

# Evidence Based Case Report: Penggunaan Metode PCR Pada Sputum Untuk Diagnosis *Pulmonary Aspergillosis*

---

Augustine Natasha, Ricky Fernando, Tubagus M. Kurniadi,  
Elyn Dohar Idarin Aritonang, Angky Budianti

---

*Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia*

## **Abstrak**

**Latar belakang:** *Pulmonary Aspergillosis* merupakan infeksi oportunistik pada populasi immunocompromised. Metode Polymerase Chain Reaction (PCR) diharapkan dapat menjadi pengganti kultur jamur sputum dengan hasil yang lebih cepat dan akurat.

**Metode:** Dilakukan pencarian di PubMed, CENTRAL, EbscoHost, dan ProQuest sejak tanggal 1 -13 Oktober menggunakan kata kunci "Aspergillosis", "Pulmonary Aspergillosis", "sputum", "PCR", "sputum fungal culture". Hasil pencarian di evaluasi menggunakan kriteria inklusi dan eksklusi. Studi yang terseleksi kemudian diperoleh full text nya dan dievaluasi kembali. Hasil akhir dari seleksi kemudian ditinjau secara kritis validity, importance, dan applicability-nya oleh ketiga penulis.

**Hasil:** Didapatkan empat studi, dengan level of evidence 4, yang kemudian ditinjau secara kritis. Tiga studi menggunakan PCR pada sampel sputum sebagai index test, sementara satu studi menggunakannya sebagai reference test. Luaran dari tiga studi melaporkan sensitivitas dan spesifisitas dari PCR dengan sampel sputum, sedangkan satu studi melaporkan proporsi dari hasil PCR. Dua studi melaporkan sensitivitas PCR pada sampel sputum sebesar 100%, sementara satu studi melaporkan sensitivitas sebesar 38%. Dua studi juga melaporkan spesifisitas diatas 70%, sementara satu studi melaporkan spesifisitas sebesar 38.5%.

**Kesimpulan:** Studi menunjukkan nilai sensitivitas dan spesifisitas yang menjanjikan terutama dengan hasil diperoleh dengan cepat. Akan tetapi rendahnya level of evidence dan biayanya yang cukup mahal, menyebabkan deteksi dengan metode PCR belum dapat digunakan sebagai modalitas diagnosis rutin.

**Kata kunci:** *Aspergillosis, pulmonary Aspergillosis, PCR, sputum, sputum fungal culture.*

## Evidence Based Case Report: Use of PCR Method in Sputum for Diagnosis Pulmonary Aspergillosis

Augustine Natasha, Ricky Fernando, Tubagus M. Kurniadi,  
Elyn Dohar Idarin Aritonang, Angky Budianti

Faculty of Medicine, University of Indonesia

### Abstract

**Background:** Pulmonary Aspergillosis is an opportunistic infection in the immunocompromised population. The polymerase chain reaction (PCR) method is expected to be a substitute for sputum mushroom culture with faster and more accurate results.

**Method:** Searched in PubMed, CENTRAL, EbscoHost, and ProQuest from October 1-13 using the keywords "Aspergillosis", "Pulmonary Aspergillosis", "sputum", "PCR", "sputum fungal culture". The search results are evaluated using inclusion and exclusion criteria. The selected study is then obtained by the full text and re-evaluated. The final results of the selection were then critically reviewed by validity, importance, and applicability by the three authors.

**Results:** Four studies were obtained, with level of evidence 4, which were then critically reviewed. Three studies used PCR in sputum samples as index tests, while one study used it as a reference test. Output from three studies reported sensitivity and specificity of PCR with sputum samples, while one study reported a proportion of PCR results. Two studies reported PCR sensitivity in sputum samples of 100%, while one study reported a sensitivity of 38%. Two studies also reported specificities above 70%, while one study reported a specificity of 38.5%.

**Conclusion:** Studies show promising values of sensitivity and specificity, especially with results obtained quickly. However, the low level of evidence and its costs are quite expensive, causing detection by the PCR method that cannot be used as a routine diagnostic modality.

