

Empleo de la RT-PCR en la detección del SARS-CoV-2

Real-time PCR-based SARS-CoV-2 detection

José Francisco Cancino Mesa^{1*} <https://orcid.org/0000-0002-9328-9856>

Adrián Alejandro Vitón Castillo² <https://orcid.org/0000-0002-7811-2470>

Jorge Casí Torres³ <https://orcid.org/0000-0003-2176-5187>

¹ Universidad de Ciencias Médicas de Granma, Facultad de Ciencias Médicas de Manzanillo Celia Sánchez Manduley. Granma. Cuba

² Universidad de Ciencias Médicas de Pinar del Río, Facultad de Ciencias Médicas Ernesto Guevara de la Serna. Pinar del Río. Cuba

³ Hospital Clínico Quirúrgico Celia Sánchez Manduley, Servicio de Medicina Interna. Manzanillo. Granma. Cuba.

* Autor para la correspondencia: jcancinomesa@gmail.com

RESUMEN

Introducción: la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa es una técnica de alta precisión en la detección y amplificación de material genético.

Objetivo: describir las bases del empleo de la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa como prueba diagnóstica en la detección del SARS-CoV-2.

Método: se realizó una revisión de la literatura en artículos publicados hasta mayo de 2020. Se consultaron las bases de datos: Scopus, Wiley Online Library, SciELO, DIALNET, EBSCO, MEDLINE y PubMed. Se recuperaron artículos en español e inglés, seleccionándose 43 referencias.

Desarrollo: la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa para detectar SARS-CoV-2 consiste en la lectura de la ARN polimerasa dependiente del ARN, fragmentos ORF1ab, el gen E, el gen N y el gen S. El exudado nasofaríngeo ofrece mejores resultados que el orofaríngeo y saliva como muestra. Resulta necesaria la inclusión de pruebas reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR) que utilicen especímenes de hisopado rectal en casos sospechosos falsos negativos. Nuevos estudios y técnicas se elaboran con el objetivo de optimizar el proceso de detección.

Conclusiones: la disponibilidad de pruebas diagnósticas es crucial para el aislamiento de casos positivos y el seguimiento de la cadena epidemiológica de transmisión. La RT-PCR resultó ser la prueba de elección durante el período de replicación viral. La Prueba de amplificación isotérmica mediada por bucle (RT-LAMP) es una alternativa diagnóstica rápida con principios similares a la RT-PCR.

Palabras clave: Infecciones por Coronavirus; Reacción en Cadena de la Polimerasa; Técnicas de Laboratorio Clínico.

ABSTRACT

The reverse transcriptase-polymerase chain reaction is a high precision technique to detect and amplify genetic material.

Aim: To describe the use of the reverse transcriptase-polymerase chain reaction as a laboratory test for the detection of SARS-CoV-2.

Method: a literature review was conducted on articles published up to May 2020. The following databases were consulted: Scopus, Wiley Online Library, SciELO, DIALNET, EBSCO, MEDLINE and PubMed. Articles in Spanish and English were retrieved, selecting 43 references.

Development: the reverse transcriptase-polymerase chain reaction to detect SARS-CoV-2 targets the RNA polymerase dependent RNA, ORF1ab fragments, the E gene, the N gene and the S gene. Nasopharyngeal swabs offer better results than oropharyngeal swabs and saliva as a sample. The inclusion of reverse transcriptase-polymerase chain reaction tests (RT-PCR) using rectal swab specimens in suspected false-negative cases is necessary. New studies and techniques are being developed to optimise the detection process.

Conclusions: the availability of diagnostic tests is crucial for the isolation of positive cases and the monitoring of the transmission chain. RT-PCR proved to be the test of choice during the period of viral replication. The RT-LAMP assay is a rapid diagnostic alternative with similar principles to RT-PCR.

Keywords: Polymerase Chain Reaction; Coronavirus Infections; Clinical Laboratory Techniques

INTRODUCCIÓN

Los coronavirus pertenecen a la subfamilia Coronavirinae en la familia de los Coronaviridae del orden Nidovirales⁽¹⁾. Son virus de ARN de gran tamaño y sentido positivo que comprenden cuatro géneros: alfa, beta, delta y gamma⁽²⁾. Hasta 2019, sólo se conocían seis coronavirus humanos (HCoV) que pudieran ser considerados responsables de enfermedades respiratorias. Dos de ellos, el *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus* (SARS-CoV) y el *Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus* (MERS-CoV), son cepas virales capaces de infectar las vías respiratorias inferiores⁽²⁾.

En 2002 se produjo un brote de síndrome respiratorio agudo severo (SARS por sus siglas en Inglés), causado por el SARS-CoV, que puso en peligro la vida de 8 098 personas con una mortalidad de 774 pacientes. El epicentro de la enfermedad fue Guangdong, China; y se propagó internacionalmente a más de una docena de países. Se asumió que los murciélagos eran los huéspedes naturales^(3,4).

