

研究报告

多酶恒温扩增核酸试纸条法快速检测肺炎支原体方法的建立及应用

胡茜盼¹, 翁兴墉¹, 吕芷贤¹, 蒋婷清¹, 何军^{*2}, 邓仲良^{*1}

1 南华大学衡阳医学院公共卫生学院卫生检验与检疫系, 湖南 衡阳 421001

2 南华大学衡阳医学院附属南华医院检验科, 湖南 衡阳 421001

胡茜盼, 翁兴墉, 吕芷贤, 蒋婷清, 何军, 邓仲良. 多酶恒温扩增核酸试纸条法快速检测肺炎支原体方法的建立及应用[J]. 微生物学通报, 2023, 50(7): 3049-3057.

HU Xipan, WENG Xingyong, LÜ Zhixian, JIANG Tingqing, HE Jun, DENG Zhongliang. Establishment and application of multienzyme isothermal rapid amplification (MIRA) nucleic acid test strip method for rapid detection of *Mycoplasma pneumoniae*[J]. Microbiology China, 2023, 50(7): 3049-3057.

摘要: 【背景】肺炎支原体是导致儿童和青少年呼吸道感染的重要病原体, 长期以来由于其临床表现不特异而容易错过最佳治疗时期。【目的】结合多酶恒温扩增(multienzyme isothermal rapid amplification, MIRA)技术和核酸试纸条建立一种快速检测肺炎支原体的方法。【方法】以肺炎支原体社区获得性肺炎呼吸窘迫综合征(community acquired respiratory distress syndrome, CARDS)毒素编码基因为靶基因设计引物和探针, 对反应体系的温度、时间等进行优化, 评估其敏感性, 通过检测肺炎支原体和其余 7 种病原体分析其特异性, 并对 35 份临床样本进行验证。【结果】MIRA 核酸试纸条法在 37 °C 条件下, 15 min 内便可完成对肺炎支原体的检测, 最低检出限为 10 copies/μL; 除肺炎支原体外, 其余 7 种病原体均不能扩增, 特异性较好。以实时荧光 PCR 检测为标准, MIRA 核酸试纸条法对 35 份临床样本检测后的诊断特异度为 100.00%、灵敏度为 96.15%、阴性预测值为 90.00%、阳性预测值为 100.00%。【结论】本研究建立了 MIRA 核酸试纸条法检测肺炎支原体的方法, 具有快速便携、灵敏度高、特异性好等优势, 易于在基层推广使用。

关键词: 多酶恒温扩增技术; 核酸试纸条; 肺炎支原体

资助项目: 湖南省教育厅重点项目(21A0261); 湖南省自然科学基金(2022JJ30501); 湖南省卫生健康委员会科研重点课题(20201915)

This work was supported by the Key Project of Education Department of Hunan Province (21A0261), the Natural Science Foundation of Hunan Province (2022JJ30501), and the Key Scientific Research Project of Hunan Provincial Health Commission (20201915).

*Corresponding authors. E-mail: HE Jun, junhe2008@163.com; DENG Zhongliang, dzl021015@163.com

Received: 2022-09-24; Accepted: 2022-11-08; Published online: 2022-11-30

Establishment and application of multienzyme isothermal rapid amplification (MIRA) nucleic acid test strip method for rapid detection of *Mycoplasma pneumoniae*

HU Xipan¹, WENG Xingyong¹, LÜ Zhixian¹, JIANG Tingqing¹, HE Jun^{*2},
DENG Zhongliang^{*1}

1 Department of Health Inspection and Quarantine, School of Public Health, Hengyang Medical School, University of South China, Hengyang 421001, Hunan, China

2 Department of Clinical Laboratory, the Affiliated Nanhua Hospital, Hengyang Medical School, University of South China, Hengyang 421001, Hunan, China

Abstract: [Background] *Mycoplasma pneumoniae* is an important pathogen causing respiratory tract infections in children and adolescents. It is easy to miss the optimal treatment period due to its nonspecific clinical manifestations for a long time. [Objective] To develop a method for rapidly detecting *M. pneumoniae* based on the multienzyme isothermal rapid amplification (MIRA) and nucleic acid test strip. [Methods] Primers and probes were designed using the community acquired respiratory distress syndrome (CARDS) toxin gene of *M. pneumoniae* as the target gene to optimize the temperature and time of the reaction system and evaluate the sensitivity. The specificity was analyzed by testing *M. pneumoniae* as well as the remaining 7 pathogens, and 35 clinical samples were validated. [Results] The MIRA nucleic acid test strip method completed the detection of *M. pneumoniae* within 15 minutes at 37 °C, and the limit of detection was 10 copies/μL. Except for *M. pneumoniae*, the other 7 pathogens could not be amplified, showing good specificity. Using real-time fluorescent PCR detection as the standard, the diagnostic specificity, sensitivity, negative predictive value, and positive predictive value of MIRA nucleic acid test strip method for 35 clinical samples were 100.00%, 96.15%, 90.00%, and 100.00%, respectively. [Conclusion] In this study, the MIRA nucleic acid test strip method has been established for the detection of *M. pneumoniae*, which is fast, portable, sensitive, and specific, and is suitable for promotion at the grassroots level.

