerektirir ve bu da zaman almaktadır (3,4).

Yaygın kullanılan yöntemlerin bu dezavantajları nedeniyle hızlı tanı yöntemleri önem kazanmaktadır. Bu yöntemler arasındaki klinik örnekte antijen saptanması (5) ve DNA problemleriyle hibridizasyon (6,7), tanıda çabukluğu sağlamış; ama duyarlılıkları düşük kalmıştır.

Günümüz hızlı tanı yöntemleri arasında yüksek özgüllük ve duyarlılığı ile rutin kullanıma girmeye başlayan polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), *M. pneumoniae* tanısı için de bir süredir kullanılmakta ve araştırmacılarca önerilmektedir (8-12).

Çalışmamızda klinik olarak atipik pnömoni tanısı konmuş çocuk ve erişkin hastalarda *M. pneumoniae* infeksiyonunun bulunma sıklığını kültür, seroloji ve PCR yöntemleri ile araştırarak ortaya koymayı amaçladık.

Yöntemler

Soğukalgınlığı benzeri semptomların başlangıcından sonra klinik bulguların belirgin hale gelmesi için geçen sürenin uzun olması, aile içi öykünün pozitif olması, şikayetlerin yoğunluğuna karşın fizik muayene bulgularının fakirliği, radyolojik özellikleri ve lökosit sayısının normal olması gibi parametrelerle atipik pnömoni tanısı konmuş 126 hastanın boğaz salgısı, bronkoalveoler lavaj sıvısı, balgam veya diğer çeşitli solunum yolu örneklerinde, *M. pneumoniae* kültür ve PCR yöntemleri, serumlarında anti-*M. pneumoniae* IgM ve IgG antikorları ELISA yöntemi ile araştırılmıştır. Hastalar 77'si çocuk (yaş ortalaması

- (1) İstanbul Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Çapa-İstanbul
- (2) İstanbul Tıp Fakültesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Çapa-İstanbul
- (3) İstanbul Tıp Fakültesi, Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı, Çapa-İstanbul
- (4) Bizim Lösemili Çocuklar Vakfı, Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Çapa-İstanbul
- (5) Yedikule Göğüs Hastalıkları Hastanesi ve Göğüs Cerrahisi Merkezi, Zeytinburnu-İstanbul

Tablo 1. Kullanılan Oligonükleotidlerin Sekans ve Yerleşimleri

Oligonükleotid	Sekans (5' ucundan 3' ucuna)	Gendeki Yerleşim (baz çifti)
MP-P11	TGCCATCAACCCGCGCTTAAC	180-201
MP-P12	CCTTTGCAACTGCTCATAGTA	625-645
MP-1(prob)	CAAACCGGGCAGATCACCTTT	462-483

Tablo 2. İncelenen Hastaların PCR ve ELISA Sonuçları

PCR	ELISA			Negatif (n=94)**
	Pozitif (n=31)			
	IgM	IgG**	IgM+IgG	
Pozitif (n=28)*	5	7	15	-
Negatif (n=96)	2	1	-	93

* Bir hastada kan örneği alınmadı

** Bir hastada solunum yolu örneği alınmadı

8.1±3.3) ve 49'u erişkin (yaş ortalaması 39.6±16.5) olmak üzere iki grupta incelenmiştir.

Kontrol grubu olarak kan alındığı sırada ve bir ay öncesine kadar solunum yolu şikayeti olmayan 20 çocuk (yaş ortalaması 8.8±3.3) ve 20 yetişkinin (yaş ortalaması 29.8±6.2) boğaz salgıları, kültür ve PCR; serum örnekleri de ELISA ile *M.pneumoniae* açısından incelenmiştir.

Kültür: Solunum yolu örnekleri alındıktan hemen sonra Hayflick'in glikozlu sıvı (10⁻³ sulandırma kadar) ve katı besiyerlerine eklenmiştir (13). Ekim yapılan besiyerleri 37°C'deki mumlu kavanozda 30 güne kadar inkübe edilmiştir. Sıvı besiyerinde bulanıklık olmaksızın sararma ve katı besiyerinde tipik kolonilerin varlığı halinde kültür pozitif olarak kabul edilmiş ve sıvı besiyerinden yapılan PCR ile doğrulama yapılmıştır.

