

# Tecniche molecolari applicate al monitoraggio aerobiologico



Lavoro svolto presso il laboratorio di microbiologia dell'ARPA Valle d'Aosta, nell'ambito di un progetto di tesi (Scuola di Specializzazione in Microbiologia e Virologia dell'Università di Torino).

M.F. Borney, C. Gyppaz

# Background di partenza



**La biologia molecolare  
applicata  
alla  
melissopalinologia**

Sviluppo di un metodo  
per la caratterizzazione  
dei mieli valdostani  
attraverso il riconoscimento  
dei **pollini**  
con **Polymerase Chain Reaction (PCR)**

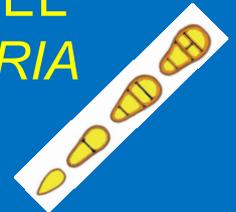


2° Focus group "Pollini simili: casi studio" – Università degli Studi di Perugia  
17 Febbraio 2014

Dott.ssa Gyppaz C.  
Dott.ssa Borney F.

Focus: CONTEGGIO DELLE  
SPORE FUNGINE DEL  
GENERE *ALTERNARIA*

Trieste 05/02/2016





# Obiettivi



L'esigenza di **approfondire** i dati del monitoraggio aerobiologico porta, l'ARPA Valle d'Aosta, ad esplorare **tecniche alternative** alla microscopia ottica.

Obiettivi:

- **Determinazione quali-quantitativa** di pollini e spore fungine aerodisperse (generi *Alternaria* e *Cladosporium*), tramite l'amplificazione del DNA target con metodiche di biologia molecolare (Real-time PCR).
- **Studio della biodiversità** presente sui vetrini di biomonitoraggio.

# Perché usare una metodica molecolare?

## La **tecnica microscopica**

Richiede **personale altamente specializzato**.

**Sottostima la biodiversità** (molte spore non possono essere distinte le une dalle altre in base alla loro morfologia).

E' possibile giungere **solo all'identificazione del genere** (Pashley C.H. et al.,2012; Tonge D.P.et al.,2014).



## La **tecnica colturale**

Richiede un **terreno colturale** adatto alla crescita di **tutti i miceti** (non esiste).

Crea un **bias** tra l'identificazione di spore fungine a **crescita veloce** e quelle a **crescita lenta**.

**Non individua** la presenza di **funghi non coltivabili**, che tuttavia possono produrre spore allergeniche (Keswani J. et al., 2005).

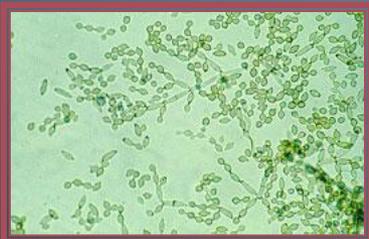
**Sottostima** inevitabilmente la **biodiversità** presente in quanto solo il **17%** dei **funghi** conosciuti può crescere su terreno colturale e molti di questi producono un micelio sterile (Tonge D.P. et al., 2014).





# Perché *Alternaria* e *Cladosporium*?

L'esposizione a spore di *Alternaria* è una delle principali cause di reazioni allergiche quali asma, congiuntivite, rinite e dermatiti. Per questo motivo è importante il suo costante monitoraggio (Pavón M.A. et al., 2010). Presenta un elevato polimorfismo tra le forme più mature e quelle più giovani, non sempre facilmente riconoscibili. Ciò porta, probabilmente, a sottostimare la concentrazione effettiva di spore in aria.



Il genere *Cladosporium* è costituito da circa 60 specie, tra le quali molte sono patogene per le piante, altre provocano allergie e indebolimento del sistema immunitario nell'uomo.

I conidi sono facilmente riconoscibili su vetrino, tuttavia le piccole dimensioni e la concentrazione elevata in cui si trovano durante il periodo di rilascio, ne rendono difficoltoso il conteggio e la quantificazione precisa (Qing-Yin Zeng et al., 2006).

# Caratteristiche della PCR Real Time

I metodi basati sulla PCR Real Time:

- **rilevano la presenza** di microrganismi **indipendentemente** dalla loro **coltivabilità e vitalità**
- **presentano ridotti tempi analitici**
- offrono la possibilità di **rilevare e quantificare** simultaneamente il **DNA** di una specie microbica in un'**unica reazione** (no manipolazioni post-PCR)
- sono caratterizzati da **elevata sensibilità, specificità** e **ampio range dinamico** (3-4 log per DNA genomico).