**Keywords:** Aspergillosis, pulmonary Aspergillosis, PCR, sputum, sputum fungal culture.

### Skenario Klinis

Seorang pasien laki-laki usia 35 tahun dengan riwayat AIDS, dengan riwayat terapi antiretroviral yang kemudian dihentikan karena neutropenia, datang dengan keluhan demam dan batuk berdarah sejak satu minggu. Pasien dengan riwayat tuberkulosis, hasil sputum BTA +2 dan hasil foto toraks dengan gambaran proses spesifik, telah menyelesaikan pengobatan tuberkulosis selama 6 bulan. Di akhir pengobatan, hasil sputum BTA pasien negatif, namun keluhan pasien tidak membaik. Dokter Penanggungjawab Pasien (DPJP) mengirim pasien untuk diperiksa *GeneXpert* dengan hasil *not-detected*, dan kultur aerob sputum dengan hasil negatif. Perbandingan foto toraks sebelum pengobatan dengan sesudah pengobatan diperoleh perubahan di mana foto terakhir menunjukkan adanya pertambahan infiltrat di seluruh lapang paru disertai gambaran *fungus-ball* yang tidak khas.

Pasien dicurigai infeksi paru disebabkan oleh infeksi jamur dan pasien dirujuk ke RS tempat anda bertugas. DPJP dirumah sakit anda memberi pilihan kepada pasien untuk pemeriksaan kultur jamur dari bahan sputum yang membutuhkan waktu 10 - 14 hari atau PCR dari bahan sputum yang membutuhkan waktu 3 hari namun biayanya lebih mahal. Terapi anti jamur baru diberikan setelah diperoleh hasil yang memastikan diagnosis infeksi jamurnya. Laboratorium Rumah Sakit (RS) anda memiliki fasilitas PCR dan kultur. Keluarga pasien kemudian berkonsultasi kepada anda pemeriksaan yang terbaik dan tercepat untuk dilakukan pasien tersebut.

### Latar Belakang

Pada tahun 2017, kasus HIV/AIDS di Indonesia tercatat sebanyak 102.667 kasus.<sup>1</sup> Sementara itu, Kementerian Kesehatan memperkirakan terdapat 628.492 kasus pada

tahun 2017.<sup>1</sup> Kondisi demikian menimbulkan perhatian akan adanya kemungkinan lebih banyak pasien dengan HIV/AIDS yang tidak tercatat, tidak pernah memperoleh pengobatan, dan berada dalam kondisi rentan. HIV/AIDS sendiri merupakan penyakit infeksi virus yang menyebabkan abnormalitas fungsi CD4<sup>+</sup> sel T dan hilangnya sel ini akibat sitotoksitas langsung maupun tidak langsung dari virus tersebut.<sup>2</sup> Hal tersebut melemahkan kekebalan tubuh penderitanya sehingga mudah mengalami infeksi dari organisme oportunistik.

Infeksi pada pasien HIV/AIDS paling banyak menyerang paru-paru.<sup>3</sup> Selain Tuberkulosis, infeksi jamur merupakan agen yang sering menyebabkan perburukan keadaan umum penderita HIV/AIDS. Jamur yang secara klinis sering menginfeksi penderita HIV/AIDS terbagi menjadi tiga kelompok besar, yaitu *Aspergillus sp.*, *Cryptococcus neoformans*, dan fungi dimorfik.<sup>3</sup> *Aspergillus sp.* merupakan jamur yang umum ditemukan di lingkungan.<sup>3-5</sup> *Konidia Aspergillus sp.* mudah terhisap saat inhalasi, namun hanya sedikit yang berkembang menjadi infeksi paru-paru.<sup>5</sup> Prevalensi infeksi *Aspergillus sp.* di Jakarta pada tahun 2013 dilaporkan sebesar 7.65%.<sup>6</sup>

