

Diagnóstico serológico de las infecciones por *Mycoplasma pneumoniae*

Lurdes Matas Andreu, Sonia Molinos Abós, Gema Fernández Rivas, Victoria González Soler y Vicente Ausina Ruiz

Servicio de Microbiología. Hospital Universitario Germans Trias i Pujol. Badalona. Barcelona. España.

***Mycoplasma pneumoniae* es un patógeno exclusivamente humano y de distribución universal. Es causa del 10-30% de las neumonías adquiridas en la comunidad que, por su forma de presentación clinicoradiológica, se denomina neumonía atípica primaria.**

La respuesta inmunitaria se manifiesta por la rápida producción de anticuerpos frente a antígenos proteicos y glucolipídicos del microorganismo. En la primoinfección se produce un incremento en forma de IgM durante la primera semana, seguido de IgG, y en las reinfecciones se genera una respuesta de IgG e IgA.

El diagnóstico microbiológico se ha basado en la demostración de anticuerpos específicos. La aplicación de técnicas de reacción en cadena de la polimerasa en muestras de esputo o exudado faríngeo/nasofaríngeo y el desarrollo de técnicas de reacción en cadena de la polimerasa múltiple, que permiten detectar *M. pneumoniae* y otros patógenos respiratorios, pueden ser de elevada utilidad en laboratorios de diagnóstico clínico. Las técnicas serológicas aplicables más usuales son la fijación del complemento, la inmunofluorescencia, la aglutinación de partículas y el enzoinmunoanálisis. Para realizar el diagnóstico se deben seleccionar las técnicas por criterios funcionales y, sobre todo, adecuado al grupo poblacional. La detección específica de IgM no se debe aplicar en infecciones en niños mayores ni en adultos. Tampoco el diagnóstico basado en la seroconversión o el incremento del título de IgG resulta práctico, pues es tardío y, además, es difícil obtener una segunda muestra de suero, dada la levedad del cuadro clínico.

Palabras clave: *Mycoplasma pneumoniae*. Diagnóstico de laboratorio. Serología.

Serologic diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* infections

***Mycoplasma pneumoniae* is a human pathogen with worldwide distribution. This microorganism is a common cause (10-30%) of community-acquired pneumonia, also called primary atypical pneumonia because of the spectrum of clinical and radiological findings.**

The immune response is mainly based on rapid antibody production against peptide and glycolipid antigens derived from this microorganism. During the primary infection, IgM levels generally rise within the first week, and are then followed by an IgG response. Titers of IgG and IgA increase in reinfections.

Microbiological diagnosis is based on specific antibody detection. Polymerase chain reaction (PCR) techniques performed on sputum or pharyngeal/nasopharyngeal exudates, as well as the development of multiplex PCR reactions allowing identification of *M. pneumoniae* and other respiratory pathogens, would be highly useful in routine diagnosis.

The most common serological techniques are complement fixation, immunofluorescence, particle agglutination, and enzyme immunoassay. Diagnosis should be performed by selecting the most appropriate test according to functional criteria and population groups. Specific detection of IgM antibodies should not be included in the differential diagnosis in adults and young people. Diagnostic criteria including seroconversion or rising IgG titers may not be clinically useful, because of the time delay and the difficulty of obtaining a second serum specimen for testing, given the mildness of the clinical symptoms.

Key words: *Mycoplasma pneumoniae*. Laboratory diagnosis. Serology.

Características generales de *Mycoplasma pneumoniae*

Mycoplasma pneumoniae es una bacteria de la familia *Mycoplasmataceae* de la clase *Mollicutes* caracterizada especialmente por carecer de pared celular. La clase *Mollicutes* ha evolucionado a partir de células tipo *Clostridium*, mediante sucesivas delecciones genéticas hasta las células actuales que presentan requerimientos nutricionales específicos y tienen un tamaño menor que la mayoría de las bacterias. De hecho, son las bacterias más pequeñas con capacidad de división autónoma y vida libre¹⁻². La falta de pared celular condiciona muchas de las características del microorganismo, como su polimorfismo, que no se tiñan con la tinción de Gram, su resistencia a los antibióticos betalactámicos y su elevada sensibilidad a las variaciones de pH, temperatura, tensión osmótica y detergentes². En la membrana celular se encuentran los principales determinantes antigénicos tanto proteínicos como glucolipídicos. La proteína P1 es una adhesina de especial im-