# Fattori che influenzano l'efficienza della PCR

Estrazione DNA



- Rottura meccanica della parete delle spore fungine
- Trattamento termico
- Degradazione del DNA
- Fase di purificazione (qualità/quantità DNA ottenuto)
- Semplicità/applicabilità del protocollo

Reazione di PCR



- Disegno dei primers
- Concentrazione del DNA
- Concentrazione dei reattivi
- Protocollo termico
- Presenza/Assenza di inibitori
- Tipo di rilevatori utilizzati
- Buona pratica di laboratorio

# Campioni su cui sono state eseguite le prove

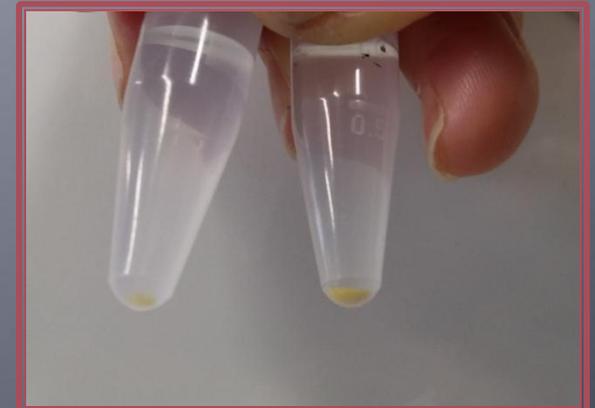
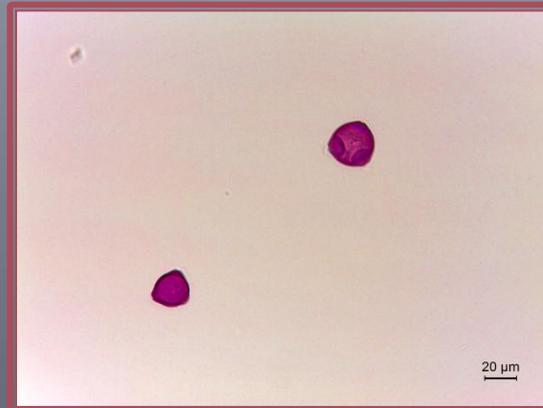
La PCR è stata **eseguita** su:

- **Campioni stock** per mettere a punto il protocollo di estrazione e di amplificazione del DNA;
- **Vetrini reali e simulati** per verificare l'applicabilità della tecnica al monitoraggio aerobiologico .



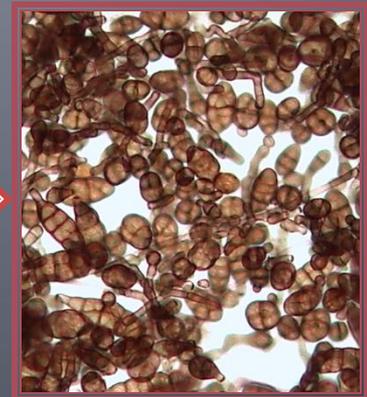
# Preparazione stock di riferimento: raccolta di pollini da infiorescenze

Otteniamo delle sospensioni di circa  $10^6$  pollini /ml

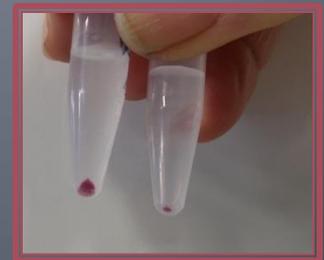
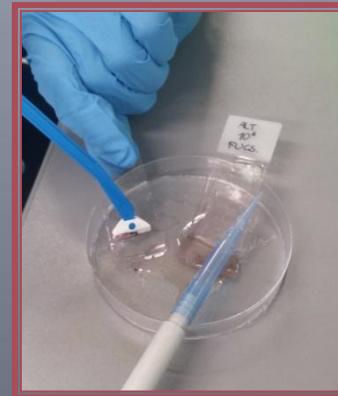
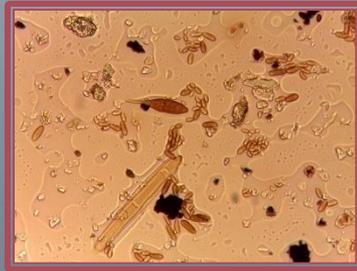


# Preparazione STOCK di riferimento: raccolta spore fungine da piastre

Otteniamo da ciascuna piastra una sospensione pari a circa  $10^7$  spore/ml per *Alternaria* e a circa  $10^8$  spore/ml per *Cladosporium*



# Risospensione di pollini e spore aerodispersi raccolti su vetrini di monitoraggio simulati e reali



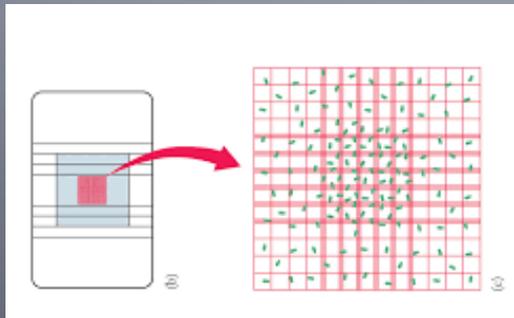
Vetrino di  
monitoraggio  
aerobiologico

Visione al  
microscopio ottico

Pulizia del vetrino  
con Cell Scraper

Pollini e spore  
raccolti in  
provetta

# Quantificazione materiale raccolto



Dopo la raccolta del materiale, il numero di spore e/o pollini effettivamente raccolti sono stati quantificati mediante **conteggio** microscopico su **Camera di Burkholder** (Dean T.R. et al., 2004; Yamamoto N. et al., 2010).

La **quantità** teorica di **DNA** è stata ricavata mediante l'utilizzo del **C-value** = quantità di DNA in pg contenuta in una cellula aploide (Yamamoto N. et al., 2010; Hospodsky D. et al., 2010).

