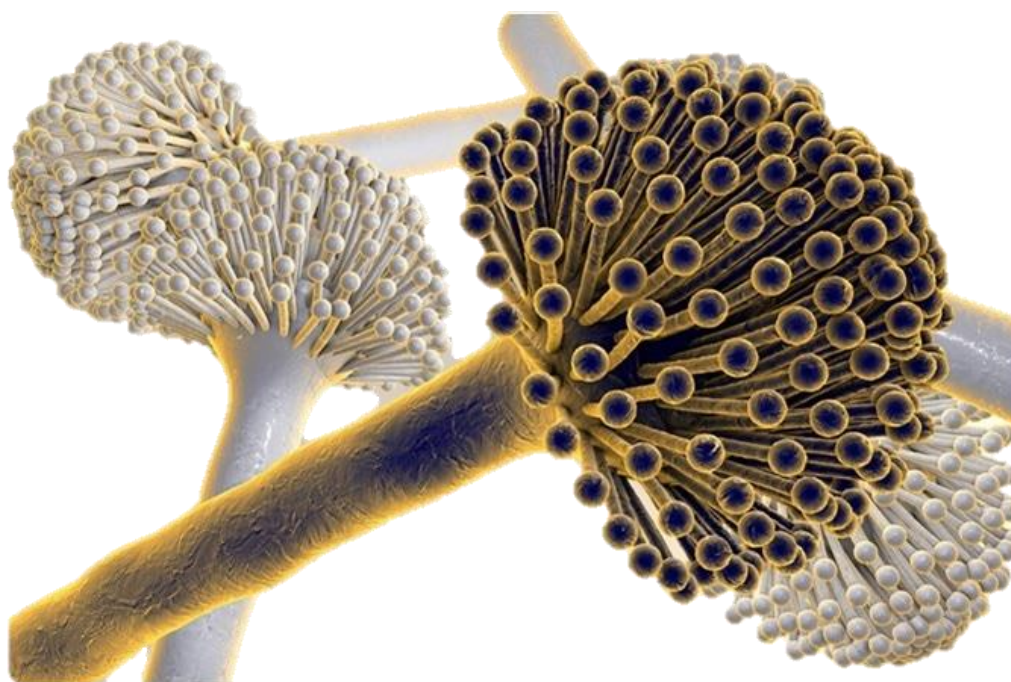


GUÍA DE PROCEDIMIENTO PARA DETECCIÓN MOLECULAR DE
ASPERGILLUS SP. Y *ASPERGILLUS TERREUS* POR PCR EN TIEMPO REAL**Guía de Procedimiento para Detección Molecular de
Aspergillus sp. y *Aspergillus terreus* por PCR en Tiempo Real****Servicio de Patología Clínica
Sub Unidad de Apoyo al Diagnóstico**

| | | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Elaborado por: | Revisado por: | Aprobado por: |
| Equipo Técnico del Laboratorio de Histocompatibilidad y Biología Molecular del Servicio de Patología Clínica. | <ul style="list-style-type: none">• Unidad de Soporte al Diagnóstico y Tratamiento• Unidad de Gestión de la Calidad | Dr. Antonio Ricardo Zopfi Rubio Director (e) del Instituto Nacional de Salud del Niño - San Borja |



