

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.19.041

· 专论与综述 ·

肺炎支原体主要黏附蛋白的研究进展*

王丽琼 薛冠华 李少丽 闫超 孙红妹[△]

(首都儿科研究所细菌研究室 北京 100020)

摘要:肺炎支原体(*Mycoplasma pneumoniae*, Mp)可引起呼吸道感染,是儿童社区获得性肺炎的常见致病菌,并且可导致多系统并发症。Mp 尖端的黏附蛋白复合体与肺纤毛上皮细胞的黏附过程是其主要致病机制。P1、P30、P116 等蛋白作为黏附复合体的主要成分,在感染过程中起到了关键作用。在缺失这些蛋白的突变株中,细胞结构异常,黏附能力、运动速度、致病性均表现出不同程度的下降。由于 Mp 生长缓慢,对营养要求苛刻,常规微生物分离培养不适用于临床快速诊断,目前亚洲地区 Mp 耐药率居高不下, Mp 感染后又无特异性临床症状,使得临床工作中 Mp 感染的诊治常被延误。重组蛋白表达技术的出现,使得 Mp 主要蛋白可以应用在 Mp 诊断试剂盒和疫苗研发中,本文针对 Mp 主要黏附蛋白的基因结构、致病机制及其应用方面的最新研究进展进行综述。

关键词:肺炎支原体;黏附蛋白;血清学诊断;疫苗

中图分类号:R375.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2014)19-3757-04

Research Progress of the Major Adhesin Proteins
of *Mycoplasma Pneumoniae**WANG Li-qiong, XUE Guan-hua, LI Shao-li, YAN Chao, SUN Hong-mei[△]

(Dept. of Bacteriology, Capital Institute of Pediatrics, Beijing, 100020, China)

ABSTRACT: *Mycoplasma pneumoniae* (*M. pneumoniae*) is an important human pathogen that causes primary atypical pneumonia, tracheobronchitis, pharyngitis, asthma and autoimmune diseases. Cytaadherence of *M. pneumoniae* to respiratory epithelium is essential to tissue colonization and subsequent pathogenesis. It is a complex multifactorial process requiring the specialized tip organelle that possesses a group of adhesin proteins such as P1, P30, P116 and HMW1-3, et al. The adhesin proteins deficient mutants show lower gliding velocity, reduced cytaadherence, and decreased steady-state levels of tip organelle. The standard methods for the diagnosis of *M. pneumoniae* are culture, serological tests, and PCR. As a fastidious organism, *M. pneumoniae* can be difficult to isolate. Considerable cross-reactivity exists between the whole cell antigens used in the commercial serological testing assays. Identification of specific protein antigens is crucial to eliminate the risk of cross-reactions among different related organisms. The adhesin proteins P1 and P30 are also testified to be strongly immunogenic in humans and experimental animals infected with *M. pneumoniae*. Expression of adhesin proteins in heterologous expression systems provides an opportunity to explore the roles of these proteins in pathogenicity and contributes to develop diagnostic reagents and vaccines. In this review we discuss the applications of various adhesin proteins of *M. pneumoniae*.

Key words: *Mycoplasma pneumoniae*; Adhesion protein; Serodiagnosis; Vaccine

Chinese Library Classification: R375.2 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)19-3757-04

前言

肺炎支原体(*Mycoplasma pneumoniae*, Mp)通过飞沫传播,侵入机体后可引发呼吸系统感染,包括原发性非典型肺炎、支气管炎、咽炎和喉炎等,且可引起支原体肺炎、心肌炎、关节炎、皮肤损害等多系统并发症。肺炎支原体肺炎占社区获得性肺炎的 5%~40%,且主要引起青少年感染^[1]。支原体(*Mycoplasma*)

