



BEC SARS-CoV-2 RT-LAMP kit for environmental samples

**Pour une utilisation en recherche uniquement (RUO)
For Research Use Only (RUO)**

BEC SARS-CoV-2 RT-LAMP kit
for environmental samples
P05302.10 ea

Pour une utilisation en recherche uniquement (RUO)
For Research Use Only (RUO)

Ce test a été développé par Bertin Technologies, Enalees et C4Diagnostics. Produit par Bertin Technologies.
This test was developed by Bertin Technologies, Enalees and C4Diagnostics. Manufactured by Bertin Technologies.

Le test utilise les licences liées aux brevets WO 00/28082, WO 01/34790, WO 01/77317, WO 02/24902 .

The test uses licenses related to patents WO 00/28082, WO 01/34790, WO 01/77317, WO 02/24902 .

Fabriqué en France
Made in France



Référence : P11302

Version: 0120

Summary - Sommaire

▶ ENGLISH	4
• INTENDED USE.....	5
• CONTENT OF THE KIT	5
• MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED	6
• WARNINGS AND PRECAUTIONS	7
• GENERAL INFORMATION	8
• PRODUCT DESCRIPTION	9
• OPERATING PROTOCOL	12
• INTERPRETATION OF RESULTS.....	24
• OPTIONAL: EXPORTING RESULTS	26
• TECHNICAL SUPPORT	28
• BIBLIOGRAPHY	29
▶ FRANÇAIS	31
• USAGE PREVU.....	32
• COMPOSANTS DU KIT	32
• MATERIEL REQUIS NON FOURNI.....	33
• MISES EN GARDE ET PRECAUTIONS.....	34
• INFORMATIONS GENERALES	36
• DESCRIPTION DU PRODUIT.....	37
• MODE OPÉRATOIRE	40
• INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS	52
• OPTION : EXPORT DES RÉSULTATS	54
• ASSISTANCE TECHNIQUE	56
• BIBLIOGRAPHIE	57

English

► **Intended Use**

The BEC SARS-CoV-2 RT-LAMP kit for environmental samples is a test for rapid detection of SARS-CoV-2 combining a technology of rapid extraction of RNA from environmental samples and a RT-LAMP molecular test targeting 2 genes of SARS-CoV-2.

The analysis of this test must be carried out with the BEC Reader device.

BEC SARS-CoV-2 RT-LAMP kit for environmental samples has been developed for a use with air samples collected with Coriolis® air samplers and with surface samples.

► **Content of the kit**

Number of tests in a kit : 10.

Kit storage temperature : +4°C.

Kit shelf life : expiry date indicated on the outside of the box.

Kit content :

- 5 individual pouches containing 2 tests each.
- A cardboard rack, which makes it easier to handle the tubes, see Figure 2.
- A user guide.

Content of a pouch :

Description	Reference	Color	Quantity per pouch	Volume
BEC SARS-CoV-2 Assay Tubes for environmental samples	P04302	-	1 strip of 6 microtubes	-
BEC SARS-CoV-2 Lysing Buffer (green)	P13300	Green	2	1,5 mL
BEC SARS-CoV-2 Neutralization Buffer (blue)	P20300	Blue	2	1,5 mL
BEC SARS-CoV-2 Reaction Buffer (orange)	P21300	Orange	2	150 µL
BEC SARS-CoV-2 Transfer Tubes (violet)	P30300	Violet	2	-
sterile 3mL syringe	P31300	-	2	-
sterile needle for 3mL syringe	P32300	-	2	-
5 micron filter for 3mL syringe	P33300	-	2	-

► Materials required but not provided

- The BEC field reader pack including :
 - o The BEC Reader device (see Picture 2)
 - o A 25 µL fixed-volume pipette (orange)
 - o A 100 µL fixed-volume pipette (violet)
 - o A box of disposable filter-tips (recommended CLEARLINE cat. number 713116)
 - o Biological waste bin

- Sampling materials :
 - o Swabs for surface sampling
 - o Coriolis® air sampler and consumable (Bertin Technologies)
- Personal protective equipment for the user

► **Warnings and precautions**

Please read the user manual carefully before using the product.

- Before any use, please check that the product and its contents are not deteriorated and that all the contents are in the kit.
- Do not use a test from a pouch that has been opened for more than 24 hours, regardless of the storage temperature.
- Handle the samples as if they were infectious and/or dangerous, in accordance with the security procedures applicable in the laboratory.
- Wear adequate personal protective equipment (laboratory coat, disposable powder-free gloves, mask).
- Avoid microbiological and amplicon contaminations (by DNase/ RNase) of the sample and of the kit contents.
- Always use pipettes with disposable DNase/RNase-free filter-tips
- Always wear protective powder-free gloves when handling the contents of the kit.
- Do not open the reaction tubes after amplification to avoid any contamination with amplicons.
- Do not use the kit content after their expiry date.
- Dispose of the samples, contents in the pouch and waste material resulting from the test in

accordance with local safety regulations.

- This kit is intended for use with the reader approved for this purpose. Any directly interpretable result is dependent on the reader settings. If another reading instrument is used, it is the responsibility of the operator to ensure the correct calibration of that instrument. Bertin Technologies shall bear no responsibility for results obtained with any other reference system.
- Do not leave the microtubes in the reader once the reaction is completed.
- It is recommended to use a flat, clean and clear working surface in a covered and closed area at a temperature between 15°C and 25°C.
- Before opening the preparation tubes, make sure that all the liquid or lyophilized pellet contained in the tube is at the bottom of the tube. If needed, tap the tube several times downwards to lower any drops.



Never reopen the microtubes once they have been inserted in the BEC Reader device, nor after the end of the reaction. Re-opening under these conditions would result in environmental contamination. This contamination may cause false positive results for subsequent tests.

► General information

The BEC SARS-CoV-2 RT-LAMP kit for environmental samples is a field molecular test kit allowing the detection of the SARS-CoV-2 virus in environmental samples such as air or surface samples.

The SARS-CoV-2 is a coronavirus responsible for the emergence of a new respiratory infectious disease called Covid-19 that has caused a global pandemic. This disease, which appeared in China at the end of 2019, is transmitted mainly by air, with a high reproduction rate of between 2 and 3 in the absence of control and prevention measures. The severity of the clinical signs of the disease varies greatly from one individual to another, with a preponderance of severe forms in elderly individuals or those suffering from other diseases.

The scientific data available to date make it possible to estimate that 30% to 60% of infected subjects are asymptomatic but can transmit the disease. In this context, it is essential to be able to carry out diagnostic tests on a massive scale in order to limit the spread of the virus.

The BEC-SARS-CoV-2 kit has been developed in order to allow molecular tests to be carried out by non-specialized personnel directly on the field.

Source : Covid-19 Disease Sheets – Institut Pasteur – May 2020 (<https://www.pasteur.fr/en/medical-center/disease-sheets/covid-19-disease-novel-coronavirus>)

► **Product description**

The BEC SARS-CoV-2 RT-LAMP kit for environmental samples is an ensemble of reagents allowing rapid extraction of viral RNA and real-time RT-LAMP amplification of 2 sequences of the SARS-CoV-2 virus genome. It contains an exogenous positive control to ensure the correct running of the amplification.