En 2012, el síndrome respiratorio del oriente medio (MERS), causado por el MERS-CoV, surgió en Arabia Saudita. Los murciélagos fueron considerados como los huéspedes naturales y los huéspedes intermedios fueron los camellos dromedarios. Se informó que un total de 2 494 casos, con 858 muertes, se debían a una transmisión nosocomial rápida. El MERS demostró características clínicas similares al SARS con síntomas gastrointestinales prominentes e insuficiencia renal aguda^(3,4).

En diciembre de 2019, el Gobierno Chino advierte a la comunidad científica internacional de un brote esporádico de casos de neumonía sin etiología conocida, asociados epidemiológicamente a un mercado mayorista de mariscos en Wuhan⁽⁴⁾. El 21 de enero de 2020, Chang y col.⁽⁵⁾ reportan el primer caso en Taiwán de la *Coronavirus Disease 19* (Covid-19) en una mujer de 55 años, tras dar positiva mediante el análisis de la muestra de exudado orofaríngeo empleando la técnica de reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR) a una nueva cepa del género de los betacoronavirus^(6,7), el Coronavirus 2 del Síndrome Respiratorio Agudo Grave (SARS-CoV-2). Posterior al reporte del primer caso confirmado, el virus se diseminó con éxito a escala mundial, siendo considerado pandemia por la Organización Mundial de la Salud (OMS) en marzo de 2020⁽⁸⁾.

El rápido desarrollo de pruebas y protocolos diagnósticos, empleados en la detección del virus constituyó un aporte crucial, en especial la RT-PCR por su seguridad demostrada en otras cepas de coronavirus. El empleo de este método, en conjunto con numerosas acciones, demostraron la eficacia en el control de la Covid-19 en territorio chino. La pandemia global de SARS-CoV-2 ha puesto a prueba a la humanidad en la búsqueda de una solución rápida y segura para lograr contener la veloz expansión de la COVID-19. Hasta que la cura definitiva sea identificada, se hace necesario contar con medios de detección precisos, donde por el momento, la RT-PCR parece ser a mejor apuesta.

La presente investigación tiene como objetivo describir las bases del empleo de la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa como prueba diagnóstica en la detección del SARS-CoV-2.

MÉTODO

Se realizó una revisión de la literatura en artículos publicados hasta mayo de 2020. Fueron consultadas las bases de datos Scopus, Wiley Online Library, SciELO, DIALNET, EBSCO, MEDLINE y PubMed.

La recolección de datos se realizó durante los meses de abril y mayo. Los términos empleados en la búsqueda fueron: test RT-PCR, RT-PCR, reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa, COVID-19, SARS-CoV-2, y sus traducciones al inglés “RT-PCR test”, “RT-PCR”, “reverse transcriptase polymerase chain reaction”, “COVID-19”, “SARS-CoV-2”.

Los términos fueron utilizados en fórmulas de búsqueda, empleando operadores booleanos. Las estructuras de las fórmulas de búsqueda fueron específicas de cada base de datos. Se seleccionaron 40 artículos publicados en revistas arbitradas pertenecientes al campo de las Ciencias de la Salud.

DESARROLLO

Comparaciones realizadas entre el genoma de 1 008 tipos de coronavirus SARS en humanos, 338 en murciélagos y 3 131 coronavirus MERS, permitió establecer una gran similitud con el SARS-CoV-2 con solo 5 diferencias en nucleótidos de aproximadamente 29,8 kb⁽⁹⁾. La secuencia completa del genoma del nuevo

coronavirus (WH-Human_1) se publicó por primera vez el 10 de enero de 2020⁽¹⁰⁾. Una revisión al código genético del SARS-CoV-2 demostró que las diferencias con el SARS-CoV y coronavirus similares corresponden a 380 sustituciones de aminoácidos⁽⁹⁾. El SARS-CoV-2 posee 14 ORFs que codifican 27 proteínas y es paralelo a los Coronavirus de murciélagos similares al SARS^(9,11,12).

La obtención completa del código viral constituyó un aporte fundamental en el desarrollo de pruebas diagnósticas basadas en el principio de la RT-PCR, dada la necesidad de síntesis de *primers* que permitieran una identificación correcta de secuencias específicas de pares de bases asociadas a los cambios en el genoma del SARS-CoV-2⁽¹³⁾, con el objetivo de evitar reacción cruzada con otras cepas virales de la misma familia o patógenos respiratorios.

Funcionamiento básico y pruebas de alto rendimiento

La RT-PCR cuantitativa en tiempo real, detecta y cuantifica las secuencias específicas de ácidos nucleicos mediante el uso de reporteros fluorescentes. Entre las tecnologías de sondeo comercializadas, las de mayor uso en los paquetes diagnósticos incluyen las tecnologías *TaqMan* y *Molecular beacon*⁽¹⁴⁾. El término en tiempo real se refiere a que la detección de los productos amplificados sucede en cada ciclo de la reacción. Por su parte, el término cuantitativo hace referencia a que es posible cuantificar la cantidad de ADN en la muestra. La ventaja con respecto a la PCR convencional es que el producto de amplificación es monitoreado conforme transcurre la reacción, sin que haya la necesidad de que sea manipulado en un gel de agarosa para conocer si la reacción fue exitosa, como sucede en la PCR punto final⁽¹⁵⁾.