GUÍA DE PROCEDIMIENTO PARA DETECCIÓN MOLECULAR DE
ASPERGILLUS *SP.* Y *ASPERGILLUS TERREUS* POR PCR EN TIEMPO REAL

**Guía de Procedimiento para Detección Molecular de
Aspergillus sp. y *Aspergillus terreus* por PCR en Tiempo Real**

| | | |
|-------|---------------------------------------------------------|----|
| I. | Titulo..... | 3 |
| II. | Finalidad..... | 3 |
| III. | Objetivos | 3 |
| IV. | Ámbito de Aplicación..... | 3 |
| V. | Nombre del proceso o Procedimiento y Código CPT | 3 |
| VI. | Consideraciones Generales..... | 3 |
| a. | Definiciones Operativas..... | 3 |
| 1 | Definición del procedimiento | 3 |
| 2 | Consentimiento informado..... | 4 |
| b. | Conceptos Básicos | 4 |
| c. | Requerimientos Básicos | 4 |
| VII. | Consideraciones Específicas | 6 |
| a. | Descripción detallada del Proceso o Procedimiento | 6 |
| b. | Indicaciones | 13 |
| 1 | Indicaciones Absolutas..... | 13 |
| 2 | Indicaciones Relativas | 13 |
| c. | Riesgos o Complicaciones Frecuentes | 14 |
| d. | Riesgos o Complicaciones poco Frecuentes | 14 |
| e. | Contraindicaciones | 14 |
| VIII. | Autores, Fecha y Lugar | 14 |
| IX. | Bibliografía..... | 14 |



GUÍA DE PROCEDIMIENTO PARA DETECCIÓN MOLECULAR DE
ASPERGILLUS *sp.* Y *ASPERGILLUS TERREUS* POR PCR EN TIEMPO REAL

**Guía de Procedimiento para Detección Molecular de
Aspergillus sp. Y *Aspergillus terreus* por PCR en Tiempo Real**

I. Título

Procedimiento para Detección Molecular de *Aspergillus sp.* y *Aspergillus terreus* por PCR en Tiempo Real.

II. Finalidad

Determinar los procedimientos técnicos para la correcta detección molecular de *Aspergillus sp.* y *Aspergillus terreus* por PCR en tiempo real.

III. Objetivos

Realizar el procedimiento de Detección Molecular de *Aspergillus sp.* y *Aspergillus terreus*, por PCR en tiempo Real (qPCR) a partir de muestras de plasma y lavado broncoalveolar (LBA).

IV. Ámbito de Aplicación

El presente procedimiento será aplicado por el laboratorio de Histocompatibilidad y Biología Molecular del Servicio de Patología Clínica del INSN - San Borja

V. Nombre del proceso o Procedimiento y Código CPT

Detección Molecular de *Aspergillus sp.* y *Aspergillus terreus* por PCR en Tiempo Real.

CPT: 8780007

VI. Consideraciones Generales

a. Definiciones Operativas

1 Definición del procedimiento

La detección molecular *Aspergillus sp.* en muestras clínicas humanas (plasma y LBA) mediante las técnicas de Biología Molecular como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) son utilizadas por su alta sensibilidad y rapidez; el diagnóstico precoz es primordial para una pronta administración terapéutica en pacientes con factores de riesgo de padecer IA.

La detección de *Aspergillus spp.* consiste de un pre tratamiento de la muestra para la desintegración de la pared celular fúngica, que posteriormente aumenta la eficacia de la extracción de ADN; seguido por la extracción del ADN fúngico y

GUÍA DE PROCEDIMIENTO PARA DETECCIÓN MOLECULAR DE
ASPERGILLUS SP. Y *ASPERGILLUS TERREUS* POR PCR EN TIEMPO REAL

finalmente la amplificación de una secuencia de ADN ribosomal específica (región rDNA ITS2/28S) y en la medición del aumento de la fluorescencia.

La presencia de *Aspergillus spp.* está indicada por el crecimiento de fluorescencia de fluoróforo FAM y la presencia de *Aspergillus terreus* está indicada por el crecimiento de fluorescencia de fluoróforo Cy5. Un estándar interno (IS) se incluye en la mezcla de reacción, controla la posible inhibición del PCR y muestra la calidad del proceso de extracción de ADN. La amplificación positiva de IS se detecta en el canal de fluorescencia de fluoróforo HEX.

El kit de detección aprovecha la tecnología "hotstart", minimiza las reacciones inespecíficas y asegura la máxima sensibilidad. La MasterMix contiene uracil-DNA-glycosylase (UDG), eliminando la posible contaminación del PCR con productos de amplificación. Se reporta esta prueba cualitativa como positivo o negativo.