Correspondencia: Dra. L. Matas Andreu.
Servicio de Microbiología. Hospital Universitario Germans Trias i Pujol.
Ctra. del Canyet, s/n. Badalona. Barcelona. España.
Correo electrónico: lmatas.germanstrias@gencat.net

TABLA 1. Infecciones extrapulmonares causadas por *Mycoplasma pneumoniae*

Sistema nervioso central	Meningoencefalitis, neuritis óptica, parálisis de los nervios craneales, parálisis ascendente (síndrome Guillain-Barré), ataxia y psicosis
Piel	Erupción eritematosa papular o vesicular Síndrome de Stevens-Johnson
Articular	Mialgias, artralgias y poliartropatías Artritis séptica (especialmente en caso de hipogammaglobulinemia)
Cardíaca	Pericarditis, miocarditis y derrame pericárdico
Sistema hematopoyético	Anemia hemolítica asociada a aglutininas frías Púrpura trombótica trombocitopénica
Renal	Glomerulonefritis, nefritis tubulointersticial, nefropatía IgA
Gastrointestinal	Vómitos, diarreas y hepatitis colestásica. Pancreatitis
Otros	Otitis externa, otitis media y miringitis Rabdomiólisis Conjuntivitis, uveítis anterior, retinitis y neuritis óptica Abscesos tuboováricos

portancia en la patogenia del microorganismo y también es la diana de los principales anticuerpos que produce la respuesta inmunitaria del hospedador³.

Mycoplasma no puede observarse en el microscopio óptico. Para su cultivo en el laboratorio, es muy exigente, y requiere un medio rico en esteroides y con precursores de aminoácidos y nucleótidos preformados, lo que se consigue por la adición de suero y extracto de levadura³. Cuando crece, no enturbia el medio líquido y para observar las colonias que forma en medio sólido hace falta el microscopio¹.

M. pneumoniae es un patógeno primario de las mucosas, mientras que otras especies de *Mycoplasma* no patógenas colonizan la superficie de la mucosa respiratoria. Se transmite de persona a persona por vía aérea, pero debido a su gran sensibilidad a los cambios de temperatura y humedad, para ello necesita un contacto próximo y continuado. Produce infecciones del tracto respiratorio, generalmente en forma de neumonía de la comunidad o infecciones de las vías respiratorias altas².

Infecciones producidas por *M. pneumoniae*

Epidemiología

M. pneumoniae es un patógeno exclusivamente humano y de distribución universal. Causa el 10-30% de las neumonías adquiridas en la comunidad⁴. En algunos estudios supone una frecuencia de 2/1.000 personas-año⁵, y la tasa varía en función de la edad; así, en niños de 5 a 9 años, se sitúa en 4/1.000/año⁵⁻⁶. Las infecciones se producen sin variaciones estacionales importantes, pero suelen presentar ciclos epidémicos cada 3-7 años que se rela-

cionan con el otoño y la primavera. También produce infecciones de las vías respiratorias altas, y es el segundo agente causal, después del virus influenza A, cuando se determina la etiología de estos procesos por técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR)². En la actualidad, se sigue considerando que *M. pneumoniae* es un patógeno primario. Su detección debe valorarse cuidadosamente, puesto que puede persistir en el tracto respiratorio durante un período variable, después de una infección clínicamente resuelta por el tratamiento antibiótico^{2,6}.

Cuadro clínico

M. pneumoniae produce infecciones del aparato respiratorio, principalmente en forma de neumonía que, por sus peculiares características de presentación clinicoradiológica, se suele denominar neumonía atípica primaria⁷. Tras un período de incubación de 2-3 semanas⁶, los síntomas se presentan de manera gradual en varios días, y consisten en fiebre, tos no productiva, cefalea y mialgias. A menudo se acompaña de faringitis, rinitis, otitis y traqueobronquitis^{2,6}.

La exploración física se caracteriza por la parquedad de síntomas y se auscultan ligeros subcrepitantes, aunque los pacientes pueden presentar crepitantes francos, roncus y sibilancias⁷. En la radiografía de tórax se observan infiltrados reticulonodulillares parahiliares o peribronquiales que pueden ser uni o bilaterales². Puede observarse la presencia de un pequeño derrame pleural en uno de cada 4 o 5 pacientes⁷. En la analítica complementaria suele encontrarse una discreta leucocitosis en un 30% de los pacientes^{2,7}.