是一类介于病毒和细菌之间,能在人工培养基中自行繁殖的最小原核生物。Mp 基因组仅有 816 kb,为大肠埃希菌的 1/5~1/6,其代谢能力差,不具备细胞壁,亦不产生内毒素, Mp 与肺上皮纤毛细胞的密切接触对于局部组织的损伤和细胞毒作用至关重要,是其致病的关键。由 P1 蛋白、P30 蛋白、P116 蛋白、HMW1~3、P65 蛋白等构成的黏附蛋白复合体是决定 Mp 黏附能力的细胞器。本文就 Mp 中的主要黏附蛋白研究现状作一综

* 基金项目:北京市自然科学基金项目(7112019)

作者简介:王丽琼(1990-),女,硕士研究生,主要研究方向:病原微生物与免疫, E-mail: wangliqiong@126.com

△ 通讯作者:孙红妹, E-mail: s.hongmei@263.net, 电话: 010-8569 5570

(收稿日期: 2014-02-18 接受日期: 2014-03-12)

述。

1 黏附蛋白的基因结构

Mp 基因组全长 816 394 bp, G+C 含量为 40 %, 有 688 个开放阅读框(open reading frame, ORF)。全序列分析表明 p1 基因由 4 884 bp 组成, 位于 180 858 ~ 185 741 位, G+C 含量为 53.5 %, 该基因中包含 21 个编码色氨酸的 UGA 密码子, 而 U-GA 在大肠埃希菌中为终止密码子, 使得 P1 蛋白在大肠埃希氏菌中的重组表达受限。P1 蛋白由 1 627 个氨基酸构成, 其中包括大量羟基氨基酸, 但是不含有半胱氨酸, 因此 P1 蛋白不能通过胞内外的二硫键稳定构象。Chaudhry R 等^[2] 重组表达了 P1-C1 和 P1-N1 两个片段, 结果发现只有 C1 端具有免疫原性, 可能与 C 端富含脯氨酸序列有关。

p30 基因由 825 个碱基组成, 位于 Mp 基因组第 552 694 ~ 553 518 位, G+C 含量为 54.4 %, p30 基因中第 46-48 位为 U-GA。P30 蛋白是一种膜结合蛋白, 分子量为 29.743 kDa, 由 275 个氨基酸构成, N 端位于胞内而 C 端暴露在细胞表面, 可分为 4 个结构域, 前导肽区(signal peptide, SP)、胞内段(intracellular, 结构域 I)、跨膜区(transmembrane domain, TM)及胞外区(extracellular, 包括结构域 II 和结构域 III)。其中, 结构域 II 与生殖支原体(*Mycoplasma genitalium*)和鸡毒支原体(*Mycoplasma gallisepticum*)有很高的同源性。P30 蛋白与生殖支原体 P32 蛋白氨基酸序列一致性约为 43 %。结构域 III 有三个富含脯氨酸的重复区, 分别为 Pro-Gly-Met-Ala-Pro-Arg 重复 7 次, Pro-Gly-Met-Pro-Pro-His 和 Pro-Gly-Phe-Pro-Pro-Gln 各重复 3 次。这些重复结构与肺炎支原体 P1 蛋白 C 端结构同源性 > 40 %, 且 P1-C 蛋白已被证实有免疫原性。两者在空间结构上位置相近, 在致病方面表现出相似的功能和协同作用^[3]。另外, P116 蛋白中的某些片段与 P1-C 蛋白也非常相似, 亦表现出免疫原性^[4]。P30 蛋白中部分氨基酸序列与人体某些蛋白相似度很高, 可能是引起自身免疫反应的原因。

2 黏附蛋白的致病机制

在 Mp 感染机制中, 黏附是其引发病理反应的主要因素, 失去黏附能力的突变株无致病性。Mp 通过黏附蛋白黏附到相关细胞表面, 激发某种信号通路从而引起特异性细胞骨架蛋白重排, 使得 Mp 穿过宿主细胞膜并在胞质中大量复制, 最终导致宿主细胞受损死亡^[5,6]。但黏附作用与免疫反应之间的具体作用机制尚不清楚, 目前认为与细胞分裂、细胞形态学变化、黏附作用、滑行运动等有关。Shimizu T 等^[7]研究表明野生株可刺激 THP-1 细胞产生炎症细胞因子 IL-1 β 和 TNF- α , 而失去黏附能力的突变株无法诱导细胞因子的产生, 证明黏附能力是激活 Mp 感染后免疫反应的必要条件。