2 Consentimiento informado

No requiere

b. Conceptos Básicos

- **La aspergilosis invasiva (IA)** es una complicación importante en pacientes inmunocomprometidos como en pacientes con leucemia aguda o pacientes que recibieron un alotrasplante de células madre. Las tasas de mortalidad por IA son altas, hasta en un 89%; esto está relacionado con las dificultades para diagnosticar IA debido a signos clínicos inespecíficos y tardíos, por lo cual se busca procedimientos más rápidos, sensibles y específicos para su detección.

c. Requerimientos Básicos**Recursos Humanos**

- Médico Patólogo Clínico.
- Biólogo.
- Técnico de Laboratorio.

Equipos Biomédicos

- Termociclador en Tiempo Real
- Cabina de Bioseguridad Clase II-A2
- Ultracentrifuga refrigerada
- Termobloque de calor seco

GUÍA DE PROCEDIMIENTO PARA DETECCIÓN MOLECULAR DE
ASPERGILLUS SP. Y *ASPERGILLUS TERREUS* POR PCR EN TIEMPO REAL

- Vórtex
- Micropipetas 1-10 µl
- Micropipeta de 2 – 20 µl
- Micropipetas 20 – 200 µl
- Micropipeta de 100 – 1000 µl
- Congeladora de - 70 °C
- Congeladora de - 20 °C
- Refrigeradora de 2 - 8 °C

Material médico no Fungible

- Tips con filtro de 1 – 10 µl
- Tips con filtro de 2 – 20 µl
- Tips con filtro de 20 – 200 µl
- Tips con filtro de 100 – 1000 µl
- Crioviales de 2.0 ml
- Gradillas para tubos de 2.0 ml
- Gradilla de tubos de 12 x 75 mm
- Criobox
- Contenedor de desechos biológicos de 1L
- Contenedor de desechos biológicos de 4L
- Placas de PCR
- Tapas de microtubos de 0.2 ml para PCR en Tiempo Real.

Material médico Fungible

- **Reactivos**
 - Kit de Extracción de ADN viral (IVD).
 - Kit para Pre Pretatamiento de muestras.
 - Kit de PCR en Tiempo Real para Detección de *Aspergillus* sp. y *Aspergillus terreus* (IVD).
- **Materiales**
 - Papel absorbente.
 - Guantes de nitrilo
 - Gafas protectoras.
- **Soluciones**
 - Etanol Absoluto



Ministerio
de Salud

Instituto Nacional
de Salud del Niño
San Borja



GUÍA DE PROCEDIMIENTO PARA DETECCIÓN MOLECULAR DE ASPERGILLUS SP. Y ASPERGILLUS TERREUS POR PCR EN TIEMPO REAL

VII. Consideraciones Específicas

a. Descripción detallada del Proceso o Procedimiento

Procedimientos

Tiempo: 430 minutos

➤ Preparación de la Muestra (50 Minutos)

Al inicio del trabajo

- 1 Toda muestra debe ser ingresada con letra legible, especificando el tipo de prueba a realizarse en el Registro General de Toma de Muestra del Servicio de Patología Clínica.
- 2 En caso de las muestras referidas, verificar la legibilidad de los nombres tanto del paciente como del médico solicitante al momento de recepcionar la muestra.
- 3 Las muestras de sangre para este examen solo deben ser obtenidas por punción directa en un tubo para extracción de sangre al vacío con EDTA y no debe ser abierto hasta encontrarse dentro de una cabina de bioseguridad.
- 4 Es obligatorio utilizar bata, guantes y lentes de protección durante todo el tiempo de trabajo en el laboratorio.
- 5 Toda muestra debe ser considerada **potencialmente infecciosa** y se deben tomar las precauciones que garanticen la seguridad del flebotomista y de los pacientes.
- 6 Antes de iniciar cualquier procedimiento, limpiar con alcohol Etílico al 70% o Hipoclorito de sodio al 10 % las superficies de las mesas de trabajo.
- 7 Utilizar contenedores de descarte para objetos punzo cortantes y biocontaminados.

