

Ciudad de México,

21 ABR 2021

Oficio No. DGE-DSA-005997-2021

Asunto: Informe de evaluación comparativa preliminar.

Adriana Vega Belmont
Gerente de Producto LSG, México & Latinoamérica
Bio-Rad, S. A.

Eugenia 197, Piso 10-A, Col. Narvarte
D.T. Benito Juárez, C.P. 03020, Ciudad de México

Presente

En respuesta a su atenta solicitud de fecha 18 de septiembre de 2020, para la evaluación del producto **"Bio-Rad SARS-CoV-2 ddPCR Kit"**, con número de catálogo: **12013743**, fabricado por Bio-Rad, Laboratories, Inc., ubicado en 5731 W. Las Posaditas Blvd., Pleasanton, CA 94588, Estados Unidos, se expide el siguiente resultado.

Procedimiento de Evaluación.

Para verificar el desempeño analítico del producto **"Bio-Rad SARS-CoV-2 ddPCR Kit"**, (véase Fotos 1 y 2), se utilizó el reactivo con números lote 64359839 y 64363185. Para la verificación de la especificidad se utilizó un panel comercial de diferentes virus respiratorios. La verificación del límite de detección se realizó utilizando un extracto de RNA total cuantificado (con carga viral determinada) y obtenido a partir de una muestra positiva al virus SARS-CoV-2 utilizando los equipos Automated Droplet Generator (BIO-RAD), PX1™ PCR Plate Sealer (BIO-RAD), C1000™ Touch Thermal Cycler (BIO-RAD) y QX 200™ Droplet Reader (BIO-RAD) (véase Foto 3).



Fotos 1 y 2. Estuche de Diagnóstico "Bio-Rad SARS-CoV-2 ddPCR Kit"

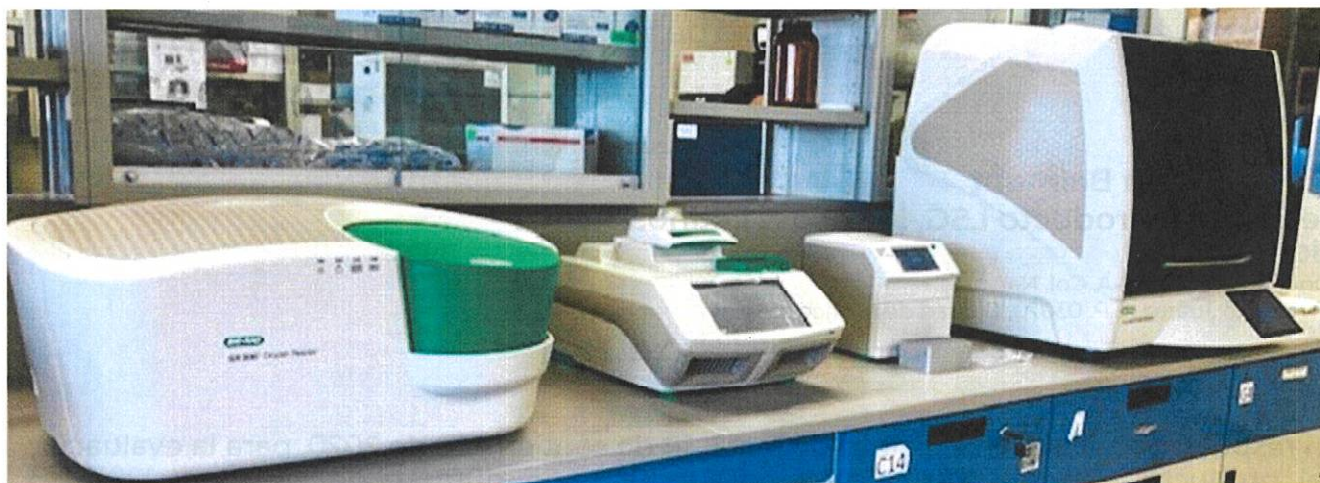


Foto 3. QX 200™ Droplet Reader (BIO-RAD), C1000™ Touch Thermal Cycler (BIO-RAD), PX1™ PCR Plate Sealer (BIO-RAD) y Automated Droplet Generator (BIO-RAD) (Izquierda-Derecha)