ELISA: Hastalar ilk başvurduğunda ve 3-4 hafta sonra alınan serum örneklerinde anti-*M.pneumoniae* IgM ve IgG antikorları ELISA yöntemi ile araştırılmıştır. IgG araştırmasında Platelia (Sanofi-Pasteur) ve IgM araştırmasında Immunocapture-ELISA (Sanofi-Pasteur) kitleri üretici firma önerilerine uyularak kullanılmıştır.

PCR: *Mycoplasma* transport besiyeri (14) veya Hayflick besiyerindeki örneklerden 50 µl ayrılarak -70°C'de saklanmıştır. Deney sırasında çözülürülen örnekler, DNA ekstraksiyonu için 15 dakika kaynayan suda bekletilmiştir (8). Tablo 1'de özellikleri gösterilen primerler ve oligoprob *M.pneumoniae*'nin P1 adezyon proteinini kodlayan geninden seçilmiştir (9).

Amplifikasyon, 10 µl'si örnek olmak üzere, toplam 50 µl hacimde gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon karışımında 1.5 ünite Taq DNA polimeraz (Promega Co.), 200'er µM dATP, dCTP, dTTP ve dGTP, 1'er µM MP-P11 ve MP-P12 ve 1X tampon (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 9), 1.5 mM MgCl₂, % 0.1 jelatin, % 0.1 TritonX-100) yer almış ve karışım bir damla mineral yağı ile kapatılmıştır. Reaksiyon 95°C, 55°C ve 72°C'de birer dakika olmak üzere 40 siklusa gerçekleştirilmiştir (9). Son sikludan sonra 72°C'de 10 dakikalık ilave bir siklus uygulanmıştır. Deneyin her yapılışında negatif ve pozitif kontroller kullanılmıştır. PCR ürünleri (10'ar µl) etidyum bromür boyalı % 1.2 agaroz jelde ultraviyole (UV) ışık altında izlenmiştir.

Dot-Blot Hibridizasyon: Tüm PCR ürünlerine uygulanmıştır. 3 µl PCR ürünü Hybond-N (Amersham, UK) membrana

UV ışık ile sabitleştirilmiştir. MP1 probun digoksigenin ile işaretlenmesinde, yıkamalarda ve saptamada sırasıyla aynı firmaya (Boehringer Mannheim, GmbH) ait olan "3' end labeling", "DIG wash and block buffer set" ve "DIG luminescence detection" kitleri üretici firma önerilerine göre kullanılmıştır.

Kültür ve PCR yöntemlerinin duyarlılıklarının karşılaştırılması amacıyla *M. pneumoniae* FH suşunun Hayflick sıvı besiyerinde seri sulandırımı yapılmış, her sulandırma PCR ve sonrasında dot-blot hibridizasyon uygulanmıştır.

Klinik bulguların varlığı ile birlikte örnek kültüründe *M. pneumoniae* üreyen, PCR sonucunda 466 baz çiftlik bandın gözleendiği, serum örneklerinde IgM veya hem IgM hem de IgG pozitif olan, IgG antikorları yüksek düzeyde pozitif olan veya iki serum arasında anlamlı artış gösteren olgular *M. pneumoniae* infeksiyonu olarak değerlendirilmiştir.

Sonuçlar

Kültür: 121 hastadan biri çocuk, ikisi yetişkin grupta olmak üzere üç tanesinin örneklerinde *M. pneumoniae* üremiştir. Kontrol gruplarında üreme olmamıştır.

Seroloji: Çocuk hasta grubunda yedi olguda tek başına, 13 olguda ise IgG ile birlikte olmak üzere 20 olguda (% 25.9) anti-*M. pneumoniae* IgM saptanmıştır. Bu olgulardan 18'inin ikinci serum örneği de incelenebilmiştir. Üç olguda antikorlar ikinci serumda pozitifleşmiştir.

