

Título	Resumen de evidencia: Uso de RT-PCR en pacientes con diagnóstico de COVID-19
Código de Identificación	07202020IHJRA
Área Solicitante	COVID-191. Comité de Crisis en Salud Publica Keralty
Nombre	COVID-191. Comité de Crisis en Salud Publica Keralty
Fecha de Respuesta	20 07 2020

Pregunta:

1. ¿Es necesario hacer pruebas PCR COVID de control en pacientes que fueron sintomáticos y tuvieron una prueba positiva para definir "recuperación"?
2. ¿Para definir retorno laboral o a la comunidad es indispensable tener una prueba PCR negativa para pacientes que tuvieron una prueba PCR anterior positiva?

Metodología:

Se realizó una Revisión Sistemática Rápida (Manual de Revisiones Sistemáticas Rápidas. Instituto Global de Excelencia Clínica. 2019)

Términos de Búsqueda: COVID 19, Coronavirus, PCR, SARS-CoV-2, RT-PCR, RiT-RT-PCR, Viral load.

Tipos de estudio: Recomendaciones de sociedades científicas y organismos referentes en salud nacionales e internacionales, revisiones sistemáticas de la literatura (RSL), meta análisis, ensayos clínicos y otros estudios primarios.

Fuentes de Información: Pubmed, Google Scholar.

Antecedentes:

En distintos países está establecido en sus protocolos institucionales que sólo aquel que fue diagnosticado como COVID-19 con base en pruebas RT-PCR positivas, se puede considerar recuperado o libre de enfermedad una vez tenga prueba RT-PCR negativa.

La racionalidad de este enfoque varía entre los países, algunos requieren pruebas de control y otros no para definir recuperación.

Descripción de la tecnología RT-PCR

El coronavirus SARS-CoV-2 es un virus de ácido ribonucleico (ARN) monocatenario positivo (también le llaman virus ARNmc+ o virus (+)ssRNA) (Tripp y Tompkins, 2018) , es decir no usa ácido dexosirribonucleico (ADN) para su replicación y, puesto que los virus ARN positivos son idénticos al ARN mensajero (ARNm) del hospedero, pueden ser inmediatamente traducidos por la célula hospedero.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica de laboratorio utilizada para amplificar secuencias de ADN (Park, 2011). El método utiliza secuencias cortas de ADN llamados cebadores para seleccionar la parte del genoma a amplificar. La temperatura de la muestra se sube y se baja repetidamente para ayudar a la enzima de replicación del ADN a duplicar la secuencia del ADN que está siendo copiada. (NHGRI, 2020). Con esta técnica se pueden producir un billón de copias de la secuencia en estudio en sólo unas pocas horas.

Pero si el SARS-CoV-2 está hecho de ARN de una sola cadena ¿por qué la PCR (que es para ADN) se utiliza como técnica de diagnóstico?, La respuesta es que usamos una técnica modificada la RT-

PCR, RT por Reverse Transcriptase, es decir una técnica que incorpora una enzima, la transcriptasa inversa; esta enzima es capaz de sintetizar ADN a partir de una molécula de ARN.

Hay varios tipos de técnicas de RT-PCR (Maddocks y Jenkins, 2016); la que se usa para el diagnóstico del SARS-CoV-2 es la cuantitativa, que permite medir en tiempo real la cantidad de copias de ADN retrotranscrito del virus que se van produciendo. Para poder determinar la presencia de ADN viral retrotranscrito añaden al tubo de ensayo sondas que se unen únicamente a secuencias específicas del ADN retrotranscrito del virus y emiten fluorescencia, a mayor fluorescencia mayor cantidad de ADN detectado (King, 2010). A la prueba que se aplica para el diagnóstico de SARS-CoV-2 se le llama RT-PCR en tiempo real (Loeffelholz y Tang, 2020).

De la descripción se infieren las limitaciones de este tipo de pruebas tiempo hasta positivización, sólo muestra infección pero no historia de la infección, y la posibilidad de múltiples fallos en el procesamiento, de ahí que los falsos positivos y negativos sean esperables.

Entre los distintos coronavirus patógenos encontramos al SARS-CoV-2, cuyo impacto en términos de salud y sociales es hasta la fecha el de mayor alcance. Ver tabla 1.

Tabla 1. Tipos de Coronavirus patógenos para humanos y su año de descubrimiento

Virus	Genero	Enfermedad	Año descubrimiento
CoV-229E	Alpha	Infección leve del tracto respiratorio	1967
CoV-NL-63	Alpha	Infección leve del tracto respiratorio	1965
CoV-HKU-1	Beta	Infección leve de las vías respiratorias; neumonía	2005
CoV-OC43	Beta	Infección leve del tracto respiratorio	2004
SARS-CoV	Beta	Síndrome respiratorio agudo humano grave	2003
MERS-CoV	Beta	Síndrome respiratorio agudo humano grave	2012
SARS-CoV-2	Beta	Infecciones respiratorias agudas severas	2019

