

# Estandarización de Emergencia para el Diagnóstico del virus SARS-CoV-2 mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa de Transcripción Reversa en Tiempo Real (RT-PCR) en situación de pandemia de COVID-19

*Emergency Standardization for SARS-CoV-2 virus Diagnosis by Real-Time Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) in a COVID-19 pandemic situation*

**Diego Fernández-Lázaro<sup>1,2</sup>, Natalia Sanz Gómez<sup>2</sup>, Nerea Sánchez Serrano<sup>2</sup>, Assma Alaoui Sosse<sup>2</sup>, Carmen Aldea-Mansilla<sup>2</sup>**

<sup>(1)</sup> Departamento de Biología Celular, Histología y Farmacología. Facultad de Ciencias de la Salud. Campus Universitario de Soria. Universidad de Valladolid. Correspondencia: [diego.fernandez.lazaro@uva](mailto:diego.fernandez.lazaro@uva)

<sup>(2)</sup> Unidad de Microbiología. Complejo Hospitalario de Soria. Gerencia de Salud de Castilla y León.

Recibido: 16/04/2020 Revisado: 10/05/2020 Aceptado: 11/05/2020 Publicado: 22/05/2020

## Resumen

Ante la pandemia del coronavirus emergente SARS-CoV-2 (Coronavirus 2 relacionado con el Síndrome Respiratorio agudo severo), es necesaria la estandarización precisa del diagnóstico hospitalario para reducir el tiempo de respuesta en la confirmación de un caso de sospecha. Por esta razón el diagnóstico de laboratorio es una prioridad de los sistemas de salud pública. En la provincia de Soria, de cerca de 100.000 habitantes, con una población muy envejecida, un índice de mortalidad por COVID-19 del doble que el observado en España, el único Hospital

Santa Bárbara de la red pública es el único centro diagnóstico de SARS-CoV-2. En el Servicio de Microbiología, hemos establecido una robusta metodología diagnóstica para la detección del ARN viral presente en muestras de pacientes infectados mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa de Transcripción Reversa (RT-PCR) en Tiempo Real, que permiten en aproximadamente 4 horas emitir un informe. Este estudio describe el proceso que podría guiar a Servicios de Microbiología de otros Centros Hospitalarios.

## Palabras clave

Coronavirus, COVID-19, pandemia, diagnóstico, RT-PCR.

**Cómo citar este artículo:** Fernández-Lázaro D, Sanz Gómez N, Sánchez Serrano N, Aldea-Mansilla C. Estandarización de Emergencia para el Diagnóstico del virus SARS-CoV-2 mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa de Transcripción Reversa en Tiempo Real (RT-PCR) en situación de pandemia de COVID-19. REMASP. 2020; 4(7): 1-11. <https://doi.org/10.36300/remasp.2020.070>



## Abstract

In the face of the emerging coronavirus pandemic SARS-CoV-2 (Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 related) accurate standardization of hospital diagnosis is necessary to reduce the response time for confirmation of a suspected case. For this reason, laboratory diagnosis is a priority for public health systems. In the area of Soria, with 100,000 inhabitants, a very old population, a mortality rate double that of Spain for COVID-19, the Hospital Santa Bárbara of the public

network is the only diagnostic center for SARS-CoV-2. In the Microbiology Service, we have established a robust diagnostic methodology for the detection of viral RNA present in samples from infected patients using the Real-Time Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) technique, which allows a report to be issued in approximately 4 hours. This study describes the process that could guide the Microbiology Services of other Hospitals.

## Keywords

Coronavirus, COVID-19, pandemic, diagnosis, RT-PCR.

## Introducción

Los coronavirus (CoV) son una gran familia de virus que causan enfermedades que van desde el resfriado común hasta procesos más graves como el síndrome respiratorio del Oriente Medio (MERS-CoV) y el síndrome respiratorio agudo severo (SARS-CoV)<sup>(1)</sup>. El nuevo coronavirus (SARS-CoV-2) es una nueva cepa que no ha sido identificada previamente en los humanos<sup>(2)</sup>. El 31 de diciembre de 2019 se informó a la Organización Mundial de la Salud (OMS) de un grupo de casos de neumonía de etiología desconocida en Wuhan (China)<sup>(3)</sup>. Se identificó un nuevo coronavirus, ahora denominado coronavirus del síndrome respiratorio agudo grave 2 (SARS-CoV-2) por el Grupo de Estudio sobre Coronavirus del Comité Internacional sobre la Taxonomía de los Virus<sup>(4)</sup>, en los pacientes afectados<sup>(5)</sup>. Gran número de pacientes presentan una sintomatología similar a la gripe y se recuperan en sus hogares<sup>(6)</sup>. Pero la gran preocupación son los pacientes que desarrollan un cuadro grave asociado a dificultades respiratorias y neumonías, que aproximadamente representan un 20% de los infectados por este nuevo coronavirus y un 5% de los que requieren cuidados críticos. Estos casos más graves se caracterizan por la presencia de insuficiencia respiratoria, síndrome respiratorio agudo, insuficiencia renal, shock séptico o fallo multiorgánico que deben ser ingresados en las unidades de cuidados intensivos, para aumentar sus posibilidades de sobrevivir<sup>(7)</sup>.