RT-LAMP is a method of specific isothermal amplification of a nucleotide sequence with incorporation of a fluorescent nucleic acid stain during amplification (Li & Macdonald, 2015; Nagamine et al., 2002; Notomi et al., 2000; Yan et al., 2014). It amplifies a target sequence with two to three sets of primers at a constant temperature of 65°C. Compared to traditional detection methods, RT-LAMP is more specific and faster (Aebischer et al., 2014). It produces more amplicons and is less sensitive to inhibitors that are naturally present in biological matrices (Chander et al., 2014; Francois et al., 2011; Nie et al., 2012).

The BEC SARS-CoV-2 RT-LAMP kit for environmental samples allows 2 samples to be tested in parallel.

An analysis with the BEC SARS-CoV-2 RT-LAMP kit for environmental samples consists of carrying out the following steps :

- For the 2 samples in a sequential manner :
 - o Rapid extraction of viral RNA with chemical lysis and precipitation by chaotropic agents.
 - o Neutralization of the amplification inhibitors present in the lysate.
 - o Filtration of the lysate to remove aggregates of cell debris and reagents precipitated during neutralization.
- For the 2 samples in parallel: RT-LAMP amplification with the reaction buffer and the primers distributed in the microtubes (assay tubes), see Figure 1.

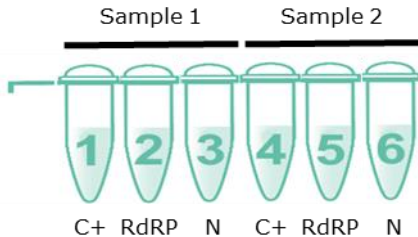


Figure 1: A strip of 6 microtubes allowing the amplification of 3 sequences of alien (C+ : positive control), RdRP and N genes for 2 samples

The test allows the amplification of 3 targeted sequences in the following genes :

- Alien gene : a non-natural sequence used as internal control for the amplification process – positions 1 and 4 on the strip of microtubes (see Figure 1).
- RdRP Gene : target specific to betacoronavirus (β CoV) human pathogens belonging to B and C groups (SARS-CoV-2, SARS-CoV and MERS-CoV) - positions 2 and 5 on the strip of microtubes (see Figure 1)
- N Gene : target specific to SARS-CoV-2 - positions 3 and 6 on the strip of microtubes (see Figure 1).

These amplifications are performed in parallel and the amplification result is obtained after a period of between 5 and 20 minutes depending on the viral load of the sample being analysed.

The BEC Reader device indicates in real time for each tube whether the amplification is positive (detection of the RNA target) or negative (no detection of the RNA target).

► **Operating Protocol**

▷ **Preparation of the samples**

The test is compatible with air and surface samples.

- Surface sampling guidelines:
Remove the swab from the package. When applying pressure with the swab onto the surface, move in at least two different directions while rotating the swab stick.
For surface, the recommended swab surface area is 25cm².
- Air sample guidelines:
Collect air sample with a Coriolis® Air sampler (Bertin Technologies).
Remove the swab from the package. Rub the inner surface of Coriolis® cone with the swab by applying a pressure while moving in at least two different directions and rotating the swab stick.

▷ **Reagent preparation**

- Open the aluminum pouch and check that the buffers or lyophilized pellets contained in the various tubes are well located at the bottom of the tubes and that no tubes are open. If this is the case, do not use the pouch.
If necessary, tap the tubes on the benchtop to make sure that drops of buffer or lyophilized pellets

do not remain in the cap.

- Leave the reagents at room temperature for 5 minutes before use. If the solution contained in the green tube is crystallized, warm the tube in your hands for a few seconds.
- Place the different tubes on the cardboard rack provided with the kit, respecting the color codes, see Figure 2. **Do not open the tubes at this stage.**

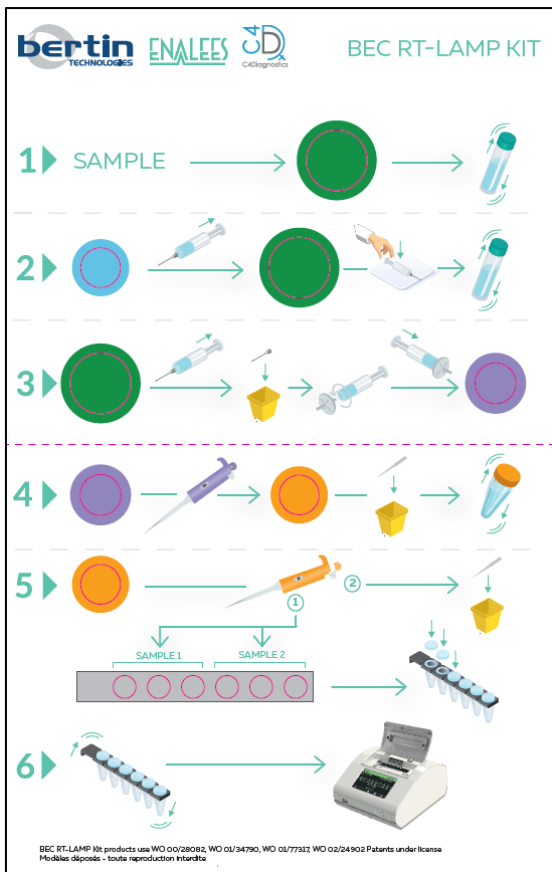


Figure 2: Rack that is provided for easy handling of the tubes.

▷ **BEC Reader device preparation**


- Switch on the BEC Reader device by pushing  button in front of the device during 3 seconds. The screen turns on and the reader performs a self-test. The cover opens.



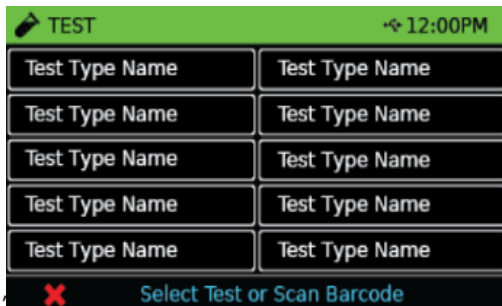
Figure 3: BEC Reader device with location of ON/OFF switch button.



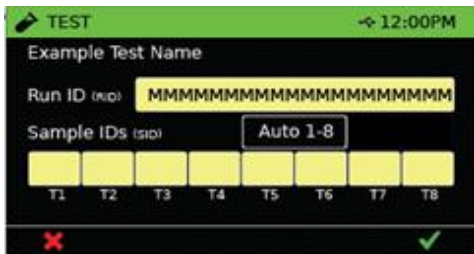
- Press on the screen and then press on TEST symbol



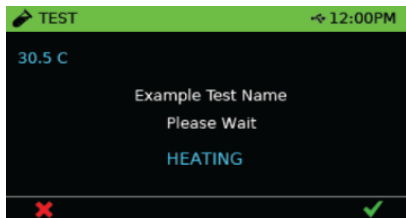
- Select the test "BEC_Environmental Assay Vx.x"



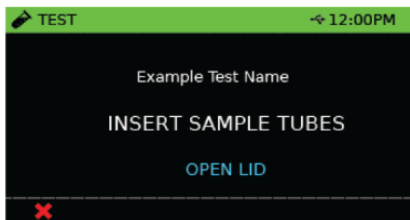
- Complete the RunID : this is the identifier of the run result file.
- Press "Auto 1-8" to automatically assign a name to the tubes. Go to the next screen by pressing ✓



- From this stage, the reader goes into preheating until reaching the set temperature of 65 °C.



- When the setpoint is reached, the reader informs the user.



▷ Test execution

CAUTION : perform the steps 1 through 5 with the 1st sample, and then repeat these steps with the 2nd sample. If only one sample is available, perform steps 1 through 6 and leave the wells 4 through 6 empty.