Los paquetes diagnósticos que emplean RT-PCR para la detección del SARS-CoV-2 funcionan mediante la lectura de la ARN polimerasa dependiente del ARN (RdRp), fragmentos ORF1ab, el gen de la envoltura (gen E), el gen de la proteína nucleocápside (gen N)^(13,16,17,18,19,20) y el gen S^(11,16). Con el fin de mejorar la sensibilidad de la detección, la mayoría de los fabricantes eligen dos o más regiones diana de la secuencia de ácido nucleico viral^(11,13,21). El diagnóstico se confirma en los pacientes con resultados positivos tanto para la amplificación del gen ORF1ab como para la del gen N o el gen E⁽¹⁸⁾. La RT-PCR de un paso dirigida a fragmentos ORF1b o al gen N del SARS-CoV-2 fue diseñada para reaccionar con el SARS-CoV y los virus estrechamente relacionados, como el coronavirus del MERS, lo que puede dar lugar a reacciones falso positivas en la identificación del virus causante de la COVID-19⁽²²⁾.

La empresa alemana TIB MOLBIOL GmbH, en colaboración con varios socios desarrollaron un novedoso y robusto ensayo de RT-PCR en tiempo real para la segunda semana de enero de 2020. La prueba detecta el ARN viral mediante ensayos genéticos de envoltura E y de RdRp⁽²³⁾. Resultó ser muy específica para el ARN del SARS-CoV-2 (Gen E: 3,2 copias de ARN/reacción 95 % IC: 2,2-6,8) (RdRP 3,7 Copias de ARN/reacción 95 % IC: 2,8-8,0) y no reaccionó de manera cruzada con otros coronavirus⁽²⁴⁾. En otro enfoque del estudio, los investigadores crearon ensayos RT-PCR de un solo paso para detectar las regiones ORF1b y gen N del SARS-CoV-2 en 1 h y 15 min⁽²³⁾.

Chan y col.⁽²⁵⁾ prepararon un ensayo RT-PCR dirigido a la ARN polimerasa/helicasa dependiente del ARN del SARS-CoV-2 (RdRp/Hel, por sus siglas en inglés), que no provocó una reacción cruzada con otros coronavirus y demostró tener una mayor sensibilidad analítica (11,2 copias/reacción con transcripciones ARN *in vitro*) en comparación con el ensayo RdRp-P2, que arrojó 42 resultados falsos negativos cuya carga viral promedio fue de $3,21 \times 10^4$ copias de ARN/ml.

Entre las pruebas comerciales disponibles de gran desempeño se encuentra *Xpert® Xpress SARS-CoV-2 test* de Cepheid, EE.UU. Esta prueba proporciona resultados en sólo 45 minutos utilizando *GenXpert benchtop system*. El test requiere de un minuto para la preparación de la muestra y se dirige a múltiples regiones del genoma viral. En las muestras clínicas *Xpert Xpress SARS-CoV-2* alcanzó una coincidencia del 100 % en comparación con otras RT-PCRs desarrolladas, y el ensayo superó las plataformas de diagnóstico utilizadas habitualmente en el panel de sensibilidad con un límite de detección de $8,26 \times 10^1$ copias/mL⁽²⁶⁾.

Variación de resultados según muestras

El exudado nasofaríngeo es generalmente el método de recolección utilizado al hacer el diagnóstico por RT-PCR, pero puede pasar por alto una infección en estadios iniciales, en estos casos es útil una muestra más profunda obtenida por broncoscopia⁽²⁷⁾. La muestra bronquial tiene la ventaja de detectar con mayor facilidad el ácido nucleico viral en el líquido del lavado alveolar, seguido de los hisopados de esputo nasal y faríngeo⁽¹¹⁾.

En un estudio de 4 880 casos, Liu y col.⁽²⁸⁾ mostraron que el líquido de lavado alveolar exhibió la tasa positiva del 100 % para el fragmento ORF1ab del SARS-CoV-2; el esputo exhibió una tasa positiva del 49,12 %, y las muestras de hisopados nasales y faríngeos mostraron una tasa positiva baja del 38,25 %.