En esta situación de pandemia declarada por la Organización de la Salud (OMS) el 11 de marzo de 2020<sup>(8)</sup> en España se declara el estado de alerta según el Real Decreto 463/2020 del 14 de marzo de 2020 como consecuencia de rápido incremento de pacientes infectados y fallecidos<sup>(9)</sup>, lo que hace necesario la estandarización precisa del diagnóstico en hospitales para establecer los tratamientos y medidas correspondientes. De este modo el diagnóstico de laboratorio es una de las prioridades de los sistemas de salud pública, en estos momentos<sup>(10)</sup>. En una situación como ésta, donde los recursos sanitarios son limitados, aumenta la necesidad de identificación, aislamiento y tratamiento de los pacientes en una fase temprana<sup>(7)</sup>. Esto se considera esencial para limitar y prevenir la transmisión entre personas, incluida la reducción de las infecciones secundarias entre los contactos cercanos y los trabajadores de los sistemas de atención de la salud<sup>(6)</sup>.

En la infección respiratoria aguda, la Reacción en Cadena de la Polimerasa por Transcripción Reversa (PCR) se utiliza habitualmente para detectar los virus causantes de las neumonías atípicas y ha demostrado ser una sólida tecnología en los laboratorios de salud pública durante otras emergencias sanitarias<sup>(11)</sup>. Este tipo de técnicas son altamente sensibles y específicas para controlar la epidemia de la enfermedad del SARS-CoV-2<sup>12</sup>.

En el presente manuscrito, informamos sobre el establecimiento de un flujo de trabajo de diagnóstico para SARS-CoV-2 en el Hospital Santa Bárbara de Soria, que es el único hospital de la red pública sanitaria de Castilla-León (SACyL) en la provincia de Soria, con objeto de reducir el tiempo de respuesta para la confirmación de sospecha de SARS-CoV-2 durante el periodo de emergencia sanitaria por la pandemia del Coronavirus “Disease” 2019 (COVID-19).

### Material y métodos

Este trabajo contempla los Convenios y Normas establecidos en la legislación española en el ámbito de la investigación biomédica, la protección de datos de carácter personal y la bioética, por esa razón ha recibido el informe favorable y la aceptación del Comité de Ética de la Investigación con Medicamentos Área de Salud Valladolid Este para que sea llevado a efecto dicho Proyecto de Investigación con el código PI 20-1718<sup>(13)</sup>.

### 2.1 Flujo de trabajo

El procedimiento y esquema de trabajo, comienza por la evaluación del paciente por el personal médico del SACyL. Si cumple los criterios de sospecha se procede a la toma de muestra del exudado nasofaríngeo/orofaríngeo del tracto respiratorio superior en pacientes hospitalizados y/o ambulatorios o la auto recogida de exudado faríngeo/amigdalár para pacientes ambulatorios mediante un hisopo estéril. En pacientes pediátricos se contemplará la toma de aspirados nasofaríngeos. Se traslada la muestra al laboratorio de Microbiología del hospital Santa Bárbara, del Complejo Asistencial de Soria. Posteriormente se procede a la realización de la prueba RT-PCR para SARS-CoV-2. Si el paciente es positivo se procede a la emisión de informe y comunicación inmediata vía telefónica al clínico correspondiente en un periodo de aproximadamente 4 horas. Sin embargo, si el paciente es negativo se procede a realizar el panel de diagnóstico diferencial de neumonía atípica mediante el Panel Respiratorio FilmArray™ (Bio Fire Salt Lake City, Utah, Estados Unidos) según marca el protocolo del Servicio de Microbiología consensuado con el servicio de Medicina Interna del Hospital Santa Bárbara de Soria.

### 2.2 Recogida y traslado de la muestra

Se obtiene la muestra de exudados de las vías respiratorias superiores (nasofaríngeo/orofaríngeo; faríngeo/amigdalár) con un hisopo estéril. El hisopo se introduce en tubos con tapa de rosca con medio Hank's BSS conteniendo HEPES, gelatina, BSA, sacarosa y antibióticos compatibles (®Vircell, Granada, España). Todas las muestras están perfectamente identificadas con los apellidos y nombre del paciente. Para el traslado de muestra, en pacientes no hospitalizados, se utiliza un bio-contenedor homologado de triple envase de seguridad (Duerolab, Salamanca, España) que es una caja de cartón con marcado y etiquetados impresos en español e inglés para transporte de muestras biológicas categoría B (sustancia infecciosa capaz causar riesgos) siguiendo la norma UN 3373.

### 2.3 Recepción y manipulación

Las muestras son recibidas en el laboratorio de microbiología, cotejando la identificación del volante con el nombre y apellido de la muestra, y añadiendo un código numérico del laboratorio de microbiología para su registro en el Sistema de Información del Laboratorio (SIL). Las muestras que no se puedan cotejar por carecer de una identificación correcta o por falta de datos para la identificación inequívoca muestra-paciente, serán rechazadas y no se procesarán.

Para el procesamiento de las muestras se utilizan los equipos de protección individual (bata, mascarilla FFP2, gafas y guantes) recomendados en cada centro por el Servicio de Prevención de Riesgos Laborales. El procesamiento inicial y la inactivación de las muestras se realizará en cabina de seguridad biológica de clase II B. La inactivación se realizará con el reactivo inhibidor para SARS-CoV-2 (kit cobas PCR media 100T IVD) (Roche Diagnostic, Berlín, Alemania). Se añade 200 µl de inhibidor a 200 µl muestra y se deja incubar a temperatura ambiente a 15 minutos.

### 2.4 Extracción de ácido ribonucleico (ARN)

Se realiza de forma semiautomatizada la extracción y purificación del ARN total de las muestras de pacientes (KingFisher Flex 96 PCR Head ThermoFisher™). Se emplean reactivos de extracción del kit de purificación de ácidos nucleicos MagMAX® CORE (ThermoFisher™).