Los niños con alteraciones inmunológicas, como la anemia de células falciformes, con anesplenía funcional o con síndrome de Down pueden desarrollar una infección respiratoria grave y de evolución fulminante⁷. La hipogammaglobulinemia es también un factor de riesgo para las infecciones del tracto respiratorio y de sus complicaciones articulares².

Las infecciones extrapulmonares ocurren con mucha menor frecuencia pero pueden cursar con mayor gravedad⁴. Generalmente acompañan a un cuadro respiratorio, pero pueden aparecer en ausencia absoluta de síntomas de esta localización. Se considera que la afección del sistema nervioso central se debe con más frecuencia a una reacción inmunológica sin verdadera presencia del microorganismo⁴. En la tabla 1 se relacionan las principales manifestaciones y complicaciones extrapulmonares.

Patogenia e inmunidad

M. pneumoniae es un patógeno extracelular cuya supervivencia depende de su capacidad de adherencia a las células del epitelio respiratorio. Para ello, ha desarrollado un organelo consistente en una estructura en forma de punta que acumula un conjunto de proteínas y adhesinas, especialmente la denominada P1, una proteína de 170 kDa que regula la interacción entre el micoplasma y las células del epitelio respiratorio. La pérdida de esta proteína P1 comporta la pérdida de adhesividad y, consecuentemente, de su capacidad patógena²⁻³.

M. pneumoniae no libera toxinas y las lesiones que produce se relacionan con el peróxido de hidrógeno que genera durante su actividad metabólica. Actúa juntamente con moléculas endógenas de las células del tracto respi-

ratorio. Los principales efectos citopáticos que se observan consisten en la pérdida de la actividad de los cilios y la destrucción final del conjunto de la capa epitelial².

La respuesta inflamatoria local consiste en la producción de un infiltrado inflamatorio peribronquial y perivascular formado, principalmente, por linfocitos y células plasmáticas. La respuesta inmunitaria se manifiesta por la rápida producción de anticuerpos frente a los antígenos proteínicos y glucolípidicos del microorganismo^{2-3,8}. En la primoinfección, la dinámica de producción de anticuerpos se inicia con un incremento de IgM que se acompaña de IgG al cabo de 2 semanas. También se produce IgA de manera más temprana y efímera que IgM. En las reinfecciones se genera una respuesta por IgG e IgA que, tras opsonizar el micoplasma, facilita su fagocitosis y su posterior lisis con ayuda del complemento⁸. Se ha sugerido que la falta de respuesta inmunológica protectora contra la reinfección se debe a que los epítomos inmunodominantes son diferentes de los dominios que condicionan la adherencia².

Diagnóstico

En la neumonía producida por *M. pneumoniae* se detecta en la analítica general una moderada leucocitosis y pueden demostrarse crioaglutininas entre 1 y 2 semanas después de la infección. La presencia de crioaglutininas es inespecífica, puesto que únicamente aparece en un 50% de los pacientes con neumonía por *M. pneumoniae* y porque también se produce en otras infecciones bacterianas y virales². Algunos autores valoran el hecho de que entre el 72 y el 92% de los pacientes con neumonía y crioaglutininas positivas desarrollen una respuesta específica para *M. pneumoniae*⁶. La presentación radiológica de la neumonía atípica primaria es muy variable. Se observa afección bilateral en tan sólo un 20% de los pacientes⁷.

El diagnóstico microbiológico en la práctica habitual se ha basado, generalmente, en la demostración de anticuerpos específicos. Varios factores contribuyen a esta situación. En primer lugar, las técnicas de cultivo son caras, laboriosas, lentas (entre 4 días y varias semanas)⁸, relativamente poco sensibles (10^5 unidades formadoras de colonias [UFC]/ml)⁴ y, a menudo, no son abordables para la mayoría de los laboratorios de diagnóstico clínico. En los cultivos de muestras respiratorias, bien sean aspirados nasofaríngeos, exudados faríngeos o esputos, la presencia de otras especies de *Mycoplasma* comensales obligan a realizar pruebas de identificación para *M. pneumoniae*. Las técnicas rápidas para detección de antígeno tampoco han tenido gran aceptación debido a su baja sensibilidad y especificidad².