Faktor risiko yang berpengaruh pada infeksi *Aspergillus sp.* adalah kondisi penurunan imunitas seperti yang terjadi pada pasien dengan konsumsi kortikosteroid atau pasien post-transplan organ, pasien dengan keganasan hematologi, dan pasien dengan neutropenia.<sup>5</sup> Neutropenia banyak ditemukan pada pasien HIV/AIDS yang mengalami perburukan karena perjalanan penyakitnya.<sup>3</sup> Sejumlah agen terapi untuk HIV, seperti zidovudine, cidofovir, foscarnet, dan ganciclovir memiliki efek myelotoksik.<sup>2</sup> Jika muncul keadaan neutropenia berat, maka terapi antiretroviral dianjurkan untuk dihentikan, meskipun terdapat risiko perburukan keadaan umum pasien setelah terapi dihentikan.<sup>7</sup> Selain itu, paru-paru yang mengalami perubahan parenkim akibat infeksi kronis atau penyakit kongenital seperti *cystic fibrosis* juga rentan untuk menjadi lokasi infeksi *Aspergillus sp.*<sup>4</sup>

Gejala klinis dari infeksi *Aspergillus sp* bervariasi. Pada umumnya, gejala *pulmonary Aspergillosis* pada pasien HIV/AIDS menyerupai gejala pneumonia.<sup>3,4</sup> Batuk, sesak nafas, dan demam merupakan gejala umum yang sering ditemukan, sedangkan nyeri dada dan hemoptisis lebih jarang.<sup>3</sup> Diagnosis *Pulmonary Aspergillosis* sering terlambat ditegakkan. Gambaran radiologik *fungus-ball* atau aspergilloma biasanya baru terdeteksi pada infeksi yang sudah berat.<sup>4</sup>

Menurut *European Organization for Research and Treatment of Cancer/ Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG)*, bukti histopatologis dari invasi jaringan oleh elemen hifa dan isolasi dengan kultur jamur dibutuhkan untuk menegakkan diagnosis, membuktikan infeksi oleh *Aspergillus sp.*<sup>3</sup> Sementara itu, panduan yang dikeluarkan oleh *European Society for Clinical Microbiology and Infectious Diseases-European Confederation of Medical Mycology* dan *European Respiratory Society (ESCMID-ECMM-ERS)* merekomendasikan kultur jamur sputum (*Quality of evidence III*) sebagai modalitas penegakkan diagnosis.<sup>8</sup> Deteksi *galactomannan (GM)* dari serum atau cairan *bronchoalveolar-lavage (BAL)* juga direkomendasikan sebagai alat bantu penegakkan diagnosis.<sup>3,8</sup>

PCR dilirik sebagai alat bantu diagnosis karena proses yang cepat dan mampu mendeteksi jenis jamur dengan lebih spesifik dibandingkan GM.<sup>9,10</sup> GM merupakan polisakarida yang ada di dinding sel berbagai varietas jamur, seperti *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium* dan *Fusarium*.<sup>11</sup> GM dilepaskan oleh jamur dalam proses metabolismenya, dicurigai jika sedang berkembang biak secara eksponensial dan kadar GM yang lepas di tubuh inangnya bergantung pada proses *angioinvasion*.<sup>11</sup> Tidak spesifiknya GM pada satu spesies jamur dan kadarnya yang bergantung pada proses invasinya menyebabkan deteksi alternatif mulai dikembangkan.

Sejumlah studi sudah mulai mengembangkan PCR sebagai alat deteksi *Aspergillus sp.*, baik dari spesimen darah maupun BAL.<sup>9,12,13</sup> Namun BAL memiliki kelemahan yaitu proses pengambilannya yang invasif, sehingga tidak bisa diperoleh dari segala jenis pasien, apalagi yang kondisinya tidak stabil.<sup>14,15</sup> Escribano et al. dalam studinya membandingkan hasil deteksi *Aspergillus sp.* dengan metode PCR dari spesimen BAL dan sputum, dan menyimpulkan bahwa spesimen sputum sama representatifnya dengan spesimen BAL dalam diagnosis *Aspergillosis* paru.<sup>14</sup> Dengan demikian, metode PCR spesimen sputum dapat dijadikan alternatif yang lebih spesifik dan tidak invasif untuk diagnosis *Pulmonary Aspergillosis*.

