DOI:10.7499/j.issn.1008-8830.2013.01.010

论著·临床研究

220 例住院肺炎患儿肺炎支原体的分子检测及其基因分型研究

徐巧[1] 林书祥[2] 郭伟[3] 董汉权[3] 王维[2] 彭林[2]

(1.天津医科大学研究生院临床检验诊断学专业,天津 300070;
2.天津市儿童医院儿研所,天津 300074;3.天津市儿童医院呼吸科,天津 300074)

[摘 要] **目的** 通过检测社区获得性肺炎患儿支气管肺泡灌洗液了解肺炎支原体(MP)感染情况及基因分型特点。**方法** 采用聚合酶链反应(PCR)方法对 220 例住院肺炎患儿支气管肺泡灌洗液进行 MP 检测,用荧光定量 PCR 方法验证结果的准确性;将检测阳性标本用 Hae Ⅱ 和 Hae Ⅲ 两种限制性内切酶进行酶切反应后与标准株对比,分析阳性标本 MP 的基因分型。通过随机采样对部分阳性标本扩增产物测序证实基因分型的准确性。**结果** 220 份标本 MP 的阳性检出率为 55.0%(121/220)。MP 感染好发于学龄前期和学龄期儿童(63.5%,101/159),6 个月内的婴儿阳性率最低 20%(1/5),无明显性别差异和季节差异。随机抽取的 60 份 MP 阳性标本经酶切反应均显示为 P1-Ⅰ型,4 份测序结果也证实其为 P1-Ⅰ型。**结论** MP 是肺炎患儿的重要病原之一,有明显的年龄特征;流行型以 P1-Ⅰ型为主。 [中国当代儿科杂志,2013,15(1):37-41]

[关 键 词] 肺炎支原体肺炎;聚合酶链反应;限制性片段长度多态性分析;基因型;儿童

Molecular detection and genotyping of Mycoplasma pneumoniae in 220 children hospitalized with pneumonia

XU Qiao, LIN Shu-Xiang, GUO Wei, DONG Han-Quan, WANG Wei, PENG Lin. Graduate School of Tianjin Medical University, Tianjin 300070, *China* (*Peng L, Email: lpengfch@yahoo.com*)

Abstract: Objective To investigate the infection rate and genotypes of Mycoplasma pneumoniae (MP) by examining bronchoalveolar lavage fluid from children with community acquired pneumonia (CAP). **Methods** Polymerase chain reaction (PCR) was used for detecting MP in bronchoalveolar lavage fluid from 220 children hospitalized with CAP, and the accuracy was confirmed by quantitative real-time PCR. Positive samples were digested with Hae Ⅱ and Hae Ⅲ and compared with standard strain to analyze the genotypes of MP from positive samples. The accuracy of genotyping was confirmed by sequencing the amplified products of some randomly selected positive samples. **Results** The positive rate of MP in 220 samples was 55.0% (121/220). MP infection occurred mostly in preschool and school-age children (63.5%, 101/159), and the lowest positive rate was seen in children aged under 6 months (20%, 1/5). The positive rate showed no significant differences between sexes and between seasons. Sixty randomly selected MP-positive samples showed a genotype of P1 type 1 after restriction digestion, which was further confirmed by sequencing of 4 samples. **Conclusions** MP is one of the main pathogens of pneumonia in children, and the MP infection rate is significantly correlated with age. The dominant genotype of MP in children is P1 type 1. [**Chin J Contemp Pediatr, 2013, 15(1):37-41**]

Key words: Mycoplasma pneumoniae pneumonia; Polymerase chain reaction; Restriction fragment length polymorphism analysis; Genotype; Child

肺炎支原体(Mycoplasma pneumoniae, MP)是儿童社区获得性肺炎重要病原微生物之一[1]。流行病学研究表明,MP 感染在社区获得性肺炎中的感染率高达 50%[2-4]。通过呼吸道飞沫传播,常年均可发病,流行周期为 3~7 年[4-5],对此有研究提出假设:这是否与 MP 不同亚型之间的周期性改变有关[4,6],目前尚缺乏明确的结论。MP 感染人体后在呼吸道定居,粘附于呼吸道细胞表面是支原体感染的第一步,也是关键的一步,其中 P1 蛋白是主要黏附素。Sasaki 等[5]和 Cousin 等[7]根据 P1 基因的重复序列 RepMP2/3 或 RepMP4 序列的 PCR 产物进行限制酶切片段多态性分析(PCR-RFLP),将 MP 分为