Keywords: multienzyme isothermal rapid amplification (MIRA); nucleic acid test strip; *Mycoplasma pneumoniae*

肺炎支原体(*Mycoplasma pneumoniae*)是人类社区获得性肺炎(communitary acquired pneumonia, CAP)的常见病原体之一^[1],经呼吸道飞沫传播,其易感人群主要为儿童和青少年^[2]。肺炎支原体感染全年发生,每隔3-7年会出现周期性流行^[3],其临床表现不典型,影像学表现复杂多样,与其他常见呼吸道疾病所致感染非常相似,仅凭临床症状和病原学诊断难以做出准确的早

期诊断^[4-5]。若病情延误,可能发展成重症肺炎甚至引发肺外并发症,危及生命。因此,开发一种简单、快速、准确的肺炎支原体实验室检测方法对于临床准确诊断、有效治疗和早期监测尤为重要。

目前,肺炎支原体的诊断方法包括分离培养法、血清学检测及分子诊断。分离培养法是世界卫生组织推荐的“金标准”,但由于耗时长、

培养条件苛刻、灵敏度低等缺点,限制了其在临床实践中的广泛应用^[6]。血清学检测通过检测血清中肺炎支原体特异性抗体滴度的变化进行诊断,包括酶联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)、冷凝集实验等,是肺炎支原体诊断和流行病学调查的重要方法,但检测结果易受患儿年龄、免疫状态、病程等的影响,容易出现假阴性,不适用于肺炎支原体早期诊断^[7]。以实时荧光 PCR 为代表的分子诊断技术因其灵敏度高、特异性好被认为是强有力的诊断工具^[8],但对实验仪器、环境和操作人员的技术水平有严格的要求,不适宜在基层医疗机构推广使用。近年来,许多等温扩增技术被开发用于病原体的快速检测,如环介导等温扩增(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)技术^[9]、多重交叉置换扩增(multiple cross displacement amplification, MCDA)^[10]、滚环扩增(rolling circle amplification, RCA)^[11]和重组酶聚合酶扩增(recombinase polymerase amplification, RPA)^[12]等,这些方法简便、快速的优点为核酸检测开辟了新的道路。

多酶恒温快速扩增(multienzyme isothermal rapid amplification, MIRA)技术类似于重组酶聚合酶扩增,是一种新型的核酸快速等温扩增技术。该技术使用 4 种核心蛋白(重组酶、DNA 解旋酶、单链结合蛋白和 DNA 聚合酶)在 25–42 °C 等温条件下对靶基因进行扩增^[13]。该方法 5–20 min 内即可完成,操作简单,且无须专业的操作人员和精密的仪器设备,仅一台水浴锅或恒温仪便可进行。此外,将 MIRA 技术与胶体金测流层析技术相结合,可通过肉眼观察条带对检测结果实现可视化。目前,尚未发现将该方法运用到肺炎支原体检测的报道。本研究基于 MIRA 技术建立快速便携式检测肺炎支原体的核酸试纸条检测方法,利用 MIRA 技术对社区获

得性肺炎呼吸窘迫综合征(community acquired respiratory distress syndrome, CARDS)毒素编码基因进行扩增,在反应体系中加入生物素探针,插入核酸试纸条进行分析检测。以期在保证高灵敏度与特异性的同时,极大地降低环境、设备与操作人员的要求,并且快速便携,便于实验室资源匮乏的基层医疗机构所使用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株

肺炎支原体标准菌株(ATCC 29342)由南华大学衡阳医学院病原生物研究所提供;肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*, SP)由南华大学附属第一医院检验科提供;结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*, MTB)由南华大学附属南华医院检验科提供;铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*, PAE)、流感嗜血杆菌(*Haemophilus influenzae*, HIB)、鲍曼不动杆菌(*Acinetobacter baumannii*, AB)、穿透支原体(*Mycoplasma penetrans*, MPE)和人型支原体(*Mycoplasma hominis*, MH)为实验室保存菌株。

1.1.2 主要试剂和仪器

DNA 恒温快速扩增试剂盒,潍坊安普未来生物科技有限公司;一次性核酸测试纸条,北京宝盈同汇生物技术有限公司;DNA 提取试剂盒,INDICAL BIOSCIENCE 公司;肺炎支原体核酸检测试剂盒,圣湘生物科技股份有限公司。恒温水浴锅,太仓市华利达实验设备有限公司。