Wang y col.⁽²⁹⁾ reportaron que durante el brote de la COVID-19 en China se utilizaron los hisopados orofaríngeos con mucha más frecuencia que los hisopados nasofaríngeos; sin embargo, el ARN del SARS-CoV-2 se detectó sólo en el 32 % de los hisopos con muestras orofaríngeas, lo que fue significativamente inferior al 63 % de positividad en los hisopos nasales. Para corroborar los resultados se llevó a cabo otro estudio comparando ambas muestras donde el 73,1 % de los casos positivos utilizando frotis nasofaríngeos fueron negativos en el frotis orofaríngeo⁽³⁰⁾, lo que indica que pueden producirse falsos negativos utilizando sólo el frotis orofaríngeo^(19,30).

Se ha reportado en una serie de pacientes, la detección de ARN del virus en muestras de vías respiratorias inferiores (esputo o aspiración endotraqueal) en el 100 % de los casos, mucosa nasal (81 %), heces fecales (69 %), orofaríngeo (63 %), contenido gástrico (46 %), mucosa anal (25 %), conjuntiva (6,7 %) y orina (6,2 %)⁽³¹⁾. Por otra parte, Wang y col.⁽²⁹⁾ determinaron que las muestras de líquido de lavado broncoalveolar mostraron las tasas positivas más altas (93 %), seguidas de esputo (72 %) y muestras de hisopos nasales (63 %).

Positividad de los resultados en el tiempo

En la mayoría de los individuos con infección sintomática por COVID-19, el ARN viral en el hisopo nasofaríngeo se detecta desde el primer día de los síntomas y alcanza su punto máximo al transcurrir una semana⁽¹³⁾. En un

estudio realizado por Wölfel y col.⁽³²⁾, los hisopos de todos los pacientes tomados entre el primer y quinto día dieron positivos al virus, mientras que ninguna de las 27 muestras de orina y 31 muestras de suero resultaron positivas para el ARN del SARS-CoV-2. En otro estudio realizado por Tang-Xiao y col.⁽¹⁹⁾ el período promedio desde el inicio de los síntomas hasta el resultado negativo de la prueba RT-PCR del SARS-CoV-2 fue de 20 días. En algunos casos, el ARN viral ha sido detectado por RT-PCR seis semanas después de la primera prueba positiva⁽¹³⁾.

Muestras no convencionales para el diagnóstico

Los pacientes con neumonía por COVID-19 en estadios avanzados han demostrado una alta carga de ARN viral para el SARS-CoV-2 al ser analizadas muestras de materia fecal, así como una menor presencia del virus en vías respiratorias. En brotes anteriores de coronavirus que causaron eventos epidémicos se comprobó una implicación entérica en la transmisión, por lo tanto, debe considerarse para detectar el SARS-CoV-2 en los casos avanzados de COVID-19 el análisis de muestras de hisopado rectal^(33,34).

Wang y col.⁽³⁵⁾ reportaron tres casos que fueron dados de alta cumpliendo todos los criterios aprobados por la Comisión Nacional de Salud de la República Popular China, y que posteriormente fueron readmitidos como casos positivos al virus. Los tres pacientes presentaron principalmente síntomas gastrointestinales como diarrea y cambios en los hábitos intestinales; resultando positivos al analizar muestras de heces después de resultar negativos por muestras respiratorias.

Los autores consideran necesaria la inclusión de pruebas diagnósticas que utilicen colecciones de hisopado rectal en los casos donde las muestras del aparato respiratorio resulten negativas y el paciente mantenga los síntomas sugerentes de la COVID-19.

Las glándulas salivales expresan el receptor de superficie de la enzima convertidora de angiotensina II (ACE2); se ha determinado que la entrada a la célula del SARS-CoV-2 depende en gran medida de su unión hacia este receptor⁽³⁶⁾. Azzi y col.⁽³⁷⁾ en un estudio realizado en Italia recolectaron muestras salivales de 25 pacientes afectados por la COVID-19; las muestras fueron analizadas por RT-PCR resultando positivas para la totalidad de los pacientes. En otro estudio similar conducido por Williams y col.⁽³⁸⁾ en Australia se encontraron muestras positivas en 33 de 39 pacientes infectados por el virus. Aunque todavía son insuficientes los estudios realizados para la detección del SARS-CoV 2 con el empleo de saliva como muestra, se ha demostrado una mayor sensibilidad al usar el exudado nasofaríngeo.

Eficiencia y automatización de las pruebas RT-PCR

La dependencia de las configuraciones manuales en la prueba RT-PCR es una de las limitaciones fundamentales durante el diagnóstico molecular del SARS-CoV-2 cuando se trata de escalabilidad y velocidad en escenarios de brotes. Por consiguiente, se requieren flujos de trabajo alternativos para permitir el seguimiento rápido de muestras de alta prioridad. Una plataforma RT-PCR totalmente automatizada, que

realice la extracción, la amplificación y la detección de material genético viral sin necesidad de interacción humana podría ser la solución, como lo son el sistema NeuMoDx 96 o la prueba Cobas 6800 SARS-CoV-2 ^(39,40).

