



Analisis *In Silico* Primer dan Probe untuk Deteksi *Aspergillus fumigatus* dengan PCR

Tati Febrianti*, Dwi Febriyana, Sunarno

Pusat Penelitian dan Pengembangan Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan

* E-mail: tatifebri@gmail.com

Info Artikel	Abstrak
<p><i>Sejarah Artikel:</i> Diterima: 25 Mei 2021 Disetujui: 5 Juni 2021 Dipublikasikan: 30 Juni 2021</p> <hr/> <p>Kata kunci: <i>Aspergillus fumigatus</i>, analisis <i>in silico</i>, <i>real time PCR</i></p>	<p><i>Aspergillus fumigatus</i> merupakan patogen utama penyebab aspergillosis invasif. Deteksi infeksi <i>A. fumigatus</i> untuk diagnostik klinik rutin dapat dilakukan menggunakan metode <i>real time Polymerase Chain Reaction (real time PCR)</i>. Pemilihan primer dan probe yang tepat merupakan komponen penting untuk digunakan dalam deteksi <i>A. fumigatus</i> dengan metode <i>real time PCR</i>. Studi ini bertujuan untuk memberikan alternatif pemilihan primer dan probe yang tepat untuk deteksi <i>A. fumigatus</i> dengan PCR. Primer dan probe yang telah digunakan dalam beberapa penelitian dianalisis menggunakan Primer BLAST NCBI dan program PerlPrimer 1.1.21. Hasil analisis secara <i>in silico</i> beberapa pasang primer dan probe dengan target gen ribosomal memiliki beberapa komposisi basa berulang dan target spesies yang tidak spesifik. Pasangan primer dan probe yang diprediksi memiliki sensitivitas dan spesifisitas paling tinggi untuk mendeteksi <i>A. fumigatus</i> dari sampel klinis di laboratorium yaitu pasangan primer gen pengkode <i>haemolysin</i>.</p>

PENDAHULUAN

Kasus infeksi jamur invasif telah menyebabkan lebih dari 1,6 juta kematian per tahun (Zakaria et al., 2020). Kasus ini banyak ditemukan di 19 negara yang berada di Asia, Afrika dan Timur Tengah (Chakrabarti et al., 2011; Denning et al., 2013; Kmeid et al., 2020). Salah satu kasus infeksi jamur yang umum ditemukan, fatal dan mematikan yaitu *invasive aspergillosis (IA)* (Crum-Cianflone, 2016; Roubarmohammadi et al., 2018).

Kasus IA erat kaitannya dengan influenza akut (Crum-Cianflone, 2016). Patogen utama penyebab IA yaitu *Aspergillus fumigatus*. Jamur ini juga menyebabkan aspergillosis paru kronik (Heddergott et al., 2014; Lamoth, 2016). Spora *A. fumigatus* yang terhirup ke dalam paru-paru mengakibatkan komplikasi, penyakit hipersensitivitas seperti *allergic asthma*, *hypersensitivity pneumonitis* serta dapat menyebabkan kematian pada pasien dengan kekebalan tubuh rendah (Heddergott et al., 2014; Lamoth, 2016; Mousavi et al., 2016).

Pengembangan deteksi *A. fumigatus* di laboratorium terus dilakukan. Deteksi *A. fumigatus* diperlukan untuk penerapan diagnosis dan terapi infeksi (Zakaria et al., 2020). Deteksi *A. fumigatus* selama ini dilakukan dengan pengujian mikroskopik, kultur spesimen dari saluran pernafasan ataupun biopsi ternyata memiliki sensitifitas rendah dan tidak efisien (Barton, 2013; Kourkoumpetis et al., 2012). *Real time polymerase chain reaction (PCR)* merupakan metode yang lebih akurat untuk deteksi *A. fumigatus* (Hadrich et al., 2011; Nabili et al., 2013; Torelli et al., 2011).

Tantangan pada penerapan metode *real time PCR*, yaitu adanya tingkat evolusi berbeda di beberapa region pada gen tertentu yang dimiliki jamur maupun mikroorganisme lainnya. Hal ini memungkinkan adanya hasil sekuens gen yang bervariasi (Ghyselinck et al., 2013). Oleh karena itu, pemilihan primer dan probe yang tepat merupakan komponen penting untuk digunakan dalam deteksi

A. fumigatus dengan metode *real time* PCR. Informasi terkait sekuen dari primer dan probe yang akan digunakan dapat terlebih dahulu diketahui secara *in silico* menggunakan program bioinformatik sebagai gambaran sensitivitas dan spesifisitasnya.