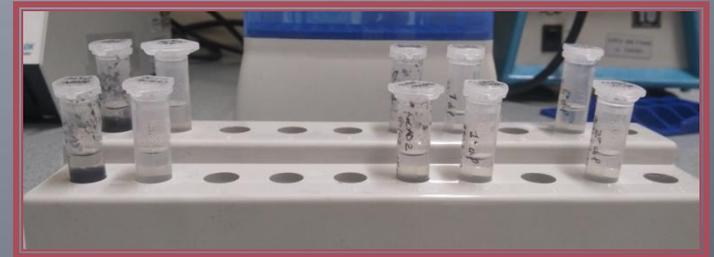
<http://www.zbi.ee/fungal-genomesize>

Es:  $1,2 \times 10^8 \times 0.03 = 3.6 \times 10^6$  pg DNA

# Estrazione del DNA

Metodo di estrazione basato sull'utilizzo del CTAB (POS VIR 031 INT rev.1 del 11/05/2011, IZSLT )

- Lisi cellulare
- Purificazione del DNA
- Precipitazione del DNA
- Lavaggio del DNA
- Risospensione del DNA
- Valutazione quali-quantitativa del DNA estratto (spettrofotometro)



# Estrazione del DNA da spore

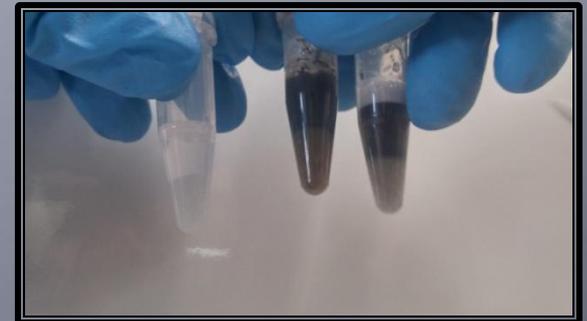
Per le spore è necessario effettuare un **pre-trattamento di tipo meccanico** (biglie di vetro) per la rottura della parete cellulare.

Sono stati testati diversi protocolli:

- Dean T.R. et al., 2004
- Pashley C. H. et al., 2012
- Yamamoto N. et al., 2010

Il **protocollo finale scelto**:

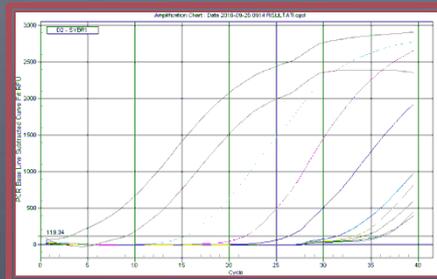
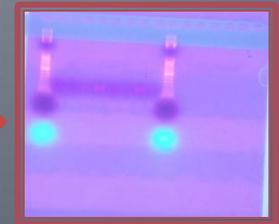
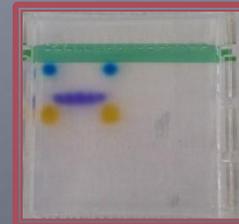
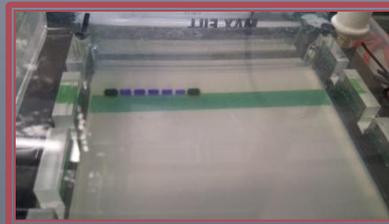
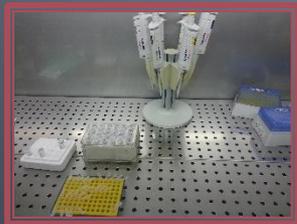
- **pre-trattamento meccanico 2'** (Pashley C. H. et al., 2012)
- **estrazione e purificazione del DNA con CTAB**



# POLLINI

## Amplificazione DNA tramite PCR end point e real-time

Primers disegnati sulla sequenza del gene **tRNA-LEU** per la verifica dell' estrazione di DNA vegetale (Laube I. et al., 2010). Sequenza già utilizzata per rilevare i pollini nel miele.



# SPORE FUNGINE

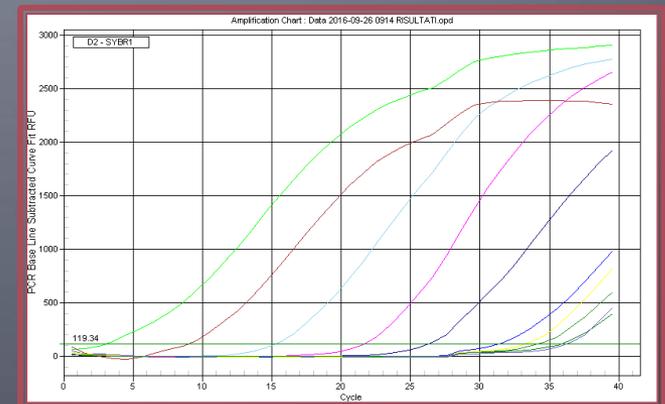
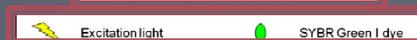
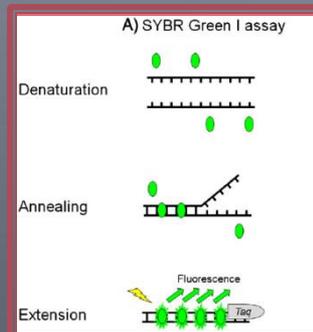
## Amplificazione DNA tramite Real-time PCR

Primers disegnati per la verifica della presenza di DNA fungino: **ITS** (ITS<sub>1</sub> e ITS<sub>4</sub>) (ITS=Internal Transcribed Spacer rDNA. White et al., 1990; Gardes & Bruns 1993).