Las aproximaciones diagnósticas de la plataforma automatizada Cobas 6800 SARS-CoV-2 empleando el Sistema de Transporte de Medios Universal (UTM-RT, por sus siglas en inglés) mostraron una coincidencia general del 98,1 % (211/215; IC del 95 %, 95,0 a 99,4 %) en comparación con el paquete diagnóstico LightMix⁽⁴⁰⁾, mientras que la plataforma automatizada NeuMoDx 96 comparada con la prueba Cobas 6800 SARS-CoV-2 mostró una coincidencia positiva del 100 % (35/35) y una coincidencia negativa del 99,2 % (129/130)⁽³⁹⁾. La superioridad de estos sistemas en relación con las pruebas convencionales radica en un tiempo menor en el procesamiento de las muestras y la eliminación del posible error humano.

Aunque la automatización de todo el proceso no es factible en la totalidad de países, principalmente debido a su alto precio, la adaptación de estrategias que permitan acelerar el análisis manual de las muestras resultaría una alternativa útil en estos casos.

Prueba de amplificación isotérmica mediada por bucle (RT-LAMP, por sus siglas en inglés)

Otra forma de lograr una eficaz identificación y aislamiento del SARS-CoV-2, estaría dada por una prueba de diagnóstico rápida y sólida, que pueda realizarse sobre el terreno y en los centros de atención local, sin necesidad de equipo especializado ni de profesionales altamente capacitados para interpretar los resultados. Este es el caso del ensayo RT-LAMP^(41,42).

Este novedoso test presentó resultados diagnósticos positivos en un tiempo de $26,28 \pm 4,48$ min⁽⁴⁶⁾, mientras que el ensayo de RT-PCR requiere 1-2 h después de la preparación del ARN viral para obtener un resultado. Emplea el mismo principio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) pero la RT-LAMP no requiere de los ciclos térmicos facilitadores de la replicación del ADN empleados en la RT-PCR, además de contar con la ventaja de realizarse en una temperatura constante que oscila entre 60 y 65°C. En un estudio realizado por Lin y col.⁽⁴³⁾ con 130 hisopos y muestras de líquido de lavado broncoalveolar, el ensayo mostró 58 individuos confirmados y ninguna reactividad cruzada con otros patógenos respiratorios.

Yan y col.⁽⁴¹⁾ crearon un conjunto de primers orf1ab-4 y S-123 con tecnología RT-LAMP que alcanzaron resultados positivos en tiempos de $18 \pm 1,32$ min y $20 \pm 1,80$ min, respectivamente. La sensibilidad de los ensayos fue de 2×10^1 copias/reacción para el orf1ab-4 y 2×10^2 copias/reacción para el S-123, ambos desarrollados en una temperatura de 63°C y durante 60 min. La especificidad se evaluó utilizando 60 cepas de patógenos respiratorios humanos y sólo los pseudovirus dieron positivo, por lo tanto, el ensayo RT-LAMP no mostró ninguna reactividad cruzada con otros patógenos respiratorios.

Gun-Soo y col.⁽⁴²⁾ validaron un ensayo RT-LAMP capaz de detectar la presencia del virus dentro de los 30 minutos siguientes al comienzo de la reacción de amplificación, reacción optimizada por el método de detección colorimétrica *leuco crystal violet*.

Las principales limitaciones de la RT-PCR y otras pruebas basadas en los principios de la PCR son relativas a las mutaciones que se produzcan en la región específica del gen diana seleccionado para el desarrollo de *primers*, por lo que resulta necesario vigilar los sitios mutantes del genoma del virus mediante la secuenciación completa del genoma viral, en búsqueda de posibles variaciones para ser incorporadas como *primers* en la validación de nuevos ensayos.

CONCLUSIONES

La disponibilidad de pruebas diagnósticas es crucial para el aislamiento de casos positivos y el seguimiento de la cadena epidemiológica de transmisión, donde la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa resulta de gran utilidad. Esta prueba exhibe altos indicadores de sensibilidad y especificidad. La muestra que ofrece mayor sensibilidad es el exudado nasofaríngeo, aunque se ha documentado la necesidad de emplear hisopados rectales en casos falsos negativos que mantengan síntomas sugerentes de la COVID-19. Se trabaja en la automatización y optimización de pruebas diagnósticas, donde la prueba de amplificación isotérmica mediada por bucle (RT-LAMP) resulta una alternativa eficaz.

DECLARACIÓN DE CONFLICTOS DE INTERESES

Los autores declaran que no existen conflictos de intereses.

CONTRIBUCIÓN DE AUTORÍA

José Francisco Cancino Mesa: Conceptualización, Curación de datos, Recursos (Igual), Visualización (Igual), Redacción- borrador original, Redacción- revisión y edición (Igual).

Adrián Alejandro Vitón Castillo: Metodología, Recursos (Igual), Visualización (Igual), Redacción- revisión y edición (Igual).

Jorge Casí Torres: Recursos (Igual), Supervisión, Visualización (Igual), Redacción- revisión y edición (Igual).

