

## RIDA® GENE *Mycoplasma pneumoniae*

**REF** PG4305



## 1. Application

Pour le diagnostic *in vitro*. RIDA<sup>®</sup>GENE *Mycoplasma pneumoniae* est un test de PCR en temps réel multiplexe pour la détection qualitative directe de *Mycoplasma pneumoniae* à partir de sécrétions trachéales, crachat et liquide de lavage broncho-alvéolaire (LBA) humains<sup>1</sup>.

Le test de PCR en temps réel multiplexe RIDA<sup>®</sup>GENE *Mycoplasma pneumoniae* est destiné à faciliter le diagnostic des infections respiratoires provoquées par *Mycoplasma pneumoniae*.

## 2. Résumé et explication du test

La pneumonie communautaire (PC) est la maladie infectieuse la plus signalée dans le monde entier et, dans les pays occidentaux, elle est la maladie infectieuse qui occasionne le plus de décès. En Allemagne, on dénombre jusqu'à 800 000 cas de PC chaque année et le taux de mortalité varie de 2 à 60 % en fonction du lieu de son acquisition (communauté ou établissement hospitalier). Les bactéries sont l'agent pathogène le plus courant dans les PC. On fait une distinction entre agent pathogène typique et agent pathogène atypique. Les bactéries atypiques ne peuvent pas être cultivées à partir de crachats ou de sang et ne sont pas visibles par coloration Gram. Cela rend quasiment impossible le diagnostic des bactéries atypiques de PC à l'aide des techniques standards. L'une des bactéries atypiques de PC la plus fréquente est *Mycoplasma pneumoniae*. Jusqu'à 20 % des cas de pneumonies communautaires sont provoqués par *M. pneumoniae*<sup>2</sup>.

*M. pneumoniae* est une bactérie très contagieuse dépourvue de paroi cellulaire qui appartient à la famille des *Mycoplasmataceae*. Elle se transmet principalement par des particules liquides ou un contact direct ou indirect. La durée d'incubation est de 1 à 4 semaines. *M. pneumoniae* ne fait pas partie de la flore habituelle de l'humain et est le plus souvent détectée chez les enfants et les jeunes adultes. Dans 5 à 25 % des infections par *M. pneumoniae*, une pneumonie se développe qui nécessite un traitement par antibiotiques. Aux États-Unis, on dénombre 2 millions de cas par an, dont 100 000 cas qui entraînent l'hospitalisation du patient.

### 3. Principe du test

Le test RIDA<sup>®</sup>GENE *Mycoplasma pneumoniae* est un test de PCR en temps réel multiplexe pour la détection qualitative directe de *Mycoplasma pneumoniae* à partir de sécrétions trachéales, crachat et liquide de lavage broncho-alvéolaire (LBA). Après isolation de l'ADN survient l'amplification des fragments de gène (IGS, si présent) spécifiques au *Mycoplasma pneumoniae*. La cible amplifiée pour *Mycoplasma pneumoniae* est détectée grâce à des sondes pour hydrolyse qui sont marquées à une extrémité par un extincteur et à l'autre extrémité par un colorant fluorescent indicateur (fluorophore). En présence d'une cible, les sondes s'hybrident aux amplicons. Pendant l'étape d'extension, la Taq-Polymerase rompt la proximité indicateur-extincteur. L'indicateur émet un signal de fluorescence qui est détecté par l'unité optique d'un instrument de PCR en temps réel. Le signal de fluorescence augmente avec le nombre d'amplicons formés. Le test RIDA<sup>®</sup>GENE *Mycoplasma pneumoniae* contient un Internal Control DNA (ICD) en tant que contrôle interne de la procédure de préparation des échantillons et/ou pour déterminer une éventuelle inhibition de la PCR.

### 4. Contenu du paquet

**Tableau 1 : Contenu du paquet (les réactifs fournis dans le kit permettent de réaliser 100 déterminations)**

Code du kit	Réactif	Quantité		Couleur du couvercle
1	Reaction Mix	2x	1050 µl	jaune
2	Taq-Polymerase	1x	80 µl	rouge
D	Internal Control DNA	2x	1700 µl	orange
N	No Template Control	1x	450 µl	blanc
P	Positive Control	1x	200 µl	bleu

### 5. Instructions de conservation des réactifs

- Protéger tous les réactifs de la lumière et les conserver à -20 °C. Tous les réactifs peuvent être utilisés jusqu'à la date de péremption. Après la date de péremption, la qualité n'est plus garantie.
- Décongeler délicatement tous les réactifs avant de les utiliser (par ex., dans un réfrigérateur entre 2 et 8 °C).
- Les réactifs peuvent supporter jusqu'à 20 cycles de congélation/décongélation sans que la performance du test ne soit affectée (par ex., après la première décongélation, séparer les réactifs en aliquotes et les congeler immédiatement).
- Pendant la préparation de la PCR, tous les réactifs doivent être conservés au frais de manière convenable (entre 2 et 8 °C).