1) Step 1 : Lysis and RNA extraction

- a) Open the green tube (BEC SARS-CoV-2 Lysing Buffer (green)) in position 1 on the rack (see Figure 2).
- b) Immerse the swab in the solution and turn and stir the swab in the solution. Squeeze the swab against the inner side of the tube and discard the swab.
- c) Close the green tube, shake it vigorously during 10 seconds and place it in position 2 on the rack.

DO NOT leave the sample to stand before proceeding to Step 2 to avoid degradation of the mix that would interfere with the test.

2) Step 2 : Neutralization

- a) Open the blue tube (BEC SARS-CoV-2 Neutralization Buffer (blue)) and the green tube in position 2 on the rack.
- b) Withdraw the entirety of the liquid from the blue tube with the syringe fitted with the needle and dispense it in the green tube.
DO NOT pour directly without using the needle.
- c) Lay the syringe aside.
- d) Close the blue tube and the green tube. Shake the green tube vigorously during 10 seconds and place it on the rack in position 3.

3) Step 3 : Filtration

- a) Tap the green tube on the benchtop to lower the droplets that are in the cap. Open the green tube and the violet tube (BEC SARS-CoV-2 Transfer Tubes (violet)) in position 3.
- b) Draw as much liquid as possible from the green tube using the syringe fitted with the needle. Be careful to draw liquid from the green tube and not foam.
- c) Take out the needle from the syringe and replace it with the filter. Discard the needle in an appropriate waste bin.
- d) Insert the filter into the violet tube. Gently push the syringe plunger until it stops. By gently pushing the plunger, the flow of the filtrate is facilitated.
- e) Close the green tube and the violet tube. Place the violet tube in position 4 on the rack. Discard the green tube in an appropriate waste bin.

4) Step 4 : Transfer

- a) Open the violet tube and the orange tube (BEC SARS-CoV-2 Reaction Buffer (orange)) in position 4 on the rack.
- b) Aspirate a 100 μL volume from the violet tube with the violet fixed-volume pipette fitted with a filter-tip and transfer it to the orange tube.
- c) Close the violet tube and the orange tube. Shake vigorously the orange tube during 10 seconds and place it in position 5 on the rack.

CAUTION : Orange tube should be used in step 5 and the incubation (step 6) should be started within 30 minutes after preparation of orange tube.

5) Step 5 : Dispensing in the microtubes

- a) Open the orange tube in position 5.
 - b) Open the microtubes of the strip.
 - c) Use the orange pipette fitted with a filter-tip to aspirate a 25 μ L volume from the orange tube and dispense this volume in each microtube corresponding to the tested sample (see Figure 1), which means :
 - In tubes 1, 2 and 3 for sample 1,
 - In tubes 4, 5 and 6 for sample 2.
- Use a new filter tip for each microtube**
- d) Discard the filter-tip, close the orange tube and the microtubes.
 - e) Discard the green, blue, violet and orange tubes.

CAUTION : Repeat steps 1 through 5 with the second sample before proceeding to the next step (incubation).

When the strip of microtubes is filled, proceed immediately to step 6.

6) Step 6 : Incubation

CAUTION : Make sure the BEC reader has reached the temperature set point (65°C).

- a) Shake the microtubes until the lyophilized pellets are completely dissolved. Then tap the tubes on the benchtop to lower all the droplets to the bottom of the tube.
- b) Insert the microtube strip into the BEC Reader device, placing the black end tab on the left side of the instrument (see Figure 4). Leave the wells 7 and 8 empty.

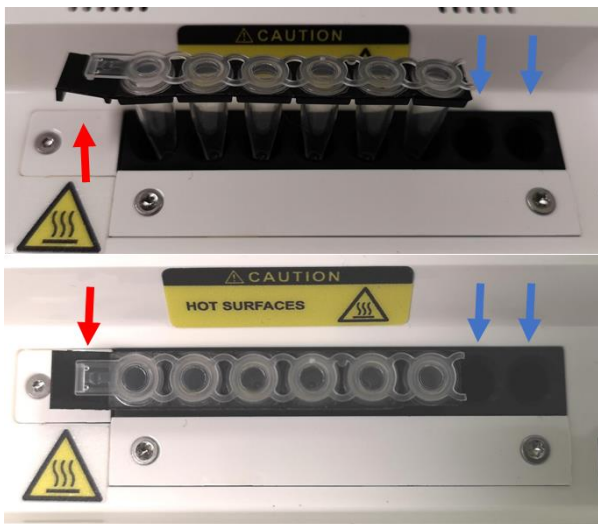
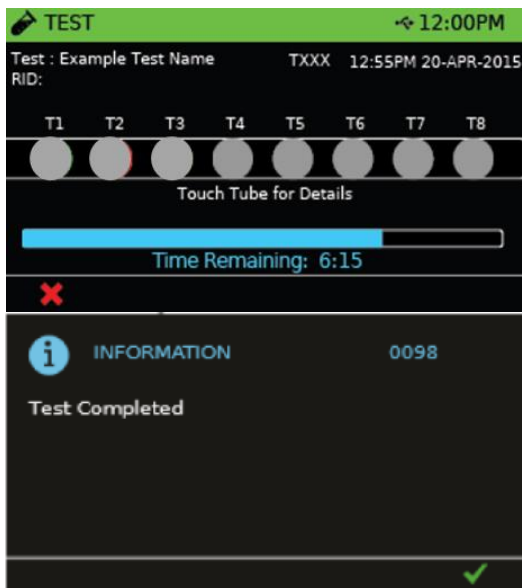


Figure 4: How to insert microtube strip in the BEC Reader device. Red arrows showing position of the black end tab. Blue arrows showing empty well positions 7 and 8.

- c) Immediately close the lid. The BEC Reader device locks and starts the program automatically.
- d) A progress bar allows you to follow the progress of the test. The result for each well is displayed in real time on the screen. At the end of the amplification, the message "test completed" appears and all the results are displayed.



























- e) The lid opens automatically at the end of the amplification.
- f) Discard immediately the microtubes **without opening the microtubes.**


► Interpretation of results

► Pictograms in positions 1 through 3 and 4 through 6


For each of the two samples (see Figure 1 for the position), the analysis of the results shall be performed pursuant to the following table :

Positive Control	RdRP gene	N gene	Interpretation of results
			Detection of viral RNA specific to the betacoronavirus groups B and C (SARS-CoV-2, SARS-CoV-1 and MERS-CoV) and to the SARS-CoV-2 virus Sample is SARS-CoV-2 positive
			Detection of viral RNA specific to betacoronavirus groups B and C (SARS-CoV-2, SARS-CoV-1 and MERS-CoV) No detection of viral RNA specific to the SARS-CoV-2 Sample is presumptive positive for SARS-CoV-2 Repeat the test with a new sample.
			Detection of viral RNA specific to SARS-CoV-2 virus No detection of viral RNA specific to betacoronavirus groups B and C (SARS-CoV-2, SARS-CoV-1 and MERS-CoV) Sample is SARS-CoV-2 positive

Positive Control	RdRP gene	N gene	Interpretation of results
			No detection of viral RNA specific to betacoronavirus groups B and C (SARS-CoV-2, SARS-CoV-1 and MERS-CoV) and to SARS-CoV-2 virus Sample is SARS-CoV-2 negative
			Detection of viral RNA specific to betacoronavirus groups B and C (SARS-CoV-2, SARS-CoV-1 and MERS-CoV) and to SARS-CoV-2 virus No detection of positive control gene Sample is SARS-CoV-2 positive
			Detection viral RNA specific to betacoronavirus groups B and C (SARS-CoV-2, SARS-CoV-1 and MERS-CoV) No detection of viral RNA specific to SARS-CoV-2 No detection of positive control gene Sample is presumptive positive for SARS-CoV-2 Repeat the test with a new sample.
			Detection of viral RNA specific to SARS-CoV-2 virus No detection of viral RNA specific to betacoronavirus groups B and C (SARS-CoV-2, SARS-CoV-1 and MERS-CoV) No detection of positiv control gene Sample is SARS-CoV-2 positive
			RT-LAMP inhibition or reagent failure. Repeat the test with a new sample.