FINANCIACIÓN

Los autores no recibieron financiación para el desarrollo de la presente investigación.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Chen Y, Liu Q, Guo D. Emerging coronaviruses: genome structure, replication, and pathogenesis. *Journal of Medical Virology* [Internet]. 2020 [citado 12 mayo 2020];92(4): 418-423. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1002/jmv.25681>

2. de Wilde AH, Snijder EJ, Kikkert M, van Hemert MJ. Host factors in coronavirus replication. En* Springer, Cham. Roles of Host Gene and Non-coding RNA Expression in Virus Infection. Vol.419. Springer, Cham; 2017 p.1-42. Disponible en: https://doi.org/10.1007/82_2017_25
3. Paules CI, Marston HD, Fauci AS. Coronavirus infections - more than just the common cold. *JAMA* [Internet]. 2020 [citado 12 mayo 2020]; 323(8): 707-708. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1001/jama.2020.0757>
4. Arshad-Ali S, Baloch M, Ahmed N, Arshad-Ali A, Iqbal A. The outbreak of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) - An emerging global health threat. *Journal of Infection and Public Health* [Internet]. 2020 [citado 15 mayo 2020]; 13(2020): 644-646. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1876034120303658>
5. Shao-Chung C, Yuan-Chia C, Yu-Long FC, Yu-Chan C, Mingte C, Yang CH et al. First case of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) pneumonia in Taiwan. *Journal of the Formosan Medical Association* [Internet]. 2020 [citado 27 abril 2020]; 119(3): 747-751. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0929664620300449>
6. J Reina. El SARS-CoV-2, una nueva zoonosis pandémica que amenaza al mundo. *Vacunas* [Internet] 2020 [citado 21 mayo 2020];21(1): 17-22. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.vacun.2020.03.001>
7. Moreno Martínez FL, Moreno López FL, Oroz Moreno R. Repercusión cardiovascular de la infección por el nuevo coronavirus SARS-CoV-2 (COVID-19). *CorSalud*. 2020;12(1):3-17. Disponible en: <http://www.revcorsalud.sld.cu/index.php/cors/article/view/588/1112>
8. Adhanom-Ghebreyesus T. WHO Director-General's opening remarks at the media briefing on COVID-19 [Internet]. WHO; 2020 [citado 27 abril 2020]. Disponible en: <https://www.who.int/dg/speeches/detail/who-director-general-s-opening-remarks-at-the-media-briefing-on-covid-19---11-march-2020>
9. Wu A, Peng Y, Huang B, Ding X, Wang X, Niu P et al. Genome Composition and Divergence of the Novel Coronavirus (2019-nCoV) Originating in China. *Cell Host & Microbe* [Internet]. 2020. [citado 2 mayo 2020]; 27(3): 325-328. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S193131282030072X>
10. Wu F, Zhao S, Yu B, Chen YM, Wang W, Song ZG et al. A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature* [Internet]. 2020 [citado 12 mayo 2020]; 579(2020): 265-269 Disponible en: <https://www.nature.com/articles/s41586-020-2008-3>
11. Wang H, Li X, Li T, Zhang S, Wang L, Wu X et al. The genetic sequence, origin, and diagnosis of SARS-CoV-2. *J Clin Microbiol Infect Dis* [Internet]. 2020 [citado 5 mayo 2020]. Disponible en: <https://dx.doi.org/10.1007/s10096-020-03899-4>

12. Khailany R, Safdar M, Ozaslan M. Genomic characterization of a novel SARS-CoV-2. *Gene Reports* [Internet]. 2020 [citado 5 mayo 2020]; 19(Junio 2020): 100682. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2452014420300960>
13. Sethuraman N, Stanleyraj-Jeremiah S, Ryo A. Interpreting Diagnostic Tests for SARS-CoV-2 *JAMA* [Internet]. 2020 [citado 18 mayo 2020]; 323(22):2249-2251. Disponible en: <https://doi.org/10.1001/jama.2020.8259>
14. Wang-Shick Ryu. *Molecular virology of human pathogenic viruses*. London, UK ; San Diego, CA : Academic Press; 2017.
15. Tamay de Dios L, Ibarra C, Velasquillo C. Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investigación en discapacidad* [Internet]. 2013 [citado 12 Jul 2020]; 2(2): 70-78. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/invdiss/ir-2013/ir132d.pdf>
16. Lorusso A, Calistria P, Mercantea MT, Monaco F, Portanti O, Marcacci M et al. A “One-Health” approach for diagnosis and molecular characterization of SARS-CoV-2 in Italy. *One Health* [Internet]. 2020 [citado 5 mayo 2020]; 10 (2020): 100135. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2352771420300823>
17. Ding-feng L, Qi-ming Ying, Yue-song Weng, Chi-bin Shen, Jin-guo Chu, Kong J et al. Dynamic change process of target genes by RT-PCR testing of SARS-Cov-2 during the course of a Coronavirus Disease 2019 patient. *Clinica Chimica Acta* [Internet]. 2020 [citado 5 mayo 2020]; 506(Julio 2020): 172-175. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0009898120301340>
18. Wang M, Zhou Y, Zong Z, Liang Z, Cao Y, Tang H et al. A precision medicine approach to managing Wuhan Coronavirus pneumonia. *Precision Clinical medicine* [Internet] . 2020 [citado 8 mayo 2020]; 3(1) 14-21. Disponible en: <https://doi.org/10.1093/pcmedi/pbaa002>
19. Tang-Xiao A, Xin-Tong Y, Gao C, Zhu L, Jie-Zhang Y, Zhang S. Dynamic profile of RT-PCR findings from 301 COVID-19 patients in Wuhan, China: A descriptive study. *Journal of Clinical Virology* [Internet]. 2020 [citado 12 mayo 2020]; 127(Junio 2020): 104346. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2020.104346>
20. Hogan C, Sahoo M, Hong-Huang C, Garamani N, Stevens B. Comparison of the Panther Fusion and a laboratory-developed test targeting the envelope gene for detection of SARS-CoV-2. *Journal of Clinical Virology* [Internet]. 2020 [citado 12 mayo 2020]; 127 (Junio 2020): 104383. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2020.104383>