A cada una de las muestras sometidas a la extracción de ARN, se añade 5 µl. de control interno (ARN diana, EAV extracción control RNA (®Roche, Berlín, Alemania)), que se coextrae con la muestra problema.

## 2.5 Reacción en cadena de la polimerasa de transcripción reversa en tiempo real (RT-PCR)

Para la realización de la RT-PCR, se emplea la enzima polimerasa LightMix® Modular SARS and Wuhan CoV E-gene (MM-CoV-E) (®Roche, Berlín, Alemania), reconstituída siguiendo las recomendaciones del fabricante. La Mezcla Maestra (Máster Mix) de reacción se prepara para cada pocillo: agua grado PCR x 5 µl, reagent Mix de Cor-V E-gene x 0,5 µl (primers y sonda), reactivo Mix EAV x 0,5 µl (primers y sonda del control interno), 4 µl de enzima Roche Máster, 0,1 µl RT para un volumen total de 10 µl por muestra o control. Como control positivo se usa Sarbecovirus Egen iv RNA (®Roche, Berlín, Alemania) que se reconstituye con 320 µl de agua de grado PCR siguiendo las recomendaciones del fabricante y se usan 10 µl por cada placa de amplificación. Se añaden 10 µl del eluido de ARN correspondiente a cada una de las muestras de paciente y como control negativo 10 µl agua de grado PCR.

## 2.6 Programación del instrumento Cobas z 480 (Roche Diagnostic, Berlín, Alemania).

Se realiza una preparación completamente automatizada de la muestra mediante la tecnología en RT-PCR para la amplificación y la detección empleando el analizador Cobas z 480 (Roche Diagnostic, Berlín, Alemania). El programa de ciclo térmico se inicia a 55°C 5 minutos para la transcripción inversa del ARN viral, después 95°C durante 5 minutos para la desnaturalización de la muestra y activación de las en-

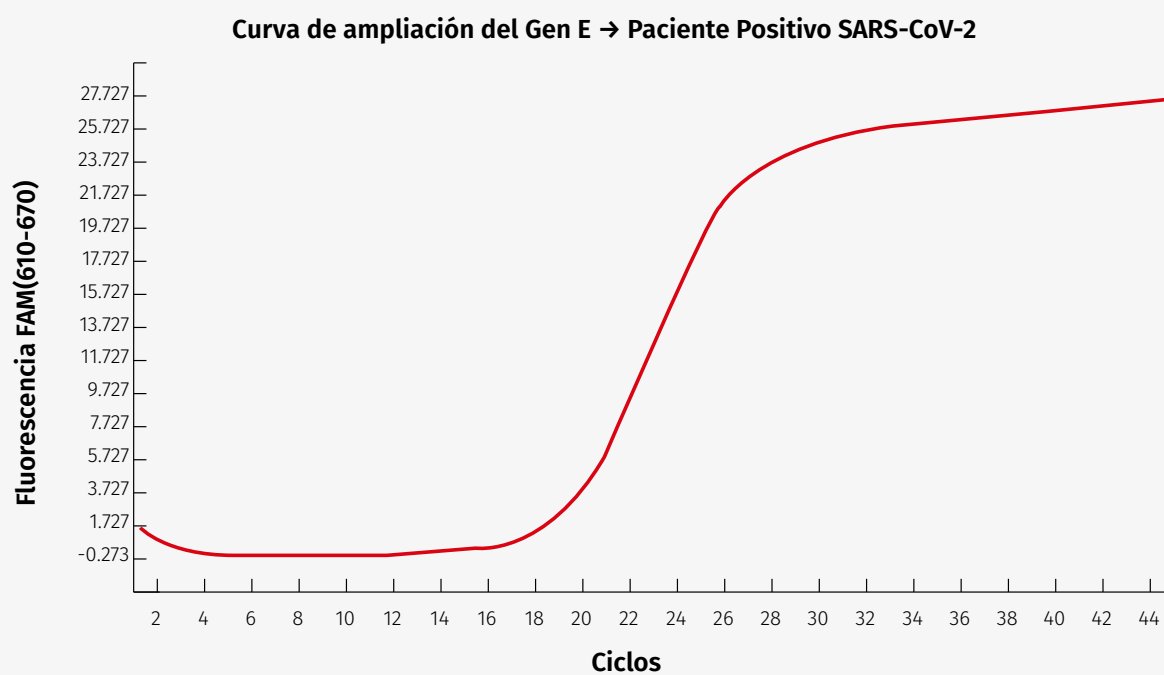
zimas, posteriormente 45 ciclos de amplificación de la PCR (95°C, 5 segundos, seguido de 60°C, 15 segundos y otros 15 segundos a 72°C). Finalmente, para el enfriamiento del instrumento, el termociclador baja a 40°C durante 30 segundos. La detección se realiza en el propio instrumento Cobas z 480, utilizando un canal establecido a 530 nm y con factor cuántico 10 con tiempo máximo de integración 1 segundo empleado un filtro 465-510 nanómetros.

