

Directrices de Laboratorio para la Detección y el Diagnóstico de la Infección con el Virus COVID-19

8 de julio de 2020

Los coronavirus son un grupo de virus ARN altamente diversos de la familia *Coronaviridae* que se dividen en 4 géneros: alfa, beta, gamma y delta, y que causan enfermedades de leves a graves en humanos y animales (1-3). Existen coronavirus humanos endémicos como los alfacoronavirus 229E y NL63 y los betacoronavirus OC43 y HKU1 que pueden causar enfermedades de tipo influenza o neumonía en humanos (1, 3). Sin embargo, dos coronavirus zoonóticos que causan enfermedades graves en humanos han emergido: el coronavirus del Síndrome respiratorio agudo grave (SARS-CoV) en 2002-2003 y el coronavirus del Síndrome respiratorio de Oriente Medio (MERS-CoV) (1-5).

En enero de 2020, el agente etiológico responsable de un grupo de casos de neumonía grave en Wuhan, China, fue identificado como un nuevo betacoronavirus, distinto del SARS-CoV y MERS-CoV (6). El 11 de febrero de 2020, el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV) anunció la denominación del virus como coronavirus del síndrome respiratorio agudo grave 2 (SARS-CoV-2) (7), mientras que, el mismo día, la OMS nombró la enfermedad como enfermedad por coronavirus COVID-19 (8). Para fines de comunicación, haremos referencia a este virus como "el virus responsable de COVID-19" o "el virus COVID-19". La secuencia genómica completa de este nuevo agente está disponible y se han desarrollado diferentes protocolos de detección (9). A la luz de la circulación actual de COVID-19 en la región de las Américas, la Organización Panamericana de la Salud / Organización Mundial de la Salud (OPS / OMS) recomienda a los Estados Miembros garantizar la identificación oportuna de casos sospechosos, la toma y el envío de muestras a los laboratorios de referencia, y la implementación de protocolos de detección molecular, según la capacidad del laboratorio.

El 19 de marzo de 2020, la OMS actualizó su guía provisional sobre las pruebas de laboratorio para la enfermedad por coronavirus (COVID-19) en casos humanos sospechosos que incluye información sobre la toma y envío de muestras, pruebas de laboratorio, e informes de casos y resultados (9). La OMS también actualiza las definiciones de casos sospechosos de COVID-19 según sea necesario (10).

Toma de muestras y envío adecuado

Toma de muestras

Las muestras deben ser tomadas por personal capacitado y teniendo en cuenta todas las instrucciones de bioseguridad, incluyendo el uso de los equipos de protección personal adecuados para las precauciones estándar, de contacto y de transmisión aérea. En particular, el personal debe usar higiene de manos adecuada, bata, respirador (N95 o FFP2), protección para los ojos (gafas) o faciales (protector facial), y guantes (11).

Muestras respiratorias

Las muestras recomendadas son los hisopados nasofaríngeos y orofaríngeos, preferiblemente combinados (los hisopos deben colocarse y transportarse en un mismo tubo con medio de transporte viral o universal) (9). Si los hisopos son un factor limitante, se puede usar un hisopo único (priorizando el hisopado nasofaríngeo). Las muestras del tracto respiratorio inferior, incluidos el esputo, el lavado broncoalveolar y el aspirado traqueal también son útiles; sin embargo, los lavados broncoalveolares y los aspirados traqueales solo deben tomarse de acuerdo con criterios médicos y garantizando todas las medidas de

bioseguridad necesarias (11). Si el muestreo de contactos asintomáticos se considera en las guías nacionales, las muestras de las vías respiratorias superiores (hisopados nasofaríngeos y orofaríngeos) se prefieren para la toma.

En general, se deben usar hisopos flocados hechos con materiales sintéticos (incluyendo nylon, Dacron o poliéster); se deben evitar los hisopos de algodón. Los protocolos para la producción casera de medios de transporte viral están disponibles previa solicitud en la Oficina Regional de la OPS. Además, si el medio de transporte no está disponible, podría usarse solución salina estéril o solución estabilizadora de ácidos nucleicos (p. ej., *DNA/RNA shield*) (ver abajo para consideraciones de transporte de muestra).

Envío de muestras

Las muestras respiratorias deben mantenerse refrigeradas (4-8 °C) y enviarse al laboratorio donde se procesarán dentro de las 24-72 horas de la toma. Si no se pueden enviar las muestras dentro de este período, se recomienda congelarlas a -70 °C (o menos) hasta que se envíen (asegurando que se mantenga la cadena de frío). Si los hisopos se colocaron en solución salina estéril en lugar de medio de transporte viral, el envío debe ser expedito.