1.2 引物、探针设计与合成

选择肺炎支原体 CARDS 毒素基因(登录号为 DQ447750.1)作为靶基因,根据潍坊安普未来生物科技有限公司的指导方针,使用 Primer Premier 5 设计引物与探针。引物长度为 30–35 bp,其中下游引物的 5'端需标记一个生物素基团;扩

增产物长度为 150–300 bp; 探针长度为 46–52 个核苷酸, 需位于上、下游引物之间; 5'端用羧基荧光素(FAM)进行修饰; 在 5'端和 3'末端的中部位置标记一个 dSpacer (四氢呋喃, THF); 3'末端标记一个 C3Spacer 修饰基团。所有的引物和探针在合成前使用 BLAST 进行筛选, 以进行特异性分析。引物和探针序列如表 1 所示, 均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

1.3 基因组 DNA 提取

按照 DNA 提取试剂盒使用说明提取细菌以及临床样本的基因组 DNA, 并放置于–80 °C 保存。

1.4 MIRA 核酸试纸条法快速检测肺炎支原体方法的建立

MIRA 扩增反应体系(50 µL): A buffer 29.4 µL, 上、下游引物(10 nmol/L)各 2.0 µL, 探针(10 nmol/L) 0.5 µL, 模板 DNA 2.0 µL, 无酶水 11.6 µL; 将预混好的反应液加入干粉反应管中后, 在管盖中加入 2.5 µL B buffer, 瞬时离心, 涡旋振荡混匀后再短暂离心, 放入恒温仪中 37 °C 孵育 10 min。反应结束后, 取 1 µL 扩增产物加入含有 99 µL 无酶水的离心管中, 混合均匀后, 将核酸试纸条的样品端插入离心管中室温平衡, 5 min 内观察质控线与检测线, 判读结果。

1.5 MIRA 体系优化

针对肺炎支原体 CARDS 毒素基因, 分别设计两条上游引物(F1、F2)和下游引物(R1、R2)

并进行交叉配对, 最终组成 4 对引物, 将其分别加入不同反应管中, 底物模板均为不含目标 DNA 的无酶水, 即阴性对照, 以排除引物本身引起的假阳性, 选出最佳引物对。在不同温度(25、30、37 和 42 °C)和反应时间(5、10、15 和 20 min)下对 MIRA 体系进行评估, 选出最佳反应条件。在每次反应中肺炎支原体标准菌株模板浓度为 10^4 copies/µL, 并以无酶水作为阴性对照。

1.6 敏感性实验

将包含上、下游引物在内的部分 CARDS 毒素基因序列克隆至 pUC57 载体上, 构建重组质粒。将该质粒进行 10 倍梯度稀释至 10^4 – 10^0 copies/µL, 分别取 2 µL 作为底物模板, 同时以无酶水作为阴性对照, 进行 MIRA 扩增, 再通过核酸试纸条对结果进行敏感性分析。

1.7 特异性实验

将建立好的 MIRA 核酸试纸条法分别对肺炎支原体和其他两种与肺炎支原体基因序列相似的支原体(人型支原体和穿透支原体), 以及另外 5 种能引起肺炎支原体类似临床症状的呼吸道病原体(铜绿假单胞菌、肺炎链球菌、流感嗜血杆菌、结核分枝杆菌和鲍曼不动杆菌)进行检测, 同时以无酶水为反应模板作为阴性对照, 评价该方法的特异性。

1.8 临床样本验证

收集来自于南华大学附属南华医院检验科肺炎支原体感染者和健康人的咽拭子样本共 35 例,

表 1 MIRA 核酸试纸条法引物和探针序列

Table 1 Primer and probe sequences of MIRA nucleic acid test strip method

Name	Sequence (5'→3')	Length (bp)
F1	ATTATCAAGAGCTGCAAACCCAAGCCAATG	30
F2	ACACCAGGAATAGCTACTCCTGTACATTTA	30
R1	[5'-biotin]-CTGGTGTATCTTCCAGTTCCTTTACACTGC	30
R2	[5'-biotin]-CTAGCGTACTGTGGTAAGGATTGTAGGTTA	30
Probe	[5'-FAM]-ATCGTTTGCGTGCCCTGATTGAAGTCCACCTT-CTA[THF]TAATGGTGAAAATCCG-[3'-C3spacer]	51

同时用 MIRA 核酸试纸条法和肺炎支原体核酸检测试剂盒(PCR-荧光探针法)检测,并用无酶水作为试剂对照。以实时荧光定量 PCR 的结果作为标准,评价基于 MIRA 核酸试纸条法的特异度、灵敏度、阴性预测值和阳性预测值。