## Pertanyaan Klinis

Tabel 1. Tabel Pertanyaan Klinis sesuai Metode PICO

PATIENT/PROBLEM	INDICATOR	COMPARISON	OUTCOME
Pasien dewasa dengan riwayat AIDS dan TB, suspek sputum aspergillosis pada paru-paru	PCR dari spesimen sputum	Kultur dan deteksi <i>galactomanan</i> dari spesimen sputum	Penegakkan diagnosis infeksi aspergillosis pada paru-paru
Clinical question based on PICO:			
Pada pasien AIDS dengan riwayat TB, apakah hasil pemeriksaan PCR dengan spesimen sputum dapat digunakan sebagai alternatif penegakan diagnosis infeksi jamur dibandingkan dengan gold standard (kultur dari sputum) ?			
Type of question :	DIAGNOSIS		
Type of study/ methodology:			
Meta-analysis/Systematic review / RCT/ Cross sectional			

## Metode

Tabel 2. Strategi Pencarian, Sumber yang Digunakan, dan Hasil Pencarian

Database	Search Strategy	Hits
Pubmed 1	(((((sputum fungal culture[Title/Abstract]) OR batch culture technique[MeSH Terms]) OR count, fungal[MeSH Terms]) OR sputum[MeSH Terms])) AND (((polymerase chain reaction[Title/Abstract]) OR polymerase chain reaction[MeSH Terms]) OR pcr[Title/Abstract]) OR pcr[MeSH Terms]) OR sputum[MeSH Terms]) OR sputum[Title/Abstract]) AND (((aspergillosis[Title/Abstract]) OR aspergillosis[MeSH Terms]) OR pulmonary aspergillosis[MeSH Terms]) OR pulmonary aspergillosis[Title/Abstract])	331
EBSCOhost	(pulmonary aspergillosis OR aspergillosis) AND sputum AND fungal culture AND (polymerase chain reaction OR PCR)	6
PROQUEST	(pulmonary aspergillosis) AND (polymerase chain reaction) AND (PCR) AND (sputum) AND (sputum fungal culture)	451
CENTRAL	((aspergillosis):ti,ab,kw (Word variations have been searched) OR MeSH descriptor: [Aspergillosis] explode all trees OR (“pulmonary aspergillosis”):ti,ab,kw OR aspergillus infection OR aspergillus pulmonary) AND (“sputum culture”):ti,ab,kw (Word variations have been searched) OR (sputum):ti,ab,kw OR (culture):ti,ab,kw OR MeSH descriptor: [Microbiological Techniques] explode all trees) AND (“polymerase chain reaction”):ti,ab,kw OR (pcr):ti,ab,kw OR MeSH descriptor: [Polymerase Chain Reaction] explode all trees OR MeSH descriptor: [Sputum] explode all trees)	20

## Kriteria Eligibilitas

- **Kriteria inklusi**
  - studi tentang uji diagnostik
  - subyek penelitian pasien dengan suspek *pulmonary aspergillosis*,
  - *index test* : PCR sputum
  - Perbandingan : kultur sputum / *bronchoalveolar lavage* / histopatologi.
- **Kriteria eksklusi**
  - Studi analisa resistensi *Aspergillosis* menggunakan PCR
  - Studi *genotyping* hasil kultur sputum

## Hasil

Hasil awal pencarian diperoleh sebanyak 331 dari PubMed, 20 dari CENTRAL, 6 dari EbscoHost, dan 451 dari ProQuest. Hasil seleksi akhir diperoleh empat studi, dengan *level of evidence* 4, yang kemudian ditinjau secara kritis.