21. Ishigea T, Murataa S, Taniguchib T, Miyabea A, Kitamura K, Kawasaki K et al. Highly sensitive detection of SARS-CoV-2 RNA by multiplex rRT-PCR for molecular diagnosis of COVID-19 by clinical laboratories. *Clinica Chimica Acta* [Internet]. 2020 [citado 5 mayo 2020]; 507(agosto 2020): 139-142. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0009898120301789>
22. Li C, Ren L. Recent progress on the diagnosis of 2019 Novel Coronavirus. *Transboundary and Emerging Diseases* [Internet]. 2020 [citado 18 mayo 2020]; 67(4): 1485-1491. Disponible en: <https://doi.org/10.1111/tbed.13620>
23. Kumar-Vashist S. In Vitro Diagnostic Assays for COVID-19: Recent Advances and Emerging Trends. *Diagnostics* [Internet]. 2020 [citado 5 mayo 2020]; 10(4):202. Disponible en: <https://www.mdpi.com/2075-4418/10/4/202>
24. Corman VM, Landt O, Kaiser M, Molenkamp R, Meijer A, Chu D, et al. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Eurosurveillance* [Internet]. 2020 [citado 21 mayo 2020]; 25(3):2000045. Disponible en: <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045>
25. Fuk-Woo-Chan J, Chik-Yan-Yip C, Kai-Wang-To K, Hing-Cheung-Tang T, Cheuk-Ying-Wong S, Leung KH et al. Improved Molecular Diagnosis of COVID-19 by the Novel, Highly Sensitive and Specific COVID-19-RdRp/Hel Real-Time Reverse Transcription-PCR Assay Validated In Vitro and with Clinical Specimens. *Journal of Clinical Microbiology* [Internet]. 2020 [citado 18 mayo 2020]; 58:e00310-20. Disponible en: <https://jcm.asm.org/content/58/5/e00310-20.long>
26. Wolters F, Van de Bovenkamp J, Van den Bosch B, Van den Brink S, Broeders M, Chung-Hoa N et al. Multi-center evaluation of cepheid xpert® xpress SARS-CoV-2 point-of-care test during the SARS-CoV-2 pandemic. *Journal of Clinical Virology* [Internet] 2020 [citado 14 mayo 2020];128(Julio 2020): 104426. Disponible en: <https://dx.doi.org/10.1016/j.jcv.2020.104426>
27. Loeffelholz M, Wei-Tang Y. Laboratory diagnosis of emerging human coronavirus infections- the state of the art. *Emerging Microbes & Infections* [Internet]. 2020. [citado 5 mayo 2020]; 9(1): 747-756. Disponible en: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/22221751.2020.1745095>
28. Liu R, Han H, Liu F, Lv Z, Wu K, Liu Y et al. Positive rate of RT-PCR detection of SARS-CoV-2 infection in 4880 cases from one hospital in Wuhan, China, from Jan to Feb 2020. *Clin Chim Acta* [Internet]. 2020 [citado 8 mayo 2020]; 505(Junio 2020): 172-175. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.cca.2020.03.009>
29. Wang W, Xu Y, Gao R, Gao R, Lu R, Han K, Wu G et al. Detection of SARS-CoV-2 in different types of clinical specimens. *JAMA* [Internet] . 2020 [citado 7 mayo 2020]; 323(18) 1843-1844. Disponible en: <https://doi.org/10.1001/jama.2020.3786>