## 6. Autres réactifs et matériel nécessaires

Le test de PCR en temps réel multiplexe RIDA® GENE Mycoplasma pneumoniae peut être utilisé avec les plateformes d'extraction et les instruments de PCR en temps réel suivants :

**Tableau 2** Équipement validé :

Plateformes d'extraction	
R-Biopharm	RIDA® Xtract
Promega	Maxwell® RSC
Instruments de PCR en temps réel	
Roche	LightCycler® 2.0, LightCycler® 480II, LightCycler® 480 z
Agilent Technologies	Mx3005P
Applied Biosystems	ABI 7500
Bio-Rad	CFX96™
QIAGEN	Rotor-Gene Q

**Remarque : utiliser uniquement des tubes de 0,1 ml sur le Rotor-Gene Q (QIAGEN).**

Si vous souhaitez utiliser d'autres plateformes d'extraction ou instruments de PCR en temps réel, contactez R-Biopharm à l'adresse [mdx@r-biopharm.de](mailto:mdx@r-biopharm.de).

- RIDA® GENE Color Compensation Kit II (PG0002) pour une utilisation avec l'appareil LightCycler® 2.0
- RIDA® GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) pour une utilisation avec les appareils LightCycler® 480II et LightCycler® 480 z
- Consommables de PCR en temps réel (plaques, tubes, feuilles)
- Centrifugeuse avec rotor pour les flacons de réaction
- Agitateur-mélangeur vortex
- Pipettes (0,5 à 20 µl, 20 à 200 µl, 100 à 1 000 µl)
- Pointes à filtre
- Gants jetables non poudrés
- Eau de PCR (qualité BioScience, sans nucléase)

## 7. Mesures de précaution

Pour le diagnostic *in vitro*.

Ce test ne doit être réalisé que par un personnel de laboratoire formé. Il convient de respecter les directives de travail dans les laboratoires médicaux. Suivre le manuel d'instructions pour la réalisation du test. Ne pas pipeter les échantillons ou les réactifs à la bouche. Éviter tout contact avec une peau meurtrie ou les membranes muqueuses. Lors de la manipulation de réactifs ou d'échantillons, porter des

vêtements de protection appropriés (gants adaptés, blouse, lunettes de protection) et se laver les mains à l'issue de la réalisation du test. Ne pas fumer, manger, ni boire dans les zones où des échantillons ou des réactifs sont utilisés.

- L'extraction, la préparation de la PCR et l'exécution de la PCR doivent être menées dans des salles différentes afin d'éviter toute contamination croisée.
- Les échantillons doivent être traités comme du matériel potentiellement infectieux de même que tous les réactifs et le matériel exposés aux échantillons. Ils doivent être manipulés conformément aux règlements nationaux en matière de sécurité.
- Ne pas utiliser le kit après sa date de péremption.

Après utilisation, tous les réactifs et matériaux utilisés doivent être éliminés de façon appropriée. Veuillez vous conformer aux règlements nationaux applicables concernant la mise au rebut.

Pour en savoir plus, consulter les fiches de données de sécurité (FDS) sur [www.r-biopharm.com](http://www.r-biopharm.com).

## 8. Prélèvement et conservation des échantillons

### 8.1 Préparation de l'échantillon de sécrétions trachéales, crachat ou lavage broncho-alvéolaire

Pour isoler l'ADN des sécrétions trachéales, du crachat ou du lavage broncho-alvéolaire, utiliser un kit d'isolation d'ADN (par ex., RIDA<sup>®</sup> Xtract [R-Biopharm]) ou un système d'extraction d'ADN (par ex., Maxwell<sup>®</sup> RSC [Promega]) disponible dans le commerce. Extraire l'ADN conformément aux instructions du fabricant.