黏附蛋白复合体是由一端的细胞膜向外延伸形成特殊的顶端结构, 属于细胞骨架的一部分。Mp 黏附功能正常执行需要构成黏附复合体的多种蛋白在结构上和功能上的协同作用。Hahn TW 等^[8]研究表明突变株 M6 中 hmw1 基因的移码突变导致 HMW1 蛋白和部分 P30 蛋白缺失, M6 失去黏附能力, 同时 P1 和 P30 分布也受到影响, 散布在细胞表面, 无法聚集形成黏附复合体; 将含有 p30 基因的转座子导入 M6 中, P30 蛋白结构

恢复, 但仍然不具备黏附能力, 证明 HMW1 对黏附功能必不可少。Hasselbring BM 等^[9]发现 P65 蛋白与 P30 蛋白在黏附复合体形成的过程中几乎同时移动, 在由于转座子插入而使 P65 蛋白受损的突变株中, P30 的稳定性下降。将野生株的 p65 等位基因转座融合入突变株后, P65 水平和 P30 的稳定性都得到了恢复。

黏附蛋白在 Mp 细胞正常发育过程中必不可少。突变株 II-3 由于开放阅读框 MpN453 的移码突变导致 p30 基因的缺失, 该突变株失去运动能力、黏附能力、细胞变为卵圆形或分枝状, 聚集成团漂浮在培养基中, 黏附复合体无法正常形成且 P65 蛋白含量减少^[10]。Relich RF 等^[11]用生殖支原体的 p32 基因导入突变株 II-3 后, Mp 在黏附能力、运动速度上基本恢复野生株水平。其原因可能是 P30 蛋白和 P32 蛋白在结构上高度相似, 且两者在 C 端均有富含脯氨酸的重复区域。在 II-3 的基础上再进行一次点突变而得到 II-3R, 有完整的开放阅读框但是结构域 III 中的 17 个氨基酸缺失, 导致其黏附能力为野生株的 60 %, 运动能力仅仅为野生株的 5%^[12]。突变株 II-7 失去了 MpN453 的 3' 端 144 bp, 其形态结构无明显改变但滑行速率和频率均明显下降^[13], 证实 C 端重复区域对于黏附功能必不可少。

对黏附蛋白具体结构域功能的研究也有助于进一步理解 Mp 的致病机制。Chang HY 等^[14]构建了缺失 P30 不同结构域的多个 Mp 转化株以比对 P30 各个片段的功能, 结果显示结构域 II 的缺失、结构域 III 的受损以及 TM 区特定部位氨基酸的替换严重影响了蛋白的稳定性和功能。细胞质内结构域 I 的缺失虽然不影响 P30 蛋白的稳定性、定位能力及 P65 的稳定性, 但其黏附能力仍然很差。这些缺失还减弱了信号肽的形成过程^[15]。信号肽的功能可能是将 P30 蛋白连接到黏附复合体或直接影响胞外结构的折叠而形成功能构象。Chang HY 等^[16]在研究 P30 蛋白翻译后修饰过程中发现, 信号肽的切割位点可能在 52-53 氨基酸位点之间。在翻译后修饰过程缺陷的突变株中, 滑行速率和黏附能力均下降, 提示修饰过程对形成有功能的成熟 P30 蛋白是必要的。推测这种修饰引发了胞外结构域的构象改变或是使得胞内结构域中某一结合位点暴露从而使蛋白与受体结合。

黏附蛋白在细胞运动中作用尚未明确, 推测 P30 可能类似于运动支原体(*Mycoplasma mobile*)中的 Gli521。运动支原体中 Gli349 蛋白根据不同底物改变构象而使支原体产生运动, 而这些运动根本上由 ATP 酶驱动, Gli521 作为黏附蛋白与 ATP 酶之间的桥梁发挥作用^[17]。另一方面, 相对于单个分子的活力, P30 的分子数量有可能是影响细胞运动速度更重要的因素^[18]。

