

Ciudad de México,

09 MAR 2021

Oficio No. DGE-DSAT- **03384** -2021

Asunto: Informe de evaluación comparativa preliminar.

Enrique Neri Spínola

Director Técnico

Abalat, S. A. de C.V.

San Marcos 130, Col. Tlalpan Centro

D.T. Tlalpan C.P. 14000, Ciudad de México

Presente

En respuesta a su atenta solicitud de fecha 05 de octubre de 2020, para la evaluación del producto "**illumina® COVIDSeq™ Test**", con número de referencia: 20043675, fabricado por Illumina, Inc. ubicado en 5200 Illumina Way San Diego, CA 92122 E.U.A., se expide el siguiente resultado.

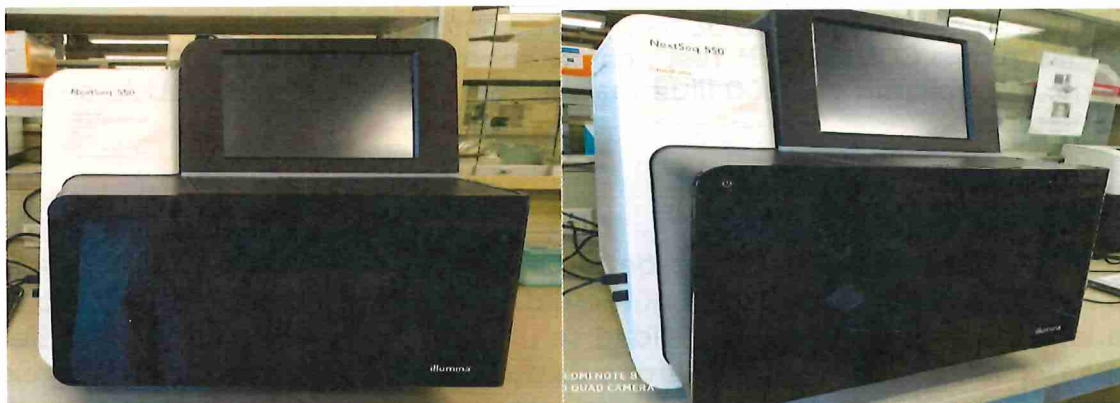
Procedimiento de Evaluación.

Para verificar el desempeño analítico del producto "**illumina® COVIDSeq™ Test**", véase Fotos 1 a 12), se utilizó el reactivo con número de referencia 20043675 y número de lote: S/L. Para la verificación de la especificidad se utilizaron muestras positivas a 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 el equipo **Illumina NextSeq™ 550 System** (véase Fotos 13 y 14).





Fotos 1 a 12. Estuche de Diagnóstico "Illumina® COVIDSeq™ Test"



Fotos 13 y 14. Illumina NextSeq™ 550 System

El producto "Illumina® COVIDSeq™ Test" es una prueba de diagnóstico in vitro por Secuenciación de Nueva Generación (Next-Generation Sequencing NGS) en el Sistema de Secuenciación Illumina NovaSeq 6000, el sistema de Secuenciación NexSeq 500, el Sistema de Secuenciación NextSeq 550 o el Instrumento NexSeq 550Dx, diseñado para la detección cualitativa de ARN del virus SARS-CoV-2 de muestras de hisopados nasofaríngeos, orofaríngeos, hisopados nasales anteriores, hisopados nasales de cornete medio, lavados / aspirados nasofaríngeos, aspirados nasales y muestras de lavado broncoalveolar de individuos sospechosos de COVID-19. El conocimiento de la cepa de SARS-CoV-2 presente en la muestra permite rastrear las cepas de virus. Esta prueba ha sido diseñada para secuenciar hasta 3072 muestras simultáneamente usando el sistema NovaSeq 6000 o hasta 384 muestras usando los sistemas NexSeq 500/550 o el instrumento NexSeq 550DX para detectar y secuenciar el ARN de SARS-CoV-2 y los controles internos. El flujo de trabajo consta de los siguientes procedimientos: extracción de ARN, síntesis de ADNc, amplificación del objetivo, preparación de la biblioteca, agrupación de bibliotecas, secuenciación y análisis mediante el uso del producto Illumina DRAGEN COVIDSeq Test Pipeline para analizar los resultados de la secuenciación para detectar la presencia de ARN de SARS-CoV-2 o en BaseSpace Hub.

Resultados del Desempeño Analítico.

Porcentajes de acuerdo positivo y negativo.

Se analizaron 50 muestras positivas y 46 muestras negativas. Los resultados de concordancia obtenidos fueron los siguientes:

Tabla 1. Porcentajes de acuerdo

Muestras verdaderas positivas	Muestras positivas	% Porcentaje de acuerdo positivo	Muestras verdaderas negativas	Muestras negativas	% Porcentaje de acuerdo negativo
50	50	50/50 (100)	46	46	46/46 (100)

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 2. Verificación de la sensibilidad

Blanco genético	Resultado esperado	Resultado observado	
	Concentración	Concentración teórica	% Positivos / total de réplicas
SARS-CoV-2	8.5 copias / reacción	8.5 copias / reacción	0 / 3 (0)

Validez externa.

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

Tabla 3. Resultados del panel de tercera opinión.