Note : The « unclear »  pictogram may appear on one or several of the positions 1 through 6. In this case, the test is not valid as the amplification did not proceed properly. The test must be repeated with a new sample. In case the « unclear » pictogram appears on two successive runs, contact Technical Support.

▷ **Pictograms in positions 7 and 8**

Positions 7 and 8 always show the « unclear »  pictogram.

▶ **Optional: exporting results**

The BEC reader device automatically saves the test results into its memory up to 50 tests.

The test results can be exported as files in .CSV and .pdf format. Both files can be opened on a PC.

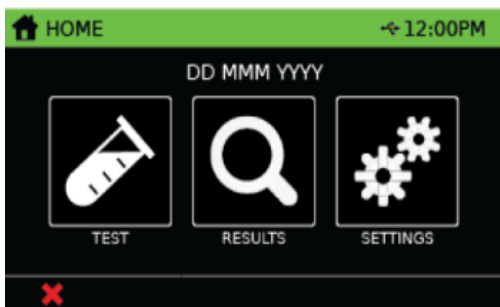
Pdf files contain run identification information (test name, RunID, date and time) and the results that are displayed on the screen.


To access detailed results (including fluorescence data), .CSV files must be opened with the 'T8 ISO Desktop' software.

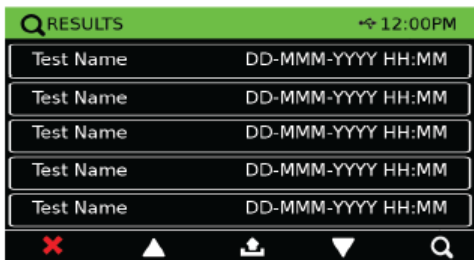
- Connect the provided USB stick in the plug in front of the device



- Press the "Results" icon on the Home Screen. The list of test results is displayed.



- Select the test results and press the Export Results icon  to export results to the USB key.



Be sure the export is completed before removing the USB stick.

► Technical Support

Before you contact Bertin Bioreagent Technical Support, please gather the following information :

- Product Name
- Batch Number
- Serial Number of the instrument
- Error messages (if any)

Technical Support contact details :

- +33 (0)139 306 036
- tech@bertin-bioreagent.com

► Bibliography

Aebischer, A., Wernike, K., Hoffmann, B., & Beer, M. (2014). Rapid genome detection of Schmallenberg virus and bovine viral diarrhoea virus by use of isothermal amplification methods and high-speed real-time reverse transcriptase PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 52(6), 1883–1892. <https://doi.org/10.1128/JCM.00167-14>

Chander, Y., Koelbl, J., Puckett, J., Moser, M. J., Klingele, A. J., Liles, M. R., Carrias, A., Mead, D. A., & Schoenfeld, T. W. (2014). A novel thermostable polymerase for RNA and DNA loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *Frontiers in Microbiology*, 5(AUG). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00395>

Francois, P., Tangomo, M., Hibbs, J., Bonetti, E. J., Boehme, C. C., Notomi, T., Perkins, M. D., & Schrenzel, J. (2011). Robustness of a loop-mediated isothermal amplification reaction for diagnostic applications. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 62(1), 41–48. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2011.00785.x>

Li, J., & Macdonald, J. (2015). Advances in isothermal amplification: Novel strategies inspired by biological processes. In *Biosensors and Bioelectronics* (Vol. 64, pp. 196–211). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2014.08.069>

Nagamine, K., Hase, T., & Notomi, T. (2002). Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers. *Molecular and Cellular Probes*, 16(3), 223–229. <https://doi.org/10.1006/mcpr.2002.0415>

Nie, K., Qi, S. xiang, Zhang, Y., Luo, L., Xie, Y., Yang, M. jie, Zhang, Y., Li, J., Shen, H., Li, Q., & Ma, X. jun. (2012). Evaluation of a Direct Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification Method without RNA Extraction for the Detection of Human Enterovirus 71 Subgenotype C4 in Nasopharyngeal Swab Specimens. *PLoS ONE*, 7(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0052486>

Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N., & Hase, T. (2000). Loop-mediated isothermal amplification of DNA. In *Nucleic Acids Research* (Vol. 28, Issue 12).

Yan, L., Zhou, J., Zheng, Y., Gamson, A. S., Roembke, B. T., Nakayama, S., & Sintim, H. O. (2014). Isothermal amplified detection of DNA and RNA. In *Molecular BioSystems* (Vol. 10, Issue 5, pp. 970–1003). Royal Society of Chemistry. <https://doi.org/10.1039/c3mb70304e>

Français

► Usage prévu

Le kit BEC SARS-CoV-2 RT-LAMP kit for environmental samples est un test de détection rapide du SARS-CoV-2 alliant une technologie d'extraction rapide d'ARN à partir de prélèvements environnementaux et un test moléculaire RT-LAMP ciblant 2 gènes du SARS-CoV-2.

L'analyse de ce test doit être réalisée avec l'incubateur-lecteur BEC Reader.

Le test a été développé pour une utilisation avec des prélèvements d'air réalisés avec les appareils Coriolis® et avec des prélèvements de surface.

► Composants du kit

Nombre de tests dans un kit : 10.

Température de conservation d'un kit : +4°C.

Durée de conservation d'un kit : date limite d'utilisation indiquée sur l'extérieur de la boîte.

Contenu du kit :

- 5 sachets individuels de 2 tests chacun.
- Un portoir en carton, permettant une manipulation facilitée des tubes, cf Figure 6.
- Un manuel d'utilisation.

Contenu d'un sachet :

Dénomination	Référence du composant	Couleur	Quantité par sachet	Volume
BEC SARS-CoV-2 Assay Tubes for environmental samples	P04302	-	1 barrette de 6 micro-tubes	-
BEC SARS-CoV-2 Lysing Buffer (green)	P13300	Vert	2	1,5 mL
BEC SARS-CoV-2 Neutralization Buffer (blue)	P20300	Bleu	2	1,5 mL
BEC SARS-CoV-2 Reaction Buffer (orange)	P21300	Orange	2	150 µL
BEC SARS-CoV-2 Transfer Tubes (violet)	P30300	Violet	2	-
sterile 3mL syringe	P31300	-	2	-
sterile needle for 3mL syringe	P32300	-	2	-
5 micron filter for 3mL syringe	P33300	-	2	-

► Matériel requis non fourni

- Le pack de lecture terrain BEC (BEC field reader pack) incluant :
 - o Le dispositif incubateur-lecteur BEC reader (cf. Figure 7)
 - o Une pipette de précision à volume fixe de 25 µL (orange)

- Une pipette de précision à volume fixe de 100 µL (violette)
- Une boîte de cônes à filtre jetables (recommandée : CLEARLINE réf. 713116)
- Poubelle à déchets biologiques

- Matériel de prélèvement :
 - Écouvillons pour les prélèvements de surface
 - Biocollecteurs d'air Coriolis® et consommables (Bertin Technologies)
- Equipement de protection individuelle de l'opérateur

► Mises en garde et précautions

Lire attentivement le manuel d'utilisation avant d'utiliser le produit.