[收稿日期]2012-07-05;[修回日期]2012-08-24
[作者简介]徐巧,女,硕士研究生。
[通信作者]彭林,研究员。

2 型。这种分型方法简便易行,便于流行病学调查。本研究对 220 例肺炎住院患儿的肺泡灌洗液进行 MP 检测,并进行了 PCR-RFLP 分析,以了解肺炎儿童 MP 感染情况及其基因分型,现将结果报告如下。

1 资料与方法

1.1 研究对象

选择天津市儿童医院 2010 年 10 月到 2011 年 11 月确诊为社区获得性肺炎患儿 220 例(入选标准符合实用儿科学第七版肺炎诊断标准[8]),其中男 122 例,女 98 例,男女比例为 1.24∶1;年龄最小 3 个月,最大 14 岁,平均年龄 5.85 岁;具体年龄构成为 <1 岁者 12 例,1 岁 ~ 者 49 例,3 岁 ~ 者 78 例,7 ~ 14 岁者 81 例。

1.2 主要仪器与试剂

离心机为美国 Beckman 公司产品,PCR 仪为德国 Eppendorf 公司产品,凝胶电泳成像分析仪为美国 Alpha Innotech 公司产品,荧光定量 PCR 仪为 ABI Prism7300,MP 核酸定量检测试剂盒为中山大学达安基因股份有限公司产品,MP 抗体检测试剂盒为日本富士瑞必欧株式会社产品,限制性核酸内切酶 HaeⅡ和 HaeⅢ为美国 Fermentas 公司产品,细菌基因组 DNA 提取试剂盒为北京康为世纪公司产品。MP 标准菌株 M129(ATCC29342)由美国 Type Culture Collection 公司提供。

1.3 引物设计

根据 MP 高保守重复序列 RepMP2/3 或 RepMP4,参照 Cousin 等[7]方法合成 ADH1/ADH2 和 ADH3/ADH4 两对引物作为扩增 MP P1 基因不同区域的引物,即 ADH1:5′-CTGCCTTGTCCAAGTCCACT-3′;ADH2:5′-AACCTTGTCGGGAAGAGCTG-3′;ADH3:5′-CGAGTTTGCTGCTAACGAGT-3′;ADH4:5′-CTTGACTGATACCTGTGCGG-3′。ADH1/ADH2 和 ADH3/ADH4 两对引物由上海生物工程有限公司合成。

1.4 方法

1.4.1 血清学 MP 抗体检查 220 例肺炎患儿均在入院后 1 ~ 3 d 内取静脉血,用酶联免疫吸附试验(ELISA 法)进行血清 MP 抗体检测。

1.4.2 纤维支气管镜检查 严格按照《儿科支气管镜术指南(2009 年版)》[9]标准及操作,经患儿家长知情同意并经医院伦理委员会批准后行纤维支气管镜术,取支气管肺泡灌洗液。标本处理后置于 -80℃冰箱待检。

1.4.3 PCR 反应和基因型检测 (1)MP DNA 的提取:将储存在 -80℃冰箱的标本取出让其在室温下充分融解,采用购自北京康为世纪公司的细菌基因组 DNA 提取试剂盒进行核酸提取,操作按说明书进行。提取核酸于 -20℃保存备用。

(2)MP-P1-PCR:采用德国 Eppendorf 公司的 PCR 仪,分别用 ADH1/ADH2 和 ADH3/ADH4 两对引物对临床标本和标准株进行 MP P1 基因扩增并通过琼脂糖凝胶电泳鉴定 PCR 反应产物。PCR 反应体系为:10 × Buffer(含 Mg^{2+})2.5 μL,dNTP 混合物(10 μmol/L)1 μL,上游引物(10 μmol/L)0.5 μL,下游引物(10 μmol/L)0.5 μL,Taq mix DNA 聚合酶 0.5 μL,DNA 模板 5 μL,ddH_2O 15 μL,总体积为 25 μL,轻微离心后,放入 PCR 仪中进行扩增。PCR 反应条件为:95℃预变性 5 min 后,按 95℃变性 1 min,65℃退火 1 min,72℃延伸 2.5 min,共进行 30 个循环,最后 72℃延伸 5 min。取 5 μL PCR 扩增产物于 2% 琼脂糖凝胶(含溴化乙锭染料)中进行电泳并用凝胶电泳成像分析仪进行拍照并记录结果。相对分子质量标准采用加拿大新产业公司 DNA Ladder Marker(D2000)。