Primers disegnati per la rilevazione di DNA caratteristico del genere:

**ALT** (*Alternaria spp.*) (ITS. Crespo-Sempere A. et al., 2013).

**CLAD** (*Cladosporium spp.*) (SSU = Small Sub Unit rDNA. Qing-Yin Zeng et al., 2006).



Chimica utilizzata per la rilevazione dell'amplificato → **SYBR Green I**

# Protocolli termici di amplificazione tramite Real-time PCR

**ITS**  
(ARPA VdA)



Attivazione Taq	95°C	x	5 min
Denaturazione DNA	95°C	x	15 sec
Annealing e estensione	60°C	x	60 sec
Melting	55°C → 95°C (0,5°C t= 30")		

} 40 cicli

**ALT**  
(ARPA VdA)



Attivazione Taq	95°C	x	3 min
Denaturazione DNA	95°C	x	10 sec
Annealing e estensione	60°C	x	30 sec
Melting	55°C → 95°C (0,5°C t= 30")		

} 40 cicli

**CLAD**  
(Qing-Yin Zeng et al., 2006)



Attivazione Taq	95°C	x	5 min
Denaturazione DNA	95°C	x	10 sec
Annealing e estensione	68°C	x	30 sec
Melting	55°C → 95°C (0,5°C t= 30")		

} 40 cicli

# Risultati ottenuti POLLINI

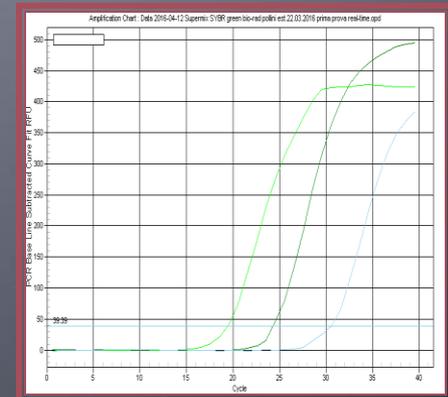
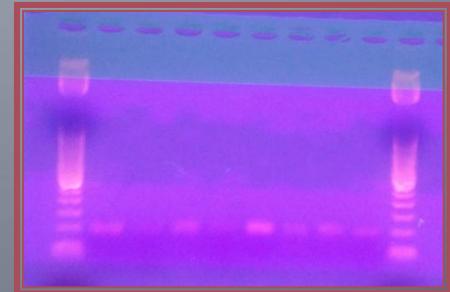
Pollini → Studio preliminare.  
PCR end point, poche prove in PCR real-time.  
No prove di specificità ed efficienza.

Estrazione del DNA e amplificazione delle sequenze generiche (tRNA-Leu).



**Pollini raccolti da vetrino di monitoraggio simulato** (i pollini sono stati a contatto con la fucsina per poche ore) → fino **10<sup>4</sup>** pollini/vetrino.

**Pollini raccolti da infiorescenze** (Diluizioni seriali del DNA estratto) → fino a **10<sup>2</sup>** pollini.

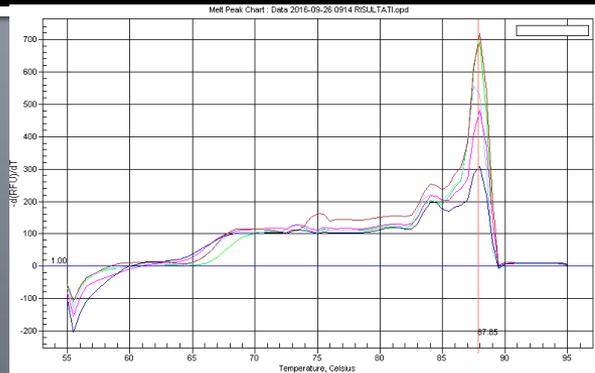


# Risultati ottenuti

## SPORE

### Specificità PCR

ITS →

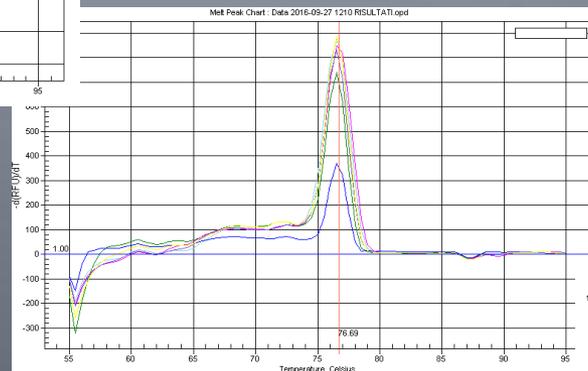


Analisi delle curve di melting:

tasso di diminuzione della fluorescenza nel tempo ( $-dF/dT$  della funzione descritta dal segnale). Rilevano amplificazioni non specifiche e dimeri di primers.