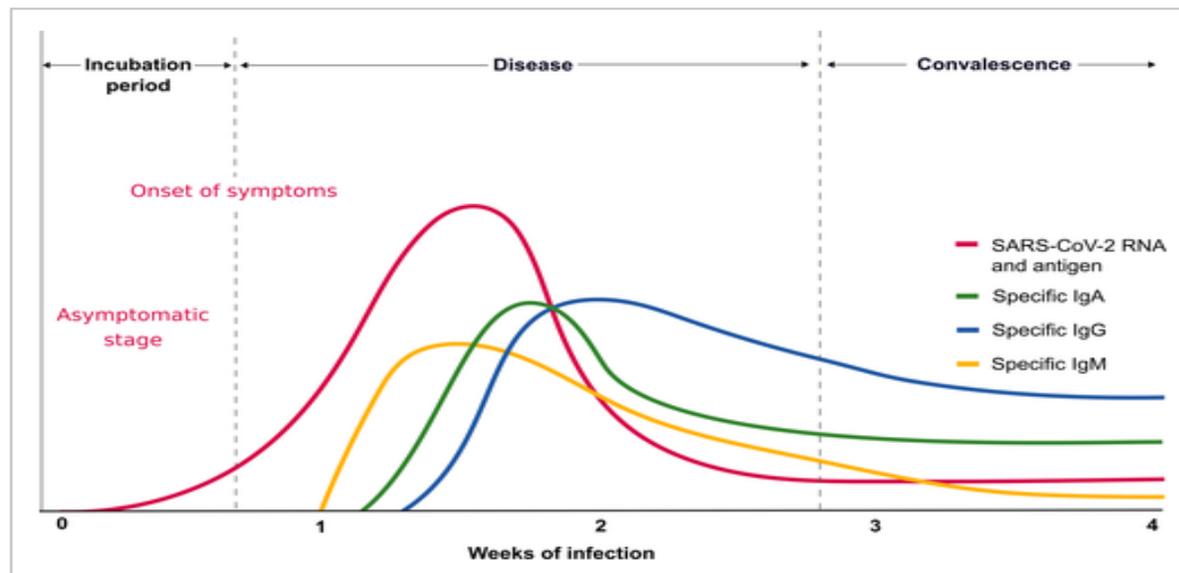
Fuente: Loeffelholz & Tang (2020)

Los exámenes diagnósticos están en constante evolución. En la Universidad de Harvard tienen un micrositio sobre las pruebas diagnósticas que se aprueban junto con sus características en términos de sensibilidad y especificidad que se puede consultar dando click [aquí](#) (Weissleder et al., 2020).

En un artículo de revisión de Azkur et al (2020) se muestra la evolución natural de los marcadores diagnósticos en el COVID-19. Hacia la segunda semana los niveles de ARN del SARS-CoV-2 empiezan a desaparecer (Azkur et al., 2020), en la imagen 1 se observa la evolución en el tiempo de los marcadores diagnósticos.

Los test RT-PCR suelen tener una gran sensibilidad analítica y especificidades en circunstancias ideales. Sin embargo, en la realidad clínica, la sensibilidad de la prueba varía según la duración de la enfermedad, el síndrome clínico específico de COVID-19, el lugar de la recogida de muestras, la calidad de la recogida de muestras y la carga viral (Weissleder et al., 2020)

Imagen 1. Evolución de marcadores diagnósticos en COVID-19



Fuente: tomado de Azkur et al. (2020).

El estándar de oro para el diagnóstico de COVID-19 es la reacción de cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa en tiempo real (rRT-PCR) (Younes et al., 2020). Sin embargo el LAMP es potencialmente una fuerte competencia, una vez se adelanten los estudios clínicos necesarios y si los resultados lo respaldan “La amplificación isotérmica mediada por lazo (LAMP) fue desarrollada como una técnica rápida, precisa, fiable y más barata para amplificar la secuencia objetivo a una sola temperatura de reacción en lugar del sofisticado equipo de ciclos térmicos que se necesita en la rRT-PCR. La ventaja de utilizar LAMP es que la cantidad de ADN producida es mucho mayor que en la rRT-PCR y un resultado positivo de la prueba puede verse visualmente sin necesidad de una máquina para leer los resultados. Además, es simple, barato y rápido. Varios estudios evaluaron el uso de un novedoso método RT-LAMP en comparación con el estándar de oro rRT-PCR. Dos estudios mostraron pruebas de que los métodos RT-LAMP demostraron más de un 97% de sensibilidad dirigida al gen ORF1ab en comparación con la rRT-PCR. Yang y otros demostraron que el RT-LAMP y la rRT-PCR tienen la misma sensibilidad y ambos pueden detectar una muestra diluida 20 veces. Además, según Yang y otros, el límite de detección de LAMP es de 1000 copias/mL, lo que equivale a los equipos de rRT-PCR [50]. Lo más importante es que los estudios han demostrado que el análisis RT-LAMP es extremadamente específico porque utiliza de seis a ocho cebadores para identificar ocho regiones diferentes en el ADN objetivo. Sin embargo, a diferencia de la rRT-PCR, la tecnología LAMP no tiene un fondo tan grande de literatura detrás de ella. Por lo tanto, las pruebas que utilizan la tecnología LAMP para COVID-19 todavía se están evaluando en entornos clínicos.” (Younes et al., 2020)