3 黏附蛋白在 Mp 诊断研究中的应用

Mp 感染的临床症状常常类似于流感等, 没有特异性, 临床诊断困难。实验室诊断方法有分离培养法、血清学检测、PCR 病原学检测。但是 Mp 生长缓慢、对营养要求苛刻, 使得分离培养耗时长, 培养阳性率低, 不利于临床应用; PCR 方法理论上具有高敏感性, 但在实际工作中, 临床标本中的非特异性物质及提取 DNA 过程中的残留物抑制 PCR 反应, 会影响 PCR 对 Mp 的检出率, 而且 PCR 对实验技术要求高, 不利于在临床工作中

的推广;血清学诊断方法包括补体结合实验(complement fixation tests, CF)、颗粒凝集实验(particle agglutination tests, PA)、间接血凝实验(indirect hemagglutination tests, IHA)和酶联免疫吸附实验(enzyme-linked immunoabsorbent assays, ELISA)等,由于 Mp 细胞膜上的抗原与其它微生物及机体组织存在非特异性交叉反应,以 Mp 全菌体抗原为基础的血清学检测方法特异性有待提高。提高血清学诊断方法的特异性是 Mp 诊断技术中的重要研究方向,重组蛋白技术的出现使得同时提高敏感性和特异性成为可能,P1、P30、P116 等黏附蛋白作为主要的毒力因子成为主要候选抗原。

Montagnani F 等^[19]尝试用重组 P1、P30、MpN456 产物来替代可溶性 Mp 全菌体抗原在血清学检测中的作用。1999 年到 2005 年间 47 例 Mp 感染患者双份血清和 39 份疑似感染患者血清被用于重组蛋白 ELISA-IgG 试验,将试验结果与 Mp 全菌体抗原包被的商业试剂盒比对。结果表明重组抗原检测在敏感性上优于商业试剂盒 Mycoplasma antigen assay ELISA-IgG (IBL, Hamburg, Germany)。该试验中表达蛋白为片段性,P1 的 1307~1340 段,P30 的 194~241 段,MpN456 的 765~846 段,并将这三段融合成一条新的蛋白 EC-12。以补体结合试验或者 PCR 阳性为感染诊断标准。以 $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 抗原包被,重组蛋白 GST-P1、GST-P30、GST-MpN456 和 GST-EC12 的双份血清检测敏感性分别为 54%、48%、25%、和 57%。而 IBL 试剂盒的敏感性为 36%,两者之间差异有统计学意义, $P<0.001$ 。但是在可疑血清的诊断上值得商榷。Kannan TR 等^[20]重组表达 P1 蛋白 C 端片段并证实其与 Mp 感染患者阳性血清有特异性反应。以该重组蛋白为抗原与 Serion ELISA 试剂盒比对,其敏感性为 72.7%(24/33),特异性为 100%(32/32)。薛冠华等^[21]曾重组表达 P1 蛋白 C 端 P1-534 抗原表位并用于血清学检测,敏感性和特异性分别为 85.00%和 97.67%。

4 黏附蛋白在 Mp 疫苗研究中的应用

Mp 通过飞沫传播,容易在人群密集在社区、学校、军队中造成暴发流行^[22,23],而且在世界范围内每 3~7 年流行一次,流行期间甚至可达到社区获得性肺炎的 40%^[24]。由于一线使用的 β -内酰胺酶抗生素对缺乏细胞壁的 Mp 无效,加之没有特异性的临床症状和快速有效的诊断方法,使得 Mp 感染常被误诊,导致经济和社会损失及负担。近年来亚洲地区 Mp 对大环内酯类药物的耐药率甚至高达 89.2%~97.0%^[25,26],所以疫苗的研发很重要。