- Avant toute utilisation, veuillez vérifier que le produit et ses composants ne sont pas endommagés et sont complets.
- Ne pas utiliser un test dont le sachet aurait été ouvert depuis plus de 24h et ce quelle que soit la température de conservation.
- Manipuler les échantillons comme s'ils étaient infectieux et/ou dangereux, en accord avec les procédures de sécurité en vigueur dans le laboratoire.
- Porter les équipements de protection individuelle appropriés (blouse, gants jetables non talqués, masque).
- Eviter les contaminations microbiennes et par les nucléases de l'échantillon et des composants du kit.

- Toujours utiliser des pipettes à cônes jetables avec filtre, non contaminées par des DNases et RNase.
- Toujours porter des gants de protection non talqués lors de la manipulation des composants du kit.
- Ne pas ouvrir les tubes de réaction après l'amplification afin d'éviter toute contamination par les amplicons.
- Ne pas utiliser les composants au-delà de leur date de péremption.
- Eliminer les échantillons, les composants du sachet et les déchets de l'essai conformément aux règles de sécurité locales.
- Ce kit est destiné à être utilisé avec le lecteur homologué à cette fin. Tout résultat directement interprétable est dépendant du paramétrage du lecteur. En cas d'utilisation d'un autre moyen de lecture, il appartient à l'opérateur de s'assurer de l'étalonnage correct de son moyen d'essai. Bertin Technologies se dégage de toute responsabilité des résultats obtenus dans tout autre référentiel.
- Ne pas laisser les micro-tubes dans l'analyseur une fois la réaction terminée.
- Il est recommandé d'utiliser une surface de travail plane, propre et dégagée, dans un endroit couvert, clos et à une température comprise entre 15°C et 25°C.
- Avant l'ouverture des tubes de préparation, s'assurer que tout le liquide ou le lyophilisat contenu dans le tube soit bien au fond de celui-ci. Si nécessaire, tapoter le tube plusieurs fois vers le bas pour faire redescendre les gouttes éventuelles.



Ne jamais rouvrir les micro-tubes une fois insérés dans l'incubateur-lecteur, ni après la fin de la réaction. Une réouverture dans ces conditions entrainerait une contamination de l'environnement. Cette contamination serait susceptible de causer des résultats faussement positifs pour les tests ultérieurs.

► Informations générales

Le kit BEC SARS-CoV-2 RT-LAMP kit for environmental samples est un kit d'analyse moléculaire de terrain permettant la détection du virus SARS-CoV-2 à partir de prélèvements environnementaux tels que des échantillons de surface ou d'air.

Le SARS-CoV-2 est un coronavirus responsable de l'émergence d'une nouvelle maladie infectieuse respiratoire appelée Covid-19 à l'origine d'une pandémie mondiale. Cette maladie, apparue en Chine à la fin de l'année 2019, se transmet principalement par voie aérienne avec un taux de reproduction élevé compris entre 2 et 3 en l'absence de mesures de contrôle et de prévention. La gravité des signes cliniques de la maladie est très variable d'un individu à un autre avec une prépondérance des formes sévères chez les individus âgés ou souffrant d'autres maladies.

Les données scientifiques disponibles à ce jour permettent d'estimer que 30% à 60% des personnes infectées sont asymptomatiques mais en capacité de transmettre la maladie. Dans ce contexte, il apparaît primordial de pouvoir réaliser massivement des tests de diagnostic afin de limiter la propagation du virus.

Le kit BEC-SARS-CoV-2 a été développé afin de permettre la réalisation de tests de diagnostic par du personnel non spécialisé au sein des établissements de soins décentralisés ou sur des sites de test dédiés.

Source : Fiche maladie Covid-19 – Institut Pasteur - mai 2020 (<https://www.pasteur.fr/fr/centre-medical/fiches-maladies/maladie-covid-19-nouveau-coronavirus>)

► Description du produit

Le kit BEC SARS-CoV-2 RT-LAMP kit for environmental samples est un système de réactifs permettant une extraction rapide d'ARN viral et une amplification RT-LAMP en temps réel de 2 séquences du génome du virus SARS-CoV-2. Il contient un contrôle positif exogène permettant de s'assurer du bon déroulement de l'amplification.

La RT-LAMP est une méthode d'amplification spécifique isotherme d'une séquence nucléotidique avec incorporation d'un intercalant fluorescent au cours de l'amplification (Li & Macdonald, 2015 ; Nagamine et al., 2002 ; Notomi et al., 2000 ; Yan et al., 2014). Elle amplifie une séquence cible avec deux à trois séries d'amorces à une température constante de 65°C. Comparée aux méthodes de détection traditionnelles, la RT-LAMP est plus spécifique et plus rapide (Aebischer et al., 2014). Elle produit une plus grande quantité d'amplicons et est moins sensible aux inhibiteurs naturellement présents dans les matrices biologiques (Chander et al., 2014 ; Francois et al., 2011 ; Nie et al., 2012).

Le kit BEC SARS-CoV-2 RT-LAMP kit for environmental samples permet de tester 2 échantillons en parallèle.

Une analyse avec le BEC SARS-CoV-2 RT-LAMP kit for environmental samples consiste à réaliser les étapes suivantes :

- Pour les 2 échantillons de manière séquentielle :
 - o L'extraction rapide de l'ARN viral avec une lyse chimique et une précipitation par des agents chaotropiques.
 - o Une neutralisation des inhibiteurs d'amplification présents dans le lysat.
 - o La filtration du lysat pour éliminer les agrégats de débris cellulaires et de réactifs précipités lors de la neutralisation.
- Pour les 2 échantillons en parallèle : l'amplification RT-LAMP avec le tampon réactionnel et les amorces réparties dans les micro-tubes (assay tubes), cf. Figure 5.

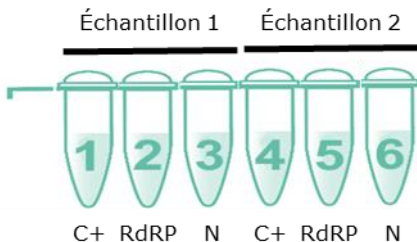


Figure 5: Une barrette de 6 micro-tubes permettant l'amplification de 3 séquences des gènes Alien RdRP et N (C+: contrôle positif) pour 2 échantillons.

Le test permet l'amplification de 3 séquences cibles au sein des gènes suivants :

- Gène Alien : séquence non naturelle servant de contrôle positif du processus d'amplification - positions 1 et 4 sur la barrette de micro-tubes (cf. Figure 5).
- Gène RdRP : cible spécifique des betacoronavirus (β CoV) pathogènes pour l'homme appartenant aux groupes B et C (SARS-CoV-2, SARS-CoV et MERS-CoV) - positions 2 et 5 sur la barrette de micro-tubes (cf Figure 5)
- Gène N : cible spécifique au SARS-CoV-2 - positions 3 et 6 sur la barrette de micro-tubes (cf. Figure 5)

Ces amplifications sont réalisées en parallèle et le résultat de l'amplification est obtenu après une durée allant de 5 à 20 min en fonction de la charge virale de l'échantillon analysé.

L'incubateur-lecteur indique en temps réel pour chaque tube si l'amplification est positive (détection de l'ARN cible) ou négative (absence de détection de l'ARN cible).