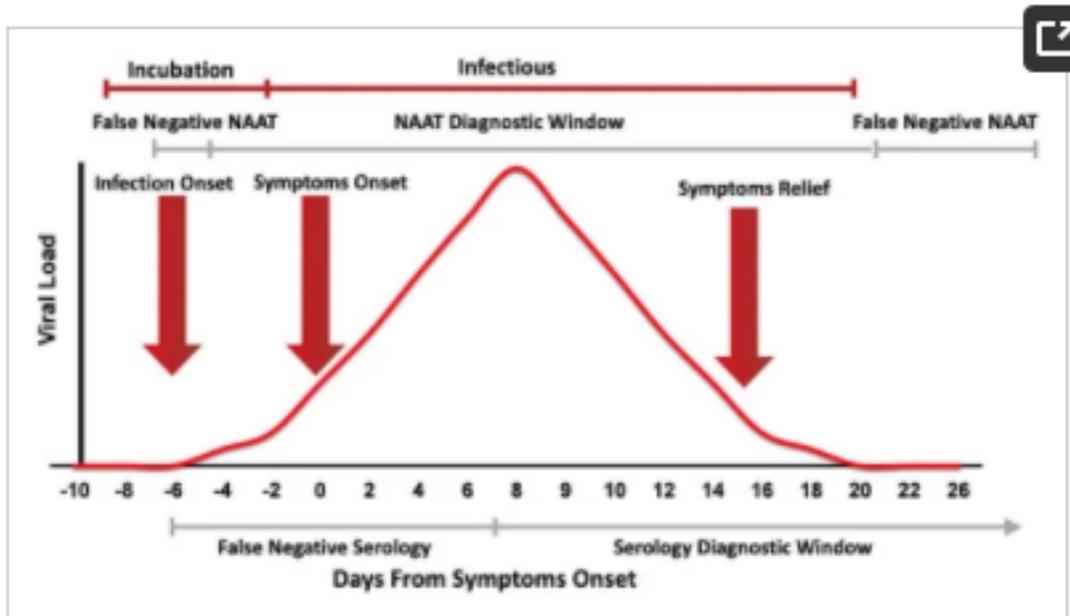
Tabla 2. Métodos de diagnóstico moleculares para COVID-19

Tecnología	tipo de prueba molecular	Laboratorio o Punto de Atención(POC)	Tiempo para los resultados	Sitio típico de toma de muestra
rRT-PCR	RNA Viral	Laboratorio	3–4 h	Hisopo nasofaríngeo, esputo
LAMP	RNA Viral	POC	2–3 h	Hisopo nasofaríngeo, esputo
Lateral Flow	Anticuerpo o antígeno	POC	15–20 min	Sangre
ELISA	Anticuerpo o antígeno	Laboratorio	1–3 h	Sangre

Fuente: tomado de Younes et al. (2020)

Las pruebas de amplificación de ácido nucleico (NAAT) como son el RT-PCR y LAMP se deben utilizar de acuerdo con las ventanas de oportunidad diagnóstica (Younes et al. , 2020), Las pruebas antes y después de la ventana de diagnóstico de la NAAT mostrarán un resultado negativo falso (Pang et al., 2020).

Imagen 2. Falsos negativos de pruebas serológicas y de amplificación ácido nucleico (NAAT).



Fuente: tomado de Younes et al. (2020)

Evidencia relacionada

En una revisión de la literatura hecha por Mawaddah et al. (2020) concluye que es mejor usar hisopado nasofaríngeo para diagnóstico en los primeros 7 días. En la tabla 2 se observan los estudios incluidos por Mawaddah et al. (2020), ellos describen los resultados de su revisión así: “La carga viral del ARN del SARS-CoV-2 en el tracto respiratorio superior fue significativamente mayor durante la primera semana y alcanzó un máximo de 4 a 6 días después de la aparición de los síntomas. El hisopo nasofaríngeo ha demostrado una carga viral más alta que el orofaríngeo, donde la diferencia en las muestras emparejadas se observa mejor a los 0-9 días después del inicio de la enfermedad. La sensibilidad del hisopo nasofaríngeo fue mayor que la del orofaríngeo en los pacientes de COVID-19. Se ha demostrado que el lavado de garganta realizado por el propio paciente contiene una carga viral más alta que el hisopo nasofaríngeo u orofaríngeo, con una sensibilidad significativamente mayor en comparación con el hisopo nasofaríngeo emparejado. Recomendaciones: El hisopo nasofaríngeo de rutina de una presunta infección por COVID-19 debe tener en cuenta la anatomía de la cavidad nasal para aumentar la comodidad del paciente y el rendimiento del diagnóstico. El hisopo orofaríngeo de rutina debe ser reemplazado por un lavado de garganta que ha demostrado una mejor precisión diagnóstica, y es seguro para los demás.” (Mawaddah et al. 2020)

Tabla. 3. Listado de estudios incluidos en la revisión de Mawaddah et al. (2020)