El estuche **"Bio-Rad SARS-CoV-2 ddPCR Kit"** es una prueba de RT-PCR basado en la detección cualitativa del ácido nucleico del SARS-CoV-2 en muestras de hisopos de turbinado nasal, nasofaríngeo, nasal anterior y medio, así como muestras de lavado/aspirado nasofaríngeo y nasal de individuos sospechosos de COVID-19. Está diseñado para la detección de las regiones del gen de la nucleocápside (N) del virus (dos cebadores/sondas), también se incluye un conjunto de cebadores/sondas adicional para detectar el gen RNasa P humano (RP), en muestras de control y clínicas, incluye estos tres conjuntos de cebadores/sondas en un único ensayo múltiplex para permitir una reacción de un pozo.

Resultados del Desempeño Analítico.

Sensibilidad (límite de detección).

Se analizaron diferentes concentraciones del extracto de RNA cuantificado, utilizando tres réplicas por cada valor de concentración. Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

Tabla 1. Verificación de la sensibilidad

| Blanco genético viral | Resultado esperado | Resultado observado | |
|-----------------------|--|-----------------------|---------------------------------|
| | Concentración | Concentración teórica | % Positivos / total de réplicas |
| Gen N1 | 625 copias/ mL equivalente a 3.4 copias/ reacción | 3.4 copias/ reacción | 2 / 3 (66.6) |
| Gen N2 | 625 copias/ mL equivalente a 3.4 copias/ reacción | 3.4 copias/ reacción | 2 / 3 (66.6) |



Especificidad.

Se utilizó el panel de verificación NATtrol™ Respiratory Verification Panel 2 marca ZeptoMetrix Corporation con número de catálogo NATRVP2-BIO. Los resultados fueron:

Tabla 2. Verificación de la especificidad

| Clave | Resultado de la técnica estándar del InDRE | Resultado observado "Bio-Rad SARS-CoV-2 ddPCR Kit" |
|-------|--|--|
| 1 | Virus parainfluenza tipo 2 | SARS-CoV-2 no detectado |
| 2 | Virus parainfluenza tipo 1 | SARS-CoV-2 no detectado |
| 3 | Influenza B cepa B/Florida/02/06 | SARS-CoV-2 no detectado |
| 4 | Influenza A H1N1pdm cepa A/NY/02/09 | SARS-CoV-2 no detectado |
| 5 | Influenza A H3 cepa A/Brisbane/10/07 | SARS-CoV-2 no detectado |
| 6 | Influenza AH1 A/New Cal | SARS-CoV-2 no detectado |
| 7 | Coronavirus NL63 | SARS-CoV-2 no detectado |
| 8 | Adenovirus tipo 3 | SARS-CoV-2 no detectado |
| 9 | Adenovirus tipo 1 | SARS-CoV-2 no detectado |
| 10 | Virus sincicial respiratorio A2 | SARS-CoV-2 no detectado |
| 11 | Virus parainfluenza tipo 4 | SARS-CoV-2 no detectado |
| 12 | Virus parainfluenza tipo 3 | SARS-CoV-2 no detectado |
| 13 | Rhinovirus 1A | SARS-CoV-2 no detectado |
| 14 | Metapneumovirus 8 cepa Peru6-2003 | SARS-CoV-2 no detectado |
| 15 | Coronavirus 229E | SARS-CoV-2 no detectado |
| 16 | Coronavirus OC43 | SARS-CoV-2 no detectado |
| 17 | Adenovirus tipo 31 | SARS-CoV-2 no detectado |
| 18 | Coronavirus HKU-1 | SARS-CoV-2 no detectado |
| 19 | <i>B. pertussis</i> cepa A639 | SARS-CoV-2 no detectado |
| 20 | <i>B. paraptussis</i> cepa A747 | SARS-CoV-2 no detectado |
| 21 | <i>C. pneumoniae</i> cepa CWL-029 | SARS-CoV-2 no detectado |
| 22 | <i>M. pneumoniae</i> cepa M129 | SARS-CoV-2 no detectado |
| 23 | Negativo | SARS-CoV-2 no detectado |



Reproducibilidad entre lotes.