2 结果与分析

2.1 建立的 MIRA 核酸试纸条法

以肺炎支原体标准菌株 M129 基因组 DNA 为模板进行 MIRA 扩增,用核酸试纸条检测扩增产物,结果显示阴性对照只有质控线显色,而用肺炎支原体标准菌株 DNA 为扩增模板的试纸条质控线和检测线均显色,表明该方法具有可行性(图 1)。

2.2 反应条件优化结果

分别用 4 组引物以无酶水为扩增模板进行检测,结果显示只有引物对 F1/R2 的试纸条带仅出现质控线,可排除引物本身引起的假阳性,其余引物对质控线和检测线均出现显色,由此确定 F1/R2 为最佳引物对(图 2A)。接着对该方法的孵育温度(25–42 °C)和扩增时间(5–20 min)进行

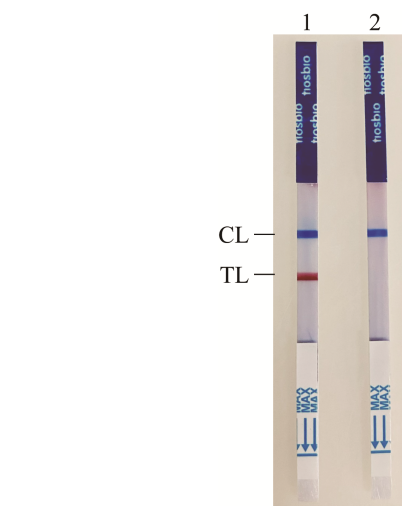


图 1 MIRA 核酸试纸条法的建立 1: M129; 2: 阴性对照; CL: 质控线; TL: 检测线

Figure 1 Establishment of MIRA nucleic acid test strip method. 1: M129; 2: Negative control; CL: Control line; TL: Test line.

了优化, MIRA 可以在 30–42 °C 下进行,而且在 25 °C 常温条件下检测线也出现较浅显色,选择 37 °C 作为后续实验孵育温度(图 2B)。在时间优化反应中, MIRA 扩增 5 min 检测线便可出现明显显色,为防止后续实验出现偶然性,选择 10 min 作为最佳扩增时间(图 2C)。

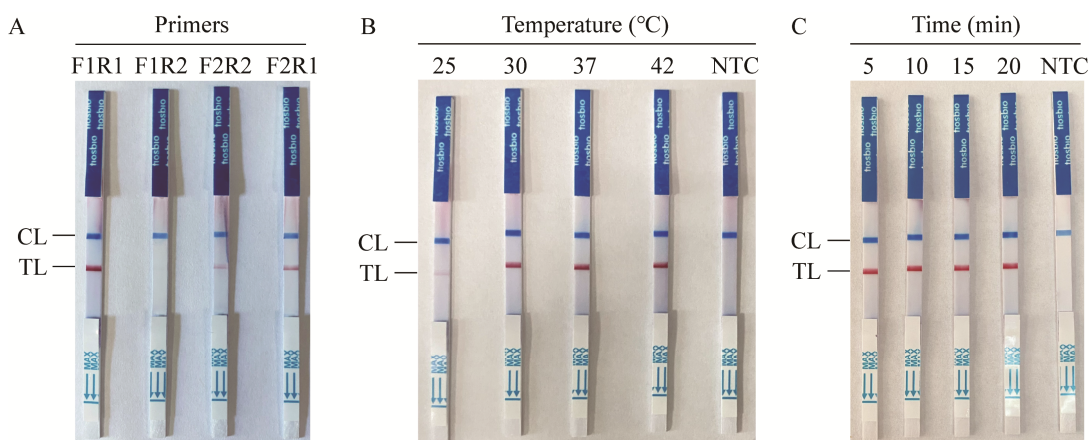


图 2 MIRA 核酸试纸条法反应条件优化 NTC: 阴性对照; CL: 质控线; TL: 检测线

Figure 2 Condition optimization of MIRA nucleic acid test strip method. NTC: Negative control; CL: Control line; TL: Test line.

2.3 敏感性分析结果

针对肺炎支原体 CARDS 毒素基因构建了重组质粒, 将其梯度稀释至 10^4 – 10^0 copies/ μ L, 并以其为模板进行 MIRA 扩增, 用试纸条检测扩增产物。结果显示浓度为 10^0 copies/ μ L 的质粒及阴性对照仅出现质控线, 而以 10^1 – 10^4 copies/ μ L 质粒为模板的扩增产物同时出现质控线和检测线。因此, MIRA 核酸试纸条法的最低检出限为 10 copies/ μ L (图 3)。