Autor	País	Número de pacientes	Número de muestras
Yang	China	213	866
Liu et al.	China	4880	4880
Roxby et al.	USA	142	284
To et al.	Hong Kong	12	24
Wang et al.	China	205	1070
Wolfel et al.	Alemania	9	9?
Guo et al.	China	11	24
Lo et al.	China	10	213
Yu et al.	China	76	323
Zou et al.	China	18	72
Pan et al.	China	?	110
To et al.	China	23	173

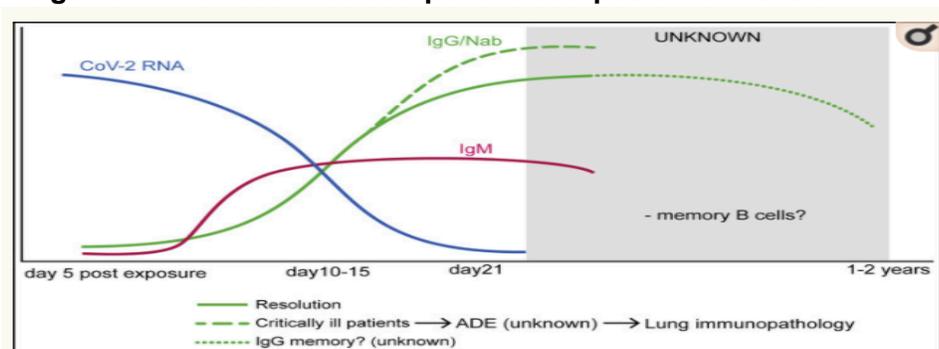
Fuente : adaptado de Mawaddah et al. (2020).

Aunque se ha postulado a la saliva como fluido para diagnóstico de COVID-19 no hay evidencia concluyente que apoye su uso como método diagnóstico. Algunos como Sri Santosh et al (2020) indican que “las investigaciones recientes sugieren que la saliva puede utilizarse como una biomuestra viable para la detección del Covid-19, por lo que se necesitan más estudios para validarla. El diagnóstico salival puede desempeñar un papel fundamental en la detección de Covid-19 y puede ofrecer una detección masiva de la población.” (Sri Santosh et al., 2020)

Se desconoce el tiempo de protección que brinda frente a una nueva infección el haber padecido con o sin síntomas COVID-19. Vabret et al. (2020) han postulado que el desconocimiento sobre la protección requiere una observación de tiempo prolongado que no ha ocurrido aún (ver imagen 3); igualmente, Huang et al. (2020) realizaron una revisión sistemática que incluyó varios tipos de coronavirus y concluyeron que los datos existentes no permitían establecer el tiempo de protección tras tener una infección por coronavirus (Huang et al., 2020).

Se han descrito casos de persistencia de positividad en pruebas RT-PCR como el reportado por Uechi et al. (2020) en el que “una paciente asintomática a la que se le diagnosticó una infección por SARS-CoV-2 permaneció en la reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa positiva durante 24 días, aunque estuvo en cuarentena en un hospital de aislamiento. Este hallazgo sugiere que un paciente asintomático diagnosticado con infección por SARS-CoV-2 con hallazgos anormales en una tomografía computarizada de tórax puede ser un portador asintomático durante más de 3 semanas”(Uechi et al., 2020).

Imagen 3. Inmunidad mediada por anticuerpos en SARS-CoV-2



Fuente: Vabret et al. (2020)

En una revisión de Zhen et al.(2020) en la que se comparaba el rendimiento diagnóstico de las tomografías de tórax (TAC) contra las RT-PCR de tiempo real (qPCR) se encontró una ligera superioridad de los TAC, pero el mejor resultado era cuando ambas formas de diagnóstico se combinaban, "Para un diagnóstico más preciso, comparamos la tasa de anormalidad en la tomografía con la tasa positiva en el qPCR. En parte debido a la falta de literatura sobre MERS, no se encontró ninguna diferencia significativa ($P = 0.3516$). Sin embargo, en el SARS y en COVID-19, hubo una diferencia significativa entre la tomografía y los hallazgos de la qPCR ($P = 0,0302$, $P = 0,00697$). Aunque la especificidad de la qPCR podía alcanzar el 100 % se requería un título viral suficiente del espécimen. En particular, excepto el líquido de lavado broncoalveolar (BALF) (100 %), el esputo mostró la tasa positiva más alta (74,4 % ~ 88,9 %), seguido de los hisopos nasales (53,6 % ~ 73,3 %). Las razones podrían ser el momento de la recogida de la muestra, el transporte de la muestra, las pruebas, etc. Se debe considerar que los especímenes de las vías respiratorias inferiores mejoran la sensibilidad de la qPCR, en particular si los resultados de las pruebas nasofaríngeas y orofaríngeas son negativos; sin embargo, en caso de sospecha clínica elevada, también se deben aplicar pruebas serológicas de seguimiento. Lo más importante es que los clínicos deben aplicar prácticas apropiadas de control de la infección para los pacientes con sospecha clínica de infección, específicamente con resultados iniciales negativos de la qPCR, en particular los que posean una anormalidad típica en la tomografía computarizada o la radiografía de tórax. Además, un solo hisopo era relativamente insuficiente. En un estudio anterior sobre la infección por MERS, el 89% de los pacientes obtuvieron un resultado positivo después de un hisopo, el 96,5% obtuvo un resultado positivo después de dos hisopos consecutivos y el resultado positivo alcanzó el 97,6% después de tres hisopos consecutivos. Por lo tanto, el resultado negativo inicial podría ser poco convincente a menos que se hicieran pruebas repetidas." (Zhen et al., 2020).