## 2.7 Informe de la formulación y expresión de los resultados de la técnica RT-PCR.

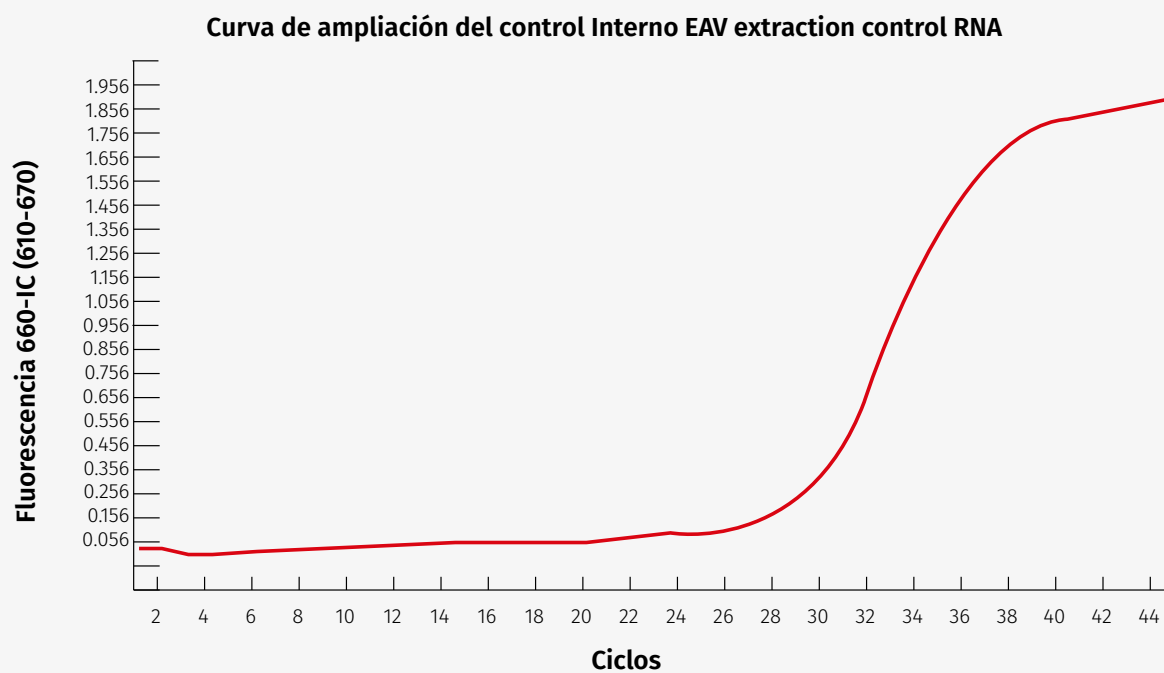
En el informe de resultados hay que tener en cuenta el algoritmo de la Tabla 1 para considerar las muestras positivas o negativas. Las muestras de pacientes que presenten una curva de amplificación del gen E cuyos puntos de cruce (Cp) (crossing point) estén por debajo de 30-31 ciclos se consideraran positivas para SARS-CoV-2 (Figura 1), comprobando que la amplificación del control interno es adecuada (Figura 2). Sin embargo, si no existe curva de amplificación del gen E y existe una curva de amplificación del control interno (Figura 2) el paciente se considera negativo para SARS-CoV-2 (Figura 3). Finalmente, el control positivo (Figura 4) debe de dar una curva de amplificación de gen E con Cp por debajo de 31 ciclos. Sin embargo, el control negativo no debe de dar una curva de amplificación de gen E. Para una mejor discriminación de resultados, es conveniente evaluar comparativa y simultáneamente las curvas de las muestras: i) control positivo; ii) pacientes positivos iii) pacientes negativos (Figura 5). En la figura 5 se observa que en las curvas de amplificación de las muestras del control positivo su amplificación es a 23 Cp, y en los pacientes positivos a 26 Cp, sin embargo, en el paciente negativo de sospecha de SARS-CoV-2 no se muestra curva de amplificación.

Canal 530nm (muestras)	Canal 660nm Control interno	Resultado
No amplificación	Detectable	No detectable
Amplificación Cp <39	No relevante	WH-CoV Positivo
No amplificación	No detectable	Fallo PCR repetir
Señal Amplificación	No relevante	Contaminación repetir

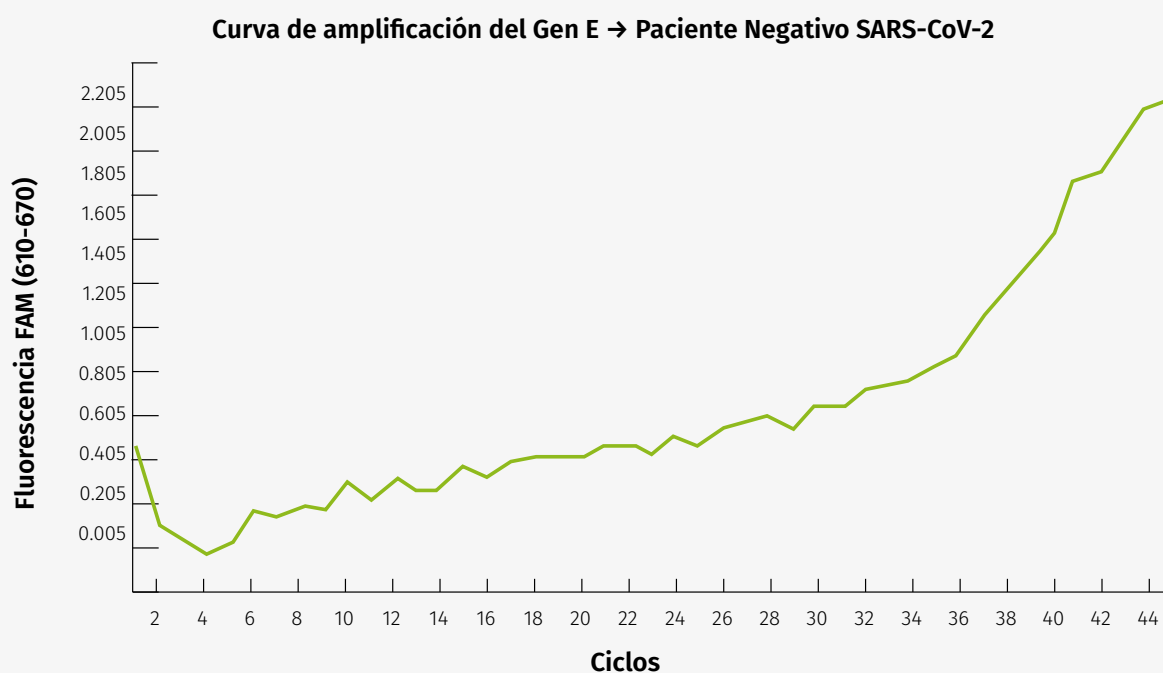
**Tabla 1.** Interpretación de los resultados de la reacción en cadena de la polimerasa de transcripción reversa