Numeración

- 1 Verificar la calidad de las muestras de sangre obtenidas, por ejemplo: hemólisis, lipemia, ictericia, etc (Describir en la orden de ser el caso).
- 2 Numerar en orden correlativo cada una de las muestras extraídas consignando los siguientes datos:
 - Tipo de Examen solicitado
 - Tipo de muestra
 - Fecha de la toma de muestra

| | | |
|------------|------------------------------------|----------------|
| Marzo 2019 | GP - 027/INSN-SB/USDXT- PC-V.01 | Página 6 de 14 |
|------------|------------------------------------|----------------|

**GUÍA DE PROCEDIMIENTO PARA DETECCIÓN MOLECULAR DE
ASPERGILLUS SP. Y ASPERGILLUS TERREUS POR PCR EN TIEMPO REAL**

- Procedencia de la muestra: Sangre Periférica (Punción) o Catéter venoso central (CVC)
- 3 La numeración asignada debe estar indicada en la orden de laboratorio como en el tubo que contiene la muestra. Ejemplo:
- Aspergillus-LBA/01-10-18
 - Aspergillus-PLASMA/01-10-18
- 4 Reposar las muestras extraídas en posición vertical por 20 minutos a temperatura ambiente.

Transporte y Almacenamiento

- 1 Rotular en orden correlativo los tubos o crioviales necesarios que se enviarán al laboratorio según la cantidad de muestras, indicando los siguientes datos:

- Nombre del Paciente
- Numeración asignada según tipo de examen solicitado
- Fecha de toma de muestra.

Ejemplo:

Pablo Ruiz Fernández

Aspergillus-PLASMA/01-10-18

- 2 Para obtener la muestra de plasma necesaria para el estudio; centrifugar las muestras de SANGRE; extraídas en tubos con EDTA; a 3000 rpm y/o 1100 g por 20 minutos, transferir el plasma (sobrenadante) a un criovial de almacenamiento (tapa rosca) de 2 ml o viales de 1,5 ml, debidamente rotulado. Utilizar pipetas de transferencia estériles de 3 ml.
- 3 Las muestras de lavado broncoalveolar son tomados por el médico especialista y enviadas al laboratorio debidamente identificadas sin apertura del recipiente de colecta.
- 4 En caso de que el proceso no se realice el mismo día de toma de muestra, el almacenaje de las muestras procederá de acuerdo a parámetros de estabilidad de muestra, tal como se detalla en el siguiente cuadro:

| VIRUS | Muestra | Almacenaje | Estabilidad de la Muestra |
|--------------------------|-----------------------------|----------------------|---------------------------|
| Aspergillus spp (ASP) | Plasma | Refrigeración (4 °C) | 12 horas |
| | Lavado Broncoalveolar (LBA) | Refrigeración (4 °C) | 48 horas |

GUÍA DE PROCEDIMIENTO PARA DETECCIÓN MOLECULAR DE
ASPERGILLUS SP. Y *ASPERGILLUS TERREUS* POR PCR EN TIEMPO REAL**Al Final del trabajo**

- 1 Limpiar la superficie de la mesa de trabajo utilizada.
- 2 Dejar los materiales utilizados en su lugar respectivo.
- 3 Eliminar los guantes y/o otros materiales descartables en los reservorios adecuados (bolsa roja).
- 4 Lavarse las manos con jabón desinfectante disponible.

➤ Extracción de ADN Viral (170 Minutos)**Pretratamiento de la muestra**

1. Incubar el tubo que contiene el buffer MS2 por 10 minutos a 40° C; homogeneizar por vórtex hasta disolver el precipitado que se forma en el tubo.
2. Agregar 1 mL del material biológico (plasma ó LBA) en el tubo que contiene perlas especialmente modificadas.
3. Incubar a 37°C por 15 minutos y continuamente mezclar por vórtex.
4. Centrifugar por 1 minuto a 11 000 g.
5. Remover 850 µl del sobrenadante y descartar.
6. Lisar la muestra que queda en el tubo (150 µl) adicionándole 25 µ de MS1 y 100 µl de MS2, homogeneizar por vórtex (Aproximadamente por 10 segundos).
7. Incubar el tubo de muestra a 70°C por 15 minutos.
8. Homogeneizar la solución por vórtex (Aproximadamente por 10 segundos).
9. Después de la incubación la muestra está lista para la extracción del DNA fúngico.