Se analizaron 40 réplicas del control positivo utilizando estuches de dos lotes diferentes (64359839 y 64363185), considerando 20 réplicas por cada uno. Al analizar los valores de CT (*Cycle Threshold*) se obtuvieron los siguientes resultados de coeficiente de variación (CV):

Tabla 3. Verificación de la reproducibilidad

| Blanco genético viral | Precisión intralote | | Precisión interlote |
|-----------------------|-----------------------------|-----------------------------|---------------------|
| | % CV obtenido Lote 64359839 | % CV obtenido Lote 64363185 | % CV obtenido |
| Gen N1 | 1.729 | 3.457 | 2.593 |
| Gen N2 | 1.905 | 3.752 | 2.829 |

Repetibilidad.

Se analizaron diferentes concentraciones del extracto de RNA cuantificado, utilizando tres réplicas en un análisis hecho por el mismo operador, con el mismo lote de reactivos. Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

Tabla 4. Verificación de la repetibilidad

| Blanco genético viral | Concentración | Positivos / réplicas | % Positivos |
|-----------------------|---------------------------|----------------------|-------------|
| Gen N1 | 100,000 copias / reacción | 3 / 3* | 100 |
| | 10,000 copias / reacción | 3 / 3 | 100 |
| | 1,000 copias / reacción | 3 / 3 | 100 |
| | 250 copias / reacción | 3 / 3 | 100 |
| | 100 copias / reacción | 3 / 3 | 100 |
| Gen N2 | 100,000 copias / reacción | 3 / 3 | 100 |
| | 10,000 copias / reacción | 3 / 3 | 100 |
| | 1,000 copias / reacción | 3 / 3 | 100 |
| | 250 copias / reacción | 3 / 3 | 100 |
| | 100 copias / reacción | 3 / 3 | 100 |

*En este nivel de concentración las lecturas en el programa de análisis QuantaSoft™ indicaron saturación y se produjo la leyenda "NO CALL", por lo que el programa de análisis QuantaSoft™ Analysis Pro no indicó valores de cuantificación reales. Sin embargo, esto no interfirió con la interpretación de las réplicas como "SARS-CoV-2 Detectado".



Validez externa.

Se analizó el panel de calificación AccuPlex™ SARS-CoV-2 Molecular Controls Kit – Full Genome marca seracare con número de catálogo 0505-0159. Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

Tabla 5. Resultados del panel de tercera opinión

| Vial | Resultado esperado | Resultado observado | Acuerdo |
|------|-----------------------|-------------------------|---------|
| 1 | Positivo a SARS-CoV-2 | SARS-CoV-2 detectado | Sí |
| 2 | Positivo a SARS-CoV-2 | SARS-CoV-2 detectado | Sí |
| 3 | Positivo a SARS-CoV-2 | SARS-CoV-2 detectado | Sí |
| 4 | Positivo a SARS-CoV-2 | SARS-CoV-2 detectado | Sí |
| 5 | Positivo a SARS-CoV-2 | SARS-CoV-2 detectado | Sí |
| 6 | Negativo a SARS-CoV-2 | SARS-CoV-2 detectado | No* |
| 7 | Negativo a SARS-CoV-2 | SARS-CoV-2 no detectado | Sí |
| 8 | Negativo a SARS-CoV-2 | SARS-CoV-2 no detectado | Sí |
| 9 | Negativo a SARS-CoV-2 | SARS-CoV-2 no detectado | Sí |
| 10 | Negativo a SARS-CoV-2 | SARS-CoV-2 no detectado | Sí |

*Esta muestra presentó valores >0.1 copias/ μ L para el blanco genético viral N2 en cuatro replicas utilizando distintos extractos de RNA, por lo que, de acuerdo a los criterios de interpretación descritos en el inserto, se considera como "SARS-CoV-2 Detectado".

Recomendaciones técnicas

- El dato del número mínimo de gotas necesario para la correcta interpretación de resultados (≥ 5000 para las muestras positivas y ≥ 10000 para las negativas) se tomó de una carta emitida por el fabricante con fecha del 18 de marzo 2021 y proporcionada por el solicitante de la evaluación, ya que ésta indicación no se encuentra en el inserto.
- Se recomienda utilizar un agitador y una centrífuga de placas para favorecer la generación de una mayor cantidad de gotas.
- Se recomienda seguir estrictamente las indicaciones para el manejo y la agitación de los reactivos al momento de preparar la mezcla maestra de reacción. Este es un punto crítico en el proceso.