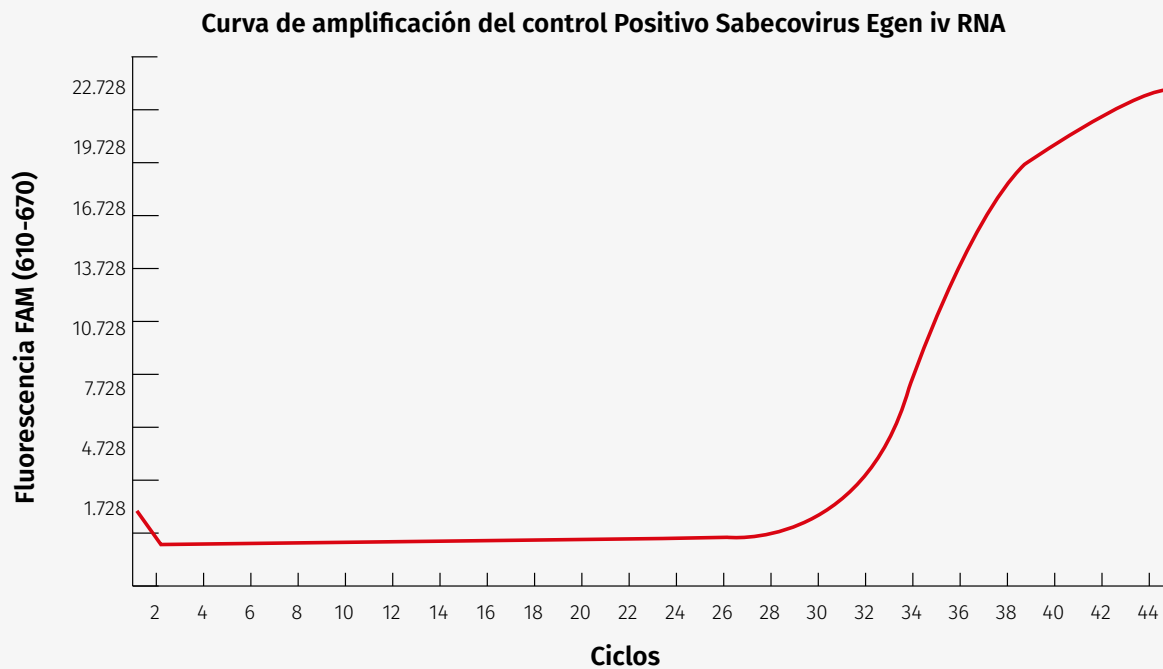
**Figura 1.** Curva de amplificación de Gen E en paciente positivo



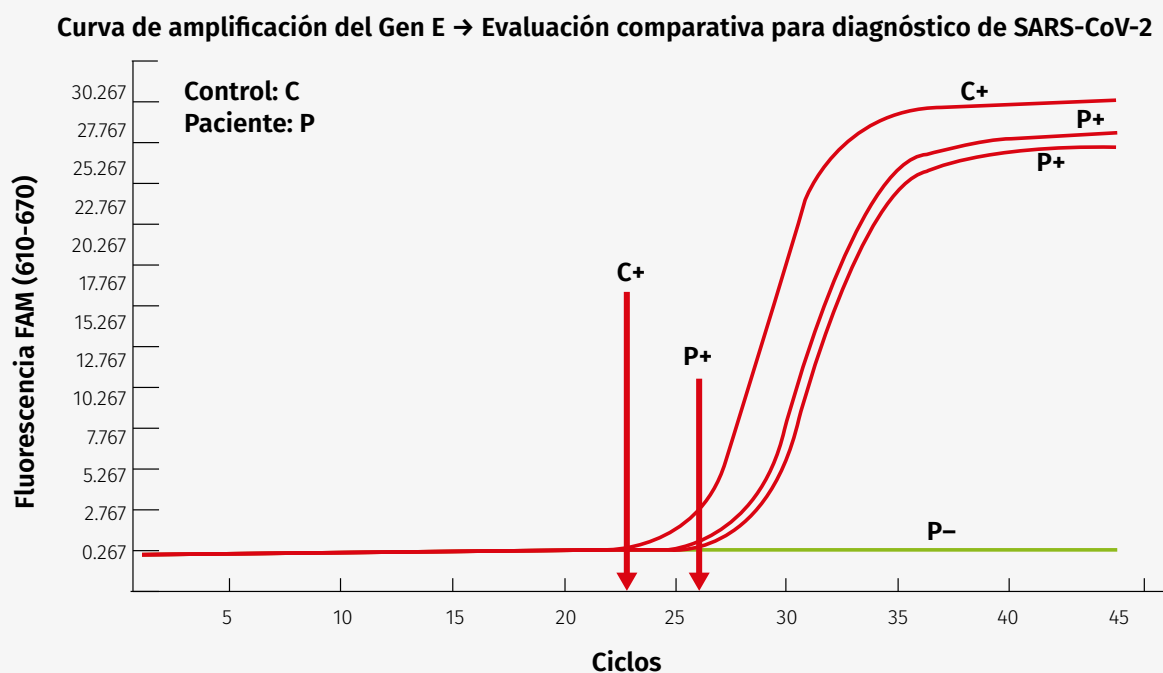
**Figura 2.** Curva de amplificación del Control Interno