Vial	Resultado esperado	Resultados observados	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	Negativo a SARS-CoV-2	Sí
7	Negativo a SARS-CoV-2	Negativo a SARS-CoV-2	Sí
8	Negativo a SARS-CoV-2	Negativo a SARS-CoV-2	Sí

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 4. Verificación de la especificidad

Resultado esperado	Resultado observado
Virus parainfluenza tipo 2	SARS-CoV-2 No Detectado
Influenza B cepa B/Florida/02/06	SARS-CoV-2 No Detectado
Influenza A H1N1pdm cepa A/NY/02/09	SARS-CoV-2 No Detectado
Influenza AH1 A/New Cal	SARS-CoV-2 No Detectado
Adenovirus tipo 3	SARS-CoV-2 No Detectado
Adenovirus tipo 1	SARS-CoV-2 No Detectado
Virus sincicial respiratorio A2	SARS-CoV-2 No Detectado
Virus parainfluenza tipo 4	SARS-CoV-2 No Detectado
Virus parainfluenza tipo 3	SARS-CoV-2 No Detectado
Rhinovirus 1A	SARS-CoV-2 No Detectado
Metapneumovirus 8 cepa Peru6-2003	SARS-CoV-2 No Detectado
Coronavirus 229E	SARS-CoV-2 No Detectado
Coronavirus OC43	SARS-CoV-2 No Detectado
Adenovirus tipo 31	SARS-CoV-2 No Detectado
<i>B. pertussis</i> cepa A639	SARS-CoV-2 No Detectado
<i>B. paraptussis</i> cepa A747	SARS-CoV-2 No Detectado
<i>M. pneumoniae</i> cepa M129	SARS-CoV-2 No Detectado
Negativo	SARS-CoV-2 No Detectado

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 5. Verificación de la repetibilidad

Blanco genético viral	Concentración	Positivos / total de réplicas	% Positivos
SARS-CoV-2	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

Recomendaciones técnicas.

- Antes de implementar la tecnología para fines de diagnóstico, es importante asegurar que el diseño e infraestructura del laboratorio permiten tanto la manipulación de muestras como la preparación de reactivos de forma segura, así como para minimizar las probabilidades de contaminación cruzada en muestras, reactivos, consumibles y en las placas de reacción.
- Es necesario que el personal que realice la metodología cuente con conocimientos sólidos y experiencia suficiente en el manejo de herramientas moleculares de diagnóstico y en la preparación de librerías para secuenciación de siguiente generación.
- Planificar previamente y organizar el flujo de trabajo con el número adecuado de analistas. Por ejemplo, se sugiere que sea un solo analista quien realice el pipeteado de muestras y reactivos, otro en la preparación de reactivos (área blanca) y uno más para suministrar el material, consumibles, y realizar la programación de equipos.
- Se recomienda realizar alícuotas de cada uno de los reactivos.
- Es importante sellar las placas con los adhesivos señalados por el fabricante (Microseal "B", Bio-Rad). No utilizar tiras de tapas para evitar salpicaduras de los productos de amplificación o de los componentes de cada reacción al destapar los pozos. Además, asegurarse de que las placas queden perfectamente selladas, particularmente en las orillas y esquinas.
- Tener extremo cuidado al manipular los productos de PCR, después del paso "amplificación del cDNA" debido a la elevada concentración de productos generados.
- Homogeneizar bien con la micropipeta en el paso de utilización de las perlas y evitar la agitación de la placa.
- Utilizar un soporte magnético compatible con la placa de reacción, a fin de mantener las perlas de tagmentación en el fondo del tubo. Esto evitará que las perlas se deshidraten y mejorará su resuspensión.
- Siempre utilizar una solución de NaOH fresco, preparado el mismo día en que se va a hacer la corrida de secuenciación. Esto es importante para asegurar que el paso de desnaturalización sea lo más eficiente.
- Poner especial cuidado en la normalización de la concentración de las bibliotecas.
- Procurar que no transcurra mucho tiempo entre la carga de las bibliotecas en el cartucho y el inicio del proceso en el equipo.



- Preparar la hoja de muestras (*SampleSheet*) cuidando el uso exclusivo de los caracteres y símbolos descritos en el manual y sin que existan dos nombres iguales en las muestras o en los controles positivos y negativos.
- Contar con una conexión de internet estable y robusta para evitar bloqueos en el intercambio de información entre el equipo NextSeq™ 550 y los servidores de Illumina.

Comentarios finales.

- No se observó concordancia entre los valores de límite de detección declarados por el fabricante y los obtenidos experimentalmente. Se identificó reactividad repetible a partir de 100 copias por reacción.
- Se observó concordancia entre los valores de especificidad declarados por el fabricante y los obtenidos experimentalmente.
- Se observó concordancia en los resultados obtenidos en el 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
InDRE

M. en G.S. Lucía Hernández Rivas

Directora de Diagnóstico y Referencia del

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 Emergentes 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/JERG/maa*/gmrr*/cgp*

Francisco de P. Miranda No. 177, Col. Lomas de Plateros, D.T. Álvaro Obregón, CD, MX
Tel: (55) 5342 7550 y (55) 5062 1600 Ext. 59570 y 59406 www.gob.mx/salud