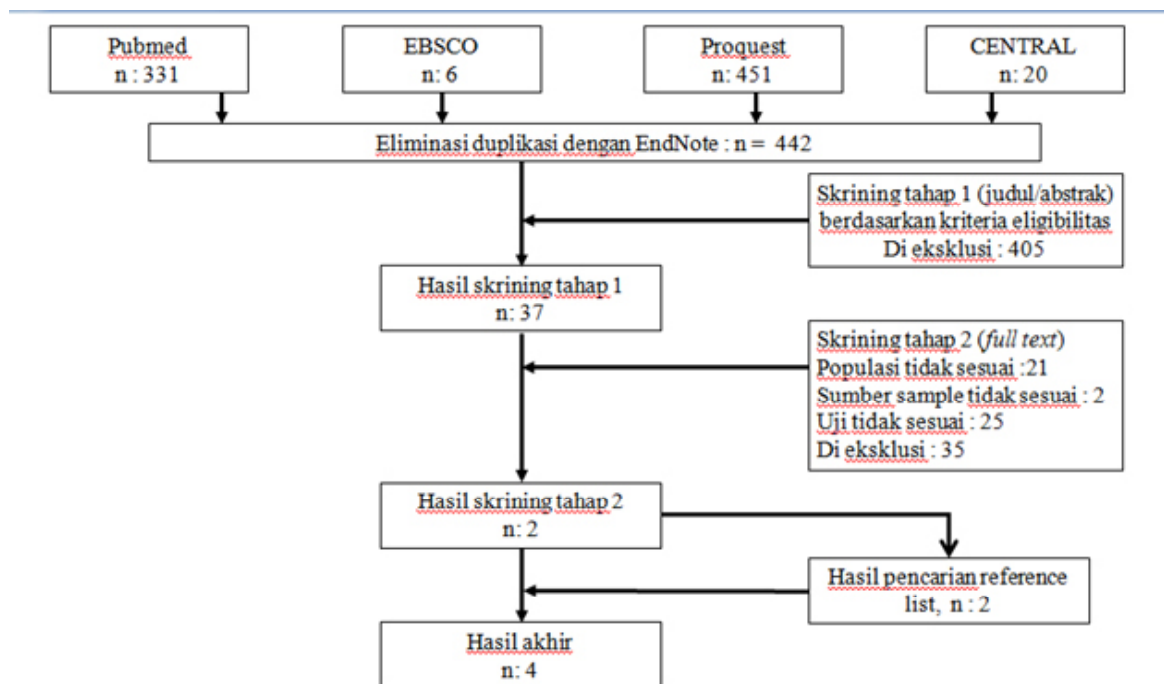
## Diskusi

Jurnal yang akhirnya dijadikan sebagai dasar jawaban untuk pertanyaan klinis tidak membandingkan hasil dari penggunaan metode PCR pada spesimen sputum dengan *gold standard* yaitu histopatologi dan kultur dari

spesimen jaringan hasil biopsi.<sup>16-19</sup> Studi yang paling mendekati adalah dari Urata et al, dimana mereka berhasil mengambil *fungus ball* dari pasien yang menderita *pulmonary aspergillosis* melalui otopsi. Meskipun demikian, studi oleh Urata et al tersebut tidak membandingkan hasil PCR sputum pasien dengan hasil isolasi *fungus ball* dari pasien yang sama, melainkan menggunakan fragmen

gen yang dianggap spesifik dari *fungus ball* hasil otopsi sebagai primer untuk dibandingkan dengan hasil PCR sputum pasien yang menjadi sampel.<sup>16</sup> Fayemiwo et al. menggunakan kultur dari sputum dan ada yang menggunakan *galactomanan* serum sebagai pembandingnya.<sup>19</sup>

Populasi sampel dari studi-studi yang disertakan juga tidak semuanya seragam,



Gambar 1. Diagram Alur Metode Seleksi Studi

Tabel 3. Karakteristik Jurnal

Authors	Patients	Index Test	Comparison	Outcome
Baxter CG et al, 2011	Pasien <i>cystic fibrosis</i> dengan suspek infeksi <i>Aspergillus fumigatus</i>	PCR sputum	Kultur Sputum	Sensitifitas, spesifisitas, NPV, PPV
Fayemiwo S et al, 2017	Pasien terdiagnosis <i>Aspergillosis</i> paru-paru dari studi sebelumnya	PCR sputum	Mikroskopik, kultur, dan <i>galaktomanan</i> sputum	Sensitifitas, spesifisitas, ROC
Guinea J et al, 2013	Pasien dengan infeksi saluran nafas yang tidak memiliki maupun memiliki faktor predisposisi : keganasan, sirosis hepatis, terapi kortikosteroid, infeksi HIV, COPD, atau resipien organ transplan.	PCR sputum	Kultur sputum	Sensitifitas, spesifisitas, PPV, NPV
Urata T et al, 1997	Pasien suspek <i>Aspergillosis</i> sesuai gejala klinis dan pemeriksaan foto toraks	PCR sputum		Sensitifitas, spesifisitas, PPV, NPV

Tabel 4. Hasil Telaah Kritis: *Validity* (Validitas)