由于 Mp 基因组很小,可以编码的蛋白质少,黏附蛋白复合体对 Mp 的致病性不可或缺,P1 蛋白和 P30 蛋白都位于高保守区,这表明它们与黏附功能直接相关。朱翠明等^[27]以 P1-C 端 1125~1395 段重组蛋白免疫小鼠后,可刺激小鼠产生特异性抗血清,该抗血清可阻断 Mp 对 HeLa 细胞的黏附,证明 P1-C 蛋白具有良好的免疫原性和免疫反应性及黏附细胞功能。Schurwanz N 等^[28]将 P1 蛋白全长分为 16 段分别构建了重组蛋白,用 Western-blot 方法检测 Mp 感染患者阳性血清发现其中 1288~1518 段免疫原性最强,将该段蛋白与 P30 蛋白构建成为融合蛋白 HP14/30,用纯化后的融合蛋白作为候选疫苗经鼻粘膜滴鼻和经皮下注射免疫豚鼠,可刺激产生相应特异

性抗体。HP14/30 免疫豚鼠后血清可将 Mp 对人肺支气管上皮细胞(human bronchial epithelial cells, HBEC)的黏附率抑制到 5%,接近于 Mp 全菌体免疫豚鼠血清的效果。Hausner M 等^[29]将 P30 蛋白经过不同途径免疫动物后,可刺激动物产生抗体(血清 IgG 抗体及鼻腔冲洗液、咽拭子、肺泡灌洗液中 IgA 分泌型抗体),用免疫后血清与 Mp 及 HeLa 细胞共同孵育可大幅度地减少 Mp 对 HeLa 细胞的黏附,差异有统计学意义。免疫后感染 Mp 的动物呼吸道 Mp 拷贝数下降。但是该试验未评估病理改变。Szczepanek SM 等^[30]构建了无红细胞吸附能力和滑行能力的 P30 突变株 P-130,这种突变株是无毒的且无法在 BALB/c 小鼠肺组织中生存。用 P-130 作为活性减毒株免疫 BALB/c 小鼠后,再用 Mp 野生株感染小鼠,却发现免疫过程反而导致了感染的激化。可能是由 Th17 细胞介导的免疫反应及嗜酸性粒细胞增多所致。在完成对呼吸道上皮细胞的黏附后,Mp 通过淋巴细胞、中性粒细胞甚至嗜酸性粒细胞的聚集激发免疫反应。通过 Toll 样受体 1/2/6(TLR1/2/6)与细胞脂蛋白的识别引起细胞因子的分泌。相比于介导清除作用,这些免疫反应更引起了啮齿动物及人类的免疫病理反应,使得疫苗的研发更加复杂。对免疫后小鼠的肺泡灌洗液中细胞因子进行分析显示经鼻感染 Mp 后,小鼠表现出 Th1 型反应。但是 Fonseca-Aten M 等^[31]认为是 Th17 介导的应答导致免疫损伤。IL-17 的升高也会引起巨噬细胞分泌 IL-1 β 、IL-16、TNF- α 的升高,在 Szczepanek SM 等的试验中,P-130 免疫后的小鼠肺泡灌洗液中也出现了这些细胞因子的变化。这些细胞因子的变化也同样出现在急性呼吸窘迫综合症的患者中,而且可能刺激成纤维细胞产生胶原,间接导致哮喘的发生。IL-1 β 、IL-17 在免疫小鼠中均升高,且差异有统计学意义^[32]。由此可见,Mp 的一些重组蛋白片段已被证实有免疫保护作用,但在这些试验中关于疫苗的安全性的评价很少,有待加强研究。

5 结论

综上所述,黏附蛋白在 Mp 的致病中起到了重要作用,目前该研究已发展到从分子水平探讨黏附蛋白基因结构、蛋白质结构、致病机制以及在实验室诊断、疫苗研发方面的应用。但是各蛋白的功能及相互之间的协作关系尚不完全明了,具体致病机制尚不清楚,重组黏附蛋白的研究也为 Mp 感染的诊断和疫苗研发开辟了一个新的方向,但随着近年来暴露的疫苗安全问题越来越多,提示在研究过程中需要更多关注实用性与安全性。