2.4 特异性分析结果

分别以肺炎支原体(MP)、其他支原体(MPE 和 MH)及另外 5 种呼吸道病原体(PAE、SP、HIB、MTB 和 AB)基因组 DNA 为模板进行 MIRA 扩增, 用核酸试纸条检测扩增产物。结果如图 4 所示, 只有肺炎支原体出现质控线和检测线, 而阴性对照及其他病原体的检测线均未显色, 说明该方法特异性好, 与其他病原体未出现交叉反应性。

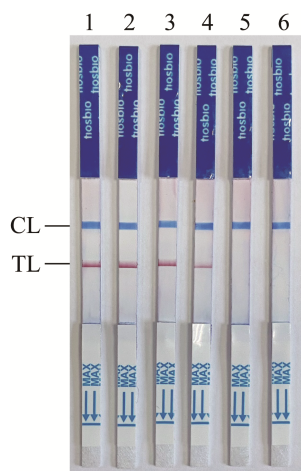


图 3 MIRA 核酸试纸条法敏感性分析 1: 10^4 copies/ μ L; 2: 10^3 copies/ μ L; 3: 10^2 copies/ μ L; 4: 10^1 copies/ μ L; 5: 10^0 copies/ μ L; 6: 阴性对照; CL: 质控线; TL: 检测线

Figure 3 Sensitivity analysis via MIRA nucleic acid test strip method. 1: 10^4 copies/ μ L; 2: 10^3 copies/ μ L; 3: 10^2 copies/ μ L; 4: 10^1 copies/ μ L; 5: 10^0 copies/ μ L; 6: Negative control; CL: Control line; TL: Test line.

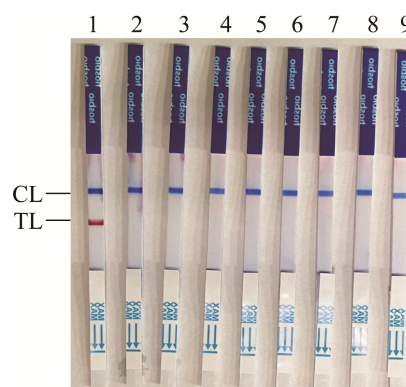


图 4 MIRA 核酸试纸条法特异性分析 1: MP; 2: MPE; 3: MH; 4: PAE; 5: SP; 6: HIB; 7: MTB; 8: AB; 9: 阴性对照; CL: 质控线; TL: 检测线

Figure 4 Specificity analysis via MIRA nucleic acid test strip method. 1: MP; 2: MPE; 3: MH; 4: PAE; 5: SP; 6: HIB; 7: MTB; 8: AB; 9: Negative control; CL: Control line; TL: Test line.

2.5 临床样本验证结果

利用已建立的 MIRA 核酸试纸条法对 35 份临床样本进行检测, 以实时荧光定量 PCR 法对临床样本的检测结果作为标准, 结果如图 5、表 2 所示, 26 例阳性样本(1–26)通过 MIRA 核酸试纸条法检测出 25 例阳性, 9 例阴性样本(27–35)则均检测为阴性。经统计, MIRA 核酸试纸条法的诊断特异度为 100.00% (9/9)、灵敏度为 96.15% (25/26)、阴性预测值为 90.00% (9/10)、阳性预测值为 100.00% (25/25)、Kappa 值为 0.93, 说明 MIRA 核酸试纸条法和实时荧光定量 PCR 法有很好的 consistency。

3 讨论与结论

肺炎支原体是导致儿童和青少年呼吸道感染的重要病原体, 长期以来, 由于其临床表现不特异而容易错过最佳治疗时期^[14], 因此亟须建立一种简单、快速、准确的肺炎支原体早期诊断方法。