Preparación de los reactivos

1. Extraer del congelador de -20°C el Control Interno de Extracción (IC) y dejar a temperatura ambiente.
2. Separar (según el número de muestras clínicas y controles a procesar) las columnas de extracción y rotularlas con el número de muestra correspondiente de acuerdo a la lista de trabajo.
3. Agregar 48 mL de Etanol absoluto a la solución de lavado 2 (Buffer B5) y mezclar por inversión. Dejar indicado en el frasco la fecha de preparación.

GUÍA DE PROCEDIMIENTO PARA DETECCIÓN MOLECULAR DE
ASPERGILLUS SP. Y ASPERGILLUS TERREUS POR PCR EN TIEMPO REAL

4. Agregar 1,35 mL de buffer de dilución al frasco que contiene el liofilizado de Proteinasa K, mezclar hasta disolver.
5. Separar en un tubo Falcón de 15 mL o 50 mL la cantidad necesaria de etanol a utilizar según el número de muestras.
6. Colocar el buffer de elución en el termobloque y mantenerlo a 70°C.

Proceso de Extracción

1. Encender la Cabina de Bioseguridad asignada para la extracción de ácidos nucleicos. Ver PC-BM-I-004: INSTRUCTIVO DE MANEJO CABINA DE BIOSEGURIDAD CLASE II TIPO A2.
2. Rotular en orden ascendente el número de crioviales necesarios según la lista de trabajo del día.
3. Mezclar por vórtex vigorosamente las muestras y controles (Aproximadamente por 10 segundos).
4. Dispensar 25 µL de Proteinasa K a cada criovial que se va a utilizar según la lista de trabajo del día.
5. Agregar 5 µL de Control Interno de Extracción (IC) a cada criovial que se va a utilizar según la lista de trabajo del día.
6. Mezclar por vórtex vigorosamente (Aproximadamente por 10 segundos).
7. Agregar 200 µL de las muestras y Control NTC (Buffer de elución), según corresponda.
8. Agregar 200 µL del Buffer de Lisis (B3) a cada muestra.
9. Mezclar por vórtex vigorosamente (Aproximadamente por 10 segundos)
10. Incubar a 70°C por 30 minutos en un termobloque de calor seco.
11. Sacar las muestras y mezclar vigorosamente en el vórtex (Aproximadamente por 10 segundos).
12. Agregar 210 µL de etanol absoluto a cada muestra.
13. Mezclar por vórtex vigorosamente (Aproximadamente por 10 segundos).
14. Trasvasar el contenido de cada criovial en las columnas de extracción identificadas (utilizar pipetas de transferencia de 3 mL).
15. Centrifugar a 11 000 x g por 1 minuto a temperatura ambiente.
16. Colocar las columnas en nuevos tubos de colección y eliminar los anteriores.
17. Agregar 500 µL de solución de lavado 1 (Buffer BW) a cada columna.
18. Centrifugar a 11 000 x g por 1 minuto a temperatura ambiente.
19. Colocar las columnas en nuevos tubos de colección y eliminar los anteriores.
20. Agregar a cada columna 600 µL de buffer de lavado 2 (Buffer B5).

GUÍA DE PROCEDIMIENTO PARA DETECCIÓN MOLECULAR DE
ASPERGILLUS SP. Y *ASPERGILLUS TERREUS* POR PCR EN TIEMPO REAL

21. Centrifugar a 11000 x g por 1 minuto a temperatura ambiente.
22. Colocar las columnas en nuevos tubos de colección y eliminar los anteriores.
23. Centrifugar a 11 000 x g por 2 minutos a temperatura ambiente para secar las columnas.
24. Colocar las columnas en nuevos tubos de colección y eliminar los anteriores.
25. Agregar 50 µL de la solución de elución previamente calentada a 70°C, directamente a la membrana de sílice de las columnas.
26. Incubar por 3 minutos a temperatura ambiente.
27. Centrifugar a 11 000 x g por 2 minutos a temperatura ambiente.
28. La solución eluida contiene ADN viral para el proceso de amplificación. Si no se usa el mismo día congelar a -20°C por un máximo de 24 horas.