Le test RIDA<sup>®</sup> GENE Mycoplasma pneumoniae inclut un **Internal Control DNA** qui détecte l'inhibition de la PCR, surveille l'intégrité du réactif et confirme que l'extraction d'acides nucléiques a été suffisante. L'ADN de contrôle interne **Internal Control DNA** peut être utilisé comme contrôle de l'inhibition de la PCR ou comme contrôle de l'extraction pour la procédure de préparation de l'échantillon et en tant que contrôle de l'inhibition de la PCR.

Si l'ADN de contrôle interne **Internal Control DNA** est utilisé uniquement comme contrôle de l'inhibition de la PCR, il convient d'en ajouter 1 µl au mélange maître (voir tableau 4).

Si le **Internal Control DNA** est utilisé comme contrôle de l'extraction pour la procédure de préparation de l'échantillon **et** comme contrôle de l'inhibition de la PCR, il convient d'ajouter 20 µl de **Internal Control DNA** pendant la procédure d'extraction. Le **Internal Control DNA** doit toujours être ajouté au mélange spécimen-tampon de lyse et **non** directement à l'échantillon. Il est aussi recommandé d'ajouter 1 µl de **Internal Control DNA** au mélange de contrôle négatif et contrôle positif de la PCR.

## 9. Réalisation du test

### 9.1 Préparation du mélange maître

Calculer le nombre total de réactions de PCR (réactions de l'échantillon et réactions de contrôle) nécessaires. Il faut inclure un contrôle positif et un contrôle négatif dans chaque exécution du test.

Nous recommandons de calculer un volume supplémentaire de 10 % pour compenser l'imprécision du pipetage (voir tableaux 3, 4). Décongeler, mélanger délicatement et centrifuger brièvement le [Reaction Mix], la [Taq-Polymerase], le [Positive Control], le [No Template Control] et le [Internal Control DNA] avant utilisation. Conserver les réactifs à une température assez basse durant l'étape de travail (entre 2 et 8 °C).

**Tableau 3** : Calcul et exemple de pipetage pour 10 réactions du mélange maître (ICD comme contrôle de l'extraction et de l'inhibition de la PCR)

Code du kit	Composants du mélange maître	Volume par réaction	10 réactions (10 % de plus)
1	[Reaction Mix]	19,3 µl	212,3 µl
2	[Taq-Polymerase]	0,7 µl	7,7 µl
	<b>Total</b>	<b>20 µl</b>	<b>220 µl</b>

Mélanger les composants du mélange maître et les centrifuger brièvement.

**Tableau 4** : Calcul et exemple de pipetage pour 10 réactions du mélange maître (ICD uniquement comme contrôle de l'inhibition de la PCR)

Code du kit	Composants du mélange maître	Volume par réaction	10 réactions (10 % de plus)
1	[Reaction Mix]	19,3 µl	212,3 µl
2	[Taq-Polymerase]	0,7 µl	7,7 µl
D	[Internal Control DNA]	1,0 µl	11 µl
	<b>Total</b>	<b>21,0 µl</b>	<b>231,0 µl</b>

Mélanger les composants du mélange maître et les centrifuger brièvement.

## 9.2 Préparation du mélange pour la PCR

Pipeter 20 µl du mélange maître dans chaque flacon de réaction (tube ou plaque).

**Contrôle négatif :** Ajouter 5 µl de **No Template Control** au mélange maître pré-pipeté.

**Remarque :** si le **Internal Control DNA** est utilisé à la fois comme contrôle de l'extraction pour la procédure de préparation de l'échantillon et comme contrôle de l'inhibition de la PCR, il convient d'en ajouter 1 µl au mélange de contrôle négatif pour la PCR.

**Échantillon :** Ajouter 5 µl d'extrait d'ADN au mélange maître pré-pipeté.

**Contrôle positif :** Ajouter 5 µl de **Positive Control** au mélange maître pré-pipeté.

**Remarque :** si le **Internal Control DNA** est utilisé à la fois comme contrôle de l'extraction pour la procédure de préparation de l'échantillon et comme contrôle de l'inhibition de la PCR, il convient d'en ajouter 1 µl au mélange de contrôle positif pour la PCR.

Recouvrir les tubes ou la plaque. Les centrifuger et les placer dans l'instrument de PCR en temps réel. La réaction de PCR devrait commencer conformément à la configuration de l'instrument de PCR (voir tableaux 5, 6, 7, 8).