Authors	Validity		
	Was the diagnostic test evaluated in a Representative spectrum of patients (like those in whom it would be used in practice)?	Was the reference standard applied regardless of the index test result?	Was there an independent, blind comparison between the index test and an appropriate reference ('gold') standard of diagnosis?
Baxter CG et al, 2011	+	+	Unclear
Fayemiwoet al, 2017	+	+ (with note)	Unclear
GuineaJ et al, 2013	+	+	+
Urata T et al, 1997	+	+	Unclear

Tabel 5. Hasil Telaah Kritis : *Importance* (kepentingan)

Authors	Overall			
	Sensitivity	Specifity	PPV	NPV
Baxter CG et al, 2011	100%	38.5%	40.7%	100%
Fayemiwoet al, 2017	Kultur jamur sputum positif pada 20/109 sampel sputum PCR <i>Aspergillus</i> positif pada 45/109 sampel sputum			
GuineaJ et al, 2013	38%	90%	65.7%	80.3%
Urata T et al, 1997	100%	71.4%	65.7%	100%

Tabel 6. Hasil Telaah Kritis: *Applicability* (Penerapan)

	Reproducibility of the test and interpretation in my setting	Do the result apply to the mix of patients I see?	Will the result of change my management ?	Would the consequences of the test help your patient?	Impact on outcomes are important to patients?
Baxter CG et al, 2011	+	+	Unclear	+	+
Fayemiwoet al, 2017	+	+	+	+	+
GuineaJ et al, 2013	+	+	+	+	+
Urata T et al, 1997	+	+		+	+

namun penulis tetap memasukkannya dalam proses seleksi karena metode pemeriksaan yang digunakan dan populasi sampel sama-sama merupakan populasi rentan terhadap infeksi *Aspergillus sp.* Sementara itu, keempat studi memenuhi syarat *applicability* dikarenakan Indonesia sudah memiliki fasilitas dan tenaga ahli untuk menggunakan PCR sebagai modalitas analisa. Masih sulitnya penegakkan diagnosis untuk infeksi jamur juga masih faktor penyebab terlambatnya klinisi dalam kecepatan dalam memberikan terapi dan tidak memmp peroleh cukup data mengenai jenis jamur yang sedang menginfeksi pasien. Keempat studi yang di inklusi dalam EBCR ini memiliki *Level of Evidence* di level 4 karena menggunakan metode *case control*, di mana memang dicari populasi kasus suspek aspergillosis untuk diuji dengan PCR dan *reference test* yang digunakan

bukanlah *gold standard*.

PCR merupakan sebuah metode analisa yang sudah masuk ke Indonesia, dengan perangkat yang semakin canggih, minimalis ukurannya, cepat prosesnya, dan akan semakin murah di masa depan. Kecepatan diagnosis dapat mempengaruhi kecepatan pemberian terapi dan dapat memperbaiki prognosis. Metode yang tidak invasif juga dapat memudahkan infeksi jamur untuk dideteksi lebih dini melalui skrining serta menguntungkan bagi pasien-pasien yang kondisinya tidak stabil maupun tidak setuju untuk tindakan yang invasif.

### Kesimpulan

Metode diagnosis menggunakan PCR pada sampel sputum sudah mulai banyak dikembangkan, namun studi dengan *Level of*

Evidence yang tinggi seperti *RCT*, *systematic review* atau *meta-analysis* masih belum dilakukan. Meskipun studi menunjukkan nilai sensitivitas dan spesifisitas yang menjanjikan, rendahnya *level of evidence* menyebabkan deteksi *Aspergillus sp.* dengan metode PCR pada sputum belum dapat digunakan secara luas sebagai modalitas diagnosis rutin