➤ **Amplificación por PCR en Tiempo Real (180 Minutos)****Al inicio del trabajo**

1. Es obligatorio utilizar bata, guantes y lentes de protección durante todo el tiempo de trabajo en el laboratorio.
2. Encender la Cabina de Bioseguridad asignada para la preparación y cargado de las reacciones de PCR. Ver PC-BM-I-004: INSTRUCTIVO DE MANEJO CABINA DE BIOSEGURIDAD CLASE II TIPO A2.
3. Retirar los reactivos para la preparación de la mezcla de PCR y los controles de Amplificación del congelador de -20 °C y dejar a temperatura ambiente.
4. Cortar las filas necesarias de la placa de PCR con sus respectivas tapas.

Preparación de la mezcla de PCR

1. Dispensar 30 µL de la master Mix en cada pocillo de la placa de PCR.
2. Agregar 10 µL del Control Positivo (C+), Control NTC (C-) y muestras según el siguiente esquema:

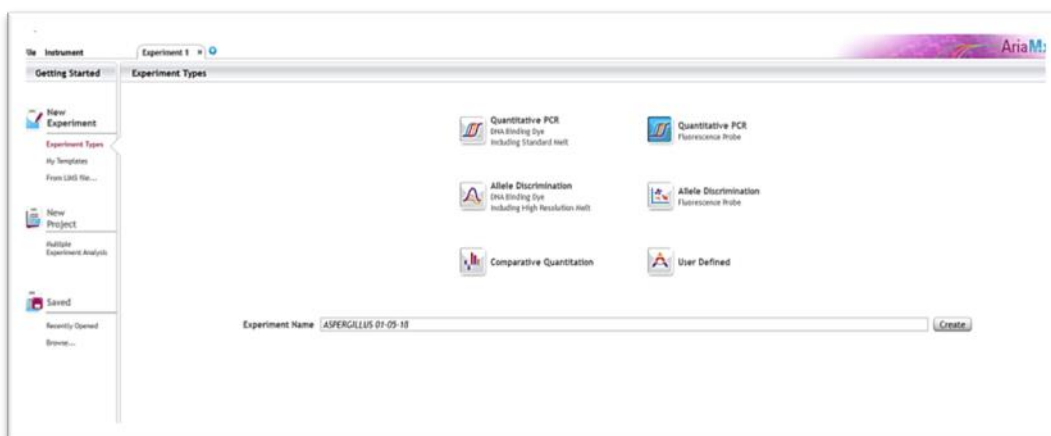
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|-----------|------------|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|
| A | C + | Muestra 4 | | | | | | | | | | |
| B | C - | Muestra 5 | | | | | | | | | | |
| C | Muestra 1 | Muestra 6 | | | | | | | | | | |
| D | Muestra 2 | Muestra 7 | | | | | | | | | | |
| E | Muestra 3 | Muestra 8 | | | | | | | | | | |
| F | Muestra 4 | Muestra 9 | | | | | | | | | | |
| G | Muestra 5 | Muestra 10 | | | | | | | | | | |
| H | Muestra 6 | Muestra 11 | | | | | | | | | | |

GUÍA DE PROCEDIMIENTO PARA DETECCIÓN MOLECULAR DE ASPERGILLUS SP. Y ASPERGILLUS TERREUS POR PCR EN TIEMPO REAL

3. Eliminar las burbujas presentes en la solución.
4. Tape cada pocillo con las tapas especiales para reacciones en PCR en tiempo Real. No tocar las tapas con los dedos.
5. Coloque la placa cargada en el bloque térmico del Termociclador en tiempo Real y cierre la tapa del equipo.