Studi ini bertujuan untuk mengetahui hasil analisis *in silico* sensitivitas dan spesifisitas primer dan probe yang digunakan pada beberapa peneliti dalam mendeteksi *A. fumigatus*. Manfaat studi ini yaitu menyediakan pilihan sekuen untuk deteksi *A. fumigatus* dengan metode *real time* PCR di laboratorium.

METODE PENELITIAN

Studi literatur dilakukan menggunakan database Google, Google Scholar dan ScienceDirect dengan kata kunci *real time* PCR *Aspergillus fumigatus*. Sekuens primer dan probe dari beberapa penelitian yang dipublikasi tahun 2011-2020 serta beberapa tahun sebelumnya yang terkait *A. fumigatus*. Analisis *in silico* dilakukan menggunakan Primer BLAST NCBI pada URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> dan program PerlPrimer 1.1.21.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil penelusuran pustaka diperoleh sebanyak 25, diantaranya 8 pustaka terkait pemeriksaan *real time* PCR *A. fumigatus*. Dari sejumlah pustaka terkait pemeriksaan *real time* PCR *A. fumigatus*, diambil 5 pustaka dengan jumlah sitasi terbanyak sehingga diperoleh 6 pasang primer dan probe dengan 6 gen target berbeda (Tabel 1).

Beberapa parameter primer yang baik meliputi panjang primer, *melting temperature* (T_m), persentase jumlah basa G dan C (%GC/*GC content*), *GC clamp*, *runs*, *repeats*, *hairpins*, *self dimer*, dan *cross dimer* (Borah, 2011; Popp & Bauer, 2015). Parameter ini perlu disesuaikan dengan standar karena akan mempengaruhi berlangsungnya proses PCR dan produk PCR yang diperoleh (Popp & Bauer, 2015).

Tabel 1. Hasil Analisis Parameter Primer dan Probe

No	Nama Primer dan Probe	Sekuens (5' -> 3')	T_m (°C)	Panjang Produk	GC (%)	Run	Repeat	Referensi
1	Forward	GCCCGCCGTTT CGAC	61,31	15	73	Ada	Tidak ada	(Luong et al., 2011)
	Reverse	CCGTTGTTGAA AGTTTAACTG ATTAC	60,37	27	33			
	Probe	CCCGCCGAAG ACCCCAACAT G						
2	Forward	GCCTGGTAGT GAAGCTGAGC GT	67,28	22	59	Ada	Ada	(Costa et al., 2001)
	Reverse	CGGTGAATGT AGGCATGTTGT CC	64,4	23	52			
	Probe	FAM- TCACTCTCTAC CCCCATGCCCG AGCC- TAMRA						
3	Forward	GAAAGGTCAG GTGTTGAGTC A	62,69	22	50	Tidak ada	Tidak ada	(Costa et al., 2001)
	Reverse	CATCATGAGT GGTCCGCTTTA C	64,4	23	52			

	Probe	FAM- ATCCCTAAACC CGCAACCAAA GGC-TAMRA					
4	F-Asphs	TGGTACAAGG ACGGTGACAA	61,54	20	50		
	R-Asphs	GTCCCAGTGG ACTCTTCCAA	61,62	20	55		(Abad-Diaz- De-Cerio et al., 2013)
	Prob-Asphs	FAM- CCAGGCGGTT CCGTGAACGT CATAMRA				Tidak ada	Tidak ada
5	Asp fum_F	GCAGTCTGAG TTGATTATCGT AATC	60,11	25	40		
	Fungi 5.8_R	CAGGGGGCGC AATGTGC	64,8	25	70	Ada	Tidak ada (Oliver Morton et al., 2011)
	ITS-PF	FAM- CAGCGAAATG CGATAAGTAA TGTGAATTGCA -TAM					
6	F-benAfum	TAATAGCTAC AATGGCTCCT	55,85	20	40		
	R-benAfum	ACGAGGAACA TATTTGTCA	54,19	19	36		(Fernandez- Molina et al., 2014)
	benAfum probe TexasRed (- BHQ2)	CTCTTGATTTA TACTATTTCCG C				Tidak ada	Tidak ada