(3)荧光定量 PCR:从 220 份肺炎患儿标本中随机抽取 75 份标本用美国 ABI Prism7300 荧光定量 PCR 仪进行检测,以验证普通 PCR 结果的准确性。具体操作步骤按照试剂盒中说明书进行。

(4)PCR-RFLP 分析:在对 MP-P1-PCR 产物经电泳后进行分析的基础上,从每月阳性标本中(在目的片段上出现特征性条带的为阳性)随机抽取 3 ~ 5 份,共计 60 份,分别用美国 Fermentas 公司提供的 HaeⅡ和 HaeⅢ进行酶切反应并通过琼脂糖凝胶电泳确定 MP 亚型。具体步骤为:①在体系中加入 10 × Fast Digest 1.5 μL,Fast Digest enzyme 1 μL,ddH_2O 5 μL,DNA 模板 7.5 μL,总体积 15 μL。②轻轻混匀,震荡。③在 37℃水浴箱孵育 5 min。④取 8 μL 酶切产物在 2% 琼脂糖凝胶(含溴化乙锭染料)中进行电泳并用凝胶电泳成像分析仪进行拍照并记录结果。相对分子质量标准采用加拿大新产业公司 DNA Ladder Marker(D2000)。

(5)核苷酸序列测序与分析:在阳性标本中随机选取 3 份(标号为 m1、m2、m3)和 1 份标准株 M129 的 PCR 产物送上海生物工程技术服务有限公司进行序列测定。利用 NCBI 中的 BLAST 软件对所获得序列进行核苷酸同源性和基因型别分析。

1.5 统计学分析

所有资料采用 SPSS 17.0 统计软件进行分析,

不同季节、年龄及性别的 MP 阳性检出率和两种方法间检测结果的比较均采用 χ^2 检验，$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MP 血清学检测结果

220 例患儿血清学抗体检测，有 92 例阳性，阳性率为 41.8%（92/220）。

2.2 MP-P1-PCR 产物鉴定结果

用 ADH1/ADH2 和 ADH3/ADH4 两对特异引物分别对 220 份临床标本和标准株 M129 进行扩增，扩增产物电泳后经凝胶电泳成像分析仪显示结果，MP 阳性标本应分别在 2280 bp 和 2580 bp 出现条带（图 1）。220 份标本中，阳性标本 121 份，阳性率为 55.0%。

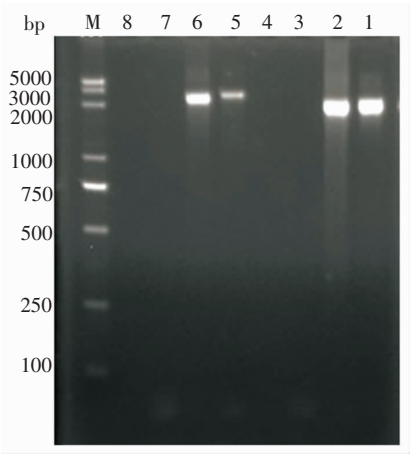

图 1 P1 基因 PCR 产物电泳图 图上方 1～4 为引物 ADH1/ADH2 扩增的 PCR 产物：1 为标准株 M129，2 为阳性标本，3 为阴性对照（水），4 为阴性标本；5～8 为引物 ADH3/ADH4 扩增的 PCR 产物：5 为标准株 M129，6 为阳性标本，7 为阴性对照（水），8 为阴性标本；M 为 DNA 分子量标准。

2.3 MP 感染与性别、年龄和季节的关系

122 份男性患儿标本中，MP 检测阳性 61 份，阳性率为 50.0%；女性患儿 98 份标本中，MP 检测阳性 60 份，阳性率为 61.2%，女性患儿阳性率高于男性，但差异无统计学意义（$\chi^2=2.77$，$P>0.05$）。