► **Mode opératoire**

▷ **Préparation des échantillons**

Le test est compatible des échantillons d'air et de surface.

- Recommandations pour les échantillons de surface: Sortir un écouvillon de son emballage. Appliquer une pression avec l'écouvillon sur la surface et le déplacer dans au moins deux directions différentes tout en effectuant une rotation du bâtonnet de l'écouvillon.
Pour les prélèvements de surface, il est recommandé de passer l'écouvillon sur une surface de 25 cm².
- Recommandations pour les échantillons d'air: Réaliser la collecte d'échantillons d'air avec un appareil Coriolis® Air sampler (Bertin Technologies). Sortir un écouvillon de son emballage. Frotter la surface interne du cône du Coriolis® en appliquant une pression avec l'écouvillon et en le déplaçant dans au moins deux directions différentes tout en effectuant une rotation du bâtonnet de l'écouvillon.
- L'écouvillon doit être transporté à sec.

ATTENTION ! Le test montre une baisse significative de sensibilité lorsqu'il est utilisé avec des écouvillons placés préalablement dans un milieu liquide entre le prélèvement et le test.

▷ Préparation des réactifs

- Ouvrir le sachet aluminium et vérifier que les tampons et lyophilisats contenus dans les différents tubes sont bien localisés au fond de ceux-ci et qu'aucun tube n'est ouvert. Si cela est le cas, ne pas utiliser le sachet.
Si nécessaire, tapoter les tubes sur le plan de travail pour être sûr que des gouttes de tampon ou des culots de lyophilisats ne restent pas présents dans le bouchon.
- Laisser les réactifs à température ambiante pendant 5 minutes avant utilisation. Si la solution contenue dans le tube vert est cristallisée, réchauffer le tube quelques secondes entre les mains.
- Disposer les différents tubes sur le portoir en carton fourni avec le kit, en respectant les codes couleurs, cf. Figure 6. **Ne pas ouvrir les tubes à cette étape.**

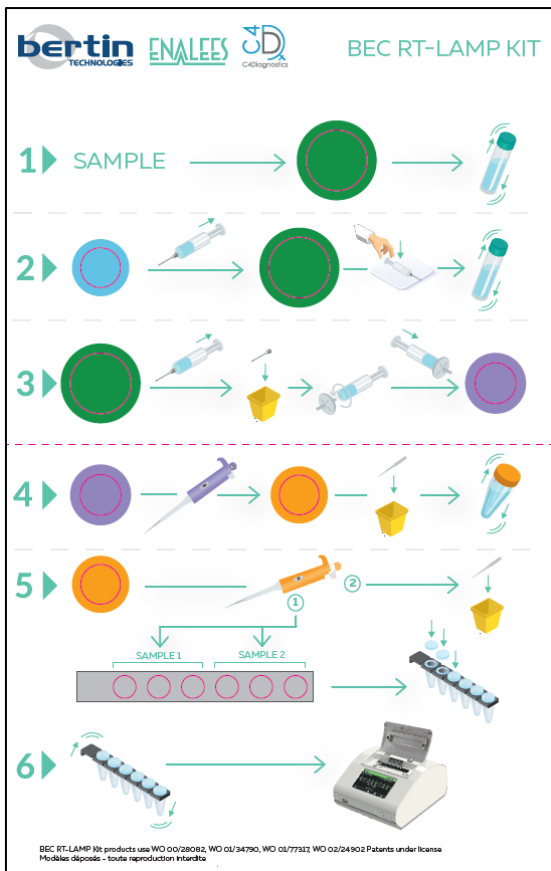


Figure 6: portoir fourni pour la manipulation des tubes.

▷ Préparation de l'incubateur-lecteur


- Mettre sous tension l'incubateur-lecteur en appuyant (appui long de 3 secondes) sur la touche  située en façade du lecteur (cf. Figure 7). L'écran s'allume et le lecteur effectue un auto-diagnostic. Le capot s'ouvre à la mise sous tension du lecteur.



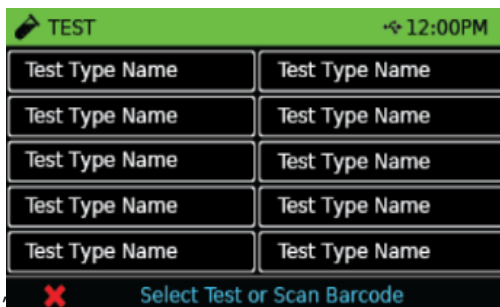
Figure 7: Incubateur-lecteur "BEC Reader" avec localisation de la touche marche/arrêt.



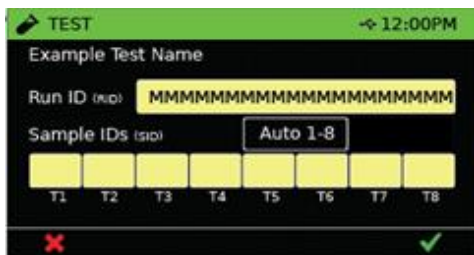
- Appuyer sur l'écran puis sélectionner le menu 'TEST'.



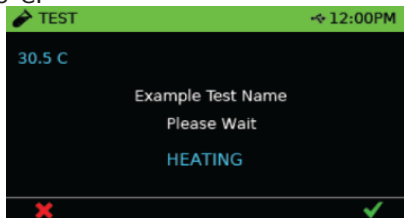
- Sélectionner le test 'BEC_Environmental Test Vx.x'



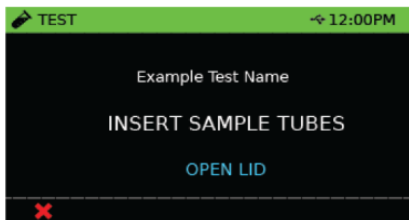
- Compléter le RunID : l'identifiant du fichier de résultats du run.
- Appuyer sur Auto 1-8 pour attribuer automatiquement un nom aux tubes. Passer à l'écran suivant en appuyant sur ✓.



- Dès cette étape, le lecteur passe en préchauffage jusqu'à atteindre la température de consigne de 65°C.



- Lorsque la consigne est atteinte, le lecteur en informe l'opérateur et l'invite à insérer les micro-tubes.



▷ **Réalisation du test**

ATTENTION : réaliser les étapes 1 à 5 avec le 1^{er} échantillon, puis répéter ces étapes avec le 2^e échantillon. Si un seul échantillon est disponible, réaliser les étapes 1 à 6 en laissant les micro-tubes 4 à 6 vides.

1) Etape 1 : Lyse et extraction de l'ARN

- a) Ouvrir le tube vert (BEC SARS-CoV-2 Lysing Buffer (green)) en position 1 sur le portoir (cf. Figure 6).
- b) Insérer l'écouvillon dans la solution et remuer l'écouvillon dans la solution. Égoutter l'écouvillon contre la paroi du tube avant de le jeter.
- c) Fermer le tube vert puis agiter celui-ci vigoureusement pendant 10s et le déposer en position 2 sur le portoir.

NE PAS laisser reposer l'échantillon avant de passer à l'étape 2 pour éviter une dégradation du mélange qui perturberait le test.

2) Etape 2 : Neutralisation

- a) Ouvrir le tube bleu (BEC SARS-CoV-2 Neutralization Buffer (blue)) et le tube vert en position 2 sur le portoir.
- b) Prélever l'intégralité du volume du tube bleu avec la seringue équipée de son aiguille et le transférer dans le tube vert.
NE PAS verser directement sans aiguille.
- c) Poser la seringue.
- d) Refermer le tube bleu et le tube vert. Agiter vigoureusement le tube vert pendant 10s avant de le déposer sur le portoir en position 3.