Sebanyak 1 dari 6 primer *forward* yang dianalisis secara *in silico* pada studi ini memiliki panjang basa 15bp, sementara primer lainnya memiliki panjang basa ideal. Panjang primer ideal yaitu antara 18-30 oligonukleotida (Borah, 2011; Handoyo & Rudiretna, 2001), dengan kondisi optimal pada 18-22 bp (Borah, 2011). Handoyo menyatakan bahwa spesifisitas primer akan berkurang jika panjang primer kurang dari 18 basa. Ukuran primer yang pendek akan menyebabkan penempelan primer di tempat lain yang tidak diinginkan (*mispriming*). Berkurangnya spesifisitas primer dapat mempengaruhi proses PCR. Panjang primer yang lebih dari 30 basa, secara umum tidak terlalu mempengaruhi spesifisitas primer, namun akan mempengaruhi besarnya biaya pembelian primer (Handoyo & Rudiretna, 2001).

Kisaran Tm untuk primer *forward* dan *reverse* yaitu 42-65°C, dengan kondisi optimal untuk menghasilkan produk terbaik pada 52-58°C. Aktivitas *annealing* tidak akan berjalan baik jika Tm lebih dari 65°C sehingga proses amplifikasi DNA pun tidak akan berjalan baik (Popp & Bauer, 2015). Sebaliknya, jika Tm terlalu rendah maka akan terjadi kecenderungan penempelan primer di tempat lain dan menghasilkan produk yang tidak spesifik. Perbedaan Tm antara primer *forward* dan *reverse* sebaiknya tidak lebih dari 5°C (Borah, 2011; Handoyo & Rudiretna, 2001). Hanya ada 1 primer *reverse* pada studi ini dengan Tm > 65°C, sementara lainnya masih masuk dalam rentang standar. Perbedaan Tm antara primer *forward* dan *reverse* yang lebih dari 5°C ditemukan pada 1 pasangan primer.

Jumlah %GC yaitu persentase banyaknya guanin dan sitosin pada primer. Jumlah %GC ideal yaitu 40-60% (Borah, 2011). Primer dengan %GC rendah tidak dapat menempel secara efektif pada *template* (Handoyo & Rudiretna, 2001). Dari 6 pasang primer yang dianalisis, tidak ada primer yang memiliki %GC dibawah 40% namun terdapat 1 primer *forward* dan 1 primer *reverse* dengan %GC > 60%.

Pasangan GC / GC *clamp* didefinisikan sebagai adanya basa G/C pada lima basa terakhir dari ujung 3' primer. Ikatan kuat antara basa G/C mengakibatkan adanya pengikatan spesifik pada ujung 3' primer dengan rentang yang masih dapat ditoleransi sebanyak 3 basa (Popp & Bauer, 2015). Keberadaan G/C di ujung 3' primer membantu stabilitas ikatan primer dan DNA template yang diperlukan untuk inisiasi polimerase DNA. Tidak ditemukan G/C yang melebihi standar untuk pasangan primer yang telah dianalisis.

Analisis *in silico* dapat menunjukkan adanya struktur sekunder yang dihasilkan oleh interaksi antar molekul atau intra molekul. Struktur sekunder dibedakan menjadi *hairpins*, *self dimer* dan *cross dimer*. Hal ini mempengaruhi penempelan primer pada template dan mengakibatkan risiko penurunan sensitivitas. *Hairpins* terbentuk karena adanya interaksi intra molekul pada primer. Struktur *hairpins* disebut juga *loop*. Pada ujung 3' primer, diperbolehkan adanya *hairpin* dengan ΔG maksimum -2 kcal/mol dan *hairpins* internal dengan ΔG maksimum -3. *Cross dimer* terbentuk karena adanya interaksi antara primer *forward* dan *reverse* yang homolog (Borah, 2011). Dari 6 pasang primer yang dianalisis tidak ditemukan adanya *hairpins*.

Adanya nukleotida berulang pada hasil analisis *in silico* primer disebut sebagai *repeats*. Pengulangan nukleotida menyebabkan *mispriming*. Sementara itu, urutan basa yang diulang terus menerus disebut sebagai *run*. Pada hasil analisis *in silico* ditemukan 2 run pada pasangan gen target ribosomal dan 1 run pada gen target AspHS. Sementara itu, terdapat 1 kali pengulangan basa T dan G pada primer dengan gen target ribosomal.

Gen target yang digunakan dalam pemeriksaan *real time* PCR *A. fumigatus* berbeda-beda (Tabel 2.). Gen ribosomal berupa 18SrRNA umumnya dijadikan sebagai gen target untuk mendeteksi jamur patogen, berbeda dengan bakteri yaitu gen 16SrRNA (Popp & Bauer, 2015). Selain itu, dapat juga digunakan gen mitokondrial (Costa et al., 2001; Guegan et al., 2018) dan gen spesifik lainnya.