Programación del equipo AriaMX Real-Time PCR System

1. Ingresar al software Mx y elegir Quantitative PCR en la ventana new Options Screen.



2. En el menú de la izquierda en **Experiment Area** seleccionar **Plate setup**:
 - a. En el menú de la derecha, seleccione e indique la posición del Control Positivo en la Placa de PCR en el Mx:
 - i. Well type: Control Positivo
 - ii. Collect Fluorescence data: FAM, HEX, CY5
 - iii. Replicate symbol: none
 - b. En el menú de la derecha, seleccione e indique la posición del Control Negativo en la Placa de PCR en el Mx:
 - i. Well type: Control Negativo
 - ii. Collect fluorescence data: FAM, HEX, CY5
 - iii. Replicate symbol: none.
 - c. En el menú de la derecha definir la posición de las muestras en la Placa de PCR en el Mx.
 - i. Well type: "Unknow"
 - ii. Collect fluorescence data: FAM, HEX, CY5
 - iii. Replicate symbol: none

GUÍA DE PROCEDIMIENTO PARA DETECCIÓN MOLECULAR DE
ASPERGILLUS SP. Y ASPERGILLUS TERREUS POR PCR EN TIEMPO REAL

d. Seleccione cada pocillo y en el menú de la derecha "**Well name**", coloque la información de cada pocillo según corresponda :

- i. Control positivo
- ii. Control negativo
- iii. Nombre del paciente

3. Configurar los parámetros de amplificación PCR con los siguientes datos:

✓ Segmento 01

- UDG decontamination (37°C por 2 min.) -- > 01 Ciclo

✓ Segmento 02

- Initial denaturation (95°C por 10 min.)
 - Denaturation (95°C por 5 s)
 - Annealing (60°C por 40 s)
 - reading of the fluorescence signal
 - Extensión (72°C por 20 s)
- } 45
ciclos

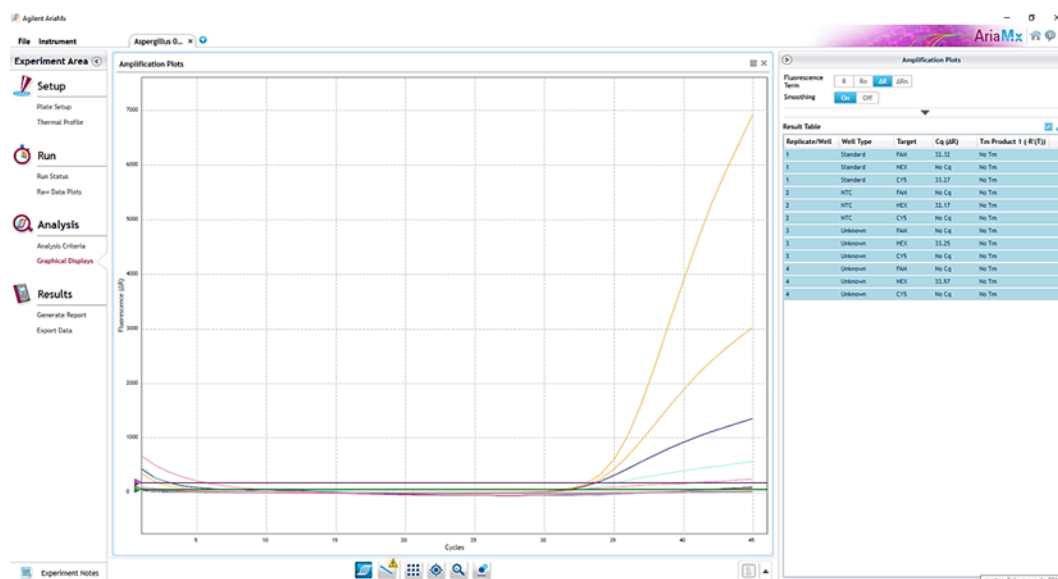
4. Guardar la corrida en la carpeta correspondiente y hacer **click** en Start para iniciar la corrida.

➤ **Análisis de datos y validación de parámetros de amplificación (30 minutos)**

1. Cuando el programa de amplificación haya culminado, hacer click en Instrument Explorer.
2. En la ventana emergente *New_instrument* hacer click en *login*.
3. Se abrirá una ventana hacer click en *Guest* allí se encontrara guardado la corrida, hacer click en la opción *Copy y delete*.
4. Hacer click en Analysis en el menú de la izquierda.
5. Active la pestaña de visualización del canal **FAM** para verificar la amplificación del control positivo y las muestras clínicas que podrían dar positivo para las especies del género *Aspergillus spp*.
6. Active la pestaña de visualización del canal **HEX** para verificar la amplificación de control interno presente en el control negativo y en todas las muestras clínicas.