El envío de muestras sospechosas debe cumplir con las reglamentaciones nacionales y utilizar, como mínimo, un sistema de triple empaque básico (12). Además, los envíos a laboratorios de referencia o centros colaboradores fuera del país debe cumplir con todas las normas internacionales para Sustancias Biológicas de Categoría B (13).

Muestras alternativas

El virus COVID-19, así como el SARS-CoV y el MERS-CoV, se ha detectado en otros tipos de muestras, como heces y sangre (9). Sin embargo, la dinámica viral en estas muestras no se ha caracterizado completamente. Las muestras de tejido pulmonar o del tracto respiratorio también pueden ser útiles para la detección molecular en casos fallecidos, siempre y cuando existan las condiciones apropiadas para realizar la autopsia, particularmente la protección respiratoria. Las muestras de sangre agudas y convalecientes podrían ser útiles a medida que las pruebas serológicas estén disponibles (ver abajo).

Además, la saliva se ha propuesto como una muestra alternativa, especialmente porque se puede tomar fácilmente sin procedimientos invasivos o incómodos, y minimizando la exposición potencial del trabajador de la salud (14-16). Sin embargo, hay pocas publicaciones que respalden el uso de muestras de saliva para la detección de COVID-19; aún se necesitan más datos de validación y resultados en sets de datos más extensos. Por estas razones, la implementación de esta muestra no se recomienda actualmente.

Finalmente, se ha propuesto el uso de “pools” de muestras como una alternativa para reducir la cantidad de pruebas necesarias para el tamizaje (17, 18). Sin embargo, es importante tener en cuenta que la sensibilidad de la prueba puede disminuir, lo que puede causar falsos negativos. Además, aunque esta estrategia puede ser útil cuando la prevalencia de COVID-19 en la población es baja, una vez que se establece la transmisión comunitaria, esta estrategia podría generar una carga adicional ya que los “pools” probablemente serán positivos. Por lo tanto, el uso de los “pools” de muestras para el diagnóstico de casos individuales debe evaluarse cuidadosamente.

Ensayos de laboratorio

Las directrices de bioseguridad para el manejo de muestras sospechosas en el laboratorio se han publicado anteriormente (13, 19).

Métodos moleculares

La confirmación rutinaria de los casos de COVID-19 se basa en la detección del ácido nucleico (ARN) del virus mediante ensayos de RT-PCR en tiempo real.

Extracción de ARN

El ARN se puede extraer de las muestras mencionadas anteriormente utilizando cualquier protocolo estándar o estuche de extracción. En general, la etapa de lisis de la muestra en la extracción de ARN inactiva cualquier virus. Por lo tanto, las muestras después de la lisis se consideran generalmente como no infecciosas. La inactivación del virus COVID-19 a través de la lisis de la muestra se ha verificado para algunos kits comerciales (20).

Las muestras de esputo requieren licuefacción antes de la extracción molecular (21), mientras que las muestras de tejido requieren lisis y homogeneización.

Protocolos de detección molecular

La OMS ha puesto a disposición varios protocolos de diagnóstico molecular (utilizando RT-PCR) en la página web:

<https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/technical-guidance/laboratory-guidance>

Favor notar que la OMS no respalda los nombres de los vendedores ni los fabricantes incluidos en los protocolos. Además, algunos de estos protocolos aún no han sido validados a través del proceso de la OMS.

Gracias al esfuerzo de los Estados Miembros de la OPS, todos los laboratorios nacionales con capacidad para realizar pruebas moleculares, incluidos los Centros Nacionales de Influenza (NIC), recibieron capacitación en el uso del primer protocolo puesto a disposición por la OMS, desarrollado por el Instituto de Virología Charité – Universitätsmedizin Berlín, Alemania. La evaluación del protocolo ha sido publicada (22) y un protocolo de trabajo está disponible en el siguiente enlace:

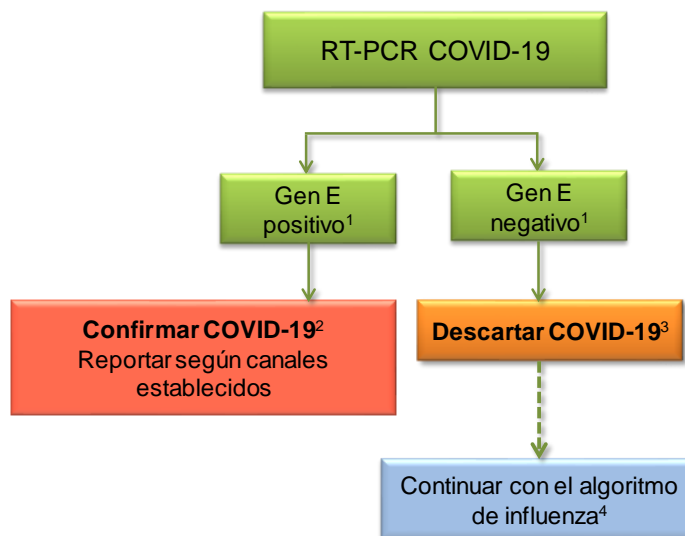
<https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/protocol-v2-1.pdf>