Çocuk kontrol grubunda IgM üç (% 15), IgG iki (% 10) serum örneğinde pozitif olarak saptanırken, hem IgM hem de IgG pozitif serum örneği saptanmamıştır. Yetişkin hasta grubunda serumları incelenen 38 hastada tek başına IgM pozitifliği saptanmazken, 18 hastada IgG, iki hastada da (% 5.2) hem IgM hem de IgG pozitif bulundu. IgG-pozitif hastaların 10'unun ikinci serum örneklerinde antikor titrasyonunda artış veya tek serum örneğinde yüksek düzeyde IgG pozitifliği saptanmamıştır. IgG pozitiflikleri *M. pneumoniae* infeksiyonu lehinde değerlendirilen 8 hastanın (% 21.5) üçünde, ikinci serum örneğinde pozitifleşme, ikisinde her iki serum örneğinde yüksek düzeyde pozitiflik ve üçünde, ikinci serum örneği bulunmamakla beraber, PCR ile birlikte pozitiflik saptanmıştır.

Yetişkin kontrol grubunda yedi serumda IgG antikorları saptanmıştır. Bunların altısı düşük düzeyde pozitif olarak değerlendirilmiştir. Bu gruptan iki serumda da sınır değerlerde IgM pozitifliği saptanmıştır.

PCR: Kültür duyarlılığı 10³ CCU/ml iken, PCR ve dot-blot hibridizasyon sonrası duyarlılık 100 kat artmıştır (10 CCU/ml). Klinik örneklerde PCR ile, dokuzu dot-blot hibridizasyondan sonra olmak üzere, 27 hastada *M. pneumoniae*'nin hedef DNA bölgesi saptanmıştır. Kontrol grubunda ise saptanmamıştır. *M. pneumoniae* infeksiyonu olarak değerlendirilen hastaların PCR ve ELISA sonuçları Tablo 2 ve diğer özellikleri Tablo 3'te sunulmuştur.

İrdeleme

M. pneumoniae kültüründe karşılaşılan sorunlar çeşitli araştırmacılarca bildirilmiştir. Skakni ve arkadaşları (10) PCR ile pozitif buldukları 20 hastanın birinden *M. pneumoniae* üretebilirken, Lüneberg ve arkadaşları (11) kültür-negatif, antikor-pozitif 19 hastanın 14'ünde PCR ile bakteriyi saptamışlardır. Benzer şekilde Jeroen ve arkadaşları (12), PCR ve/veya antikor pozitifliği ile tanı koydukları 14 hastanın ikisinde *M. pneumoniae*

Tablo 3. *M. pneumoniae* İnfeksiyonu Olarak Değerlendirilen Hastaların Laboratuvar Bulguları

No.	Cinsiyet	Yaş	IgM		IgG		PCR	Örnek	Kültür
			İlk	İkinci	İlk	İkinci			
1.	K	8,5	+	+	-	-	+	BS	-
2.	E	7	+	+	+	+	+	BS	-
3.	E	9	+	+	+	+	+	BS	-
4.	K	10	+	+	-	+	+DB	BS	-
5.	E	7	+	+	+	+	+	BS	-
6.	E	7	+	*	-	*	+DB	BS	-
7.	K	9	+	+	+	+	+	BS	-
8.	E	5,5	-	+	-	-	-	BS	-
9.	E	7	+	*	-	*	-	BS	-
10.	E	8	+	+	+	+	+	BS	-
11.	K	10	+	+	+	+	+	BS	-
12.	E	8	-	+	-	-	-	Balgam	-
13.	K	6	-	+	-	+	+DB	BS	-
14.	E	8	+	+	+	+	+	BS	-
15.	K	9	+	+	+	+	+	BS	-
16.	K	5	+	*	-	*	+DB	BS	-
17.	E	2	-	+	-	+	+	BS	-
18.	K	9	+	+	+	+	+	BS	-
19.	E	11	+	+	-	-	+	BS	-
20.	E	13	-	-	+	+	+	BS	+
21.	K	9	+	+	+	+	+	BS	-
22.	E	29	-	-	-	+	+DB	Balgam	-
23.	E	35	-	-	-	+	-	BAL	-
24.	K	55	-	*	+	*	+DB	Balgam	-
25.	E	79	*	*	*	*	+DB	Balgam	-
26.	E	40	-	-	+	+	+	BS	+
27.	E	31	-	-	+	+	**	**	-
28.	E	31	-	-	-	+	-	BS	-
29.	E	17	-	+	-	+	+	ProBAL	-
30.	K	30	-	*	+	*	+DB	Balgam	-
31.	E	17	-	*	+	*	+DB	Balgam	-
32.	E	41	+	*	+	*	+	ProBAL	+