Tabla 4. Comparación entre los resultados de la tomografía y la qPCR (RT-PCR de tiempo real) de los pacientes con neumonía por virus de la corona.

Neumonía	TAC (media± Desviación Estándar)	qPCR (media± Desviación Estándar)	P value
SARS	93~100 % (98 ± 4)	50~86 % (75 ± 13)	0.0302
MERS	100%	58~90 % (74 ± 23)	0.3516
COVID-19	69~100 % (89 ± 11)	50~97 % (72 ± 15)	0.00697

Fuente: Zhen et al. (2020)

Hallazgos / Respuesta a Interrogantes

¿Es necesario hacer pruebas RT-PCR COVID de control en pacientes que fueron sintomáticos y tuvieron una prueba positiva para definir "recuperación"?

En la revisión no se encontró evidencia específica para responder esta pregunta, sin embargo a partir de la evidencia encontrada se puede sugerir que la respuesta depende del tiempo que ha transcurrido desde que iniciaron síntomas.

Si han transcurrido más de 15 días desde iniciados los síntomas una prueba RT-PCR no genera valor agregado y no define el término recuperado.

¿Para definir retorno laboral o a la comunidad es indispensable tener una prueba PCR negativa para pacientes que tuvieron una prueba RT-PCR anterior positiva?

En la revisión no se encontró evidencia específica para responder esta pregunta, no obstante el período de aislamiento transcurrido tras una prueba RT-PCR positiva en ausencia de síntomas guía la realización de una nueva prueba de acuerdo con la evidencia encontrada.

No se recomienda hacer pruebas adicionales RT-PCR, una vez tenemos un resultado positivo en paciente asintomático. Se recomienda aislamiento preventivo en todo paciente asintomático. No hay evidencia concluyente sobre el período de tiempo que debe permanecer en aislamiento un paciente asintomático, en general la posición más repetida en la revisión está entre 10 y 14 días de aislamiento.

Posiciones de Organismo profesionales

En una búsqueda dirigida a cuerpos profesionales y centros de referencia cuyos hallazgos se resumen en la tabla 5. La posición mayoritaria es NO usar estrategias basadas en pruebas de control posterior a diagnóstico de COVID-19.

Tabla 5. Posiciones de algunos organismos de salud.

País	Estrategia diagnóstica general	¿Pruebas de control RT-PCR una vez terminado el aislamiento?	Observación
Robert Koch Institute (Alemania)	RT-PCR	Sí para los casos que requirieron oxígeno durante su tratamiento o son población geriátrica. No para los que no requirieron oxígeno o fueron asintomáticos. Las personas con enfermedades autoinmunes requieren evaluación individual. (RKI, 2020).	<p>Los pacientes con un curso severo de COVID-19 (que necesitan oxígeno) Al menos 48 horas sin síntomas (definido como la mejora sostenida de los síntomas agudos de COVID-19 según la evaluación médica) MÁS Los primeros 10 días después de la aparición de los síntomas MÁS Prueba de PCR</p> <p>Los pacientes con un curso COVID-19 leve (sin necesidad de oxígeno) Al menos 48 horas sin síntomas (definido como la mejora sostenida de los síntomas agudos de COVID-19 según la evaluación médica) MÁS Como mínimo 10 días después de la aparición de los síntomas</p> <p>Personas con infección asintomática de SARS-CoV-2 Como mínimo 10 días después de la primera detección del patógeno (RKI, 2020)</p>
Ministerio de Salud Colombia	RT-PCR	No.	Pruebas de control para casos específicos con persistencia de síntomas a criterio médico. (Minsalud, 2020)
Centers for Disease Control and Prevention (Estados Unidos)	RT-PCR	No.	En la actualización del 17 de julio de 2020 se recomienda de forma general el uso de una estrategia basada en síntomas para definir recuperación y regreso al trabajo. (CDC, 2020)
Ministerio de Sanidad España	RT-PCR	No.	Los casos que han requerido ingreso hospitalario podrán recibir el alta hospitalaria si su situación clínica lo permite aunque su PCR siga siendo positiva, pero se deberá mantener aislamiento domiciliario con monitorización de su situación clínica al menos 14 días desde el alta hospitalaria. A partir de estos 14 días, y siempre que hayan transcurrido tres días desde la resolución de la fiebre y el cuadro clínico, se podrá finalizar el aislamiento. En cualquier caso, si antes de transcurridos estos 14 días de aislamiento domiciliario desde el alta hospitalaria se realiza una PCR y se obtiene un resultado negativo, se podrá desaislar al paciente. En caso de tener la última PCR negativa en el momento del alta hospitalaria y no presentar síntomas respiratorios en los tres días previos, se considerará que la infección está resuelta y se podrá dar el alta sin necesidad de aislamiento en domicilio (MSE. 2020).