La aplicación de técnicas de PCR, bien por técnicas convencionales, bien en sistemas de PCR en tiempo real (RT-PCR), ha cambiado algunos de los conceptos epidemiológicos y clínicos que se tenían acerca de *Mycoplasma*. Las principales ventajas de estas técnicas radican en su sensibilidad (en función del método se pueden detectar entre 10 y 100 bacterias)⁴, su rapidez, en la posibilidad de obtener resultados en un día, así como su posible aplicación sobre muestras con elevado inóculo de bacterias acompañantes, en las cuales es muy difícil aislar *Mycoplasma* por cultivo⁹. Los mejores rendimientos de la PCR se obtienen en muestras de esputo, pero en general se realizan en exudado faríngeo, debido a la escasa productividad de la tos que acompaña a la neumonía de esta etiología. Aunque

algunos autores prefieren el exudado faríngeo al aspirado nasofaríngeo por la mayor frecuencia de inhibiciones de la PCR en estas muestras, no existen datos concluyentes que demuestren el superior rendimiento de ninguna muestra en concreto¹⁰. El estudio combinado de diferentes muestras, como siempre ocurre, permite un mayor número de detecciones. La persistencia de micoplasma en las muestras respiratorias ha sugerido la necesidad de cuantificar el número de copias/ml que permita diferenciar la infección clínica de la colonización residual. Actualmente, el desarrollo de técnicas de PCR múltiple, que permite detectar *Mycoplasma* junto con otros patógenos respiratorios, como *Chlamydia pneumoniae*, puede ser de utilidad en la práctica habitual de los laboratorios de diagnóstico clínico¹¹.

En la actualidad, la serología continúa siendo el método diagnóstico más ampliamente aplicado para el diagnóstico de las infecciones por *M. pneumoniae*. Las particulares consideraciones que merece este apartado hacen que lo individualicemos del resto de los métodos diagnósticos.

Diagnóstico serológico

Técnicas serológicas disponibles

Las primeras determinaciones de respuesta inmunológica específica frente a *M. pneumoniae* se realizaron por técnica de fijación del complemento (FC), utilizando como antígenos bien un extracto lipídico de *M. pneumoniae*, bien una suspensión de lisado bacteriano¹. La complejidad antigénica de este microorganismo, en comparación con los virus, condiciona un mayor número de inespecificidades^{1,2}. También se observan reacciones cruzadas con los antígenos glucolípidicos de otros *Mycoplasma*. La técnica de FC determina principalmente IgM y, en menor medida, IgG. La demostración de un incremento de 4 veces el título entre una muestra de la fase aguda y una de la fase de convalecencia, o bien títulos superiores o iguales a 1/32 ofrece una sensibilidad del 90% y una especificidad del 88%^{1,4}. La complejidad y las múltiples variables a controlar con esta técnica han contribuido a que la mayoría de los laboratorios busquen otras alternativas de diagnóstico serológico.

Las técnicas de inmunofluorescencia (IF) son relativamente fáciles de realizar y permiten un resultado cuantitativo. Sus principales limitaciones son la subjetividad de la interpretación de los resultados obtenidos y la reactividad cruzada con el factor reumatoide.

Las técnicas de aglutinación pasiva utilizan un soporte como el látex o la gelatina para una mezcla de antígenos específicos de *M. pneumoniae*. Detectan conjuntamente IgG e IgM, y permiten también su cuantificación⁴. La aglutinación de partículas de gelatina es de muy fácil realización y considerable especificidad, si bien para conseguir una máxima sensibilidad se recomienda realizar la determinación en 2 muestras seriadas^{6,12}. En un estudio comparativo con técnicas de PCR, Templeton et al⁹ observaron que una muestra de suero de la fase inicial permite detectar el 50% de las infecciones, y que la sensibilidad alcanza el 66% si se dispone de una muestra de la fase de convalecencia, siempre que se valoren aglutinaciones a títulos iguales o superiores a 1/320.