Tabel 2. Hasil Analisis Gen Target dari Masing-Masing Primer dan Probe secara *In Silico*

No	Primer dan Probe (Referensi)	Gen Target	Jumlah gen target teramplifikasi	Jumlah gen target teregistrasi	Jumlah spesies non target	Jumlah spesies target dengan mutasi	Jumlah spesies target tanpa mutasi	Sensitivitas (%)	Spesifisitas (%)
1	Forward Reverse Probe (Luong et al., 2011)	<i>ITS-1 regions of ribosomal DNA</i>	842	813	55	6	807	99,26	96,56
2	Forward Reverse Probe (Costa et al., 2001)	<i>FKS gene</i>	16	2	18	0	2	100	12,50
3	Forward Reverse Probe (Costa et al., 2001)	<i>AfMITO (mitochondrial gene)</i>	28	5	0	0	5	100	17,86
4	F-Asphs R-Asphs Prob-Asphs (Abad-Diaz-De-Cerio et al., 2013)	<i>AspHS gene</i>	4	4	0	0	4	100	100
5	Asp fum_F Fungi 5.8_R ITS-PF	<i>ITS1/5,8S rRNA gene region</i>	35	24	1049	0	24	100	68,57

	(Oliver Morton et al., 2011)								
6	F-benAfum R-benAfum benAfum probe TexasRed (- BHQ2)6 (Fernandez- Molina et al., 2014)	18S-ITS1- 5.8S- ITS2-28S <i>region</i> <i>and</i> <i>partial</i> <i>benA</i> <i>gene</i>	846	838	25	0	838	100	99,05

Penggunaan gen spesifik untuk deteksi *A. fumigatus* dengan *real time* PCR masih terus dikembangkan (Guegan et al., 2018; Kourkoumpetis et al., 2012; White et al., 2015), terutama untuk deteksi resistensi umumnya saat ini dilakukan secara konvensional. Pada studi ini digunakan gen mitokondrial yaitu *AfMITO* dan beberapa gen target lainnya seperti *AfKS* dan *AspHS* (Abad-Diaz-De-Cerio et al., 2013; Costa et al., 2001). Gen *AfKS* dipilih sebagai salah satu target untuk deteksi *A. fumigatus* karena merupakan gen tunggal yang terlibat dalam sintesis β -(1-3)-glukan (Costa et al., 2001), sedangkan *AspHS* merupakan gen virulen pengkode *haemolysin* yang diekspresikan secara berlebihan pada infeksi *in vivo* (Abad-Diaz-De-Cerio et al., 2013).

Sebanyak 3 pasang primer dan probe dengan gen target ribosomal menunjukkan prediksi sensitivitas dan spesifisitas bervariasi. Analisis menggunakan Primer BLAST NCBI diperoleh adanya mutasi pada spesies target yang terdeteksi pada salah satu pasangan primer dengan gen target ribosomal sehingga prediksi sensitivitas yang diperoleh rendah. Hal ini sejalan dengan pernyataan Bauer et al. (2015) yang menyebutkan bahwa penggunaan gen ribosomal untuk deteksi mikroba patogen memiliki risiko kontaminasi. Primer 16sRNA atau 18sRNA dapat mengamplifikasi komponen asing yang mungkin dihasilkan dari mikroba sehingga sinyal reaksi terganggu (Popp & Bauer, 2015). Selain itu, gen ribosomal juga memiliki tingkat evolusi yang sangat tinggi. Pada striktur gen ini terdapat *hypervariable region*, yaitu daerah gen ribosomal yang laju evolusinya melebihi rata-rata laju evolusi seluruh nukleotida dalam molekul (Ghyselinck et al., 2013). Pasangan primer dan probe yang diprediksi memiliki sensitivitas dan spesifisitas paling tinggi untuk mendeteksi *A. fumigatus* dari sampel klinis di laboratorium yaitu pasangan primer dengan gen target *AspHS gene* (gen pengkode *haemolysin*).