- Antes de la generación de gotas, es importante verificar que todos los pozos lleven el mismo volumen de reacción y en caso de trabajar con tiras de tubos, si las muestras son menos a múltiplos de 8, llenar los pozos restantes con amortiguador control para ddPCR diluido 1:1 con agua. De no ser así, el equipo generador de gotas puede detener el proceso.

Comentarios finales.

- La validez de los resultados obtenidos en esta evaluación se limita únicamente al uso del estuche con el total de equipos mencionados en sus versiones especificadas y siguiendo el flujo de trabajo y volúmenes de reactivos descritos en el inserto con clave 12013769 (10000128583) Rev B, con fecha de revisión mayo de 2020.
- El tiempo de procesamiento de 96 muestras, siguiendo las indicaciones del inserto y con los equipos mencionados, es de aproximadamente 8 horas sin contar el tiempo de la extracción de ácidos nucleicos a partir de las muestras y controles.
- Para la extracción de ácidos nucleicos a partir de los controles incluidos en el ensayo, se utilizaron los volúmenes indicados en la carta emitida por el fabricante con fecha 18 de marzo 2021. Se recomienda extremar precauciones para evitar contaminación cruzada y resultados falsos positivos.
- Las muestras con alta carga viral pueden inducir una saturación del sistema y producir la leyenda "NO CALL" en el programa del lector de gotas QuantaSoft™ (ver tabla 3), por lo que se debe ajustar de forma manual contra un control negativo antes de realizar el análisis en el programa QuantaSoft™ Analysis Pro. Esta consideración no está descrita en el inserto.
- Durante el proceso de Análisis de datos con el programa QuantaSoft™ Analysis Pro 1.0, la selección de los "Threshold Cluster Modes" para asignar a que grupo o "cluster" pertenecen las gotas (triples negativas, N1, N2, RP, N1-N2, N1-RP, N2-RP y triples positivas) es hecha por el usuario, siguiendo un análisis visual sin que haya parámetros establecidos por el programa. Lo anterior puede ocasionar diferencias en los resultados, ya que queda a decisión del analista en donde agrupará las gotas más dispersas, lo cual es crítico para determinar la positividad o negatividad en una muestra con baja carga viral.
- No se observó concordancia entre los resultados de límite de detección (LD) obtenidos experimentalmente con los reportados por el fabricante en el total de réplicas. No obstante, se observó reactividad repetible a partir de 100 copias/reacción. Por otra parte, el inserto indica un límite de detección de 0.625 copias/μL pero el cuadro de interpretación de resultados indica que una muestra es positiva si tiene una cantidad ≥ 0.1 copias/μL.



- Se observó concordancia entre los valores de especificidad declarados por el fabricante y los obtenidos experimentalmente.
- El inserto no indica el valor de %CV esperado.
- Se observó concordancia en la mayoría de tubos del panel de referencia.

Validez.

Esta evaluación es provisional en apoyo a la emergencia por la pandemia de la enfermedad COVID-19, declarada por la OMS el día 11 de marzo del 2020, y será válida únicamente durante la duración de la misma. Al término de ésta, la validez de esta evaluación quedará automáticamente cancelada y será necesario realizar una evaluación completa para uso posterior.

Sin otro particular, reciba un cordial saludo.

A t e n t a m e n t e

Directora de Servicios y Apoyo Técnico del InDRE

Directora de Diagnóstico y Referencia del InDRE

M. en G.S. Lucía Hernández Rivas

Biol. Irma López Martínez

C.c.p. Biol. Irma López Martínez, Directora de Diagnóstico y Referencia del InDRE.
Dr. Noé Escobar Escamilla, Jefe del Laboratorio de Transferencia de Métodos Moleculares del InDRE.
MIBB, Hiram Olivera Díaz, Coordinador del Área de Enfermedades Emergencias y Urgentes del InDRE.
Dr. José Ernesto Ramírez González, Encargado de la Unidad de Desarrollo Tecnológico e Investigación Molecular del InDRE.

Sección/Serie: 6S.17
LHR/ILM/NEE/HOD/DEPO/cgp*/gmrr*