Las técnicas de enzoinmunoanálisis (EIA) se han impuesto en la mayoría de los laboratorios clínicos. Para la preparación de los reactivos necesarios se utiliza una gran diversidad de preparados antigénicos (proteínas purificadas, péptidos sintéticos, mezcla de antígenos crudos, glucolípidos purificados), que permiten la detección de IgG o de IgM y en diferentes presentaciones (técnicas de captura- μ , microplacas, en soporte de membrana)¹. Las pruebas de EIA parecen muy sensibles para la detección de anticuerpos específicos, presentando como siempre la ventaja de ser automatizables y de necesitar un volumen de suero reducido⁸. Las presentaciones en soporte de membrana permiten determinaciones cualitativas de IgM, generalmente en presentaciones unitarias de fácil realización y que permiten obtener resultados de manera muy rápida¹². También existen presentaciones en soporte de membrana que permiten detectar tanto IgG como IgM y que han demostrado tener una sensibilidad y una especificidad buenas. En cualquier caso, para alcanzar una buena sensibilidad diagnóstica con las técnicas de EIA, sigue siendo necesario disponer de una muestra de suero del período de convalecencia^{8,13}.

La detección de IgA se considera el mejor indicador de infección aguda; sin embargo, Csángó et al¹⁴, utilizando reactivos comercializados, encuentran un 68,5% de positividad para esta inmunoglobulina en donantes de sangre.

Principales condicionantes de la respuesta inmunológica a *M. pneumoniae*

Una vez revisadas las técnicas serológicas disponibles, y para evaluar los resultados que se obtienen en función de la técnica aplicada, es conveniente tener presente la dinámica de producción de anticuerpos frente a esta bacteria. La respuesta inmunológica en la primera infección por *M. pneumoniae* se produce rápidamente, y alcanza la máxima concentración de anticuerpos en unas 3-6 semanas, para seguidamente disminuir de forma gradual durante meses, aunque pueden persistir hasta 4 años⁴. Las IgM específicas anti-*Mycoplasma* aparecen durante la primera semana de la infección y preceden en unas 2 semanas a la IgG. A menudo los anticuerpos están presentes en el momento de la sintomatología clínica debido al largo período de incubación².

En la reinfección no hay respuesta de IgM sino una rápida elevación de IgG que se acompaña de producción de IgA. Además, se ha observado que, si se produce IgM, puede persistir durante meses o años, de modo que, en el adulto joven, la detección de IgM puede no responder a una infección reciente⁶. Así, en la primoinfección las técnicas de detección de IgM tienen una sensibilidad y una especificidad buenas, mientras que, en las reinfecciones, la falta de detección de IgM específica no permite descartar una infección aguda por *M. pneumoniae*⁴. Otros factores que también se deben tener en cuenta para el diagnóstico etiológico de estas infecciones por serología es que, al tratarse, por lo general, de una enfermedad no grave, incluso se ha denominado la neumonía del paseante (*walking pneumonia*), no requiere ingreso hospitalario de la mayoría de los enfermos y su recuperación, relativamente rápida, dificulta el cumplimiento de recogida de una segunda muestra, especialmente en niños, pero también en adultos.

Los patrones epidemiológicos clásicos deben replantearse debido al cambio de costumbres y a las posibilidades diagnósticas de las nuevas técnicas de PCR. En la actualidad, se sabe que la primoinfección se da cada vez con más frecuencia en niños de 3-4 años o incluso menores, cuando antes se creía muy rara por debajo de los 5. También se observa, con una frecuencia mayor de la esperada, en personas adultas o de edad avanzada⁵. También contribuye al problema diagnóstico de esta entidad el hecho de que en el adulto se produzcan con frecuencia infecciones asintomáticas o muy leves, lo que tal vez pueda relacionarse con un cierto grado de inmunidad debida a infecciones previas.

Con todas las premisas anteriores, en el momento de plantear el diagnóstico de las infecciones por *M. pneumoniae* en el laboratorio se deben seleccionar las técnicas no sólo por criterios funcionales (posibilidad de automatización, respuesta minuto, etc.) sino también adecuándolas al grupo poblacional. Las técnicas de EIA para detección específica de IgM no deberían aplicarse en las infecciones de los niños mayores ni de los adultos, dado que las reinfecciones no condicionan una buena respuesta de IgM. Además, los reactivos comercializados deben valorarse cuidadosamente, sobre todo por lo que respecta a su especificidad^{8,13}. Tampoco resulta práctico plantear el diagnóstico basándose en la demostración de IgG, con seroconversión o incremento significativo del título, puesto que ello nos obliga a un diagnóstico muy tardío que, en una enfermedad generalmente leve, es de muy difícil cumplimiento.