## 9.3 Configuration de l'instrument de PCR

### 9.3.1 Profil de PCR en temps réel de l'ADN

**Tableau 5** : Profil de PCR en temps réel de l'ADN pour la série LightCycler® et Rotor-Gene Q

Dénaturation initiale	1 min, 95 °C
Cycles	45 cycles
<u>PCR</u> Dénaturation	10 s, 95 °C
Hybridation/extension	15 s, 60 °C
Vitesse de transition de température / Vitesse de montée	Maximale

**Remarque** : l'hybridation et l'extension se produisent au cours de la même étape.

**Tableau 6** : Profil de PCR en temps réel de l'ADN pour Mx3005P, ABI7500, CFX96™

Dénaturation initiale	1 min, 95 °C
Cycles	45 cycles
<u>PCR</u> Dénaturation	15 s, 95 °C
Hybridation/extension	30 s, 60 °C
Vitesse de transition de température / Vitesse de montée	Maximale

**Remarque** : l'hybridation et l'extension se produisent au cours de la même étape.



### 9.3.2 Profil universel de PCR en temps réel

**Remarque : le profil universel de PCR en temps réel doit seulement être utilisé pour les tests d'ADN si les tests PCR en temps réel RIDA® GENE DNA et ARN sont effectués lors d'une même exécution.**

**Tableau 7 :** Profil universel de PCR en temps réel pour la série LightCycler®

<u>Transcription inverse</u>	10 min, 58 °C
Dénaturation initiale	1 min, 95 °C
Cycles	45 cycles
<u>PCR</u> Dénaturation	10 s, 95 °C
Hybridation/extension	15 s, 60 °C
Vitesse de transition de température / Vitesse de montée	Maximale

**Remarque : l'hybridation et l'extension se produisent au cours de la même étape.**

**Tableau 8 :** Profil universel de PCR en temps réel pour Mx3005P, ABI7500, CFX96™ et Rotor-Gene Q

<u>Transcription inverse</u>	10 min, 58 °C
Dénaturation initiale	1 min, 95 °C
Cycles	45 cycles
<u>PCR</u> Dénaturation	15 s, 95 °C
Hybridation/extension	30 s, 60 °C
Vitesse de transition de température / Vitesse de montée	Maximale

**Remarque : l'hybridation et l'extension se produisent au cours de la même étape.**

## 9.4 Configuration du canal de détection

Tableau 9 : Sélection des canaux de détection adéquats

Instrument de PCR en temps réel	Détection	Canal de détection	Remarque
Roche LightCycler® 2.0	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	530	Le kit RIDA® GENE Color Compensation Kit II (PG0002) est nécessaire
	ICD	560	
Roche LightCycler® 480II	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	465/510	Le kit RIDA® GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) est nécessaire
	ICD	533/580	
Roche LightCycler® 480 z	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	465/510	Le kit RIDA® GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) est nécessaire
	ICD	540/580	
Agilent Techn. Mx3005P	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	FAM	Vérifier que le colorant de référence n'est pas précisé
	ICD	HEX	
ABI 7500	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	FAM	Vérifier que l'option de référence passive ROX n'est pas sélectionnée
	ICD	VIC	
Bio-Rad CFX96™	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	FAM	-
	ICD	VIC	
Qiagen Rotor-Gene Q	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Vert	Les paramètres de gain doivent être réglés sur 5, conformément aux paramètres par défaut
	ICD	Jaune	

Remarque : lors de l'utilisation du LightCycler® 2.0, le paramètre « Seek Temperature » doit être augmenté de « 30 » à « 58 ».

## 10. Contrôle qualité

L'analyse des échantillons est effectuée par le logiciel de l'instrument de PCR en temps réel utilisé conformément aux instructions du fabricant. Le contrôle positif et le contrôle négatif doivent afficher des résultats corrects (voir tableau 10, figure 1) afin de déterminer qu'une série est valide.

Le **Positive Control** a une concentration de  $10^3$  copies/ $\mu$ l. Chaque série de PCR utilise au total  $5 \times 10^3$  copies de contrôle positif.