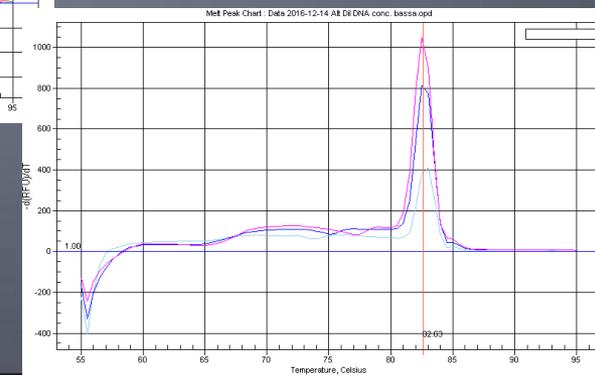
**SYBR Green I**: legame aspecifico con il DNA. Specificità della reazione data solo dai primers.

CLAD →



Il grafico di amplificazione non da informazioni sulla specificità del segnale.

ALT →

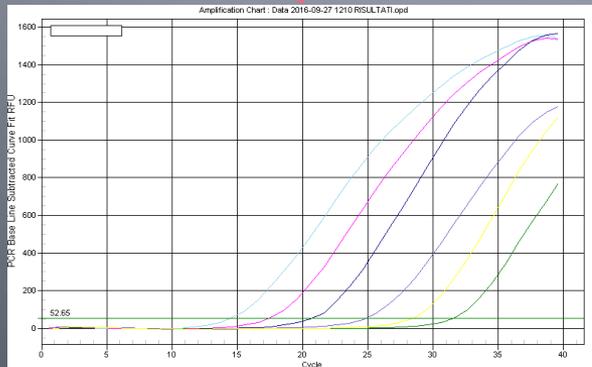


# Risultati ottenuti

## SPORE

## Efficienza PCR

### Curva di Amplificazione

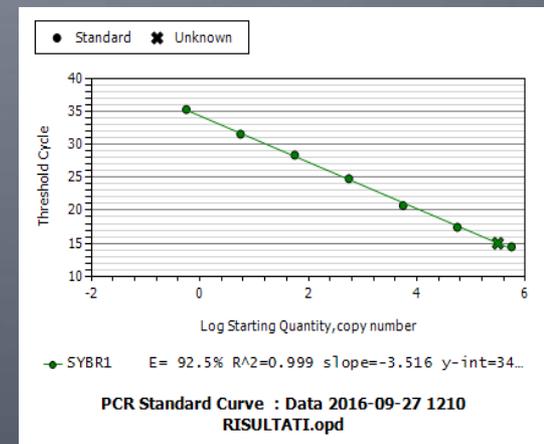


**Threshold:** linea che distingue un segnale significativo di amplificazione rispetto al rumore di fondo.

**Threshold Cycle (Ct):** numero di cicli al quale il segnale fluorescente della reazione supera la linea soglia. E' inversamente proporzionale alla quantità di DNA target presente.

**Curva Standard:** retta di taratura costruita con diluizioni seriali del DNA target (standard). Serve per determinare l'efficienza di reazione e per quantificare i campioni ignoti.

Log quantità DNA / Threshold Cycle (Ct)

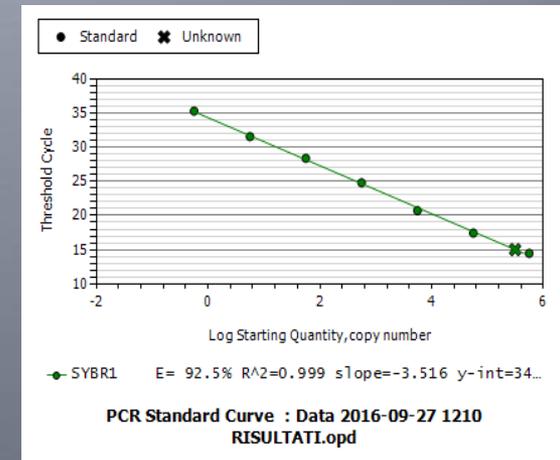


# Risultati ottenuti

## SPORE

### Efficienza PCR

Primers	Efficienza (90-110%)	Slope (-3.58; -3.10)	Coeff. di correlazione (R <sup>2</sup> )	Y-intercetta (Ct)
ITS su Cladosporium	62,7 %	-4.480	0.998	41
ITS su Alternaria	74.5 %	-4.137	0.990	36
CLAD	92.5%	-3.516	0.999	34
ALT	91.9%	-3.532	0.996	36



**Efficienza** del 100% = la quantità di DNA raddoppia ogni ciclo (durante la fase esponenziale di amplificazione).

**Slope (pendenza)** = numero di cicli che intercorrono tra due diluizioni 1:10 dello standard (teorico -3.32).

**Coeff. di correlazione (R<sup>2</sup>)** = riflette la linearità della *standard curve* (esprime la correlazione esistente tra i dati. Ideale=1).

**Y-intercetta** = definisce il numero di cicli necessari per rilevare una copia di DNA target (corrisponde al limite teorico di rilevazione).