Este protocolo se basa en la detección de dos marcadores en el genoma del virus: el gen E y el gen RdRP (dos sondas P1 y P2 fueron diseñadas para la detección del gen RdRP). El ensayo E es específico para todos los virus del subgénero *Sarbecovirus* (es decir, SARS-CoV, el virus COVID-19 y los virus de murciélagos relacionados), mientras que el ensayo RdRP con la sonda P2 solo detecta el virus COVID-19. Sin embargo, **el único Sarbecovirus que circula actualmente en humanos es el virus COVID-19**. Por lo tanto, un resultado positivo con el ensayo E confirma un caso de COVID-19. La OPS / OMS ha distribuido reactivos específicos (cebadores, sondas y controles positivos) y protocolos de trabajo para estos ensayos en toda la Región.

La detección de un solo marcador genético es suficiente para la confirmación laboratorial de los casos. Aunque la recomendación inicial era detectar dos marcadores genéticos diferentes (p. ej., detección del gen E seguida por gen RdRP), un algoritmo más simple aumenta la capacidad del laboratorio mientras que garantiza la precisión mediante el uso de los ensayos de Charité que son altamente específicos. Según procedimientos estándares, los laboratorios deben asegurarse de que todos los parámetros de control de calidad del ensayo (controles negativos y positivos, forma de las curvas de amplificación) sean óptimos antes de emitir resultados. Se pueden usar los genes E o RdRP para la confirmación laboratorial; sin embargo, el ensayo del gen E ha demostrado una sensibilidad ligeramente mayor, por lo que **recomendamos priorizar el gen E como el marcador seleccionado** (Figura 1).

Otros ensayos moleculares están disponibles y se pueden realizar en plataformas abiertas (“manuales”) o cerradas (es decir, que los estuches solo funcionan en sistemas propietarios que realizan los ensayos de manera automatizadas). Estos incluyen ensayos que han sido añadidos al Listado de Uso de Emergencia (EUL) de OMS (23), evaluados independientemente por FIND (*Foundation for Innovative New Diagnostics*, Centro Colaborador OMS) (24), y/o aprobados para su comercialización por las autoridades reguladoras nacionales (en particular, aquellas consideradas por la OMS como SRA [*Stringent Regulatory Authority*] para su precalificación acelerada de pruebas de diagnóstico in vitro). Bajo la supervisión de la autoridad sanitaria nacional y con el apoyo técnico de los Laboratorios Nacionales de Salud Pública y Centros Nacionales de Influenza, estos ensayos pueden ser utilizados en centros de atención que cuenten con la capacidad instalada, o en laboratorios descentralizados.

Figura 1. Algoritmo de detección molecular



¹Cuando se usa el protocolo de referencia Charité. Si se utiliza un protocolo diferente, siga los criterios de positividad indicados.

²En ausencia de otros Sarbecovirus circulando a nivel global, un resultado positivo con el gen E del protocolo de referencia de Charité permite confirmar la detección.

³Asumiendo que la muestra se tomó correctamente y que se siguieron todos los procesos de aseguramiento de calidad. La información clínica y epidemiológica también debe considerarse antes de descartar el caso.

⁴Según los protocolos de vigilancia y los recursos disponibles. También se pueden detectar otros virus respiratorios.

Interpretación de los resultados¹

Aunque la dinámica de la infección incluyendo la excreción viral en diferentes fluidos sigue en estudio, hasta el momento se ha podido determinar que el virus puede ser detectado desde al menos 48 horas antes del inicio de síntomas (pre-sintomáticos) y hasta 12-14 días (al menos 6-7 días) en muestras del tracto respiratorio superior (hisopado naso/orofaríngeo) y hasta por 20 días (o más) en muestras del tracto respiratorio inferior incluyendo esputo, aspirado traqueal, lavado bronquioalveolar, etc. (Figura 2).