**Tableau 10** : Pour que l'exécution soit valide, les conditions suivantes doivent être satisfaites :

Échantillon	Résultat du test	Ct ICD	Ct cible
Contrôle positif	Positif	S/O <sup>*1</sup>	Voir Certificat d'assurance qualité
Negative control	Négatif	Ct > 20	0

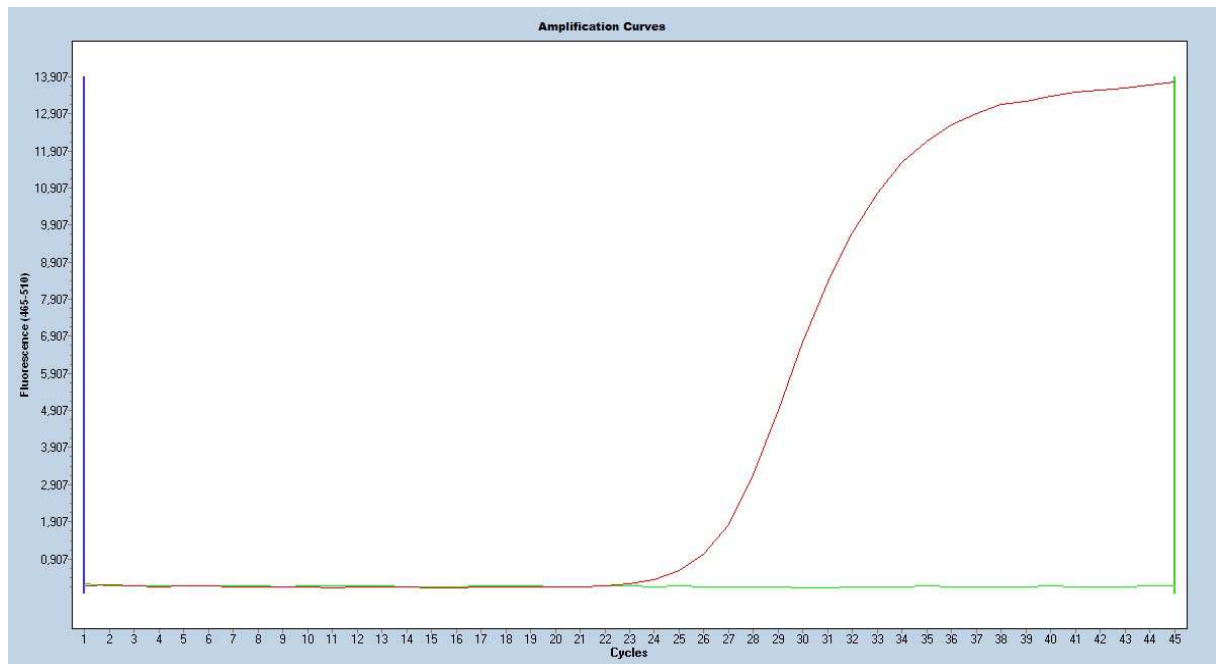
<sup>\*1</sup> Aucune valeur de Ct n'est requise pour que le résultat de l'ICD soit positif pour le contrôle positif.

Si le contrôle positif n'est pas positif dans la plage de Ct spécifiée, mais que le contrôle négatif est valide, préparer des réactions entièrement neuves y compris les contrôles.

Si le contrôle négatif n'est pas négatif, mais que le contrôle positif est valide, préparer des réactions entièrement neuves y compris les contrôles.

Si les critères requis ne sont pas satisfaits, les points suivants doivent être contrôlés avant de recommencer le test :

- Date de péremption des réactifs utilisés
- Fonctionnement de l'instrumentation utilisée
- Exécution correcte de la procédure de test



**Fig. 1** : Exécution correcte des contrôles positif et négatif (*Mycoplasma pneumoniae*) sur le LightCycler® 480II

## 11. Interprétation des résultats

Les résultats sont interprétés conformément au tableau 11.

**Tableau 11** : Interprétation des échantillons

Gène cible		
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	ICD	Résultat
positif	positif/négatif	<i>M. pneumoniae</i> détecté
négatif	positif	Gènes cibles non détectés
négatif	négatif	Non valide

*Mycoplasma pneumoniae* est détecté si l'ADN de l'échantillon et le **Internal Control DNA** présentent un signal d'amplification dans le système de détection.

*Mycoplasma pneumoniae* est également détecté si l'ADN de l'échantillon présente un signal d'amplification dans le système de détection, mais aucun pour le **Internal Control DNA**. La détection du **Internal Control DNA** n'est pas nécessaire car les concentrations élevées de l'amplicon peuvent générer un signal faible ou absent du **Internal Control DNA**.