不同年龄患儿 MP 检出阳性率不同，<1 岁者检出率为 33%（4/12），其中 0～6 月龄者检出率为 20%（1/5）；1 岁～者为 33%（16/49），3 岁～者为 54%（42/78）；7～14 岁者为 73%（59/81），即<3 岁者（婴幼儿）MP 阳性率为 32.8%（20/61），3～14 岁（学龄前期和学龄期儿童）MP 阳性率为 63.5%（101/159），学龄前期和学龄期儿童的阳性率明显高于婴幼儿，差异有统计学意义（$\chi^2=16.827$，$P<0.01$）。

在 2010 年 10 月至 2011 年 11 月观察期中，每月均有 MP 检出，全年均可发病，阳性率最高为 10 月（72%），最低的为 6 月（43%），见表 1。春季（3～5 月）阳性率为 60%（32/53），夏季（6～8 月）为 50%（21/42），秋季（9～11 月）为 59%（39/66），冬季（12～2 月）为 49%（29/59），四季间 MP 阳性率差异无统计学意义（$\chi^2=2.28$，$P>0.05$）。

表 1 不同月份 MP 的检出率

月份	检测数（例）	阳性数（例）	阳性率（%）
1	35	18	51
2	15	7	47
3	13	9	69
4	23	14	61
5	17	9	53
6	7	3	43
7	15	8	53
8	20	10	50
9	11	7	64
10	25	18	72
11	30	14	47
12	9	4	44
合计	220	121	55.0

2.4 荧光定量 PCR 检测结果及两种检测方法比较

在这 220 份标本中随机抽取的 75 份进行了荧光定量 PCR 检测，其中阳性结果 44 份，阳性率为 59%（44/75）。这 75 份标本用普通 PCR 检测发现 39 份呈阳性结果，阳性率为 52%（39/75）。两种方法阳性检出率差异无统计学意义（$\chi^2=1.78$，$P>0.05$）。

2.5 RFLP 检测结果

从每月阳性标本中随机抽取共 60 份 PCR 产物用 Hae Ⅱ 和 Hae Ⅲ 分别进行酶切反应，同时用标准株 M129 的 PCR 产物进行酶切对比，（图 2～3）。这 60 份阳性标本的酶切模式与标准株 M129 完全相似，而且 Hae Ⅱ 和 Hae Ⅲ 对各标本分型结果完全一样，均表现出了 P1-Ⅰ型的结果，未发现有不同的型别情况。

2.6 测序结果比对和核苷酸序列同源性分析

将选取的 4 份标本（m1、m2、m3 和 M129）的测序结果递交 GenBank 数据库进行 BLAST 搜索，结果显示均属于 MP P1-Ⅰ型。3 份临床标本与标准株 M129 的基因序列之间同源性为 97.24%～100%，其中 m1 和 m2 同源性最高，为 100%，m1、m2 和 M129 的同源性达到 99.83% 和 99.71%，m3 与其他 3 株同源性稍低，但也都在 97% 以上。将这 4 份标本的测序结果与 GenBank 中登录的 M129 P1 标准

基因序列(GenBank 序列号:FJ215696)比较,结果显示这 4 份标本序列与参比序列的同源性高达 99%以上。由此分析得出,随机抽取的 3 份临床标本与标准株 M129 亲缘性很近,为同一型别,与 GenBank 中 M129 P1 标准基因序列比较更进一步证实了分型的准确性。

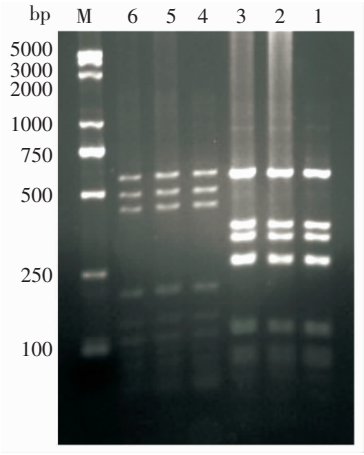

图 2　Hae Ⅱ 酶切 PCR 产物电泳图　图上方 1 ~6 为 Hae Ⅱ 酶切 PCR 产物的酶切图谱;1 ~3 为引物 ADH1/ADH2 扩增的 PCR 产物,其中 1 为标准株 M129,2 和 3 为阳性标本;4 ~6 为引物 ADH3/ADH4 扩增的 PCR 产物,其中 4 为标准株 M129,5 和 6 为阳性标本;M 为 DNA 分子量标准。