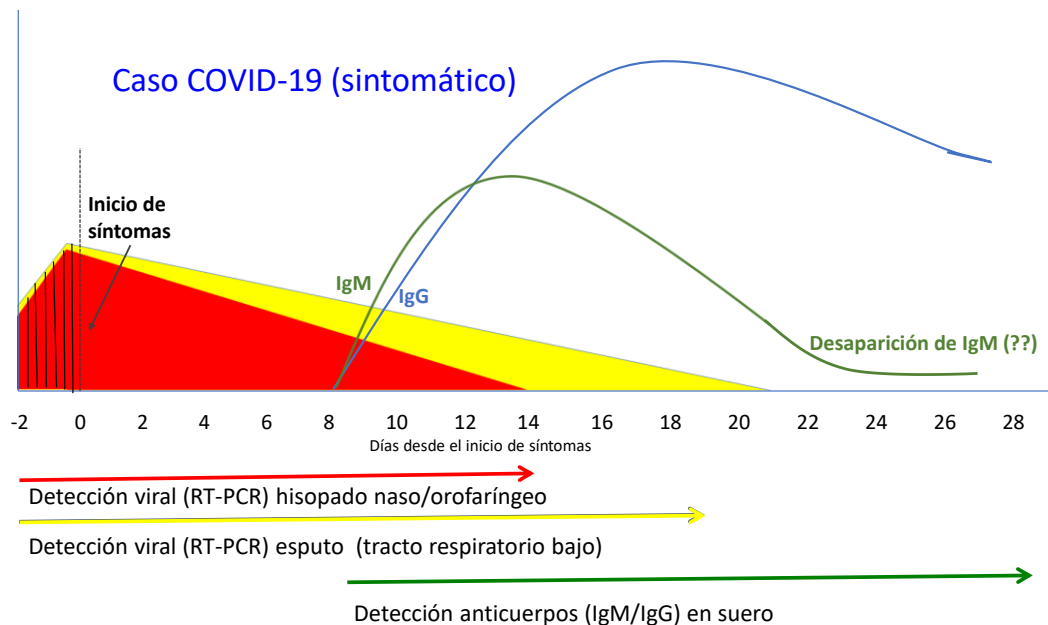
En un individuo identificado como contacto de un caso confirmado, se debe considerar cuál es el valor agregado de realizar un ensayo de laboratorio, teniendo en cuenta que independiente del resultado, la

¹ Esta sección está basada en el documento OPS “Interpretación de resultados de laboratorio para diagnóstico de COVID-19” disponible en: <https://www.paho.org/es/documentos/interpretacion-resultados-laboratorio-para-diagnostico-covid-19>

indicación es la cuarentena por 14 días contados desde el día del último contacto con el caso. Si se realiza un ensayo molecular, un resultado negativo no descarta el contacto previo, ni descarta la posibilidad que el contacto esté en periodo de incubación. Si se obtiene un resultado positivo, constituye un caso asintomático o presintomático y en cualquier caso se deberá cumplir con el aislamiento.

En un individuo asintomático, ya que no se cuenta con una fecha que pueda ser utilizada como referencia, un resultado negativo de detección molecular puede ocurrir porque la cantidad de virus no es suficiente para ser detectada, porque el individuo se encuentra en el periodo posterior a la infección, o simplemente porque el individuo nunca ha estado infectado. Por lo tanto, un resultado negativo no descarta una posible infección. Si como parte de una búsqueda activa (trabajadores de salud, cuidadores en casas de retiro, etc.) se obtiene un resultado positivo por detección molecular, el resultado constituye un caso asintomático y el individuo deberá ser aislado.

Figura 2. Dinámica de la infección por COVID-19 (según datos disponibles actualmente)



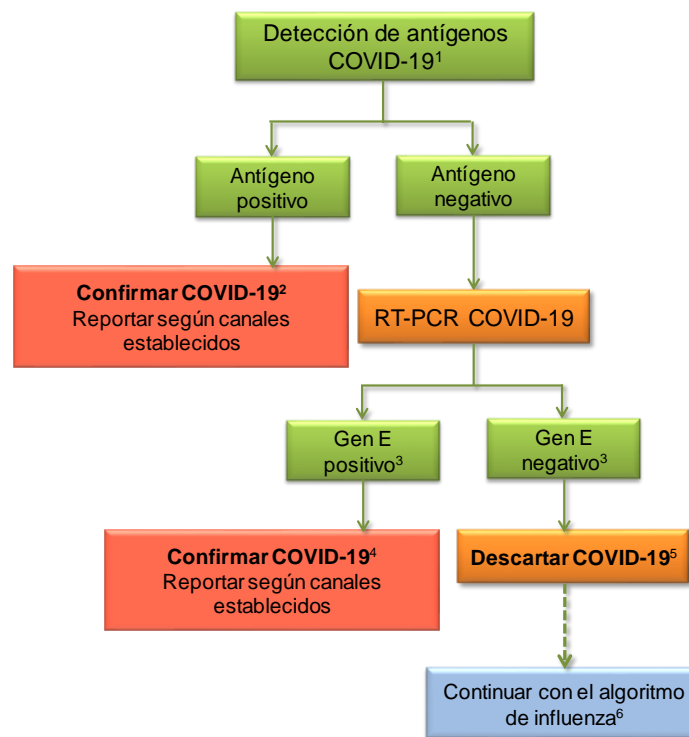
La detección molecular del virus COVID-19 utilizando protocolos bien diseñados suele ser muy específica; por lo tanto, un resultado positivo confirma la detección del virus. Por el contrario, un resultado negativo no siempre significa la ausencia de infección por el virus COVID-19 (9). Varias razones pueden explicar un resultado negativo en una persona infectada con el virus COVID-19, principalmente:

- Calidad de la muestra, manipulación, transporte y / o almacenamiento deficientes (como control, se puede realizar la detección cualitativa de un gen constitutivo (*housekeeping*) humano [p. ej., RNase P (25)]).
- Extracción de muestra deficiente / fallida, presencia de inhibidores de PCR en el ARN extraído (como control, se puede usar un control de extracción o la detección de un constitutivo como se mencionó anteriormente).
- La muestra se recolectó en un momento en que el paciente no estaba secretando cantidades suficientes de virus, por ejemplo, muy temprana o tardíamente durante la infección (este punto es particularmente relevante ya que la dinámica de la presencia del virus en diferentes tipos de muestra no se ha establecido del todo).
- Al igual que con cualquier ensayo de detección molecular, las mutaciones del virus en las regiones a las que se dirigen los ensayos pueden afectar la sensibilidad de la detección.

Detección de antígenos

Durante los primeros días tras el inicio de síntomas (1 a 5 días aproximadamente), se generan proteínas virales (antígenos) que pueden ser detectadas mediante diferentes ensayos (ELISA, inmunofluorescencia, o incluso pruebas rápidas). Sin embargo, no se ha caracterizado totalmente la dinámica de producción y excreción de estas proteínas. En general, la detección de antígenos presenta una especificidad aceptable (dependiendo del ensayo) por lo cual su detección puede ser usada como criterio de confirmación (en conjunto con la definición de caso, la historia clínica y los antecedentes epidemiológicos) y para tomar decisiones en salud pública (p. ej., aislamiento). Sin embargo, un resultado negativo (en cualquier estadio de la infección) **no debe ser usado como criterio para descartar un caso**, y por lo tanto se recomiendan pruebas adicionales con ensayos moleculares (Figura 3).

Figura 3. Algoritmo basado en la detección de antígenos



¹ELISA o pruebas rápidas validadas y autorizadas por las entidades reguladoras respectivas.

²Se debe tener en cuenta la especificidad del ensayo, incluyendo la posibilidad de reacción cruzada con otros coronavirus humanos.

³Cuando se usa el protocolo de referencia Charité. Si se utiliza un protocolo diferente, siga los criterios de positividad indicados.

⁴En ausencia de otros Sarbecovirus circulando a nivel global, un resultado positivo con el gen E del protocolo de referencia de Charité permite confirmar la detección.

⁵Asumiendo que la muestra se tomó correctamente y que se siguieron todos los procesos de aseguramiento de calidad. La información clínica y epidemiológica también debe considerarse antes de descartar el caso.

⁶Según los protocolos de vigilancia y los recursos disponibles. También se pueden detectar otros virus respiratorios.

Los ensayos de detección de antígeno deben someterse a una evaluación independiente para establecer el rendimiento diagnóstico y las modalidades de implementación. El costo-efectividad también debe analizarse cuidadosamente. Dada la probable pérdida de sensibilidad, se recomienda que estos solo se utilicen para pruebas de menor prioridad de acuerdo con las pautas nacionales y no para casos graves / hospitalizados.

Métodos serológicos

Los ensayos serológicos, son aquellos que permiten detectar los anticuerpos (IgM, IgG o IgA) generados como parte de la respuesta inmune del individuo contra el virus COVID-19. En general, la mayor proporción de anticuerpos son producidos contra la proteína más abundante del virus que es la de la Nucleocápside (N). Por ello, los ensayos que detectan anticuerpos contra esta proteína podrían ser más sensibles. Sin embargo, los anticuerpos dirigidos contra la proteína de unión a los receptores celulares (proteína S) suelen ser más específicos. Por esto, utilizar ensayos que detecten anticuerpos IgG y/o IgM dirigidos contra los dos antígenos pueden tener un mejor desempeño. En cualquier caso, estos anticuerpos pueden presentar reactividad cruzada con SARS-CoV e incluso con otros coronavirus humanos (26).