**Figura 3.** Curva de amplificación de Gen E en paciente negativo



**Figura 4.** Curva de amplificación del control positivo



**Figura 5.** Evaluación comparativa de curvas de amplificación del control positivo, pacientes positivos y pacientes negativos

### Resultados

En el presente estudio se plantea la implementación del diagnóstico de laboratorio de la infección por SARS-CoV-2 mediante RT-PCR en un Servicio de Microbiología de un hospital público provincial. Esta técnica permite emitir un informe al clínico en aproximadamente 4 horas.

Los resultados positivos por amplificación del genoma viral específico del SARS-CoV-2, se comunican por llamada telefónica al médico responsable de cada paciente y se incluyen en el programa específico del sistema de información del laboratorio (SIL) y en la historia clínica del paciente. A todas las muestras con resultados positivos para la detección del virus SARS-CoV-2 se les realiza estudio para descartar co-infección con el virus de la gripe (Virus Influenzae A y Virus Influenzae B), mediante una PCR a tiempo real con el sistema automatizado Cobas Liat (®Roche).

Los resultados negativos, también se incluyeron en el programa específico del SIL y en la historia clínica del

paciente. A todas las muestras con resultado negativo para la detección del virus SARS-CoV-2 se realiza el estudio del panel sindrómico de neumonías atípicas, Panel Respiratorio FilmArray™ (Bio Fire Salt Lake City, Utah, Estados Unidos) que analiza 20 dianas, 17 virus y 3 bacterias, que causan infecciones del tracto respiratorio con una sensibilidad y especificidad, según el fabricante, del 95% al 99% respectivamente.

### Discusión

Actualmente nos enfrentamos a una epidemia de un nuevo coronavirus que ha infectado a millones de personas en el mundo. A finales de enero de 2020, la OMS lo ha declarado una emergencia mundial y pandemia en marzo del 2020<sup>(4)</sup>. Ante esta situación de emergencia sanitaria y el estado de alerta de España (RD463/2020) hemos estandarizado el diagnóstico de SARS-CoV-2 mediante el sistema de RT-PCR en el Servicio de Microbiología del Hospital Santa Bárbara de Soria.

El método diagnóstico se basa en la detección del ARN viral presente en las muestras de hisopos nasofaríngeos y orofaríngeos de pacientes que cumplen los criterios clínicos y/o epidemiológicos de COVID-19, donde previamente es necesario la extracción del ARN <sup>(6)</sup>. En esta situación de emergencia donde la disponibilidad en el mercado es prácticamente nula para obtener un extractor y sin el equipamiento previo en el Servicio de Microbiología del Hospital Santa Bárbara de Soria, fue preciso conseguir un extractor eficaz y fiable (KingFisher™ Flex 96 PCR Head ThermoFisher™) que también cumpliera con las normas de seguridad biológica para evitar posibles múltiples contagios en el servicio. Este instrumento emplea la tecnología MagMAX® de separación magnética permitiendo la separación y purificación de efectiva del ARN. El kit de purificación empleado MagMAX® CORE está optimizado para ahorrar tiempo, emplear menos recursos económicos, minimizar significativamente los residuos y el riesgo biológico, es de alta sensibilidad y es un único protocolo adaptado para el extractor Thermo Scientific™ KingFisher™. Estas ventajas consiguen la unificación de los flujos de trabajo permitiendo que el Servicio de Microbiología del Hospital Santa Bárbara de Soria pueda seguir, con seguridad biológica, el ritmo necesario de la demanda de las pruebas de diagnóstico de COVID-19, muy elevada en esta situación de pandemia. Un mecanismo que utilizamos para asegurarnos del correcto procedimiento de la extracción de ARN, es introducir el control interno (EAV extraction control RNA) de del kit de RT-PCR *Light-Mix® Modular SARS and Wuhan CoV E-gene (MM-CoV-E)* (©Roche, Berlin, Germany) en cada una de las muestras de paciente previamente al proceso de extracción. En estos momentos no se cuantifica el ARN, porque durante esta emergencia sanitaria en la que debemos dar el diagnóstico de COVID-19 con la mayor rapidez posible, es suficiente desde el punto de vista clínico un estudio cualitativo.