*Kan örneği alınmadı, ** solunum yolu örneği alınmadı, DB: PCR sonrası hibridizasyon ve dot-blot işlemleri ile pozitifleşenler, BS: boğaz salgısı, BAL: bronkoalveoler lavaj sıvısı, ProBAL: korunmuş bronkoalveoler lavaj

üretebilmişlerdir. Çalışmamızda da PCR ve/veya ELISA ile tanı koyduğumuz 31 hastanın üçünde *M. pneumoniae* üretilmiştir. Duyarlılık düşüklüğünün yanı sıra pratikte sık karşılaşılan, zengin besiyerinin uzun süre inkübe edilmesi ile bağlantılı kontaminasyon ve bakterinin at serumu, taze maya özeti, pürifiye agar gibi maddelerin lotlarındaki ufak farklılıklardan dahi etkileniyor olması (15) gibi nedenler kültürün *M. pneumoniae*'nin rutin tanısı için kullanılan yöntemler arasından çıkmasına neden olmuştur.

Kültürdeki bu sorunlar *M. pneumoniae* infeksiyonlarının tanısında serolojiyi ön plana çıkarır. IgM sınıfı antikorlar çoğunlukla ilk infeksiyonda ve semptomların başlamasından yaklaşık yedi gün sonra saptanırlar ve 2-3 hafta sonra maksimum düzeye ulaşırlar. İkinci haftadan sonra IgM antikorları ile birlikte artmaya başlayan ve serumdan en hızlı kaybolan antikor olan IgA da akut infeksiyon tanısında kullanılabilir (16). IgG sınıfı antikorlar ise ikinci hafta başlarında yükselmeye başlar. Reinfeksiyonlarda IgM sınıfı antikorlar genellikle yoktur (4). Bu nedenle tek başına IgG cinsi antikor varlığında, 3-4 hafta sonra alınan ikinci serum örneğinde dört kat artışı göstermek gerekmektedir. Ancak hastalar klinisyene genellikle geç başvururlar ve bu dönemde antikor pozitifdir. Bu nedenle dört katlık artış gözlenmeye-