Dado que los anticuerpos (IgM/IgG) contra el virus son detectables solo alrededor del día 7 desde el inicio de los síntomas (en aproximadamente 50% de los casos), un resultado de serología negativo durante los primeros 7 días de enfermedad no puede ser usado como criterio para descartar un caso (27). La sensibilidad en la detección de anticuerpos totales incrementa a partir de la segunda semana tras el inicio de los síntomas; y para el día 14 más del 90% de pacientes ya han desarrollado anticuerpos (detectables por ELISA). Sin embargo, la detección de anticuerpos solo indica que hubo un contacto previo con el virus, pero no permite definir el momento en que ocurrió el contacto. Por ejemplo, un paciente que haya tenido contacto previo con el virus (no necesariamente enfermo) pero que posteriormente se infecte con otro patógeno circulante (influenza u otro agente etiológico) que también genere síntomas respiratorios, va a resultar positivo para anticuerpos COVID-19 llevando a un diagnóstico errado; por esta razón, el uso de la serología por sí sola para confirmar un caso, debe ser cuidadosamente evaluado.

Por otro lado, es importante tener en cuenta que la presencia de anticuerpos no necesariamente indica protección. La única manera inferir la capacidad de neutralización de los anticuerpos será mediante un ensayo de neutralización por reducción de placas (PRNT); aun así, la duración de estos anticuerpos en el tiempo y su capacidad de protección no se han esclarecido completamente.

Con todo esto, los ensayos serológicos (tanto pruebas de ELISA como pruebas rápidas) **no son considerados como pruebas diagnósticas** y los resultados deben ser evaluados cuidadosamente a la luz de la información clínica, el resultado de otros ensayos y el contexto epidemiológico. Así, su implementación debe estar enfocada principalmente a investigaciones epidemiológicas y estudios de seroprevalencia.

Se están comercializando muchos productos para la detección de anticuerpos (IgM y / o IgG) inducidos por la infección por el virus COVID-19, incluidas las pruebas rápidas. Cualquier prueba de este tipo debe validarse y su rendimiento en términos de especificidad y sensibilidad debe ser analizado. Actualmente y a solicitud de la OMS, se están llevando a cabo procesos de evaluación y validación eventual para algunas de estas pruebas. Aunque se han generado datos preliminares de validación de ELISA y pruebas rápidas, los resultados se basan en sets de datos limitados y no todos se han realizado con paneles de muestras bien caracterizados de pacientes con COVID-19.

Pruebas rápidas basadas en la detección de anticuerpos del huésped

Hasta el momento no existen pruebas rápidas (inmunocromatografía, detección con oro coloidal u otros formatos) que hayan sido formalmente validadas. Además de todas las limitaciones descritas anteriormente para las pruebas serológicas, en general las pruebas rápidas tienen menor sensibilidad. Por lo tanto, según los datos actuales, la OPS / OMS **no recomienda el uso de pruebas rápidas de detección de anticuerpos para la atención al paciente o el diagnóstico de COVID-19** (28). Su utilidad en la vigilancia y la investigación epidemiológica aún no se ha establecido.

Detección de influenza en el contexto de COVID-19

La influenza es una amenaza persistente y se necesita una vigilancia continua para detectar la aparición de virus de influenza zoonóticos y no estacionales de potencial pandémico (29). Por lo tanto, **la detección de influenza no debe detenerse, y los laboratorios deben continuar utilizando el algoritmo de laboratorio de influenza recomendado por la OPS** para la vigilancia rutinaria de la influenza y de los casos inusuales de IRAG.

Fortalecimiento de las capacidades y redes de laboratorio

Todos los laboratorios nacionales de salud pública con capacidad de diagnóstico molecular, incluidos los NIC, han implementado la detección del virus COVID-19. Se insta a los laboratorios a garantizar la disponibilidad de recursos humanos e insumos genéricos (p. ej., kits de extracción y enzimas de RT-PCR) para la detección del virus COVID-19, y a planificar un aumento en las pruebas de laboratorio.

Los países sin capacidad de diagnóstico molecular para implementar la detección del virus COVID-19 deben enviar muestras clínicas sospechosas (ajustadas estrictamente a la definición del caso) a un laboratorio de referencia. La lista de laboratorios de referencia de la OMS que realizan pruebas de confirmación está disponible en:

<https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/technical-guidance/laboratory-guidance>

En las Américas, existen tres laboratorios de referencia de la OMS para el virus COVID-19:

- Laboratorio de Virus Respiratório e do Sarampo, Fiocruz, Río de Janeiro, Brasil.
- Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (InDRE), Ciudad de México, México.
- Respiratory Viruses Diagnostic Laboratory, CDC, Atlanta, EE. UU.

Se debe contactar a la OPS antes de remitir las muestras a los laboratorios de referencia de la OMS.