3) Etape 3 : Filtration

- a) Tapoter le tube vert sur le plan de travail pour faire tomber les gouttes présentes dans le bouchon. Ouvrir le tube vert et le tube violet (BEC SARS-CoV-2 Transfer Tubes (violet)) en position 3.
- b) Prélever le maximum de volume de liquide du tube vert à l'aide de la seringue équipée de l'aiguille. Attention à bien aspirer le liquide présent dans le tube vert et non la mousse.
- c) Enlever l'aiguille de la seringue et la remplacer par le filtre. Jeter l'aiguille dans une poubelle adaptée.
- d) Insérer le filtre dans le tube violet. Presser doucement sur le piston de la seringue jusqu'à la butée. En appuyant doucement sur le piston, le flux du filtrat est facilité.
- e) Refermer le tube vert et le tube violet. Placer le tube violet en position 4 sur le portoir. Jeter le tube vert dans une poubelle adaptée.

4) Etape 4 : Transfert

- a) Ouvrir le tube violet et le tube orange (BEC SARS-CoV-2 Reaction Buffer (orange)) en position 4 sur le portoir.
- b) Prélever un volume de 100 µL du tube violet avec la pipette de précision violette équipée d'un cône à filtre et le transférer dans le tube orange.
- c) Fermer le tube violet et le tube orange. Bien agiter le tube orange pendant 10s et le déposer en position 5 sur le portoir.

ATTENTION : Le tube orange doit être utilisé à l'étape 5 et l'incubation (étape 6) doit être démarrée dans les 30 minutes suivant la fin de la préparation du tube orange.

5) Etape 5 : Dépôt du mélange réactionnel dans les micro-tubes

- a) Ouvrir le tube orange en position 5.
- b) Ouvrir les micro-tubes de la barrette.
- c) Prélever un volume de 25 μ L du tube orange avec la pipette de précision orange équipée d'un cône à filtre et déposer ce volume dans chaque micro-tube correspondant à l'échantillon testé (cf. Figure 5), soit :
 - positions 1, 2 et 3 pour l'échantillon 1
 - positions 4, 5 et 6 pour l'échantillon 2**Utiliser un nouveau cône à filtre pour chaque puit**
- d) Jeter le cône à filtre, refermer le tube orange et les micro-tubes.
- e) Jeter les tubes vert, bleu, violet et orange

ATTENTION : Répéter les étapes 1 à 5 avec le deuxième échantillon avant de procéder à l'étape suivante d'incubation.

Lorsque la barrette de micro-tubes est remplie, procéder immédiatement à l'étape 6.

6) Etape 6 : Incubation

ATTENTION : Vérifier que l'incubateur-lecteur a atteint la température de consigne (65°C).

- a) Agiter les micro-tubes jusqu'à dissolution complète des lyophilisats. Tapoter ensuite les tubes sur le plan de travail afin de faire redescendre toutes les gouttelettes au fond du tube.

- b) Insérer la barrette de micro-tubes dans l'incubateur-lecteur en plaçant le détrompeur noir à l'extrémité gauche du support de micro-tubes (cf. Figure 8). Laissez les positions 7 et 8 vides.

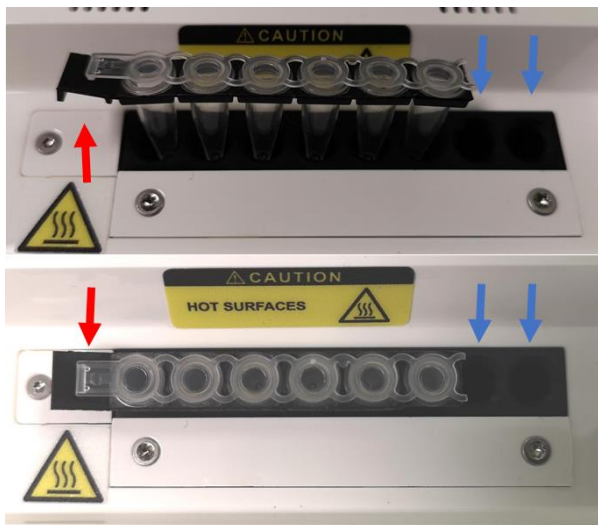
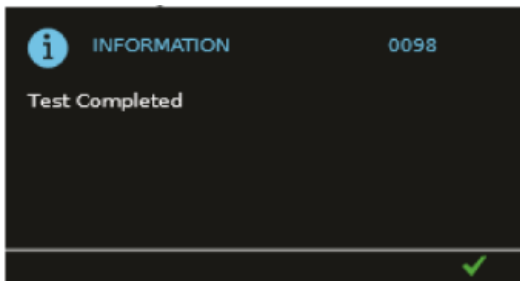
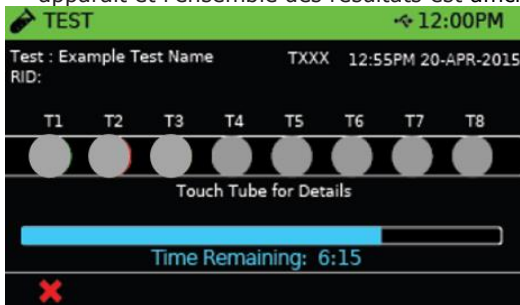


Figure 8: Insertion de la barrette de micro-tubes dans l'incubateur-lecteur. Les flèches rouges indiquent la position du détrompeur noir à l'extrémité gauche du support de micro-tubes. Les flèches bleues indiquent les positions 7 et 8 laissées vides.

- c) Refermer immédiatement le capot. L'incubateur-lecteur se verrouille et démarre le programme automatiquement.

- d) Une barre de progression permet de suivre l'avancement du test. Le résultat pour chaque puit est affiché en temps réel sur l'écran. A la fin de l'amplification, le message « test completed » apparaît et l'ensemble des résultats est affiché.



























- e) Ouvrir l'appareil dès la fin de l'amplification.
 f) Jeter immédiatement les micro-tubes **en faisant attention à ne pas les ouvrir.**


► Interprétation des résultats

► Pictogrammes en position 1 à 3 et 4 à 6

Pour chacun des deux échantillons (se référer à la Figure 5 pour la position), l'interprétation des résultats doit être réalisée selon le tableau suivant :


Contrôle interne	Gène RdRP	Gène N	Interprétation des résultats
			Détection d'ARN viral spécifique des betacoronavirus groupes B et C (SARS-CoV-2, SARS-CoV-1 et MERS-CoV) et du virus SARS-CoV-2 Echantillon positif pour le SARS-CoV-2
			Détection d'ARN viral spécifique des betacoronavirus groupes B et C (SARS-CoV-2, SARS-CoV-1 et MERS-CoV) Absence de détection d'ARN viral spécifique du SARS-CoV-2 Echantillon présumé positif pour le SARS-CoV-2 Répétez le test à partir d'un nouvel échantillon.
			Détection d'ARN viral spécifique au virus SARS-CoV-2 Absence de détection d'ARN viral spécifique des betacoronavirus groupes B et C (SARS-CoV-2, SARS-CoV-1 et MERS-CoV) Echantillon positif pour le SARS-CoV-2

Contrôle interne	Gène RdRP	Gène N	Interprétation des résultats
			Absence de détection d'ARN viral spécifique des betacoronavirus groupes B et C (SARS-CoV-2, SARS-CoV-1 et MERS-CoV) et du virus SARS-CoV-2 Echantillon négatif pour le SARS-CoV-2
			Détection d'ARN viral spécifique des betacoronavirus groupes B et C (SARS-CoV-2, SARS-CoV-1 et MERS-CoV) et du virus SARS-CoV-2 Absence de détection du gène alien Echantillon positif pour le SARS-CoV-2
			Détection d'ARN viral spécifique des betacoronavirus groupes B et C (SARS-CoV-2, SARS-CoV-1 et MERS-CoV) Absence de détection d'ARN viral spécifique du SARS-CoV-2 Absence de détection du gène alien Echantillon présumé positif pour le SARS-CoV-2 Répétez le test à partir d'un nouvel échantillon.
			Détection d'ARN viral spécifique au virus SARS-CoV-2 Absence de détection d'ARN viral spécifique des betacoronavirus groupes B et C (SARS-CoV-2, SARS-CoV-1 et MERS-CoV) Absence de détection du gène alien Echantillon positif pour le SARS-CoV-2
			Inhibition de la RT-LAMP ou défaillance des réactifs. Répétez le test à partir d'un nouvel échantillon.