# Risultati ottenuti

## SPORE

### Riproducibilità PCR

Primers	Conteggio spore estratte (spore/reazione)	Ct medio (threshold = 189.66)	Dev standard (SR)	Riproducibilità $R = 2 * \sqrt{2} * SR$	CV % (SR/Ct medio)
ITS Cladosporium	$5.6 \times 10^6$	6.70	4.85	13.71	72.69
ITS Alternaria	$1.4 \times 10^5$	16.56	2.77	7.83	16.72

Riproducibilità = ripetizione dello stesso campione, con le stesse condizioni di PCR, in sedute analitiche diverse.

Primers	Conteggio spore estratte (spore/reazione)	Ct medio (threshold = 53)	Dev standard (SR)	Riproducibilità $R = 2 * \sqrt{2} * SR$	CV % (SR/Ct medio)
CLAD	$5.6 \times 10^6$	13.44	1.61	4.55	11.98
ALT	$4.8 \times 10^5$	25.79	2.26	6.40	8.77

# Risultati ottenuti SPORE

## Sensibilità PCR

*The reaction sensitivity is different from the method sensitivity. The reaction sensitivity can be precisely defined by amount of the nucleic acid used as template (ISO 22118:2011)*

Primer	Spore/reazione	pg DNA/reazione (genoma aploide)	Limiti bibliografia	Handbook REAL-TIME PCR (Invitrogen)
CLAD	0.56*	0.017* pg	Potenzialmente 1 spora/reazione (0.04 pg) (Qing-Yin Zeng et al., 2006)	100pg-1µg  =
ALT	13.5*	0.4* pg	75 copie di DNA (4 pg) (Andersen B. et al., 2006)	10-1000 copie di DNA

\*Valori indicativi calcolati su una sola ripetizione per livello di diluizione di DNA

Limite teorico → 1 spora/reazione (y-int )

ITS → Questi calcoli non sono stati eseguiti in quanto l'efficienza di PCR è bassa.

# Risultati ottenuti SPORE

## Confronto tempi di rottura meccanica

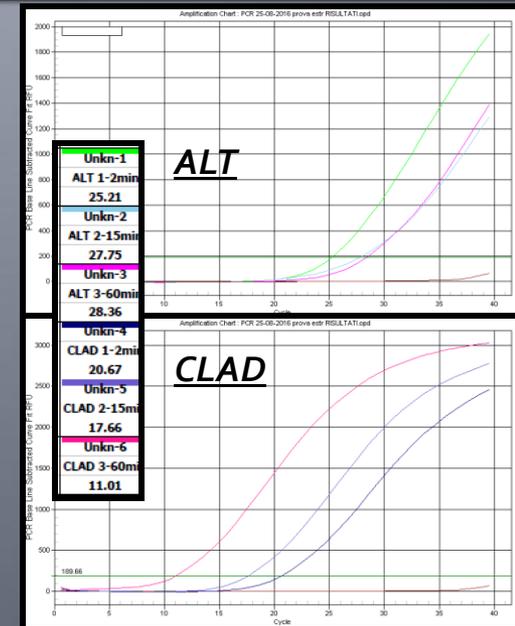
Spora	Conteggio spore	Tempi di rottura con biglie	Risultati PCR (Ct) (Primers ITS)
<i>Alternaria</i>	1.0 x 10 <sup>6</sup>	2 min	25.21
		15 min	27.75
		60 min	28.36
<i>Cladosporium</i>	1.7 x 10 <sup>7</sup>	2 min	20.67
		15 min	17.66
		60 min	11.01

Risultati indicativi (effettuata una sola prova)

### Risultati opposti tra *Alternaria* e *Cladosporium* (confronto Ct):

- *Alternaria* → 2' sembra migliore (Ct più basso); no differenze tra 15' e 60'
- *Cladosporium* → meglio a 60', poi 15' e 2'; si evidenziano differenze maggiori.

I tempi di pretrattamento meccanico sembrano influenzare il risultato dell'estrazione (necessario approfondimento).



# Risultati ottenuti SPORE

## Confronto metodi purificazione

Spora	N° spore/reazione	Metodo di estrazione	Risultati PCR (Ct) Primers specifici	Ct ± R (metodo)
<i>Alternaria</i>	1,7X10 <sup>6</sup>	Pashley*	NA	19.06 ± 11.66
		CTAB	19.06	
	0.7X10 <sup>6</sup>	Pashley*	30.28	24.12 ± 11.66
		CTAB	24.12	
	2X10 <sup>6</sup>	Pashley*	32.97	23.63 ± 11.66
		CTAB	23.63	
<i>Cladosporium</i>	8.5 X10 <sup>6</sup>	Pashley*	19.45	18.96 ± 6.67
		CTAB	18.96	
	6.0X10 <sup>6</sup>	Pashley*	25.12	19.29 ± 6.67
		CTAB	19.29	
	9.3X10 <sup>6</sup>	Pashley*	<b>21.04</b>	14.36 ± 6.67
		CTAB	14.36	



I due metodi differiscono per la procedura di estrazione e purificazione del DNA. Il trattamento di rottura delle spore è il medesimo.