PENUTUP

Pasangan primer dan probe dengan target gen ribosomal memiliki beberapa komposisi basa berulang dan target spesies yang tidak spesifik. Pasangan primer dan probe yang diprediksi memiliki sensitivitas dan spesifisitas paling tinggi untuk mendeteksi *A. fumigatus* dari sampel klinis di laboratorium yaitu pasangan primer gen pengkode *haemolysin*. Reaksi kimia yang terjadi selama pelaksanaan *real time* PCR di laboratorium belum diperhitungkan dalam penentuan spesifisitas pasangan primer dan probe. Sesuai hasil analisis *in silico*, untuk penerapan deteksi *A. fumigatus* di laboratorium dapat digunakan pasangan primer dan probe dengan target gen spesifik non ribosomal.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih disampaikan kepada semua pihak di Puslitbang Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan yang telah membantu dan mendukung penulisan artikel ini.

DAFTAR PUSTAKA

Abad-Diaz-De-Cerio, A., Fernandez-Molina, J. V., Ramirez-Garcia, A., Sendino, J., Hernando, F. L., Pemán, J., Garaizar, J., & Rementeria, A. (2013). The *aspHS* gene as a new target for detecting

- Aspergillus fumigatus* during infections by quantitative real-time PCR. *Medical Mycology*, 51(5), 545–554. <https://doi.org/10.3109/13693786.2012.756989>
- Barton, R. C. (2013). Laboratory Diagnosis of Invasive Aspergillosis: From Diagnosis to Prediction of Outcome. *Scientifica*, 2013, 1–29. <https://doi.org/10.1155/2013/459405>
- Borah, P. (2011). Primer Designing for PCR. *Science Vision*, 11(3), 134–136.
- Chakrabarti, A., Chatterjee, S. S., Das, A., & Shivaprakash, M. R. (2011). Invasive aspergillosis in developing countries. *Medical Mycology*, 49(SUPPL. 1), 35–47. <https://doi.org/10.3109/13693786.2010.505206>
- Costa, C., Vidaud, D., Olivi, M., Bart-Delabesse, E., Vidaud, M., & Bretagne, S. (2001). Development of two real-time quantitative TaqMan PCR assays to detect circulating *Aspergillus fumigatus* DNA in serum. *Journal of Microbiological Methods*, 44(3), 263–269. [https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(01\)00212-3](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(01)00212-3)
- Crum-Cianflone, N. F. (2016). Invasive aspergillosis associated with severe influenza infections. *Open Forum Infectious Diseases*, 3(3), 1–8. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofw171>
- Denning, D. W., Pleuvry, A., & Cole, D. C. (2013). Global burden of allergic bronchopulmonary aspergillosis with asthma and its complication chronic pulmonary aspergillosis in adults. *Medical Mycology*, 51(4), 361–370. <https://doi.org/10.3109/13693786.2012.738312>
- Fernandez-Molina, J. V., Abad-Diaz-de-Cerio, A., Sueiro-Olivares, M., Pellon, A., Ramirez-Garcia, A., Garaizar, J., Pemán, J., Hernando, F. L., & Rementeria, A. (2014). Rapid and specific detection of section *Fumigati* and *Aspergillus fumigatus* in human samples using a new multiplex real-time PCR. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 80(2), 111–118. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2014.06.003>
- Ghyselinck, J., Pfeiffer, S., Heylen, K., Sessitsch, A., & De Vos, P. (2013). The effect of primer choice and short read sequences on the outcome of 16S rRNA gene based diversity studies. *PLoS One*, 8(8), 1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0071360>
- Guegan, H., Chevrier, S., Belleguic, C., Deneuville, E., Robert-Gangneux, F., & Gangneux, J. P. (2018). Performance of molecular approaches for *Aspergillus* detection and azole resistance surveillance in cystic fibrosis. *Frontiers in Microbiology*, 9(MAR), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00531>
- Hadrich, I., Mary, C., Makni, F., Elloumi, M., Dumon, H., Ayadi, A., & Ranque, S. (2011). Comparison of PCR-ELISA and Real-Time PCR for invasive aspergillosis diagnosis in patients with hematological malignancies. *Medical Mycology*, 49(5), 489–494. <https://doi.org/10.3109/13693786.2010.540724>
- Handoyo, D., & Rudiretna, A. (2001). Prinsip umum dan pelaksanaan Polymerase Chain Reaction (PCR). *Unitas*, 9(1), 17–29.
- Heddergott, C., Latgé, J. P., & Calvo, A. M. (2014). The volatome of *Aspergillus fumigatus*. *Eukaryotic Cell*, 13(8), 1014–1025. <https://doi.org/10.1128/EC.00074-14>
- Kmeid, J., Jabbour, J. F., & Kanj, S. S. (2020). Epidemiology and burden of invasive fungal infections in the countries of the Arab League. *Journal of Infection and Public Health*, 13(12), 2080–2086. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2019.05.007>
- Kourkoumpetis, T. K., Fuchs, B. B., Coleman, J. J., Desalermos, A., & Mylonakis, E. (2012). Polymerase chain reaction-based assays for the diagnosis of invasive fungal infections. *Clinical Infectious Diseases*, 54(9), 1322–1331. <https://doi.org/10.1093/cid/cis132>
- Lamoth, F. (2016). *Aspergillus fumigatus*-related species in clinical practice. *Frontiers in Microbiology*, 7(MAY), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00683>
- Luong, M. L., Clancy, C. J., Vadnerkar, A., Kwak, E. J., Silveira, F. P., Wissel, M. C., Grantham, K. J., Shields, R. K., Crespo, M., Pilewski, J., Toyoda, Y., Kleiboeker, S. B., Pakstis, D., Reddy, S. K., Walsh, T. J., & Nguyen, M. H. (2011). Comparison of an aspergillus real-time polymerase chain reaction assay with galactomannan testing of bronchoalveolar lavage fluid for the diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis in lung transplant recipients. *Clinical Infectious Diseases*, 52(10), 1218–1226. <https://doi.org/10.1093/cid/cir185>
- Mousavi, B., Hedayati, M. T., Hedayati, N., Ilkit, M., & Syedmousavi, S. (2016). *Aspergillus* species in indoor environments and their possible occupational and public health hazards. *Current Medical Mycology*, 2(1), 36–42. <https://doi.org/10.18869/acadpub.cmm.2.1.36>
- Nabili, M., Shokohi, T., Janbabaie, G., Hashemi-Soteh, M. B., Ali-Moghaddam, K., & Aghili, S. R.