Nuestro sistema de detección del ARN viral presente en las muestras clínicas de los pacientes se basa en la determinación del gen E. Es un gen de la envoltura de la familia de los betacoronavirus del linaje B subgénero Sarbecovirus que incluyen SARS-CoV-2 y otras especies de SARS-CoV, que codifica una proteína de ensamblaje viral<sup>(3)</sup>. Esta determinación es inespecífica para determi-

nar el COVID-19 y debería realizarse conjuntamente con gen RdRP (específico de SARS-CoV-2) según han descrito Corman et al. <sup>(14)</sup>. En el genoma de SARS-CoV-2 se han identificado regiones que tienen secuencias conservadas como el gen RdRP (RNA-dependent RNA polymerase) del marco de lectura abierta de lectura abierta ORF1ab (Open Reading Frame 1ab), el gen E (envelope protein gene), y el gen N (nucleocapsid protein gene). Los genes RdRP y E muestran una elevada sensibilidad analítica <sup>(15, 17)</sup>.

La elección del método para la detección del gen E, está fundamentada en que nuestro Hospital ya disponíamos del equipo de COBAS Z480. En esta situación de pandemia severa sobre España y especialmente sobre nuestra provincia, no existían disponibilidad de ningún otro instrumento de amplificación y detección en el mercado. De la misma manera, los reactivos descritos en la metodología eran los únicos reactivos de los que disponíamos. Sin embargo, en la situación de emergencia sanitaria pandémica que ha ocasionado una escasez de reactivos para la determinación del gen RdRP, por la demanda de los laboratorios de todo el mundo, se podría asumir que las infecciones por coronavirus son ocasionadas por SARS-CoV-2 y pueden ser confirmadas sólo por la determinación de la presencia del gen E. La determinación por RT-PCR a tiempo real del gen E de los coronavirus muestra una especificidad del 80% para la detección de SARS-CoV-2 que filogenéticamente muestra una secuencia genética que coincide con otras especies SARS-CoV en un 80% <sup>(15)</sup>. Actualmente se dispone de otros procedimientos comercializados para la detección de varios genes de SARS-CoV-2 como son ORF1ab (Open Reading Frame 1ab), N (Nucleocapsid protein gene) y S (Spike protein) del kit de ThermoFisher para RT-PCR TaqPath COVID-19 Multiplex Diagnostic Solution (CE-IVD), que hace necesario el amplificador/detector QS5 ThermoFisher.

La prueba RT-PCR SARS-CoV-2 con los reactivos descritos en material y métodos de la empresa Roche®, ha recibido la Autorización de Uso de Emergencia de la U.S. Food and Drug Administration (FDA) y está disponible en los mercados que aceptan la marca CE® para diagnósticos *in vitro* (CE-IVD). Además, el ensayo tiene un proceso completo de control negativo, control positivo y control interno.



Para poder interpretar los resultados positivos, debemos conocer previamente que datos son indicativos de la presencia de ARN del SARS-CoV-2. La correlación clínica con el historial del paciente y otra información diagnóstica es necesaria para determinar el estado de infección<sup>(16)</sup>. La emisión de resultados positivos no excluye la infección bacteriana o la coinfección con otros virus. Cuando obtenemos un resultado positivo en cualquier laboratorio de España estamos obligados a comunicarlo a las autoridades sanitarias competentes. Por otra parte, los resultados negativos no excluyen la infección por el SARS-CoV-2 y no deben utilizarse como única base para las decisiones de tratamiento de los pacientes. Los resultados negativos deben combinarse con observaciones clínicas, antecedentes de la historia clínica de los pacientes e información epidemiológica. En los casos positivos se descarta la posible coinfección con virus de la Gripe, y en casos negativos se descarta la infección por otros agentes causantes de neumonía atípica. Una consideración importante es que el sistema cobas® SARS-CoV-2 debe ser utilizado por personal de laboratorio clínico capacitado, específicamente instruido y entrenado en las técnicas de RT-PCR en tiempo real y en procedimientos de diagnóstico in vitro.

La importancia de realizar este trabajo es porque en la provincia de Soria, de 100.000 habitantes, con un solo Hospital Público y único centro diagnóstico de SARS-CoV-2, se evita el envío de muestras a otros laboratorios de microbiología altamente sobresaturados. Además, este diagnóstico es una herramienta fundamental para la supervivencia del paciente en una población muy envejecida por encima de la media española y con el índice de mortalidad de 15,8 cada 1000 habitantes que duplica al del Estado Español<sup>(10)</sup> durante esta situación de pandemia. La realización de nuestra estandarización clínica de emergencia para la determinación del virus SARS-CoV-2 mediante RT-PCR permite la posibilidad del establecimiento del diagnóstico y comunica-

ción al clínico en un periodo inferior a 4 horas, ya que no hay vacunas o antivirales aprobados para fines profilácticos o terapéuticos. Además, este estudio podría describir el proceso a seguir para el diagnóstico de la infección por el nuevo coronavirus que podría guiar a otros Servicios de Microbiología de otros centros hospitalarios.

En conclusión, para reducir el tiempo de respuesta para la confirmación de un caso de sospecha de SARS-CoV-2 el método diagnóstico que empleamos se basa en la detección del ARN viral (Gen E) presente en las muestras clínicas de los pacientes sospechosos de estar infectados mediante la técnica de RT-PCR. Esta prueba diagnóstica juntamente con los procesos de recepción, inactivación y purificación del ARN del virus que realizamos en el Servicio Microbiología del Hospital Santa Bárbara de Soria, podrían establecer una metodología robusta para su uso en otros centros hospitalarios para reducir el tiempo de respuesta del diagnóstico y establecer de manera temprana las medidas correspondientes frente al COVID-19. 📌

**Agradecimientos:** los autores del manuscrito, el Servicio de Microbiología y la dirección del Hospital Sta. Bárbara de Soria, agradecen profundamente la cesión del extractor (KingFisher™ Flex 96 PCR Head ThermoFisher™) para la puesta en marcha de la técnica de RT-PCR a la empresa soriana COPISO. Además, también queremos agradecer al director del Instituto de Estudios de Ciencias de la Salud de Castilla y León (ICSCYL), Dr. Alberto Caballero García por su ayuda para proporcionarnos materiales clave para la realización de RT-PCR. Finalmente, expresamos nuestro agradecimiento a Antonio del Olmo por sus consejos e implicación en el lanzamiento de esta técnica de RT-PCR.