bilir. Tek serum örneğinde yüksek titrasyonda IgG pozitifliğinin varlığı da akut hastalık göstergesi olarak kabul edilir (3,4). Reinfeksiyonlarda tek serum örneğinde IgA varlığı da tanıda değerlidir (12). Anti-*M. pneumoniae* antikorların saptanmasında kullanılan deneylerden ELISA, kompleman fiksasyondan daha duyarlıdır (3). Spesifik IgM ve IgG'yi birlikte veya ayrı ayrı saptayan ELISA kitleri geliştirilmiştir. IgM saptamada, romatoid faktöre bağlı yalancı pozitiflik sorunu görülmeden, "µ-capture" ELISA yöntemi önerilmektedir (16-18). Çalışmamızda, serolojik bulgular PCR ve kültür bulgularından bağımsız olarak değerlendirildiğinde; akut *M. pneumoniae* infeksiyonu geçirmekte olan 21 çocuk hastadan sadece birinde IgM her iki kanda da negatif kalmış ve bu hastada IgG her iki örnekte de yüksek düzeyde pozitif olarak saptanmıştır. Diğer 20 hastanın yedisinde IgG saptanmaksızın ve 13'ünde IgG ile birlikte IgM saptanmıştır. Bu hastaların ilk kan örneklerinde antikor bulunmayan dördünde IgM, ikisinde de hem IgM hem de IgG ikinci kan örneklerinde pozitifleşmiştir. Kontrol grubunda IgM saptanan üç çocuk, gerek klinik bulguların olmaması, gerekse PCR ve kültür negatifliği nedeniyle asemptomatik veya bir süre önce geçirilmiş infeksiyon olarak değerlendirilmiştir. Yetişkin grupta akut infeksiyon olarak değerlendirdiğimiz 11 hastadan kan örnekleri incelenebilen 10 tanesinin hepsinde IgG pozitifliği saptanmış, iki hastada beraberinde IgM de pozitifleşmiştir. Hastaların dördünde IgG ikinci kanda pozitifleşmiş, birinde beş kat antikor artışı ve birinde de her iki kanda da yüksek düzeyde antikor saptanmıştır. Tek kan örneği incelenebilen bir hastada da IgM ile birlikte IgG pozitifliği hastalık lehine bir bulgu olarak değerlendirilmiştir. Tek kan örneği incelenebilip sadece IgG pozitifliği saptanan üç hasta, klinik bulguların varlığı ve PCR pozitifliği nedeniyle *M. pneumoniae* infeksiyonu olarak değerlendirilmiştir. Kontrol grubundaki sağlıklı 20 kişinin yedisinde IgG, ikisinde de IgM pozitif bulunmuştur. Bu gruptaki IgG pozitiflerin altısı (% 30) düşük düzey pozitifdir. Hasta grubunda olup da *M. pneumoniae* infeksiyonu olarak değerlendirilmeyenler arasındaki IgG pozitifliği de buna yakın bir orandır (% 26,3). Bu durum bize, toplumumuzda *M. pneumoniae* infeksiyonu prevalansının bu oranlar arasında olduğunu düşündürmektedir. Kontrol grubundaki biri orta düzey IgG, ikisi IgM-pozitif üç kişi ise kültür ve PCR negatifliği ve klinik bulguların yokluğu nedeniyle asemptomatik veya kısa süre önce geçirilmiş infeksiyon olarak değerlendirilmiştir. PCR-pozitif hastalar içinde antikor negatif hasta saptanmamıştır. 30 ve 31 no.'lu hastaların tek kan örneklerindeki orta düzey pozitiflikler tek başına tanı koydurucu olmadığından bu hastalar pozitif PCR sonuçları ile akut *M. pneumoniae* infeksiyonu olarak değerlendirilmişlerdir. Antikor-pozitif, PCR-negatif dört hastadan birinde IgM, ikisinde IgG serokonversiyonu, birinde de tek kan örneğinde IgM pozitifliği saptanmıştır. Antikor pozitifliğine rağmen PCR'nin negatif bulunmasının nedenleri arasında incelenen örnekteki bakteri sayısının PCR duyarlılığının kısa süre önce geçirilmiş infeksiyonlardan önce *M. pneumoniae*'nin ortamdaki uzaklaştırılması sayılabilir. 9 no.'lu hastamızın, boğaz salgısı alındığı sırada klaritromisin kullanıyor olması bu hastadaki PCR negatifliğinin nedeni olarak değerlendirilmiştir.

Çalışma sonuçları, diğer çeşitli çalışmalarda da görüldüğü gibi, kültürün düşük duyarlılık, geç sonuç verme ve bazen de kontamine olma gibi sorunları nedeniyle *M. pneumoniae* tanısında rutin olarak kullanılamayacağını göstermektedir. Serolo-

jik deneyler IgM pozitifliği veya yüksek düzey IgG pozitifliği dışında ikinci kan örneklerinin çalışmasını gerektirmesi nedeniyle zaman kaybına neden olabilmektedir. PCR ise hızlı, duyarlı ve özgül olma özellikleri ile *M. pneumoniae* tanısında güvenli bir yöntem olarak gözlenmektedir. *M. pneumoniae*'ye bağlı solunum yolu hastalıklarından sonra bakteri boğaz ve solunum yollarında uzun süre bulunmaya devam edebildiğinden, PCR pozitifliği, asemptomatik infeksiyon, akut infeksiyon ve taşıyıcılık arasında ayırım yapılabilmesi için, serolojik bulgularla desteklenmelidir.

Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Araştırma Fonunca desteklenmiştir. Proje No: 662/210994.

Teşekkür

Çalışmada kullanılan primerleri ve standard M. pneumoniae suşunu sağlayan Prof. Dr. Christian Bear ve Dr. Helene Renaudin'e teşekkür ederiz.