\*DNeasy Plant mini kit (Qiagen)

L'estrazione e purificazione DNA tramite il kit sembra meno performante: Ct rilevati sempre più alti.

NA = non amplificato

21.04 = oltre il limite di riproducibilità del metodo

# Risultati ottenuti

## SPORE

### Confronto estrazioni

➤ Yamamoto N. et al., 2010

➤ Dean T.R. et al., 2004

La purificazione del DNA solo dal surnatante, dopo la rottura meccanica della parete fungina, **non è performante** → DNA rimane nel pellet (scartato dopo i lavaggi).

➤ Pashley C. H. et al., 2012

Il kit di estrazione utilizzato **non ha dato risultati soddisfacenti**.  
Per questo motivo si è scelto di usare il **CTAB**.

# Risultati ottenuti

## SPORE

### Sensibilità metodo

The method sensitivity is, among other thing, dependent on the efficiency recovery of the extraction per concentration (ISO 22118:2011)

	<u>Efficienza estrazione</u> (DNA misurato allo spettrofotometro/DNA atteso dal conteggio) x 100	Limiti espressi in bibliografia	<u>Sensibilità</u> (spore/reazione)	Limiti espressi in bibliografia (spore/reazione)
Cladosporium spp.	24%	22-54% (Yamamoto N. et al., 2009)	$10^2$	$10^3$ - $10^2$ (Dean T.R. et al., 2004)
Alternaria spp.	Non calcolabile*	19% (Yamamoto N. et al., 2010)	$10^5$	$10^2$ (Crespo-Sempere A. et al., 2013)

\* il limite di rilevabilità del nostro spettrofotometro ( $2,4\mu\text{g/ml}$ ) coincide con la quantità di DNA che teoricamente possiamo ricavare dalle spore che raccogliamo.

#### Sensibilità del metodo:

*Cladosporium* → in linea con quanto indicato in bibliografia  
*Alternaria* → molto al di sopra di quanto indicato in bibliografia

# Risultati ottenuti

## SPORE

### Riproducibilità del metodo

Spora	Conteggio spore (stock)	Ct med (threshold =53)	Dev standard (SR)	Riproducibilità $R = 2 * \sqrt{2} * SR$	CV % (SR/Ct medio)
<b>CLAD</b> <i>Cladosporium</i>	$10^8$ ( $5 \times 10^6$ spore/reaz.)	17.81	2.93	6.67	16.43
<b>ALT</b> <i>Alternaria spp.</i>	$10^7$ ( $5 \times 10^5$ spore/reaz.)	23.94	4.17	11.66	17.40

10 ripetizioni (estrazione del DNA da stock con quantità di spore uguali e successiva reazione di PCR real-time con i primers indicati)

# Risultati ottenuti SPORE

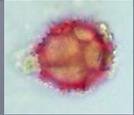
## Vetrini monitoraggio veri o simulati

	Campione	Conteggio spore estratte	Ct
1 prova	Vetrini di monitoraggio veri (Primer ITS)	$10^6$	NA
2 prova	Vetrini di monitoraggio veri (Primer ITS)	$10^6$	NA
3 prova	Vetrini simulati - non colorati (Primer ITS)	$10^8$	17.17
	Vetrini simulati - FUCS poche ore (Primer ITS)	$10^8$	19.96
4 prova	Vetrini simulati - non colorati (Primer CLAD)	$10^8$	20.36
	Vetrini simulati - FUCS poche ore (Primer CLAD)	$10^8$	25.41
5 prova	Vetrini simulati - non colorati (Primer CLAD)	$10^6$	22.69
	Vetrini simulati - non colorati (Primer CLAD)	$10^5$	28.39
	Vetrini simulati - FUCS 1 settimana (Primer CLAD)	$10^6$	NA
	Vetrini simulati - FUCS 1 settimana (Primer CLAD)	$10^5$	NA
	Vetrini simulati - non colorati (Primer ALT)	$10^7$	23.23
	Vetrini simulati - non colorati (Primer ALT)	$10^6$	NA
	Vetrini simulati - FUCS 1 settimana (Primer ALT)	$10^7$	NA
	Vetrini simulati - FUCS 1 settimana (Primer ALT)	$10^6$	NA

Il contatto prolungato con la fucsina interferisce con la reazione di PCR



# Conclusioni POLLINI



I risultati ottenuti fino ad ora indicano che è **possibile**, con il metodo messo a punto nel laboratorio dell'ARPA Valle d'Aosta, **rilevare** i pollini raccolti da **vetrino di monitoraggio simulato** (i pollini sono stati a contatto con la fucsina per poche ore) fino a circa **10<sup>4</sup>** pollini/vetrino (corrispondenti a circa 800 pollini/reazione). Non sono state studiate le caratteristiche di performance di questo metodo.

Il numero di pollini teoricamente rilevabili è **molto al di sopra** dei conteggi riscontrati normalmente sui vetrini di monitoraggio.



# Conclusioni

## SPORE

### Reazione di PCR



**PCR ITS** → pensato come utilizzabile per uno screening iniziale della presenza di spore. Il sistema da noi utilizzato ha un' **efficienza molto bassa**, in quanto i primers non sono sufficientemente specifici ⇒ necessario utilizzare **primers diversi**.