Con cierto pragmatismo, y con criterios de oficio, parecen más útiles las técnicas que detectan tanto IgG como IgM, puesto que permiten el diagnóstico de la primera infección ya en el momento de la consulta, especialmente en los niños pequeños. Un porcentaje considerable de casos quedará diagnosticado ya con la primera muestra de suero, pero además la dinámica de producción de anticuerpos a menudo permite confirmar un diagnóstico dudoso simplemente repitiendo la determinación 2 o 3 días después. Únicamente en casos seleccionados será necesario esperar 2-3 semanas para observar una seroconversión o un incremento significativo del título de anticuerpos.

Probablemente, la proliferación de sistemas de PCR a tiempo real y de PCR múltiple permitirá, en un futuro ya muy próximo, el diagnóstico etiológico de las neumonías. El diagnóstico serológico persistirá únicamente en función de las diferencias en el coste, tanto de reactivos como de utillaje.

Bibliografía

1. Waites KB, Bébear CM, Robertson JA, Talkington DF, Kenny GE. Cumitech 34. Laboratory diagnosis of mycoplasmatal infections. Washington: ASM Press; 2001.
2. Waites KB, Talkington DF. *Mycoplasma pneumoniae* and its role as a human pathogen. Clin Microbiol Rev. 2004;17:697-728.
3. Razin S, Yoge D, Naot Y. Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. Microbiol Mol Biol Rev. 1998;62:1094-156.
4. Daxboeck F, Krause R, Wenisch C. Laboratory diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* infection. Clin Microbiol Infect. 2003;9:263-373.
5. Daxboeck F, Kircher K, Krause R, Heinzl H, Wenisch C, Stanek G. Effect of age on antibody titer to *Mycoplasma pneumoniae*. Scand J Infect Dis. 2002; 34:577-9.
6. Hammerschlag MR. *Mycoplasma pneumoniae* infections. Curr Opin Infect Dis. 2001;14:181-6.

7. Ausina V, Rodrigo C. Infecciones causadas por micoplasmas. En: Rozman C, editor. *Farreras-Rozman medicina interna*. 15ª ed. Madrid: Elsevier España; 2004. p. 2362-65.
8. Talkington DF, Shott S, Fallon MT, Schwartz SB, Thacker WL. Analysis of eight commercial enzyme immunoassay tests for detection of antibodies to *Mycoplasma pneumoniae* in human serum. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2004; 11:862-7.
9. Templeton KE, Scheltinga SA, Graffelman AW, Van Schie JM, Crielaard JW, Sillekens P, et al. Comparison and evaluation of real-time PCR, real-time nucleic acid sequence-based amplification, conventional PCR, and serology for diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae*. *J Clin Microbiol*. 2003; 41:4366-71.
10. Michelow IC, Olsen K, Lozano J, Duffy LB, McCracken GH, Hardy RD. Diagnostic utility and clinical significance of naso- and oropharyngeal samples used in a PCR assay to diagnose *Mycoplasma pneumoniae* infection in children with community-acquired pneumonia. *J Clin Microbiol*. 2004;42: 3339-41.
11. Stralin K, Tornqvist E, Kaltoft MS, Olcen P, Holmberg H. Etiologic diagnosis of adult bacterial pneumonia by culture and PCR applied to respiratory tract samples. *J Clin Microbiol*. 2006;44:643-5.
12. Matas L, Domínguez J, De Ory N, García N, Gali P, Cardona PJ, et al. Evaluation of Meridian ImmunoCard Mycoplasma test for the detection of *Mycoplasma pneumoniae*. *Sand J Infect Dis*. 1998;30:289-93.
13. Beersma MF, Dirven K, Van Dam AP, Templeton KE, Class EC, 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 "gold standard". *J Clin Microbiol*. 2005;43:2277-85.
14. Csángó PA, Pedersen JE, Hess RD. Comparison of four *Mycoplasma pneumoniae* IgM-, IgG- and IgA- specific enzyme immunoassays in blood donors and patients. *Clin Microbiol Infect*. 2004;10:1094-8.