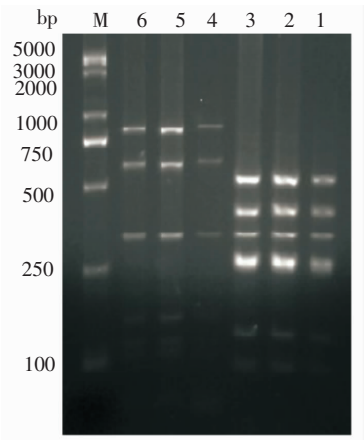

图 3　Hae Ⅲ 酶切 PCR 产物电泳图　图上方 1 ~6 为 Hae Ⅲ 酶切 PCR 产物的酶切图谱;1 ~3 为引物 ADH1/ADH2 扩增的 PCR 产物,其中 1 为标准株 M129,2 和 3 为阳性标本;4 ~6 为引物 ADH3/ADH4 扩增的 PCR 产物,其中 4 为标准株 M129,5 和 6 为阳性标本;M 为 DNA 分子量标准。

3　讨论

目前国内外采用的 PCR 技术是检测 MP 核酸,与宿主免疫系统无关,具有特异性强、敏感性高、快速简便的优点[10]。据报道荧光定量 PCR 检测 MP-DNA 敏感度 94%,特异度 100%,对于病程早期及难治性病例中检测肺泡灌洗液 MP-DNA 准确性优于单份血清 MP 抗体检测[10]。本研究采用了 PCR 方法检测 MP-DNA,同时随机抽取了部分标本进行荧光定量 PCR 检测以验证结果的准确性。本研究采用 ADH1/ADH2 和 ADH3/ADH4 两对特异引物扩增 MP P1 基因的保守区域,易于扩增,且适用于基因分型研究。

本研究中,MP 阳性率为 55.0%,明显高于国内外报道[11-12]的阳性率,可能原因有:第一,本研究对象均来自于天津,天津地区的温度、湿度比较适宜 MP 的繁殖,易造成 MP 感染的流行。第二,本研究采用了敏感性较高的 PCR 方法,减少假阴性出现。第三,本研究对象是肺炎患儿的肺泡灌洗液,支气管肺泡灌洗液对于病原学检测较以往的气管抽吸分泌物和血清标本特异性敏感性均较高[10]。张润书等[13]报道河北地区在难治性肺炎中检测肺泡灌洗液 MP 阳性率达到 76.06%。第四,标本来自儿童医院住院肺炎患儿,阳性率可能比社区和其他综合性医院的检测结果要高。

MP 肺炎广义上讲是一种传染病,其发病有年代与地区差异;同一年代和地区 MP 感染率又有年龄和季节差异。韩国报道儿童 MP 流行高峰发生在秋季或冬季,0 ~3 岁组 MP 抗体滴度最低,4 ~6 岁组和 7 岁以上组滴度明显升高,无明显的性别差异[14]。波兰华沙连续 28 年资料表明 MP 感染开始于每年第 3 季度,高峰在第 4 季度,至次年第 2 季度最低,3 ~6 岁是发病第一高峰,最高峰年龄 10 ~ 16 岁,占总数的 25%,而发病率最低为 0 ~6 月龄组,仅0.8%,无明显的性别差异[15]。王素梅等[16]对蚌埠市的儿童 MP 感染情况也做了相应的研究,发现 MP 感染以春季发病率最高,冬季最低,学龄前期和学龄期儿童 MP 感染占到 62.87%,小于 1 岁的婴儿感染人数最少(5.82%),最小年龄为 6 个月,多发于女性。本研究结果显示 MP 感染好发于学龄前期和学龄期儿童,占总数的 63.5%,6 个月内的患儿阳性率最低,与以上文献[14-16]报道相符;女性 MP 检出阳性率(61.2%)高于男性(50.0%),但两者差异无统计学意义,说明 MP 感染无明显的性别差异[14-15];MP 感染春夏秋冬均发病,春季阳性率最高(60%),冬季最低(49%),但四季间 MP 阳性率差异无统计学意义,说明四季中 MP 肺炎的阳性率均较高,有相应临床症状的患儿均要考虑 MP 肺炎的可能性。