*Mycoplasma pneumoniae* n'est pas détecté si l'ADN de l'échantillon ne présente aucun signal d'amplification dans le système de détection, mais en présente un pour le **Internal Control DNA**. Une inhibition de la réaction de PCR peut être exclue par la détection de l'ADN du contrôle interne **Internal Control DNA**.

Un échantillon est non valide si l'ADN de l'échantillon et l'ADN du contrôle interne **Internal Control DNA** ne présentent aucun signal d'amplification dans le système de détection. L'échantillon contient un inhibiteur de la PCR. L'échantillon extrait doit être encore dilué avec de l'eau de PCR (1/10) et de nouveau amplifié, ou il convient d'améliorer l'isolation et la purification de l'échantillon.

## 12. Limites de la méthode

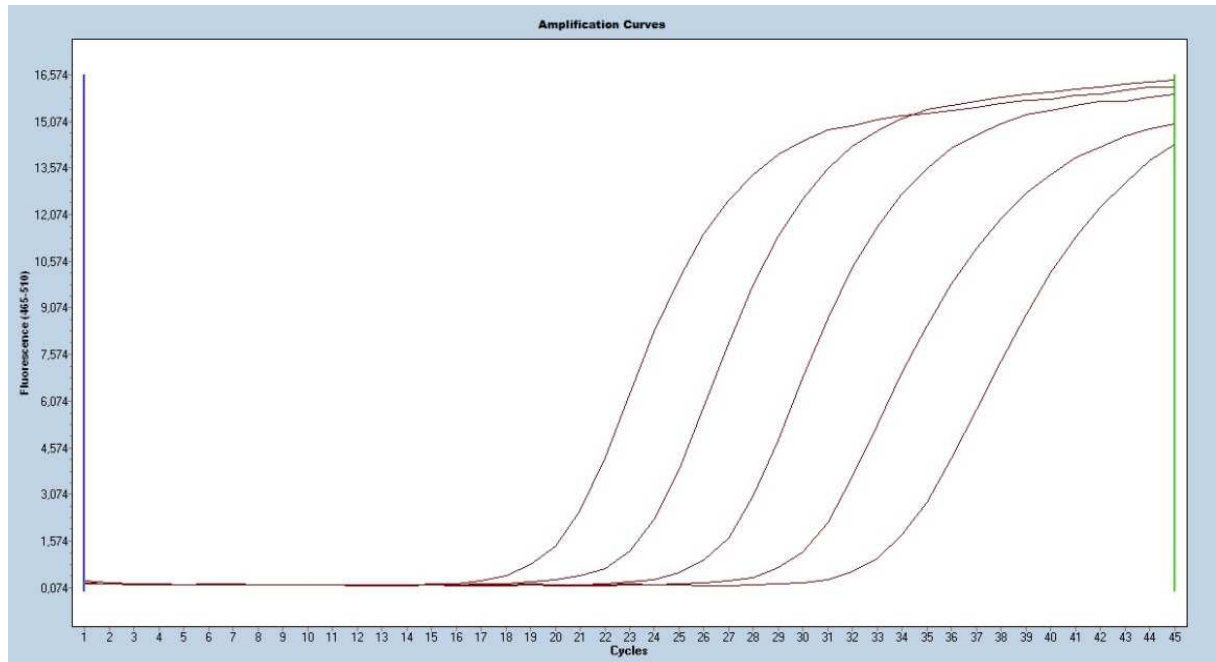
1. Le résultat de l'analyse moléculaire ne doit pas mener au diagnostic, mais toujours être envisagé dans le contexte des antécédents médicaux et des symptômes du patient.
2. Ce test est seulement validé pour les échantillons de sécrétions trachéales, de crachat et de LBA.
3. Un prélèvement, transport, stockage et traitement incorrects du spécimen ou une charge en agents pathogènes inférieure à la sensibilité analytique peuvent entraîner des résultats faux négatifs.
4. La présence d'inhibiteurs de la PCR peut donner lieu à des résultats non valides.
5. Des mutations ou des polymorphismes dans les régions de liaison à l'amorce ou à la sonde peuvent empêcher la détection de nouveaux variants et donner lieu à un résultat faux négatif avec le test RIDA® GENE Mycoplasma pneumoniae.
6. À l'instar de tous les tests de diagnostic *in vitro* de type PCR, des niveaux de la cible extrêmement bas sous la limite de détection (LDD) peuvent être détectés, mais les résultats peuvent ne pas être reproductibles.
7. Un résultat positif du test ne signifie pas nécessairement que des organismes viables sont présents. Cependant, un résultat positif indique la présence du gène cible (IGS).