Fuente: elaboración propia a partir de los documentos institucionales

Conclusiones / Recomendaciones generales:

1. Si han transcurrido más de 15 días desde iniciados los síntomas una prueba RT-PCR no genera valor agregado y no define el término recuperado.
2. Como el COVID-19 es una enfermedad de interés en salud pública, se recomienda seguir las regulaciones gubernamentales locales para su diagnóstico.

Recomendaciones para los profesionales de la salud:

1. El diagnóstico de COVID-19 se basa tanto en aspectos clínicos como de pruebas de diagnóstico (laboratorios e imágenes)
2. El diagnóstico de recuperación de COVID-19 se basa tanto en aspectos clínicos como de laboratorio.
3. La decisión sobre mantener el aislamiento del paciente, o autorizar su retorno laboral o a la comunidad en la convalecencia de COVID-19 o después de una prueba positiva de NAAT (tal como RT-PCR) para SARS-CoV2, puede tomarse teniendo en cuenta solo el tiempo de evolución o el tiempo transcurrido desde el primer NAAT, sin requerir una segunda prueba NAAT.

Recomendaciones para comunidad:

1. El diagnóstico de COVID-19 tanto en su fase inicial como en su recuperación lo deben hacer médicos.

Búsquedas ejecutadas

```
("viral load"[MeSH Terms] OR ("viral"[All Fields] AND "load"[All Fields])) OR "viral load"[All Fields]) AND (((((((("covid 19"[All Fields] OR "covid 2019"[All Fields]) OR "severe acute respiratory syndrome coronavirus 2"[Supplementary Concept]) OR "severe acute respiratory syndrome coronavirus 2"[All Fields]) OR "2019 ncov"[All Fields]) OR "sars cov 2"[All Fields]) OR "2019ncov"[All Fields]) OR (("wuhan"[All Fields] AND ("coronavirus"[MeSH Terms] OR "coronavirus"[All Fields])) AND (2019/12/1:2019/12/31[Date - Publication] OR 2020/1/1:2020/12/31[Date - Publication])))
```

```
("polymerase chain reaction"[MeSH Terms] OR ("polymerase"[All Fields] AND "chain"[All Fields]) AND "reaction"[All Fields]) OR "polymerase chain reaction"[All Fields]) AND (((((((("covid 19"[All Fields] OR "covid 2019"[All Fields]) OR "severe acute respiratory syndrome coronavirus 2"[Supplementary Concept]) OR "severe acute respiratory syndrome coronavirus 2"[All Fields]) OR "2019 ncov"[All Fields]) OR "sars cov 2"[All Fields]) OR "2019ncov"[All Fields]) OR ("wuhan"[All Fields] AND ("coronavirus"[MeSH Terms] OR "coronavirus"[All Fields])) AND (2019/12/1:2019/12/31[Date - Publication] OR 2020/1/1:2020/12/31[Date - Publication])))
```

Bibliografía

1. Azkur, A. K., Akdis, M., Azkur, D., Sokolowska, M., van de Veen, W., Brügger, M. C., O'Mahony, L., Gao, Y., Nadeau, K., & Akdis, C. A. (2020). Immune response to SARS-CoV-2 and mechanisms of immunopathological changes in COVID-19. *Allergy*, 75(7), 1564–1581. <https://doi.org/10.1111/all.14364>
2. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (2020). Discontinuation of Transmission-Based Precautions and Disposition of Patients with COVID-19 in Healthcare Settings (Interim Guidance). Consultado el 18 de

julio de 2020 en <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/hcp/disposition-hospitalized-patients.html>

3. Guo, W. L., Jiang, Q., Ye, F., Li, S. Q., Hong, C., Chen, L. Y., & Li, S. Y. (2020). Effect of throat washings on detection of 2019 novel coronavirus. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, ciaa416. Advance online publication. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa416>
4. Hong, K. H., Lee, S. W., Kim, T. S., Huh, H. J., Lee, J., Kim, S. Y., Park, J. S., Kim, G. J., Sung, H., Roh, K. H., Kim, J. S., Kim, H. S., Lee, S. T., Seong, M. W., Ryoo, N., Lee, H., Kwon, K. C., & Yoo, C. K. (2020). Guidelines for Laboratory Diagnosis of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) in Korea. *Annals of laboratory medicine*, 40(5), 351–360. <https://doi.org/10.3343/alm.2020.40.5.351>
5. Huang, A. T., Garcia-Carreras, B., Hitchings, M., Yang, B., Katzelnick, L. C., Rattigan, S. M., Borgert, B. A., Moreno, C. A., Solomon, B. D., Rodriguez-Barraquer, I., Lessler, J., Salje, H., Burke, D., Wesolowski, A., & Cummings, D. (2020). A systematic review of antibody mediated immunity to coronaviruses: antibody kinetics, correlates of protection, and association of antibody responses with severity of disease. *medRxiv : the preprint server for health sciences*, 2020.04.14.20065771. <https://doi.org/10.1101/2020.04.14.20065771>
6. King, N. (2010). RT-PCR protocols (2nd ed. /, Ser. Methods in molecular biology, 630). Humana. <https://doi.org/10.1007/978-1-60761-629-0>
7. Liu, R., Han, H., Liu, F., Lv, Z., Wu, K., Liu, Y., Feng, Y., & Zhu, C. (2020). 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. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, 505, 172–175. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2020.03.009>
8. Lo, I. L., Lio, C. F., Cheong, H. H., Lei, C. I., Cheong, T. H., Zhong, X., Tian, Y., & Sin, N. N. (2020). Evaluation of SARS-CoV-2 RNA shedding in clinical specimens and clinical characteristics of 10 patients with COVID-19 in Macau. *International journal of biological sciences*, 16(10), 1698–1707. <https://doi.org/10.7150/ijbs.45357>
9. Loeffelholz, M. J., & Tang, Y. W. (2020). Laboratory diagnosis of emerging human coronavirus infections - the state of the art. *Emerging microbes & infections*, 9(1), 747–756. <https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1745095>
10. Maddocks, S., & Jenkins, R. (2016). *Understanding PCR: a practical bench-top guide*. Academic Press is an imprint of Elsevier
11. Mawaddah, A., Gendeh, H. S., Lum, S. G., & Marina, M. B. (2020). Upper respiratory tract sampling in COVID-19. *The Malaysian journal of pathology*, 42(1), 23–35.
12. Ministerio de Salud de Colombia (Minsalud). (2020). Lineamientos para el uso de pruebas moleculares RT-PCR y pruebas serológicas de anticuerpos para SARS-CoV-2 (COVID-19) en Colombia del 6 de julio de 2020 5 Versión. Consultado el 23 de julio de 2020.