1990 年 Su 等[17]应用 DAN 指纹图谱和 Southern 印迹杂交技术首次描述了不同 MP 菌株之间的差异,根

据 P1 蛋白主要粘附基因的不同将 MP 分成Ⅰ型和Ⅱ型。1994 年 Cousin-Allery 等[18]采用 PCR-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)研究 MP 菌株,也证实了可将 MP 临床分离株分为两型。随后,相继出现了关于 MP 不同型别间相互交替流行的研究报道。Kenri 等[19]对日本神奈川县 1995 ~2005 年分离的 127 株分离株进行研究发现,在 1995 ~2001 年所有分离株均为 P1-Ⅱ 型,2002 年出现了 40% 的 P1-Ⅰ 型,2003 年 P1-Ⅰ型继续增加到很大部分,到 2004 年和 2005 年就没有 P1-Ⅱ 型的分离株,P1-Ⅰ 型占主导地位。Pereyre 等[20]和 Martinez 等[21]也分别对来自法国和智利的菌株进行了分型,均发现 P1-Ⅰ型和 P1-Ⅱ型之间存在交替流行的现象。这些研究均表明,MP 基因型别可以在 P1-Ⅰ型和 P1-Ⅱ型之间自然转变,这可能与人群的免疫反应有关。值得一提的是,从以上研究[20-22]能否提出 MP 基因型别间的转变与 MP 的流行周期性变化有关的假设还需要进一步研究证实。目前国内对 MP 基因分型方面的报道还较少,张立等[22]对浙江省 300 例 MP 感染患儿标本做出分型研究,显示浙江省 MP 感染以 P1-Ⅰ型为主,仅 3 例为 P1-Ⅱ型。本研究对 2010 年 10 月至 2011 年 11 月来自天津地区的 MP 肺炎患儿 220 株临床分离株中随机抽取了 60 份标本,通过 HaeⅡ和 HaeⅢ两对限制性内切酶进行了酶切反应,结果显示这 60 份阳性标本的酶切图谱与标准株 M129 的酶切图谱完全相似,即为 P1-Ⅰ型。随后本研究又从中随机选取了 3 份临床标本和标准株 M129 进行测序,结果进一步证明了基因分型的准确性。说明在此研究期间来自天津地区的这 220 例患儿 MP 感染以 P1-Ⅰ型为主。

MP 感染不仅引起呼吸系统疾病还可累及多个系统导致肺外器官损害,严重危害儿童健康,故掌握 MP 感染的感染情况及流行病学特点对疾病预防和临床治疗有着重要意义。

[参 考 文 献]

[1] Schwartz SB, Thurman KA, Mitchell SL, Wolff BJ, Winchell JM. Genotyping of Mycoplasma pneumoniae isolates using real-time PCR and high-resolution melt analysis[J]. Clin Microbiol Infect, 2009, 15(8): 756-762.

[2] Waites KB, Talkington DF. Mycoplasma pneumoniae and its role as a human pathogen[J]. Clin Microbiol Rev, 2004, 17(4): 697-728.

[3] 姜铭. 儿童社区获得性肺炎肺炎支原体感染 60 例快速诊断分析[J]. 中国误诊学杂志,2007,7(16):3862.

[4] Dumke R, Luck PC, Noppen C, Schaefer C, Von Baum H, Marre R, et al. Culture-independent molecular subtyping of Mycoplasma pneumoniae in clinical samples[J]. J Clin Microbiol, 2006, 44(7): 2567-2570.

[5] Sasaki T, Kenri T, Okazaki N, Iseki M, Yamashita R, Shintani M, et al. Epidemiological study of mycoplasma pneumoniae infections in Japan based on PCR restriction fragment length polymorphism of the P1 cytadhesin gene[J]. J Clinic Microbiol, 1996, 34(2): 447-449.