GUÍA DE PROCEDIMIENTO PARA DETECCIÓN MOLECULAR DE ASPERGILLUS SP. Y *ASPERGILLUS TERREUS* POR PCR EN TIEMPO REAL

7. Active la pestaña de visualización del canal **Cy5** para verificar la amplificación de control positivo y las muestras clínicas que podrían dar positivo para *Aspergillus terreus*.
8. Para mostrar los resultados de detección, hacer click en Export Data.
9. Los resultados se exportaran en una hoja excel, las muestras positivas darán un valor de Ct y las muestras que son negativas serán No Ct.



b. Indicaciones

1 Indicaciones Absolutas

Detección Molecular de *Aspergillus* sp. y *Aspergillus terreus* en pacientes pediátricos remitidos por los diversos servicios del Instituto Nacional del Niño – San Borja (INSN-SB).

2 Indicaciones Relativas

- Detección de *Aspergillus* sp. y *Aspergillus terreus* en pacientes pediátricos hospitalizados o por consulta de los diferentes servicios del INSN-SB.
- Las muestras validadas para la detección de *Aspergillus* sp. y *Aspergillus terreus* por PCR a Tiempo Real son: Plasma y Lavado Broncoalveolar (LBA).



Ministerio
de Salud

Instituto Nacional
de Salud del Niño
San Borja



GUÍA DE PROCEDIMIENTO PARA DETECCIÓN MOLECULAR DE ASPERGILLUS SP. Y ASPERGILLUS TERREUS POR PCR EN TIEMPO REAL

- Las muestras de sangre total en evaluación solo deben de ser extraídas por punción directa en un tubo con EDTA, que no debe ser abierto hasta encontrarse dentro de una cabina de bioseguridad.

c. Riesgos o Complicaciones Frecuentes

Ninguno

d. Riesgos o Complicaciones poco Frecuentes

Ninguno

e. Contraindicaciones

Ninguna

VIII. Autores, Fecha y Lugar

Instituto Nacional de Salud del Niño - San Borja

Laboratorio de Histocompatibilidad y Biología Molecular-Servicio de Patología Clínica.

Sub Unidad de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento

Fecha de Elaboración: Marzo 2019

Vigencia: 02 años

Autores:

- | | |
|---------------------------------------------|-------------------------|
| 1. Blgo. Luis Eduardo Grados Molina | lgrados@insnsb.gob.pe |
| 2. Blga. Giannina Wendy Tineo Pozo, MsC (C) | gtineo@insnsb.gob.pe |
| 3. Dra. Carla Méndez Chacón Rodríguez | cmendez@insnsb.gob.pe |
| 4. Dra. Andrea de María Zavaleta González | azavaleta@insnsb.gob.pe |
| 5. Blga. Madeley Aliaga Zamudio, MsC(C) | maliaga@insnsb.gob.pe |
| 6. Blgo. Luis Martín Cruz Diaz, MsC (C) | lcruz@insnsb.gob.pe |

IX. Bibliografía

- Barnes R. & White P. PCR Technology for Detection of Invasive Aspergillosis. Journal of Fungi. 2016; 2,23.
- Henry T., Iwen P. & Hinrichs S. Identification of Aspergillus Species Using Internal Transcribed Spacer Regions 1 and 2. Journal of Clinical Microbiology. 2000; 1510-1515.
- Narayanan S. The preanalytic phase. An important component of laboratory medicine. Am J Clin Pathol. 2000; 113:429 – 452.
- Protection of laboratory workers from infectious disease transmitted by blood, body fluids and tissue. Tentative Guideline. NCCLS Document M29-T Villanova, PA:NCCLS, 1989. erase chain reactions. Gene. 93(1):125-128.
- Manual de instrucciones del kit GeneProof® DNA Isolation.
- GeneProof Aspergillus PCR kit insert.