Vigilancia genómica

Desde la caracterización genómica inicial del virus COVID-19, el virus ha divergido en diferentes subclados (6). **La aparición de mutaciones es un evento natural esperado dentro del proceso de evolución del virus.** De hecho, algunas mutaciones específicas definen los subclados virales. Aunque el efecto de algunas de estas mutaciones sobre el incremento de la infectividad o la virulencia ha sido evaluado (30), en este momento no hay evidencia suficiente para demostrar que algunos virus COVID-19 circulantes tienen una mayor virulencia.

Sin embargo, se necesita más información genética sobre los virus COVID-19 circulantes en la Región para establecer patrones de dispersión y evolución. Así, las plataformas de secuenciación pueden usarse para la caracterización genética del virus COVID-19 en laboratorios con capacidad de secuenciación de Sanger o *Next Generation*. Se alienta a estos laboratorios a secuenciar oportunamente muestras positivas y

compartir información genética a través de GISAID (*Global Initiative on Sharing All Influenza Data*) (6). La OPS está trabajando para fortalecer una red de secuenciación genómica COVID-19 en la Región de las Américas para que los datos genómicos estén disponibles de manera oportuna a través de la plataforma GISAID. La Red Regional de Vigilancia Genómica de COVID-19 está abierta a todos los países de las Américas y cuenta con dos Laboratorios de Secuenciación Regional (Fiocruz, Brasil e Instituto de Salud Pública de Chile) para los laboratorios que necesiten secuenciación externa.

Reporte de datos

Conformemente el Reglamento Sanitario Internacional (RSI), todos los casos confirmados de COVID-19 deben notificarse en 24 horas a través de los canales oficiales del RSI (10).

Además, todos los resultados positivos y negativos para COVID-19 deben informarse en la base de datos FluNet que se envía semanalmente a la OPS / OMS. Las hojas de cálculo de FluNet fueron actualizadas con la adición de una nueva columna para COVID-19 y se han enviado a los países para reemplazar la versión anterior. Se puede obtener información adicional a través de flu@paho.org.

Referencias

1. Azhar EI, Hui DSC, Memish ZA, Drosten C, Zumla A. The Middle East Respiratory Syndrome (MERS). *Infect Dis Clin North Am*. 2019;33(4):891-905.
2. Drosten C, Preiser W, Gunther S, Schmitz H, Doerr HW. Severe acute respiratory syndrome: identification of the etiological agent. *Trends Mol Med*. 2003;9(8):325-7.
3. Hui DSC, Zumla A. Severe Acute Respiratory Syndrome: Historical, Epidemiologic, and Clinical Features. *Infect Dis Clin North Am*. 2019;33(4):869-89.
4. de Wit E, van Doremalen N, Falzarano D, Munster VJ. SARS and MERS: recent insights into emerging coronaviruses. *Nat Rev Microbiol*. 2016;14(8):523-34.
5. Hilgenfeld R, Peiris M. From SARS to MERS: 10 years of research on highly pathogenic human coronaviruses. *Antiviral Res*. 2013;100(1):286-95.
6. Global Initiative on Sharing All Influenza Data (GISAID). Genomic epidemiology of hCoV-19 2020. Available from: <https://www.gisaid.org/epiflu-applications/next-hcov-19-app/>.
7. Gorbalenya AE, Baker SC, Baric RS, de Groot RJ, Drosten C, Gulyaeva AA, et al. Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: The species and its viruses – a statement of the Coronavirus Study Group. *bioRxiv*. 2020:2020.02.07.937862.
8. World Health Organization. Naming the coronavirus disease (COVID-19) and the virus that causes it. Geneva: WHO; 2020. Available from: [https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/technical-guidance/naming-the-coronavirus-disease-\(covid-2019\)-and-the-virus-that-causes-it](https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/technical-guidance/naming-the-coronavirus-disease-(covid-2019)-and-the-virus-that-causes-it).
9. World Health Organization. Laboratory testing for coronavirus disease (COVID-19) in suspected human cases: interim guidance. WHO/COVID-19/laboratory/2020.5. Geneva: WHO; 2020. Available from: <https://www.who.int/publications-detail/laboratory-testing-for-2019-novel-coronavirus-in-suspected-human-cases-20200117>.
10. World Health Organization. Global Surveillance for human infection with coronavirus disease (COVID-2019), Interim guidance. WHO/2019-nCoV/SurveillanceGuidance/2020.6. Geneva: WHO; 2020. Available from: <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/technical-guidance/surveillance-and-case-definitions>.
11. Organización Panamericana de la Salud / Organización Mundial de la Salud. Requerimientos para uso de equipos de protección personal (EPP) para el nuevo coronavirus (2019-nCoV) en establecimientos de salud. Washington, DC: OPS / OMS; 2020. Available from: <https://www.paho.org/es/documentos/requerimientos-para-uso-equipos-proteccion-personal-epp-para-nuevo-coronavirus-2019-ncov>.
12. Organización Mundial de la Salud. Guía sobre la reglamentación relativa al transporte de sustancias infecciosas 2019–2020. Aplicable a partir del 1 de enero de 2019. Ginebra: OMS; 2019. Available from: <https://www.who.int/ihr/publications/WHO-WHE-CPI-2019.20/es/>.
13. Organización Panamericana de la Salud / Organización Mundial de la Salud. Directrices provisionales de bioseguridad de laboratorio para el manejo y transporte de muestras asociadas al nuevo coronavirus 2019 (2019-nCoV). Washington, DC: PAHO / WHO; 2020. Available from: www.paho.org/es/file/58508/download?token=fc5J8kWB.
14. Alizargar J, Etemadi Sh M, Aghamohammadi M, Hatefi S. Saliva samples as an alternative for novel coronavirus (COVID-19) diagnosis. *J Formos Med Assoc*. 2020.
15. Azzi L, Carcano G, Gianfagna F, Grossi P, Gasperina DD, Genoni A, et al. Saliva is a reliable tool to detect SARS-CoV-2. *J Infect*. 2020;81(1):e45-e50.
16. To KK, Tsang OT, Chik-Yan Yip C, Chan KH, Wu TC, Chan JMC, et al. Consistent detection of 2019 novel coronavirus in saliva. *Clin Infect Dis*. 2020.
17. Hogan CA, Sahoo MK, Pinsky BA. Sample Pooling as a Strategy to Detect Community Transmission of SARS-CoV-2. *JAMA*. 2020.