**PCR CLAD**



**PCR ALT**

Ha dimostrato **buone** caratteristiche di **performance**.  
E' stata utilizzata con successo nella sperimentazione.

# Conclusioni SPORE



*Cladosporium spp.* → Il metodo, ha dimostrato buona efficienza, specificità, riproducibilità e sensibilità ( $10^2$  spore/reazione).



*Alternaria spp.* → sono state evidenziate alcune **criticità** nella fase di **estrazione** e **purificazione** dell'acido nucleico. Le condizioni utilizzate per *Cladosporium spp* non sembrano adeguate a **spore di grandi dimensioni** (Yamamoto N. et al., 2010).  
E' anche possibile che lo **stato fisiologico** dei conidi influenzi l'efficienza di estrazione del DNA (Andersen B. et al., 2006).



L'**applicabilità** del metodo sui vetrini del monitoraggio aerobiologico, dopo colorazione con fucsina, **non è stata dimostrata.**

# GRAZIE PER L'ATTENZIONE!



Il lavoro non è ancora concluso, necessita di ulteriori approfondimenti, che verranno sviluppati nei prossimi mesi.

I risultati conclusivi verranno pubblicati, in forma più esaustiva, nella tesi presentata presso la Scuola di Specializzazione in Microbiologia e Virologia dell'Università di Torino (luglio 2017).



# Bibliografia

- 1) Andersen B., Smedsgaard J., Jorring I., Skouboe P., Hagsholm Pedersen L. (2006). Real-time PCR quantification of the AM-toxin gene and HPLC qualification of toxigenic metabolites from *Alternaria* species from apples. *Int. J. Food Microbiol.* 111:105-111.
- 2) Crespo-Sempere A., Estiarte N., Marin S., Sanchis V., Ramos A.J. (2013). Propidium monoazide combined with real-time quantitative PCR to quantify viable *Alternaria* spp. contamination in tomato products. *Int. J. Food Microbiol.* 165:214-220.
- 3) Dean T.R., Betancourt D., Menetrez M.Y. (2004). A rapid DNA extraction method for PCR identification of fungal indoor air contaminants. *J. Microbiol. Methods*, 56: 431-434.
- 4) Gardes M., Bruns T.D. (1993). ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes--application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Mol. Ecol.* 2:113-8. doi: 10.1111/j.1365-294X.1993.tb00005.x
- 5) Hospodsky D., Yamamoto N., Peccia J. (2010). Accuracy, Precision, and method detection limits of quantitative PCR for airborne bacteria and fungi. *App. Environ. Microbiol.* 76: 7004-7012
- 6) Keswani J., Kashon M. L., Chen B.T. (2005). Evaluation of interference to conventional under real-time PCR for detection and quantification of fungi in dust. *J. Environ. Monit.* 7:311-318
- 7) Laube I., Hird H., Brodmann P., Ulmann S., Shone-Michling M., Chisholm J., Broll H. (2010). Development of primer and probe sets for the detection of plant species in honey. *Food Chemistry.* 118: 979-986
- 8) Pashley C.H., Fairs A., Free R.C., Wardla A.J. (2012). DNA analysis of outdoor air reveals a high degree of fungal diversity, temporal variability, and genera not seen by spore morphology. *Fungal Biology*, 116 : 2014-224
- 9) Pavón M.A., Gonzalez I., Pegels N., Martin R., Garcia T. (2010). PCR detection and identification of *Alternaria* species-groups in processed foods based on the genetic marker Alt A1. *Food Control*, 21:1745-1756.
- 10) Tonge D.P., Pashley C.H., Gant T.W. (2014). Amplicon-based metagenomic analysis of mixed fungal samples using proton release amplicon sequencing. *PLoS ONE* 9 (4) : e 93849. doi: 10.1371/journal.pone.0093849
- 11) White T. J., Bruns T., Lee S., Taylor J. (1990). PCR protocols . Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. doi: 10.1016/b978-0-12-372180-8.50042-1
- 12) Yamamoto N., Matsuzaka Y., Kimura M., Matsuki H., Yanagisawa Y. (2009). Comparison of dry- and wet-based fine bead homogenization to extract DNA from fungal spores. *J. Biosci. Bioeng.*, 107: 464-470.
- 13) Yamamoto N., Kimura M., Matsuki H., Yanagisawa Y. (2010). Optimization of a real-time PCR assay to quantitate airborne fungi collected on a gelatin filter. *J. Biosci. Bioeng.*, 109: 83-88
- 14) Zeng Q.Y., Westermark S.O., Rasmuson-Lestander A. , Wang X.R. (2006). Detection and quantification of *Cladosporium* in aerosols by real-time PCR . *J. Environ. Monit.*, 8:153-160.
- 15) ISO/TR 13843:2000 Water Quality \_ Guidance on validation of microbiological methods.
- 16) ISO 22118:2011 Microbiology of food and animal feeding stuffs- Polymerase chain reaction (PCR) for the detection and quantification of food-borne pathogens – Performance characteristics.
- 17) Real-Time PCR: From theory to practice. HandBook (www.invitrogen.com)