13. Ministerio de Sanidad de España (MSE). (2020). Estrategia de detección precoz, vigilancia y control de covid 19. Consultado el 18 de julio de 2020 en https://www.mscbs.gob.es/profesionales/saludPublica/ccayes/alertasActual/nCov/China/documentos/COVID19_Estrategia_vigilancia_y_control_e_indicador
14. National Human Genome Research Institute (NHGRI). (2020). Reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Consultado el 16 de julio de 2020 en <https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Reaccion-en-cadena-de-la-polimerasa>
15. Pan, Y., Zhang, D., Yang, P., Poon, L., & Wang, Q. (2020). Viral load of SARS-CoV-2 in clinical samples. *The Lancet. Infectious diseases*, 20(4), 411–412. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(20\)30113-4](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30113-4)
16. Pang, J., Wang, M. X., Ang, I., Tan, S., Lewis, R. F., Chen, J. I., Gutierrez, R. A., Gwee, S., Chua, P., Yang, Q., Ng, X. Y., Yap, R. K., Tan, H. Y., Teo, Y. Y., Tan, C. C., Cook, A. R., Yap, J. C., & Hsu, L. Y. (2020). Potential Rapid Diagnostics, Vaccine and Therapeutics for 2019 Novel Coronavirus (2019-nCoV): A Systematic Review. *Journal of clinical medicine*, 9(3), 623. <https://doi.org/10.3390/jcm9030623>
17. Park, D. J. (2011). PCR protocols (3rd ed., Ser. Springer protocols). Humana Press. <https://doi.org/10.1007/978-1-60761-944-4>
18. Robert Koch Institute (RKI). (2020). COVID-19: Entlassungskriterien aus der Isolierung In Abstimmung mit der Arbeitsgruppe Infektionsschutz der AOLG consultado el 18 de julio de 2020 https://www.rki.de/DE/Content/InfAZ/N/Neuartiges_Coronavirus/Entlassmanagement.html
19. Roxby, A. C., Greninger, A. L., Hatfield, K. M., Lynch, J. B., Dellit, T. H., James, A., Taylor, J., Page, L. C., Kimball, A., Arons, M., Munanga, A., Stone, N., Jernigan, J. A., Reddy, S. C., Lewis, J., Cohen, S. A., Jerome, K. R., Duchin, J. S., & Neme, S. (2020). Outbreak Investigation of COVID-19 Among Residents and Staff of an Independent and Assisted Living Community for Older Adults in Seattle, Washington. *JAMA internal medicine*, e202233. Advance online publication. <https://doi.org/10.1001/jamainternmed.2020.2233>
20. Sri Santosh, T., Parmar, R., Anand, H., Srikanth, K., & Saritha, M. (2020). A Review of Salivary Diagnostics and Its Potential Implication in Detection of Covid-19. *Cureus*, 12(4), e7708. <https://doi.org/10.7759/cureus.7708>
21. To, K. K., Tsang, O. T., Chik-Yan Yip, C., Chan, K. H., Wu, T. C., Chan, J., Leung, W. S., Chik, T. S., Choi, C. Y., Kandamby, D. H., Lung, D. C., Tam, A. R., Poon, R. W., Fung, A. Y., Hung, I. F., Cheng, V. C., Chan, J. F., & Yuen, K. Y. (2020). Consistent detection of 2019 novel coronavirus in saliva. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, ciaa149. Advance online publication. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa149>
22. To, K. K., Tsang, O. T., Leung, W. S., Tam, A. R., Wu, T. C., Lung, D. C., Yip, C. C., Cai, J. P., Chan, J. M., Chik, T. S., Lau, D. P., Choi, C. Y., Chen, L. L., Chan, W. M., Chan, K. H., Ip, J. D., Ng, A. C., Poon, R. W., Luo, C. T., Cheng, V. C., ... Yuen, K. Y. (2020). Temporal profiles of viral load in