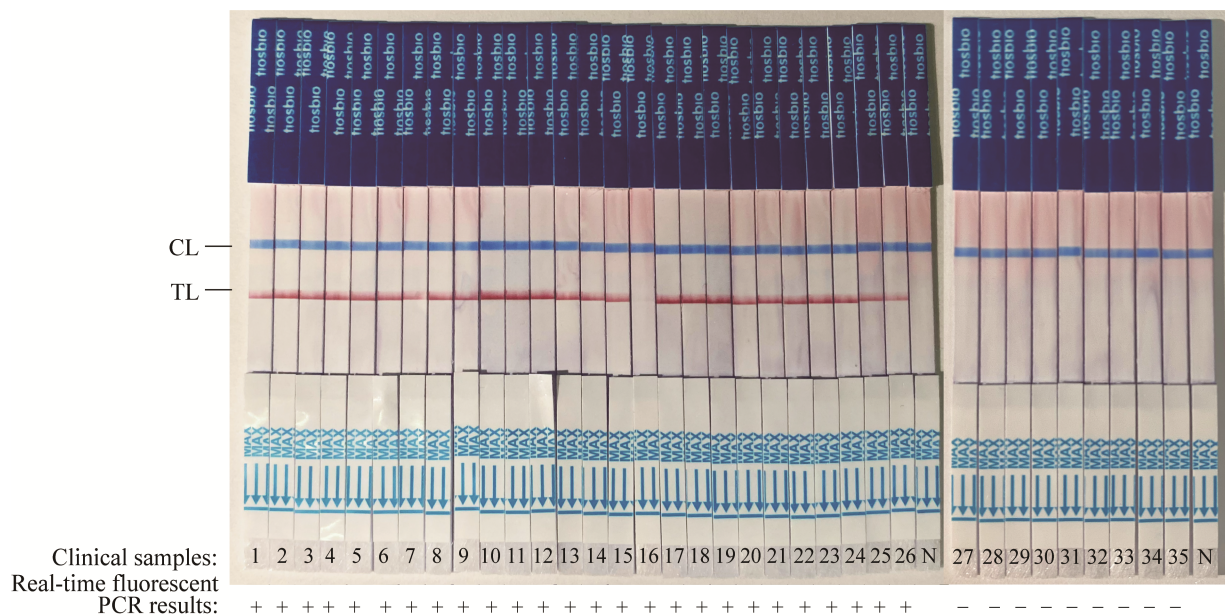


图 5 MIRA 核酸试纸条法临床样本验证 N：阴性对照；CL：质控线；TL：检测线
Figure 5 Clinical sample validation via MIRA nucleic acid test strip method. N: Negative control; CL: Control line; TL: Test line.

表 2 MIRA 核酸试纸条法与实时荧光 PCR 法的比较
Table 2 Comparison between MIRA nucleic acid test strip method and real-time fluorescent PCR method

		Real-time fluorescent PCR method		Total
		Positive	Negative	
MIRA nucleic acid test strip method	Positive	25	0	25
	Negative	1	9	10
Total		26	9	35

肺炎支原体实验中常扩增的目的基因有 P1 蛋白编码基因、CARDS 毒素基因、16S rRNA 基因和 ATP 酶基因等^[15]，其中 CARDS 毒素蛋白参与肺炎支原体的增殖和接合，并与呼吸道炎症反应有关^[16]。此外，有研究表明在肺炎支原体的检测中，CARDS 毒素基因比 P1 蛋白编码基因表现出更高的灵敏度^[17-18]。Petrone 等^[19]以 CARDS 毒素基因为靶基因对肺炎支原体进行检测，其研究结果也展现出高灵敏度与特异性。因此，在本研究中，针对 CARDS 毒素基因建立 MIRA 核酸试纸条检测方法、优化反应条件，并通过检测临床样本评估了其检测效能。结果

表明，整个扩增在 37 °C 条件下仅需 10 min，随后稀释扩增产物插入试纸条，5 min 内肉眼观察结果，在 Sun 等^[13]利用此方法检测乙肝病毒的研究基础上将总检测时间由 20 min 缩短至 15 min；与 RPA (20 min)、LAMP (30 min) 等现有肺炎支原体检测方法^[20-21]相比，本方法进一步缩短了检测时间，并且高效便携，不受实验室条件限制，适合在卫生资源缺乏地区实施。此外，通过对梯度稀释的质粒进行检测，发现其灵敏度可达到 10 copies/μL，相较于其他一些检测肺炎支原体的等温扩增技术，与重组酶介导链替换核酸扩增技术(recombinase aided

amplification, RAA)检测灵敏度($10\text{ copies}/\mu\text{L}$)^[22]相当,明显高于 LAMP^[21]和酶促重组等温扩增技术(enzymatic recombinaise amplification, ERA)技术($10^3\text{ copies}/\mu\text{L}$)^[23],有助于肺炎支原体的早期诊断;对肺炎支原体和其他两种支原体及另外 5 种呼吸道病原体进行 MIRA 核酸试纸条检测,除肺炎支原体外,其余病原体均与阴性对照结果一致,只有质控线显色,展示了该方法的高特异性;利用该方法对 35 份临床样本进行检测,灵敏度为 96.15%、特异度为 100.00%,其检测效能与实时荧光 PCR 法相当^[24],具有潜在的推广和应用前景。

胶体金测流层析技术是一种检测微量抗原的高灵敏度技术,其利用含有生物素的扩增产物与探针标记的 5-羧基荧光素(FAM)杂交,并与胶体金标记的抗体结合,短时间内可直观获得结果^[25]。本研究将该技术与 MIRA 相结合,利用简单的设备对肺炎支原体实现快速、准确的早期诊断。但本方法仍然存在一定的局限性,其荧光探针较昂贵,而且由于灵敏度较高,实验过程中易产生气溶胶,需将试剂配备与模板扩增分区进行,试纸条显色最好选择通风良好的区域或室外,以免造成假阳性。综上所述,以肺炎支原体 CARDS 毒素基因作为检测靶标建立的 MIRA 核酸试纸条检测方法,简单可行、特异性好、灵敏度高、15 min 内即可完成检测,而且不需要复杂的仪器设备和专业操作人员,易于在基层推广使用,对预防肺炎支原体传播和感染具有重要应用价值。