## 13. Performances

### 13.1 Sensibilité analytique

La limite de détection du test de PCR en temps réel multiplexe RIDA® GENE *Mycoplasma pneumoniae* est  $\geq 10$  copies d'ADN par réaction pour *Mycoplasma pneumoniae*.

La figure 2 ci-dessous présente une série de dilutions de *Mycoplasma pneumoniae* ( $10^5 - 10^1$  copies d'ADN par  $\mu\text{l}$ ) avec le LightCycler® 480II.



**Figure 2 :** Série de dilutions pour *Mycoplasma pneumoniae* ( $10^5 - 10^1$  copies d'ADN par  $\mu\text{l}$ ) avec le LightCycler® 480II

La limite de détection de l'ensemble de la procédure dépend de la matrice de l'échantillon, de l'extraction de l'ADN et de la concentration de l'ADN.

## 13.2 Spécificité analytique

La spécificité analytique du test de PCR en temps réel multiplexe RIDA® GENE *Mycoplasma pneumoniae* concerne *Mycoplasma pneumoniae*. Aucune réaction croisée n'a pu être détectée pour les espèces suivantes (voir tableau 13) :

**Tableau 13** : Test de la réactivité croisée

Adénovirus 1, humain, souche Adénoïde 71	-	Échovirus 11	-	<i>Legionella bozemanii</i>	-	Virus parainfluenza, sérotype 3	-
Adénovirus 7, humain, souche Gomen	-	Entérovirus Type 71	-	<i>Legionella longbeacheae</i>	-	Virus parainfluenza 4b, humain, souche CH19503	-
<i>Bordetella parapertussis</i>	-	<i>Haemophilus influenzae</i> Rd	-	<i>Legionella pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i>	-	Virus respiratoire syncytial, humain, souche 9320	-
<i>Bordetella pertussis</i>	-	Virus Herpes simplex 1, souche McIntyre	-	<i>Mycoplasma fermentas</i>	-	Virus respiratoire syncytial, humain, souche Long	-
<i>Chlamydia abortus</i>	-	Virus Herpes simplex 2, souche MS	-	<i>Mycoplasma hominis</i>	-	Rhinovirus humain, génogroupe A	-
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	-	Metapneumovirus humain	-	<i>Neisseria meningitidis</i>	-	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	-
<i>Chlamydia psittaci</i>	-	Virus influenza, infectieux A/PR/8/34	-	Virus parainfluenza 1, humain, souche C35	-	<i>Staphylococcus hominis</i> subsp. <i>novobiosepticus</i> R22	-
Coronavirus 229E, humain	-	Virus influenza B (B/Lee/40)	-	Virus parainfluenza 2, humain, souche Greer	-	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	-
Coxsackie B4, humain	-	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-		-		-












## 14. Historique des versions

Numéro de version	Chapitre et désignation
2014-10-29	Version de la publication
2018-06-14	Révision générale
2018-06-14	4. Contenu du paquet 5. Instructions de conservation des réactifs 6. Autres réactifs et matériel nécessaires 9. Réalisation du test 10. Contrôle qualité 13. Performances 14. Historique des versions 15. Signification des symboles

## 15. Signification des symboles

### Symboles généraux

	Pour le diagnostic <i>in vitro</i>
	Respecter le mode d'emploi
	Numéro de lot
	Date de péremption
	Température de stockage
	Numéro d'article
	Nombre de tests
	Date de fabrication
	Fabricant

### Symboles spécifiques au test

Sans objet

## 16. Bibliographie

1. Qasem JA, *et al.* Polymerase chain reaction as a sensitive and rapid method for specific detection of *Mycoplasma pneumoniae* in clinical samples. *Microbiol. Res.* 2002, 157:77-82.
2. Touati *et al.* Evaluation of five commercial real-time PCR assays for Detection of *Mycoplasma pneumoniae* in respiratory tract specimens. *J. Clin. Microbiol.* 2009, 2269-2271.
3. <http://www.cdc.gov/pneumonia/atypical/mycoplasma/index.html>, accessed 29.10.2014