18. Yelin I, Aharony N, Shaer Tamar E, Argoetti A, Messer E, Berenbaum D, et al. Evaluation of COVID-19 RT-qPCR test in multi-sample pools. Clin Infect Dis. 2020.
19. World Health Organization. Laboratory biosafety guidance related to coronavirus disease 2019 (COVID-19). WHO/WPE/GIH/2020.3. Geneva: WHO; 2020. Available from: [https://www.who.int/publications-detail/laboratory-biosafety-guidance-related-to-coronavirus-disease-2019-\(covid-19\)](https://www.who.int/publications-detail/laboratory-biosafety-guidance-related-to-coronavirus-disease-2019-(covid-19)).
20. Centers for Disease Control and Prevention. CDC 2019-Novel Coronavirus (2019-nCoV) Real-Time RT-PCR Diagnostic Panel, Instructions for Use. Atlanta: CDC; 2020. Available from: <https://www.fda.gov/media/134922/download>.
21. Centers for Disease Control and Prevention. Processing of Sputum Specimens for Nucleic Acid Extraction. Atlanta: CDC; 2020. Available from: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/downloads/processing-sputum-specimens.pdf>.
22. Corman VM, Landt O, Kaiser M, Molenkamp R, Meijer A, Chu DKW, et al. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. Euro Surveill. 2020;25(3).
23. World Health Organization. Coronavirus disease (COVID-19) outbreak – Emergency Use Listing Procedure (EUL) announcement. Geneva: CDC; 2020 [Available from: https://www.who.int/diagnostics_laboratory/EUL/en/].
24. FIND. SARS-CoV-2 Molecular Assay Evaluation: Results. 2020 [Available from: <https://www.finddx.org/covid-19/sarscov2-eval-molecular/molecular-eval-results/>].
25. Centers for Disease Control and Prevention. CDC protocol of realtime RTPCR for swine influenza A(H1N1). Geneva: WHO; 2009. Available from: https://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/CDCrealtimerTPCRprotocol_20090428.pdf.
26. Meyer B, Drosten C, Muller MA. Serological assays for emerging coronaviruses: challenges and pitfalls. Virus Res. 2014;194:175-83.
27. Sethuraman N, Jeremiah SS, Ryo A. Interpreting Diagnostic Tests for SARS-CoV-2. JAMA. 2020.
28. World Health Organization. Advice on the use of point-of-care immunodiagnostic tests for COVID-19. Scientific brief. Geneva: WHO; 2020. Available from: <https://www.who.int/news-room/commentaries/detail/advice-on-the-use-of-point-of-care-immunodiagnostic-tests-for-covid-19>.
29. World Health Organization. Preparing GISRS for the upcoming influenza seasons during the COVID-19 pandemic – practical considerations. Geneva: WHO; 2020. Available from: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/332198/WHO-2019-nCoV-Preparing_GISRS-2020.1-eng.pdf.
30. Korber B, Fischer W, Gnanakaran S, Yoon H, Theiler J, Abfalterer W, et al. Tracking changes in SARS-CoV-2 Spike: evidence that D614G increases infectivity of the COVID-19 virus. Cell. 2020.