REFERENCES

- [1] HE J, LIU MH, YE ZF, TAN TP, LIU XH, YOU XX, ZENG YH, WU YM. Insights into the pathogenesis of *Mycoplasma pneumoniae* (review)[J]. Molecular Medicine Reports, 2016, 14(5): 4030-4036.
- [2] DENG ZL, HU HY, TANG D, LIANG JX, SU XL, JIANG TQ, HU XP, YING WQ, ZHEN DS, XIAO XL, HE J. Ultrasensitive, specific, and rapid detection of *Mycoplasma pneumoniae* using the ERA/CRISPR-Cas12a dual system[J]. Frontiers in Microbiology, 2022, 13: 811768.
- [3] 中华医学会儿科学分会呼吸学组,《中华实用儿科临床杂志》编辑委员会. 儿童肺炎支原体肺炎诊治专家共识(2015 年版)[J]. 中华实用儿科临床杂志, 2015, 30(17): 1304-1308. Respiratory Group of Chinese Pediatric Society, Chinese Medical Association, Editorial Board of Chinese Journal of Applied Clinical Pediatrics. Expert consensus on diagnosis and treatment of *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia in children (2015)[J]. Chinese Journal of Applied Clinical Pediatrics, 2015, 30(17): 1304-1308 (in Chinese).
- [4] 孙国磊, 王一民. 肺炎支原体感染诊断方法的研究进展[J]. 医学综述, 2021, 27(10): 1961-1965. SUN GL, WANG YM. Research progress of diagnosis methods of *Mycoplasma pneumoniae* infection[J]. Medical Recapitulate, 2021, 27(10): 1961-1965 (in Chinese).
- [5] LUO H, HE J, QIN L, CHEN Y, CHEN L, LI R, ZENG Y, ZHU C, YOU X, WU Y. *Mycoplasma pneumoniae* lipids license TLR-4 for activation of NLRP3 inflammasome and autophagy to evoke a proinflammatory response[J]. Clinical and Experimental Immunology, 2021, 203(1): 66-79.
- [6] WAITES KB, BALISH MF, ATKINSON TP. New insights into the pathogenesis and detection of *Mycoplasma pneumoniae* infections[J]. Future Microbiology, 2008, 3(6): 635-648.
- [7] LEAL Jr SM, TOTten AH, XIAO L, CRABB DM, RATLIFF A, duFFY LB, FOWLER KB, MIXON E, WINCHELL JM, DIAZ MH, BENITEZ AJ, WOLFF BJ, QIN X, TANG YW, GONZALEZ M, SELVARANGAN R, HONG T, BROOKS E, DALlaS S, ATKINSON TP, et al. Evaluation of commercial molecular diagnostic methods for detection and determination of macrolide resistance in *Mycoplasma pneumoniae*[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2020, 58(6): e00242-20.
- [8] LOENS K, IEVEN M. *Mycoplasma pneumoniae*: current knowledge on nucleic acid amplification techniques and serological diagnostics[J]. Frontiers in Microbiology, 2016, 7: 448.
- [9] NOTOMI T, OKAYAMA H, MASUBUCHI H, YONEKAWA T, WATANABE K, AMINO N, HASE T. Loop-mediated isothermal amplification of DNA[J]. Nucleic Acids Research, 2000, 28(12): e63.