Note : Le pictogramme « unclear »  peut apparaître sur une ou plusieurs des positions 1 à 6. Dans ce cas, le test est non valide car l'amplification ne s'est pas déroulée correctement.

Il faut répéter le test à partir d'un nouvel échantillon.
En cas d'apparition du pictogramme « unclear » sur deux amplifications successives, contactez le service client.

▷ **Pictogrammes en position 7 et 8**

Les positions 7 et 8 affichent le pictogramme « unclear »  en fonctionnement normal.

▶ **Option : export des résultats**

L'incubateur-lecteur sauvegarde automatiquement les résultats des tests dans une limite de 50 tests.

Ces résultats peuvent être exportés sous forme d'un fichier .pdf et d'un fichier .CSV.

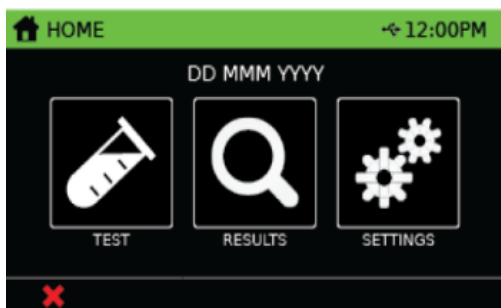
Les fichiers .pdf contiennent les informations d'identification du test (Nom du test, RunID, date et heure) ainsi que les résultats affichés sur l'écran.


Les fichiers .CSV permettent d'accéder aux résultats détaillés et notamment aux données de fluorescence. Pour ouvrir et analyser les fichiers .CSV, l'opérateur doit avoir installé préalablement sur son ordinateur le logiciel 'T8 ISO Desktop'.

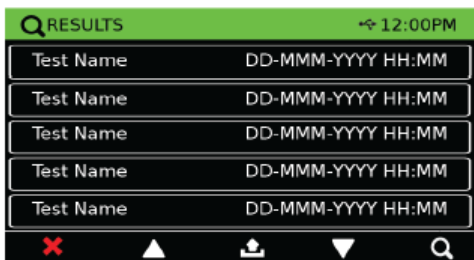
- Brancher la clé USB sur la face avant du lecteur



- Appuyer sur 'Results' sur la page d'accueil de l'incubateur-lecteur. La liste des résultats enregistrés s'affiche.



- Sélectionner les tests à exporter puis appuyer sur l'icône 'Exporter'  pour exporter les résultats sur la clé USB.



Attendre la fin du processus d'export avant de retirer la clé USB.

► Assistance technique

Avant de contacter le service technique de Bertin Bioreagent, recueillir les informations suivantes :

- Nom du produit
- Numéro de lot
- Numéro de série de l'instrument
- Messages d'erreur (le cas échéant)

Contact du service technique :

- +33 (0)139 306 036
- tech@bertin-bioreagent.com

► Bibliographie

Aebischer, A., Wernike, K., Hoffmann, B., & Beer, M. (2014). Rapid genome detection of Schmallenberg virus and bovine viral diarrhoea virus by use of isothermal amplification methods and high-speed real-time reverse transcriptase PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 52(6), 1883–1892. <https://doi.org/10.1128/JCM.00167-14>

Chander, Y., Koelbl, J., Puckett, J., Moser, M. J., Klingele, A. J., Liles, M. R., Carrias, A., Mead, D. A., & Schoenfeld, T. W. (2014). A novel thermostable polymerase for RNA and DNA loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *Frontiers in Microbiology*, 5(AUG). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00395>

Francois, P., Tangomo, M., Hibbs, J., Bonetti, E. J., Boehme, C. C., Notomi, T., Perkins, M. D., & Schrenzel, J. (2011). Robustness of a loop-mediated isothermal amplification reaction for diagnostic applications. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 62(1), 41–48. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2011.00785.x>

Li, J., & Macdonald, J. (2015). Advances in isothermal amplification: Novel strategies inspired by biological processes. In *Biosensors and Bioelectronics* (Vol. 64, pp. 196–211). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2014.08.069>

Nagamine, K., Hase, T., & Notomi, T. (2002). Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers. *Molecular and Cellular Probes*, 16(3), 223–229. <https://doi.org/10.1006/mcpr.2002.0415>

Nie, K., Qi, S. xiang, Zhang, Y., Luo, L., Xie, Y., Yang, M. jie, Zhang, Y., Li, J., Shen, H., Li, Q., & Ma, X. jun. (2012).

Evaluation of a Direct Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification Method without RNA Extraction for the Detection of Human Enterovirus 71 Subgenotype C4 in Nasopharyngeal Swab Specimens. *PLoS ONE*, 7(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0052486>

Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N., & Hase, T. (2000). Loop-mediated isothermal amplification of DNA. In *Nucleic Acids Research* (Vol. 28, Issue 12).

Yan, L., Zhou, J., Zheng, Y., Gamson, A. S., Roembke, B. T., Nakayama, S., & Sintim, H. O. (2014). Isothermal amplified detection of DNA and RNA. In *Molecular BioSystems* (Vol. 10, Issue 5, pp. 970–1003). Royal Society of Chemistry. <https://doi.org/10.1039/c3mb70304e>



French industrial company specialized in particular in Life Sciences and Biodefense fields. Bertin Technologies is the Legal Manufacturer of the tests and markets these tests.

Industriel français, spécialisé en particulier dans les domaines des Life Sciences et de la Biodéfense. Bertin Technologies est le Legal Manufacturer et commercialise les tests.



Leading company in the field of veterinary infectious disease diagnostics. Enalees developed the RNA extraction technology used for the tests and the point-of-care test model.

Société leader dans le domaine vétérinaire du diagnostic des maladies infectieuses. Enalees est à l'origine de la technologie d'extraction d'ARN utilisée pour les tests, et du modèle de test point-of-care.



French biotech company specialized in infectious disease in-vitro diagnostics, particularly in respiratory diseases. C4Diagnostics participated in the development of the tests and markets these tests.

Biotech française spécialisée dans le diagnostic in-vitro des maladies infectieuses, notamment respiratoires. C4Diagnostics a participé au développement et commercialise les tests.



NOUS CONTACTER / CONTACT US

Bertin Technologies
10 bis Avenue Ampère
Parc d'Activités du Pas du Lac
78180 Montigny-le-Bretonneux
FRANCE



+33 (0)139 306 036



tech@bertin-bioreagent.com



EU webstore: Bertin-bioreagent.com
US webstore: Bertin-corp.com