### Daftar Pustaka

- Indonesia KK. Profil Kesehatan Indonesia Tahun 2017. 2018:165-70.
- Shi X, Sims MD, Hanna MM, Xie M, Gulick PG, Zheng Y-H, et al. Neutropenia during HIV infection: adverse consequences and remedies. *International reviews of immunology*. 2014 Nov 2;33(6):511-36.
- Pupaibool J, Limper AH. Other HIV-associated pneumonias. *Clinics in chest medicine*. 2013 Jun 1;34(2):243-54.
- Kosmidis C, Denning DW. The clinical spectrum of pulmonary aspergillosis. *Thorax*. 2015 Mar 1;70(3):270-7.
- Baddley JW. Clinical risk factors for invasive aspergillosis. *Medical mycology*. 2011;49 Suppl 1:S7-S12.
- Wahyuningsih R, Prihartono P, Adawiyah R, Syam R, Wulandari T, Rozallyani A, et al. Estimation of The Burden of Serious Mycoses in Indonesia. *ISHAM 19th*. 2015.
- Moh R, Danel C, Sorho S, Sauvageot D, Anzian A, Minga A, et al. Haematological changes in adults receiving a zidovudine-containing HAART regimen in combination with co-trimoxazole in Côte d'Ivoire. *Antivir Ther*. 2005;10(5):615-24.
- Ullmann AJ, Aguado JM, Arikan-Akdagli S, Denning DW, Groll AH, Lagrou K, et al. Diagnosis and management of *Aspergillus* diseases: executive summary of the 2017 ESCMID-ECMM-ERS guideline. *Clinical Microbiology and Infection*. 2018;24:e1-e38.
- Cao G-J, Xing Z-F, Hua L, Ji Y-H, Sun J-B, Zhao Z. Evaluation of the diagnostic performance of panfungal polymerase chain reaction assay in invasive fungal diseases. *Experimental and Therapeutic Medicine*. 2017 Nov 1;14(5):4208-14.
- Vehreschild JJ. As Galactomannan Disappoints, Our Quest for a Feasible Diagnostic Standard for Invasive Aspergillosis Continues. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2014;190(3):248-9.
- Johnson G, Ferrini A, Dolan SK, Nolan T, Agrawal S, Doyle S, et al. Biomarkers for invasive aspergillosis: the challenges continue. *Biomarkers in Medicine*. 2014 Mar;8(3):429-51.
- Zarrinfar H, Mirhendi H, Makimura K, Satoh K, Khodadadi H, Paknejad O. Use of Mycological, nested PCR, and Real-time PCR Methods on BAL Fluids for Detection of *Aspergillus fumigatus* and *A. flavus* in Solid Organ Transplant Recipients. *Mycopathologia*. 2013;176(5-6):377-85.
- Buess M, Cathomas G, Halter J, Junker L, Grendelmeier P, Tamm M, et al. *Aspergillus*-PCR in bronchoalveolar lavage for detection of invasive pulmonary aspergillosis in immunocompromised patients. *BMC infectious diseases*. 2012 Dec;12(1):237.
- Escribano P, Marcos-Zambrano LJ, Pelaez T, Munoz P, Padilla B, Bouza E, et al. Sputum and bronchial secretion samples are equally useful as bronchoalveolar lavage samples for the diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis in selected patients. *Medical mycology*. 2015 Jan;53(3):235-40.
- Xiao W, De-ying G, Mao B, Xin-miao D, Lin-Li C, Min-yu W, et al. Sputum signatures for invasive pulmonary aspergillosis in patients with underlying respiratory diseases (SPARED): study protocol for a prospective diagnostic trial. *BMC infectious diseases*. 2018;18.
- Urata T, Kobayashi M, Imamura J, Tanaka Y, Muneishi H, Iwahara Y, et al. Polymerase chain reaction amplification of *Asp f I* and alkaline protease genes from fungus balls: clinical application in pulmonary aspergillosis. *Internal medicine (Tokyo, Japan)*. 1997;36(1):19-27.
- Baxter CG, Jones AM, Webb K, Denning DW. Homogenisation of cystic fibrosis sputum by sonication—an essential step for *Aspergillus* PCR. *Journal Of Microbiological Methods*. 2011 Apr 1;85(1):75-81.
- Guinea J, Padilla C, Escribano P, Muñoz P, Padilla B, Gijón P, et al. Evaluation of MycAssay™ *Aspergillus* for Diagnosis of Invasive Pulmonary Aspergillosis in Patients without Hematological Cancer. *PloS one*. 2013;8(4).
- Fayemiwo S, Moore CB, Foden P, Denning DW, Richardson MD. Comparative performance of *Aspergillus* galactomannan ELISA and PCR in sputum from patients with ABPA and CPA. *Journal Of Microbiological Methods*. 2017;140:32-9.