*Los autores declaran que no tienen conflicto de intereses.*

## Bibliografía

1. Lai CC, Shih TP, Ko WC, Tang HJ, Hsueh PR. Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) and corona virus disease-2019 (COVID-19): the epidemic and the challenges. *Int J Antimicrob Agents* 2020;55(3):105924.
2. Organización Mundial de la Salud (OMS)[Internet]. Coronavirus. [Consultado 18 de mayo de 2020]. Disponible en: <https://www.who.int/es/health-topics/coronavirus>
3. González-Silva Y, Bahillo Marcos E, Martín Gutiérrez R, Merino MM. Afectación clínica y sintomatológica en pacientes mayores de 65 años por COVID-19. *Aten Primaria*. 2020;S0212-6567(20)30101-3. <https://doi.org/10.1016/j.aprim.2020.03.003> [Epub ahead of print].
4. Gorbalenya AE, Baker SC, Baric RS et al. The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. *Nat Microbiol*. 2020; 5: 536-544. <https://doi.org/10.1038/s41564-020-0695-z>
5. Chan JF, Yip CC, To KK, Tang TH, Wong SC, 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-polymerase chain reaction assay validated in vitro and with clinical specimens. *J Clin Microbiol*. 2020; 58(5): e00310-20. <https://doi.org/10.1128/JCM.00310-20>
6. 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*. 2020;505:172-175. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2020.03.009>
7. Konrad R, Eberle U, Dangel A, Treis B, Berger A, Bengs K, et al. Rapid establishment of laboratory diagnostics for the novel coronavirus SARS-CoV-2 in Bavaria, Germany, February 2020. *Euro Surveill*. 2020; 25(9):2000173. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.9.2000173>
8. Yang Y, Peng F, Wang R, Guan K, Jiang T, Xu G, et al. The deadly coronaviruses: The 2003 SARS pandemic and the 2020 novel coronavirus epidemic in China. *J Autoimmun* 2020; 109: 102434. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2020.102434>
9. González del Pozo JP. La incidencia de la declaración del estado de alarma de 14 de marzo de 2020 en el régimen de custodia y visitas de los menores. *Diario La Ley* [Internet]. 2020 [Consultado 18 de mayo de 2020];9600:3. Disponible en: <https://diariolaley.laleynext.es/dll/2020/03/24/la-incidencia-de-la-declaracion-del-estado-de-alarma-de-14-de-marzo-de-2020-en-el-regimen-de-custodia-y-visitas-de-los-menores>
10. Palacios Cruz M, Santos E, Velázquez Cervantes MA, León Juárez M. COVID-19, una emergencia de salud pública mundial. *Rev Clin Esp*. 2020; S0014-2565(20)30092-8. <https://dx.doi.org/10.1016%2Fj.rce.2020.03.001> [Epub ahead of print].
11. Corman VM, Rasche A, Baronti C, Aldabbagh S, Cadar D, Reusken CB, et al. Assay optimization for molecular detection of Zika virus. *Bull World Health Organ*. 2016;94(12):880-892. <https://doi.org/10.2471/BLT.16.175950>
12. Li Z, Yi Y, Luo X, Xiong N, Liu Y, Li S, et al. Development and clinical application of a rapid IgM-IgG combined antibody test for SARS-CoV-2 infection diagnosis. *J Med Virol*. 2020. <https://doi.org/10.1002/jmv.25727> [Epub ahead of print].

13. Lamoca Abad A, Garrote Molpeceres R (dir), Pino Vázquez MA (dir). Validación del índice de perfusión periférica como marcador predictor en screening de cardiopatías congénitas críticas en neonatos. [trabajo final de grado en Internet]. [Valladolid]: Universidad de Valladolid, 2019 [citado 12 de mayo de 2020]. Recuperado a partir de <http://uvadoc.uva.es/handle/10324/36420>
14. Corman VM, Landt O, Kaiser M, Molenkamp R, Meijer A, Chu D. Detection of 2019 novel coronavirus (SARS-COV2) by real-time RT-PCR. *Euro Surveill.* 2020;25(3): 2000045. <https://dx.doi.org/10.2807%2F1560-7917.ES.2020.25.3.2000045>
15. Maroto Vela MC, Piédrola Angulo G. Los Coronavirus. *Anales Ranm.* 2019;136(03):235–238. <http://dx.doi.org/10.32440/ar.2019.136.03.rev01>
16. Coronavirus: creando la ilusión de una pandemia a través de pruebas de diagnóstico [Internet]. Disponible en: <https://kalitarget.wordpress.com/2020/03/?>
17. Udugama B, Kadhiresan P, Kozłowski HN, Malekjahani A, Osborne M, Li VYC, et al. Diagnosing COVID-19: The Disease and Tools for Detection. *ACS Nano.* 2020;14(4):3822–3835. <https://dx.doi.org/10.1021%2Facs.nano.0c02624>