参考文献(References)

- [1] Atkinson TP, Balish MF, Waites KB. Epidemiology, clinical manifestations, pathogenesis and laboratory detection of Mycoplasma pneumoniae infections[J]. FEMS Microbiol Rev, 2008, 32(6): 956-973
- [2] Chaudhry R, Nisar N, Hora B, et al. Expression and immunological characterization of the carboxy-terminal region of the P1 adhesin protein of Mycoplasma pneumoniae[J]. J Clin Microbiol, 2005, 43(1): 321-325
- [3] Chaudhry R, Varshney AK, Malhotra P. Adhesion proteins of Mycoplasma pneumoniae[J]. Front Biosci, 2007, 12: 690-699

- [4] Tabassum I, Chaudhry R, Chourasia BK, et al. Identification of an N-terminal 27 kDa fragment of *Mycoplasma pneumoniae* P116 protein as specific immunogen in *M. pneumoniae* infections [J]. BMC Infect Dis, 2010, 10: 350-350
- [5] Hames C, Halbedel S, Hoppert M, et al. Glycerol metabolism is important for cytotoxicity of *Mycoplasma pneumoniae*[J]. J Bacteriol, 2009, 191(3): 747-753
- [6] Schmidl SR, Otto A, Lluch-Senar M, et al. A trigger enzyme in *Mycoplasma pneumoniae*: impact of the glycerophosphodiesterase GlpQ on virulence and gene expression [J]. PLoS Pathog, 2011, 7(9): e1002263
- [7] Shimizu T, Kida Y, Kuwano K. Cytoadherence-dependent induction of inflammatory responses by *Mycoplasma pneumoniae* [J]. Immunology, 2011, 133(1): 51-61
- [8] Hahn TW, Willby MJ, Krause DC. HMW1 is required for cytoadhesion P1 trafficking to the attachment organelle in *Mycoplasma pneumoniae*[J]. J Bacteriol, 1998, 180(5): 1270-1276
- [9] Hasselbring BM, Sheppard ES, Krause DC. P65 truncation impacts P30 dynamics during *Mycoplasma pneumoniae* gliding [J]. J Bacteriol, 2012, 194(11): 3000-3007
- [10] Jordan JL, Berry KM, Balish MF, et al. Stability and subcellular localization of cytoadherence-associated protein P65 in *Mycoplasma pneumoniae*[J]. J Bacteriol, 2001, 183(24): 7387-7391
- [11] Relich RF, Balish MF. Insights into the function of *Mycoplasma pneumoniae* protein P30 from orthologous gene replacement [J]. Microbiology, 2011, 157(Pt 10): 2862-2870
- [12] Layh-Schmitt G, Himmelreich R, Leibfried U. The adhesin related 30-kDa protein of *Mycoplasma pneumoniae* exhibits size and antigen variability[J]. FEMS Microbiol Lett, 1997, 152(1): 101-108
- [13] Romero-Arroyo CE, Jordan J, Peacock SJ, et al. *Mycoplasma pneumoniae* protein P30 is required for cytoadherence and associated with proper cell development [J]. J Bacteriol, 1999, 181(4): 1079-1087
- [14] Chang HY, Jordan JL, Krause DC. Domain analysis of protein P30 in *Mycoplasma pneumoniae* cytoadherence and gliding motility [J]. J Bacteriol, 2011, 193(7): 1726-1733
- [15] Cloward JM, Krause DC. *Mycoplasma pneumoniae* J-domain protein required for terminal organelle function [J]. Mol Microbiol, 2009, 71(5): 1296-1307
- [16] Chang HY, Prince OA, Sheppard ES, Krause DC. Processing is required for a fully functional protein P30 in *Mycoplasma pneumoniae* gliding and cytoadherence [J]. J Bacteriol, 2011, 193(20): 5841-5846
- [17] Miyata M. Unique centipede mechanism of *Mycoplasma* gliding[J]. Annu Rev Microbiol, 2010, 64: 519-537
- [18] Nakane D, Adan-Kubo J, Kenri T, et al. Isolation and characterization of P1 adhesin, a leg protein of the gliding bacterium *Mycoplasma pneumoniae*[J]. J Bacteriol, 2011, 193(3): 715-722