- (2013). Detection of invasive aspergillosis in bone marrow transplant recipients using real-time PCR. *Journal of Global Infectious Diseases*, 5(2), 68–75. <https://doi.org/10.4103/0974-777X.112296>
- Oliver Morton, C., Clemons, K. V., Springer, J., Mueller, J. G., Rogers, T. R., Stevens, D. A., Kurzai, O., Einsele, H., & Loeffler, J. (2011). Real-time PCR and quantitative culture for monitoring of experimental *Aspergillus fumigatus* intracranial infection in neutropenic mice. *Journal of Medical Microbiology*, 60(7), 913–919. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.028399-0>
- Popp, J., & Bauer, M. (Eds.). (2015). *Modern Techniques for Pathogen Detection : Nucleic Acid amplification Tehniques*. Wiley-Blackwell.
- Roudbarmohammadi, S., Salimi-Khorashad, A., Forouzandeh-Moghadam, M., & Roudbary, M. (2018). Investigating the presence of *aspergillus fumigatus* and *A. Flavus* using galactomannan enzyme assay and taqman real-time PCR technique. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 11(2). <https://doi.org/10.5812/jjm.13670>
- Torelli, R., Sanguinetti, M., Moody, A., Pagano, L., Caira, M., De Carolis, E., Fuso, L., De Pascale, G., Bello, G., Antonelli, M., Fadda, G., & Posteraro, B. (2011). Diagnosis of invasive aspergillosis by a commercial real-time PCR assay for *Aspergillus* DNA in bronchoalveolar lavage fluid samples from high-risk patients compared to a galactomannan enzyme immunoassay. *Journal of Clinical Microbiology*, 49(12), 4273–4278. <https://doi.org/10.1128/JCM.05026-11>
- White, P. L., Wingard, J. R., Bretagne, S., Löffler, J., Patterson, T. F., Slavin, M. A., Barnes, R. A., Pappas, P. G., & Donnelly, J. P. (2015). *Aspergillus* Polymerase Chain Reaction: Systematic Review of Evidence for Clinical Use in Comparison with Antigen Testing. *Clinical Infectious Diseases*, 61(8), 1293–1303. <https://doi.org/10.1093/cid/civ507>
- Zakaria, A., Osman, M., Dabboussi, F., Rafei, R., Mallat, H., Papon, N., Bouchara, J. P., & Hamze, M. (2020). Recent trends in the epidemiology, diagnosis, treatment, and mechanisms of resistance in clinical *Aspergillus* species: A general review with a special focus on the Middle Eastern and North African region. *Journal of Infection and Public Health*, 13(1), 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2019.08.007>