[6] Musatovova O, Kannan TR, Baseman JB. Genomic analysis reveals Mycoplasma pneumoniae repetitive element 1-mediated recombination in a clinical isolate[J]. Infect Immun, 2008, 76(4): 1639-1648.

[7] Cousin A, Bertille DB, A Charron, Renadin H, Bebear C. Analysis of RFLP of amplified cytadhesin P1 gene for epidemiological study of Mycoplasma pneumoniae[C]. The 10th International Congress of the International Organization for Mycoplasmology. French, 1994: 494-495.

[8] 胡亚美,江载芳. 诸福棠实用儿科学[M]. 第 7 版. 北京:人民卫生出版社,2002:1204-1205.

[9] 中华医学会儿科学分会呼吸学组儿科支气管镜协作组. 儿科支气管镜术指南(2009年版)[J]. 中华儿科杂志,2009,47(10):740-744.

[10] 钟礼立,彭力,黄寒,梁沫,周琼华,张兵,等. 支气管肺泡灌洗液荧光定量 PCR 对儿童肺炎支原体肺炎诊断研究[J]. 中国当代儿科杂志,2011, 13(3): 191-194.

[11] 吴金屏,赵林清,邓洁,王芳,朱汝南,钱渊. 北京地区 2002 年秋冬儿童急性上呼吸道感染爆发的病原学调查[J]. 中华流行病学杂志,2004, 25(8): 671-673.

[12] 阎思斯,李萍,贾卉. 西安地区小儿肺炎支原体 716 例血清流行病学分析[J]. 陕西医学杂志,2007, 36(8): 1101-1102.

[13] 张润书,安会波,郭大丽. 荧光定量检测 MP-DNA 在难治性肺炎中的应用[J]. 河北医药,2010,32(22):3231.

[14] Eun BW, Kim NH, Choi EH, Lee HJ. Mycoplasma pneumoniae in Korean children: the epidemiology of pneumonia over an 18-year period[J]. J Infect, 2008, 56(5): 326-331.

[15] Rastawicki W, Kaluz ewski S, Jagielski M, Gierczyski R. Epidemiology of Mycoplasma pneumoniae in poland: 28 years of surveillance in Warsaw 1970-1997[J]. Euro Surveill, 1998, 3(10): 99-100.

[16] 王素梅,刘欣. 肺炎支原体感染的流行病学研究[J]. 蚌埠医学杂志, 2006, 31(2): 132-133.

[17] Su CJ, Chavoya A, Dallo SF, Baseman JB. Sequence divergency of the cytadhesin gene of Mycoplasma pneumoniae[J]. Infect Immun, 1990, 58(8): 2669-2674.

[18] Cousin-Allery A, Charron A, de Barbeyrac B, Fremy G, Skov Jensen J, Renaudin H, et al. Molecular typing of Mycoplasma pneumoniae strains by PCR-based methods and pulsed-field gel electrophoresis. Application to French and Danish isolates[J]. Epidemiol Infect, 2000, 124(1): 103-111.

[19] Kenri T, Okazaki N, Yamazaki T, Narita M, Izumikawa K, Matsuoka M, et al. Genotyping analysis of Mycoplasma pneumoniae clinical strains in Japan between 1995 and 2005: type shift phenomenon of M. pneumoniae clinical strains[J]. J Med Microbiol, 2008, 57(Pt 4): 469-475.

[20] Pereyre S, Charron A, Renaudin H, Bebear C, Bebear CM. First report of macrolide-resistant strains and description of a novel nucleotide sequence variation in the P1 adhesin gene in Mycoplasma pneumoniae clinical strains isolate in France over 12 years[J]. J Clin Microbiol, 2007, 45(11): 3534-3539.

[21] Martinez MA, Ruiz M, Zunino E, Luchsinger V, Aquirre R, Avendano LF. Identification of P1 types and variants of Mycoplasma pneumoniae during an epidemic in Chile[J]. J Med Microbiol, 2010, 59(Pt 8): 925-929.

[22] 张立,陈志敏,沈征,李淑娴,徐丹,唐兰芳. 浙江省儿童鼻咽吸出物标本肺炎支原体基因分型研究[J]. 中华儿科杂志,2011, 49(10): 750-754.

(本文编辑:邓芳明)