- [19] Montagnani F, De Paolis F, Beghetto E, et al. Use of recombinant chimeric antigens for the serodiagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* infection[J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2010, 29(11): 1377-1386
- [20] Kannan TR, Baseman JB. Expression of UGA-containing *Mycoplasma* genes in *Bacillus subtilis* [J]. J Bacteriol, 2000, 182(9): 2664-2667
- [21] 薛冠华, 孙红妹, 赵汉青, 等. 肺炎支原体 P1 黏附因子主要抗原表位的表达及其临床应用研究 [J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2011, 31(6): 544-548
- Xue Guan-hua, Sun Hong-mei, Zhao Han-qing, et al. Expression and immunological characterization of the major epitope of P1 adhesin protein of *Mycoplasma pneumoniae* and its clinical application research [J]. Chinese Journal of Microbiology and Immunology, 2011, 31(6): 544-548
- [22] Sliman JA, Metzgar D, Asseff DC, et al. Outbreak of acute respiratory disease caused by *Mycoplasma pneumoniae* on board a deployed U.S. navy ship[J]. J Clin Microbiol, 2009, 47(12): 4121-4123
- [23] Walter ND, Grant GB, Bandy U, et al. Community outbreak of *Mycoplasma pneumoniae* infection: school-based cluster of neurologic disease associated with household transmission of respiratory illness[J]. J Infect Dis, 2008, 198(9): 1365-1374
- [24] Waites KB, Talkington DF. *Mycoplasma pneumoniae* and its role as a human pathogen[J]. Clin Microbiol Rev, 2004, 17(4): 697-728
- [25] Matsuda K, Narita M, Sera N, et al. Gene and cytokine profile analysis of macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae* infection in Fukuoka, Japan [J]. BMC Infect Dis, 2013, 16(13): 591-591
- [26] Zhao F, Liu G, Wu J, et al. Surveillance of macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae* in Beijing, China, from 2008 to 2012 [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2013, 57(3): 1521-1523
- [27] 朱翠明, 汪世平, 吴移谋, 等. 肺炎支原体 P1 蛋白片段免疫学活性及黏附功能的研究 [J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2012, 32(8): 706-710
- Zhu Cui-ming, Wang Shi-ping, Wu Yi-mou, et al. Characterization of immunologic and adhesive abilities of *Mycoplasma pneumoniae* P1 protein segment[J]. Chinese Journal of Microbiology and Immunology, 2012, 32(8): 706-710
- [28] Schurwanz N, Jacobs E, Dumke R. Strategy to create chimeric proteins derived from functional adhesin regions of *Mycoplasma pneumoniae* for vaccine development [J]. Infect Immun, 2009, 77(11): 5007-5015
- [29] Hausner M, Schamberger A, Naumann W, et al. Development of protective anti-*Mycoplasma pneumoniae* antibodies after immunization of guinea pigs with the combination of a P1-P30 chimeric recombinant protein and chitosan[J]. Microb Pathog, 2013, 64: 23-32
- [30] Szczepanek SM, Majumder S, Sheppard ES, et al. Vaccination of BALB/c mice with an avirulent *Mycoplasma pneumoniae* P30 mutant results in disease exacerbation upon challenge with a virulent strain [J]. Infect Immun, 2012, 80(3): 1007-1014
- [31] Fonseca-Aten M, Ríos AM, Mejías A, et al. *Mycoplasma pneumoniae* induces host-dependent pulmonary inflammation and airway obstruction in mice[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2005, 32(3): 201-210
- [32] Linchevski I, Klement E, Nir-Paz R. *Mycoplasma pneumoniae* vaccine protective efficacy and adverse reactions--Systematic review and meta-analysis[J]. Vaccine, 2009, 27(18): 2437-2446