30. Wang X, Tan L, Wang X, Liu W, Lu Y, Cheng L et al. Comparison of nasopharyngeal and oropharyngeal swabs for SARS-CoV-2 detection in 353 patients received tests with both specimens simultaneously. *International Journal of Infectious Diseases* [Internet]. 2020 [citado 5 mayo 2020]; 94(Mayo2020): 107-109. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1201971220302356>
31. Huang Y, Chen S, Yang Z, Guan W, Liu D, Lin Z, et al. SARS-CoV-2 Viral Load in Clinical Samples of Critically Ill Patients. *Am J Respir Crit Care Med* [Internet]. 2020 [citado 5 mayo 2020]; 201(11). Disponible en: <https://doi.org/10.1164/rccm.202003-0572le>
32. Wölfel R, Corman V, Guggemos W, Seilmaier M, Zange S, Müller MA et al. Virological assessment of hospitalized patients with COVID-2019. *Nature* [Internet]. 2020 [citado 18 mayo 2020]; 581(2020): 465-469. Disponible en: <https://dx.doi.org/10.1038/s41586-020-2196-x>
33. Wei-Tang Y, Schmitz J, Persing D, Stratton C. The Laboratory Diagnosis of COVID-19 Infection: Current Issues and Challenges. *Journal of Clinical Microbiology* [Internet]. 2020 [citado 5 mayo 2020];58(6) e00512-20. Disponible en: <https://jcm.asm.org/content/early/2020/04/03/JCM.00512-20>
34. Zhang T, Cui X, Zhao X, Wang J, Zheng J, Zheng G et al (2020) Detectable SARS-CoV-2 viral RNA in feces of three children during recovery period of COVID-19 pneumonia. *Journal of Medical Virology* [Internet]. 2020 [citado 10 mayo 2020];92(7): 909-914. Disponible en: <https://doi.org/10.1002/jmv.25795>
35. Wang X, Zhou Y, Jiang N, Zhou Q, Ma W-L. Persistence of intestinal SARS-CoV-2 infection in patients with COVID-19 leads to re-admission after pneumonia resolved. *International Journal of Infectious Diseases* (2020) [Internet]. 2020 [citado 12 mayo 2020]; 95(2020): 433-435. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.04.063>
36. Hoffmann M, Kleine-Weber H, Schroeder S, Krüger N, Herrler T, Erichsen S et al. SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell* [Internet]. 2020 [citado 5 mayo 2020]; 181:(2) 271-280.e8 . Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867420302294>
37. Azzi L, Carcano G, Gianfagna F, Grossie P, Dalla-Gasperina D, Genoni A et al. Saliva is a reliable tool to detect SARS-CoV-2. *Journal of Infection* [Internet]. 2020 [citado 5 mayo 2020];81(1): e45-e50 . Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0163445320302139>
38. Williams E, Bond K, Zhang B, Putland M, Williamson D. Saliva as a non-invasive specimen for detection of SARS-CoV-2. *Journal of Clinical Microbiology* [Internet]. 2020 [citado 5 mayo 2020]; [In Press]:JCM.00776-20 . Disponible en: <https://jcm.asm.org/content/jcm/early/2020/04/17/JCM.00776-20.full.pdf>

39. Nörz D, Fischer N, Schultze A, Kluge S, Mayer-Runge U. Clinical evaluation of a SARS-CoV-2 RT-PCR assay on a fully automated system for rapid on-demand testing in the hospital setting. *Journal of Clinical Virology* [Internet]. 2020 [citado 12 mayo 2020]; 128 (Junio 2020): 104390. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2020.104390>
40. Poljak M, Korva M, Knap-Gašper N, Fujs-Komloš K, Sagadin M. Clinical evaluation of the cobas SARS-CoV-2 test and a diagnostic platform 2 switch during 48 hours in the midst of the COVID-19 pandemic. *Journal of Clinical Microbiology* [Internet]. 2020 [citado 12 mayo 2020] 58:e00599-20. Disponible en: <http://doi.org/10.1128/JCM.00599-20>
41. Yan C, Cui J, Huang L, Du B, Chen L, Xue G et al. Rapid and visual detection of 2019 novel coronavirus (SARS-CoV-2) by a reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay. *Clinical Microbiology and Infection* [Internet]. 2020 [citado 5 mayo 2020];26(6): 773-779. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1198743X20301865>
42. Gun-Soo, Keunbon P, Seung-Hwa K, Seong-Jun B, Seung K, Kim BT et al. Development of Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification Assays Targeting Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2. *The Journal of Molecular Diagnostics* [Internet]. 2020 [citado 5 mayo 2020];22(6): 729-735. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1525157820300908>
43. Lin Y, Wu S, Hao X, Li X, Liu X, Ye S et al. Rapid Detection of COVID-19 Coronavirus Using a Reverse Transcriptional Loop-Mediated Isothermal Amplification (RT-LAMP) Diagnostic Platform. *Clinical Chemistry* [Internet]. 2020 [citado 13 julio 2020]; 66(7): 975-977. Disponible en: <https://academic.oup.com/clinchem/article/66/7/975/5823294>