Kaynaklar

1. Foy HM, Kenny GE, Cooney MK, Allan ID. Long term epidemiology of infections with *Mycoplasma pneumoniae*. *J Infect Dis* 1979; 139: 681-7
2. Krause DC, Taylor-Robinson D. Mycoplasmas which infect humans. In: Maniloff J, McElhaney RN, Finch LR, Baseman JB, eds. *Mycoplasmas. Molecular Biology and Pathogenesis*. Washington, DC: American Society for Microbiology, 1992; 417-44
3. Taylor-Robinson D. Mycoplasma and ureaplasma. In: Murray PC, Baron JE, Pfaller MA, Tenover F C, Tenover RH, eds. *Manual of Clinical Microbiology*. 6th ed. Washington, DC: American Society for Microbiology, 1995: 652-62
4. Kenny GE. Serodiagnosis. In: Maniloff J, McElhaney RN, Finch LR, Baseman JB, eds. *Mycoplasmas. Molecular Biology and Pathogenesis*. Washington, DC: American Society for Microbiology, 1992; 505-12
5. Kok TW, Varkanis G, Marmion BP, Martin J, Esterman A. Laboratory diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* infection. 1. Direct detection of antigen in respiratory exudates by enzyme immunoassay. *Epidemiol Infect* 1988; 101:669-84
6. Hyman HC, Yogev D, Razin S DNA probes for detection and identification of *Mycoplasma pneumoniae* and *Mycoplasma genitalium*. *J Clin Microbiol* 1987; 25: 726
7. Marjaana Kleemola SR, Karjalainen JE, Raty KH. Rapid diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* infection: clinical evaluation of a commercial probe test. *J Infect Dis* 1990; 162: 70-5
8. Helen M Palmer. The chlamydiales and mycoplasmatales. In: Ehrlich GD, Greenberg SJ, eds. *PCR-Based Diagnostics in Infectious Diseases*. Boston: Blackwell Scientific Publications, 1994; 495-510
9. B de Barbeyrac, C Bernet-Poggi, F Febrer, H Renaudin, M Dupon, C Bebear. Detection of *Mycoplasma pneumoniae* and *Mycoplasma genitalium* in clinical samples by polymerase chain reaction. *Clin Infect Dis* 1993; 17 (Suppl 1): 83-9
10. Skakni L, Sardet A, Just J, et al. Detection of *Mycoplasma pneumoniae* in clinical samples from pediatric patients by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 2638-43
11. Lüneberg E, Skov Jensen J, Frosch M. Detection of *Mycoplasma pneumoniae* by polymerase chain reaction and nonradioactive hybridization in microtiter plates. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 1088-94
12. Tjhie HTJ, vanKuppeveld JM, Roosendaal R, et al. Direct PCR enables detection of *Mycoplasma pneumoniae* in patients with respiratory tract infections. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 11-6
13. Freundt EA. Culture media for classical mycoplasmas. In: Razin S, Tully JG, eds. *Methods in Mycoplasmaology*. New York: Academic Press, 1983: 127-36
14. Clyde WA, Kenny GE, Schacter J. Laboratory diagnosis of chlamydial and mycoplasmal infections. In: Drew WL, ed. *Cumulative Techniques and Procedures in Clinical Microbiology*. Washington, DC: American Society for Microbiology, 1984
15. Cummings MC. Mycoplasmas. In: Isenberg HD, ed. *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. Washington, DC: American Society for Microbiology, 1992: 8.24
16. Granström M, Holme T, Sjögren A M, Ötrqvist A, Kalin M. The role of IgA determination by ELISA in the early serodiagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* infection, in relation to IgG and p-capture IgM methods. *J Med Microbiol* 1994; 40:288-92
17. Jacops E. Serological diagnosis of mycoplasma pneumonia infections: a critical review of current procedures. *Clin Infect Dis* 1993; 17 (Suppl 1): 79-82
18. Uldum SA, Jensen JS, Sondergard-Andersen, Lind K. Enzyme immunoassay for detection of immunoglobulin M (IgM) and IgG antibodies to *Mycoplasma pneumoniae*. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 1198-1204