- posterior oropharyngeal saliva samples and serum antibody responses during infection by SARS-CoV-2: an observational cohort study. *The Lancet. Infectious diseases*, 20(5), 565–574. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(20\)30196-1](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30196-1)
23. Tripp, R. A., & Tompkins, S. M. (Eds.). (2018). Roles of host gene and non-coding rna expression in virus infection (Ser. Current topics in microbiology and immunology, volume 419). Springer. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-05369-7>
24. Uechi, T., Nakamura, S., Takeshita, R., Morino, K., Mizuno, R., Nakagawa, Y., Irifukuhama, Y., Takada, S., Teruya, H., Mita, N., Nakamori, T., & Kinoshita, H. (2020). Persistence of positive severe acute respiratory syndrome coronavirus-2 reverse transcription-polymerase chain reaction test result for 24 days in a hospitalized asymptomatic carrier. *Acute medicine & surgery*, 7(1), e525. <https://doi.org/10.1002/ams2.525>
25. Vabret, N., Britton, G. J., Gruber, C., Hegde, S., Kim, J., Kuksin, M., Levantovsky, R., Malle, L., Moreira, A., Park, M. D., Pia, L., Risson, E., Saffern, M., Salomé, B., Esai Selvan, M., Spindler, M. P., Tan, J., van der Heide, V., Gregory, J. K., Alexandropoulos, K., ... Sinai Immunology Review Project (2020). Immunology of COVID-19: Current State of the Science. *Immunity*, 52(6), 910–941. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2020.05.002>
26. Wang, W. K., Chen, S. Y., Liu, I. J., Chen, Y. C., Chen, H. L., Yang, C. F., Chen, P. J., Yeh, S. H., Kao, C. L., Huang, L. M., Hsueh, P. R., Wang, J. T., Sheng, W. H., Fang, C. T., Hung, C. C., Hsieh, S. M., Su, C. P., Chiang, W. C., Yang, J. Y., Lin, J. H., ... SARS Research Group of the National Taiwan University/National Taiwan University Hospital (2004). Detection of SARS-associated coronavirus in throat wash and saliva in early diagnosis. *Emerging infectious diseases*, 10(7), 1213–1219. <https://doi.org/10.3201/eid1007.031113>
27. Wang, W., Xu, Y., Gao, R., Lu, R., Han, K., Wu, G., & Tan, W. (2020). Detection of SARS-CoV-2 in Different Types of Clinical Specimens. *JAMA*, 323(18), 1843–1844. Advance online publication. <https://doi.org/10.1001/jama.2020.3786>
28. Weissleder, R., Lee, H., Ko, J., & Pittet, M. J. (2020). COVID-19 diagnostics in context. *Science translational medicine*, 12(546), eabc1931. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.abc1931>
29. Wölfel, R., Corman, V. M., Guggemos, W., Seilmaier, M., Zange, S., Müller, M. A., Niemeyer, D., Jones, T. C., Vollmar, P., Rothe, C., Hoelscher, M., Bleicker, T., Brünink, S., Schneider, J., Ehmann, R., Zwirgmaier, K., Drosten, C., & Wendtner, C. (2020). Virological assessment of hospitalized patients with COVID-2019. *Nature*, 581(7809), 465–469. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2196-x>
30. Yang Y, Yang M, Shen C, et al.(2020). Evaluating the accuracy of different respiratory specimens in the laboratory diagnosis and monitoring the viral shedding of 2019-nCoV infections. medRxiv. February 2020:2020.02.11.20021493.
31. Younes, N., Al-Sadeq, D. W., Al-Jighefee, H., Younes, S., Al-Jamal, O., Daas, H. I., Yassine, H. M., & Nasrallah, G. K. (2020). Challenges in Laboratory Diagnosis of the Novel Coronavirus SARS-CoV-2. *Viruses*, 12(6), E582. <https://doi.org/10.3390/v12060582>

32. Yu, F., Yan, L., Wang, N., Yang, S., Wang, L., Tang, Y., Gao, G., Wang, S., Ma, C., Xie, R., Wang, F., Tan, C., Zhu, L., Guo, Y., & Zhang, F. (2020). Quantitative Detection and Viral Load Analysis of SARS-CoV-2 in Infected Patients. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, ciaa345. Advance online publication. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa345>
33. Zheng, Z., Yao, Z., Wu, K., & Zheng, J. (2020). The diagnosis of pandemic coronavirus pneumonia: A review of radiology examination and laboratory test. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*, 128, 104396. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2020.104396>
34. Zou, L., Ruan, F., Huang, M., Liang, L., Huang, H., Hong, Z., Yu, J., Kang, M., Song, Y., Xia, J., Guo, Q., Song, T., He, J., Yen, H. L., Peiris, M., & Wu, J. (2020). SARS-CoV-2 Viral Load in Upper Respiratory Specimens of Infected Patients. *The New England journal of medicine*, 382(12), 1177–1179. <https://doi.org/10.1056/NEJMc2001737>