- [10] WANG Y, WANG Y, MA AJ, LI DX, LUO LJ, LIU DX, JIN D, LIU K, YE CY. Rapid and sensitive isothermal detection of nucleic-acid sequence by multiple cross displacement amplification[J]. Scientific Reports, 2015, 5(1): 11902.
- [11] LIZARDI PM, HUANG XH, ZHU ZR, BRAY-WARD P, THOMAS DC, WARD DC. Mutation detection and single-molecule counting using isothermal rolling-circle amplification[J]. Nature Genetics, 1998, 19(3): 225-232.
- [12] PIEPENBURG O, WILLIAMS CH, STEMPLE DL, ARMES NA. DNA detection using recombination proteins[J]. PLoS Biology, 2006, 4(7): e204.
- [13] SUN ML, LAI HY, CHONG NY, LIU DF, ZHANG ZY, PANG B, YAO J. Simple and feasible detection of hepatitis B virus via combination of multienzyme isothermal rapid amplification and lateral flow dipstick strip[J]. Frontiers in Molecular Biosciences, 2021, 8: 763079.
- [14] 王良玉, 辛德莉. 肺炎支原体感染实验室诊断的研究进展[J]. 传染病信息, 2017, 30(1): 51-55.
WANG LY, XIN DL. Research progress on laboratory diagnostic techniques for *Mycoplasma pneumoniae* infection[J]. Infectious Disease Information, 2017, 30(1): 51-55 (in Chinese).
- [15] SCHMITT BH, SLOAN LM, PATEL R. Real-time PCR detection of *Mycoplasma pneumoniae* in respiratory specimens[J]. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 2013, 77(3): 202-205.
- [16] SU XL, YOU XX, LUO HD, LIANG KY, CHEN L, TIAN W, YE ZF, HE J. Community-acquired respiratory distress syndrome toxin: unique exotoxin for *M. pneumoniae*[J]. Frontiers in Microbiology, 2021, 12: 766591.
- [17] 司文, 周世冠, 刘宝山, 白爽, 王蒙, 王桂珍. 重组肺炎支原体 CARDS 毒素蛋白临床检测应用的初步研究[J]. 中国微生态学杂志, 2015, 27(11): 1262-1265.
SI W, ZHOU SG, LIU BS, BAI S, WANG M, WANG GZ. Clinical application of recombinant *Mycoplasma pneumoniae* CARDS toxin protein in detection of *Mycoplasma pneumoniae*: a preliminary study[J]. Chinese Journal of Microecology, 2015, 27(11): 1262-1265 (in Chinese).
- [18] PETERS J, SINGH H, BROOKS EG, DIAZ J, KANNAN TR, COALSON JJ, BASEMAN JG, CAGLE M, BASEMAN JB. Persistence of community-acquired respiratory distress syndrome toxin-producing *Mycoplasma pneumoniae* in refractory asthma[J]. Chest, 2011, 140(2): 401-407.
- [19] PETRONE BL, WOLFF BJ, delaNEY AA, DIAZ MH, WINCHELL JM. Isothermal detection of *Mycoplasma pneumoniae* directly from respiratory clinical specimens[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2015, 53(9): 2970-2976.
- [20] JIANG TT, WANG YC, JIAO WW, SONG YQ, ZHAO Q, WANG TY, BI J, SHEN AD. Recombinase polymerase amplification combined with real-time fluorescent probe for *Mycoplasma pneumoniae* detection[J]. Journal of Clinical Medicine, 2022, 11(7): 1780.
- [21] 吴亮, 夏雯, 阴晴, 戴晓玥, 邹治情, 王海波, 陈盛霞, 易承学. 建立实时荧光 LAMP 法检测肺炎支原体[J]. 临床检验杂志, 2020, 38(1): 7-10.
WU L, XIA W, YIN Q, DAI XY, ZOU ZQ, WANG HB, CHEN SX, YI CX. Establishment of real-time fluorescent LAMP assay for *Mycoplasma pneumoniae*[J]. Chinese Journal of Clinical Laboratory Science, 2020, 38(1): 7-10 (in Chinese).
- [22] NIE MZ, ZHANG RQ, ZHAO MC, TAN H, HU YX, FAN GH, LI JY, HE AN, TIAN FY, LI FY, ZHENG YH, SHEN XX, TIE YQ, MA XJ. Development of a duplex recombinase-aided amplification assay for direct detection of *Mycoplasma pneumoniae* and *Chlamydia trachomatis* in clinical samples[J]. Journal of Microbiological Methods, 2022, 198: 106504.
- [23] 胡海洋, 应婉琴, 何军, 吕芷贤, 谢小平, 邓仲良. 酶促重组等温扩增实时荧光法快速检测肺炎支原体方法的建立及应用[J]. 生物技术通报, 2022, 38(9): 264-270.
HU HY, YING WQ, HE J, LYU ZX, XIE XP, DENG ZL. Establishment and application of ERA real-time fluorescence method for rapid detection of *Mycoplasma pneumoniae*[J]. Biotechnology Bulletin, 2022, 38(9): 264-270 (in Chinese).
- [24] 郭东星, 胡文娟, 李丹, 李静宜, 栗绍刚, 吴赵永, 田秀君, 辛德莉. 荧光定量聚合酶链反应检测肺炎支原体方法的建立[J]. 传染病信息, 2016, 29(1): 52-56.
GUO DX, HU WJ, LI D, LI JY, LI SG, WU ZY, TIAN XJ, XIN DL. Development of real-time fluorescence quantitative PCR for the detection of *Mycoplasma pneumoniae*[J]. Infectious Disease Information, 2016, 29(1): 52-56 (in Chinese).
- [25] ZENG FW, WU ML, MA L, HAN ZX, SHI Y, ZHANG YP, LIU CJ, ZHANG SQ, CONG F, LIU SW. Rapid and sensitive real-time recombinase polymerase amplification for detection of Marek's disease virus[J]. Molecular and Cellular Probes, 2019, 48: 101468.