



## **BEC SARS-CoV-2 RT-LAMP kit for human samples**



## **BEC SARS-CoV-2 RT-LAMP kit for human samples**

**REF** **P05301.10 ea**

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









User Guide reference : P11301

User Guide version: 0122

Revision date : 2022 April 20

## Symbol chart

	<p>Consult the instructions for use          Consulter les instructions          d'utilisation</p>
	<p>Catalog Number          Référence catalogue</p>
	<p>Lot Number          Numéro de lot</p>
	<p>Use by:          Date limite d'utilisation:</p>
	<p>Keep away from heat or direct sun          light.          Garder à l'abri de la chaleur et de          toute exposition lumineuse.</p>
	<p>Manufacturer          Fabricant</p>

## Summary - Sommaire

▶	<b>ENGLISH</b> .....	<b>6</b>
•	INTENDED USE .....	7
•	CONTENT OF THE KIT .....	7
•	MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED .....	8
•	WARNINGS AND PRECAUTIONS .....	9
•	GENERAL INFORMATION .....	11
•	PRODUCT DESCRIPTION .....	12
•	OPERATING PROTOCOL .....	15
•	INTERPRETATION OF RESULTS.....	27
•	OPTIONAL: EXPORTING RESULTS.....	29
•	LIMITATIONS .....	31
•	QUALITY CONTROL .....	32
•	PERFORMANCE CHARACTERISTICS.....	33
•	TECHNICAL SUPPORT .....	40
•	BIBLIOGRAPHY.....	40
▶	<b>FRANÇAIS</b> .....	<b>43</b>
•	USAGE PREVU.....	44
•	COMPOSANTS DU KIT .....	44
•	MATERIEL REQUIS NON FOURNI .....	45
•	MISES EN GARDE ET PRECAUTIONS.....	46
•	INFORMATIONS GENERALES.....	48
•	DESCRIPTION DU PRODUIT .....	50
•	MODE OPÉRATOIRE .....	53
•	INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS.....	66
•	OPTION: EXPORT DES RÉSULTATS.....	69
•	LIMITES.....	71
•	CONTRÔLE QUALITÉ .....	72
•	PERFORMANCES .....	72
•	ASSISTANCE TECHNIQUE .....	80
•	BIBLIOGRAPHIE .....	80

# English

## ► **Intended Use**

The BEC SARS-CoV-2 RT-LAMP kit for human samples is a test for rapid detection of SARS-CoV-2 combining a technology of rapid extraction of RNA from nasal or nasopharyngeal samples and a RT-LAMP molecular test targeting 2 genes of SARS-CoV-2. Its use is intended for research purposes only.

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

## ► **Content of the kit**

Number of tests in a kit: 10.

Kit storage temperature: +4°C.

Kit shipping temperature: room temperature (RT) or +4°C.  
The kit is stable at RT for 2 weeks.

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 human samples	P04301	-	1 strip of 6 microtubes + 2 strips of caps	-
BEC SARS-CoV-2 Lysing Buffer (green)	P13300	Green	2	1.050 mL
BEC SARS-CoV-2 Neutralization Buffer (blue)	P20300	Blue	2	1 mL
BEC SARS-CoV-2 Reaction Buffer (orange)	P21300	Orange	2	150 $\mu$ L
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  $\mu$ L fixed-volume pipette (orange)
  - o A 100  $\mu$ L fixed-volume pipette (violet)
  - o A box of disposable filter-tips (recommended CLEARLINE cat. number



713116)

- Biological waste bin
- Sampling material: Swabs for nasal or nasopharyngeal sample  
Examples of swabs:
  - iClean® Specimen Collection Flocked Swab
  - Dry Swabs 155C, COPAN Diagnostics
  - Dry Swabs 159C, COPAN Diagnostics
- Personal protective equipment for the user according to the local regulation.

## ► 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).
- The operator must handle the syringe with the needle with care. To avoid any risk of injury, the needle protective cap must be put back on it between each preparation step. At the end of handling, the needle with its protective cap must be discarded in accordance with local safety rules. 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
- The user must check the accuracy of the pipettes regularly
- 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 human samples is a kit allowing the detection of the SARS-CoV-2 virus in nasal or nasopharyngeal samples, for research use only (RUO)

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 detection 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 detection tests to be carried out by non-specialized personnel in remote health establishments or on dedicated test sites.

*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 human 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 endogenous internal control to ensure the correct running of the extraction and 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).

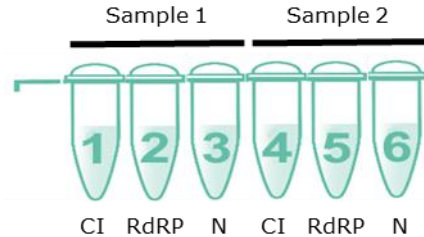
The BEC SARS-CoV-2 RT-LAMP kit for human samples allows 2 samples to be tested in parallel.

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

- For the 2 samples in a sequential manner:
  - Rapid extraction of viral RNA with chemical lysis.
  - Neutralization of the amplification inhibitors present in the lysate by precipitation with chaotropic agents.
  - 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 the RdRP, N and Rnase P genes (CI: internal control) for 2 samples*

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

- RdRP Gene: target specific to betacoronavirus ( $\beta$ 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)
- RNase P, human gene used as internal control for the extraction and amplification processes - positions 1 and 4 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 25 minutes depending on the viral load of the sample being analyzed.

The reaction buffer used to perform RT-LAMP amplification contains a 6-FAM fluorescent dye. If the virus is present in the sample, SARS-CoV-2 cDNA is amplified and 6-FAM fluorescent nucleic acid stains are incorporated into the generated nucleotide sequences. The BEC Reader device measures the fluorescent signal emitted on the FAM channel by the sample every ten seconds for 25 minutes. An algorithm analyses the slope and the amplitude of fluorescent signal to determine if there is a significant amplification.

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 nasal and nasopharyngeal samples collected with a swab.

For nasopharyngeal sample, the following protocol is recommended:

- Tilt person's head back 70 degrees.
- Gently and slowly, insert the swab through the nostril parallel to the palate (not upwards) until resistance is encountered.
- Gently rub and roll the swab.
- Leave swab in place for several seconds to absorb secretions.
- Slowly remove swab while rotating it.
- Repeat the protocol in the second nostril with the same swab

For nasal sample, the following protocol is recommended:

- Insert the swab into the nostril (1-2 cm)
- Gently rotate 5 times against the walls of the nostril.
- Repeat the protocol in the other nostril with the same swab

**The sample must be stored and/or transported in a dry form at +4°C and analyzed within 24 hours after the sampling**

CAUTION! The test shows a significant decrease in sensitivity when used with samples previously placed in a liquid medium between collection and testing.

## ▷ 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.**



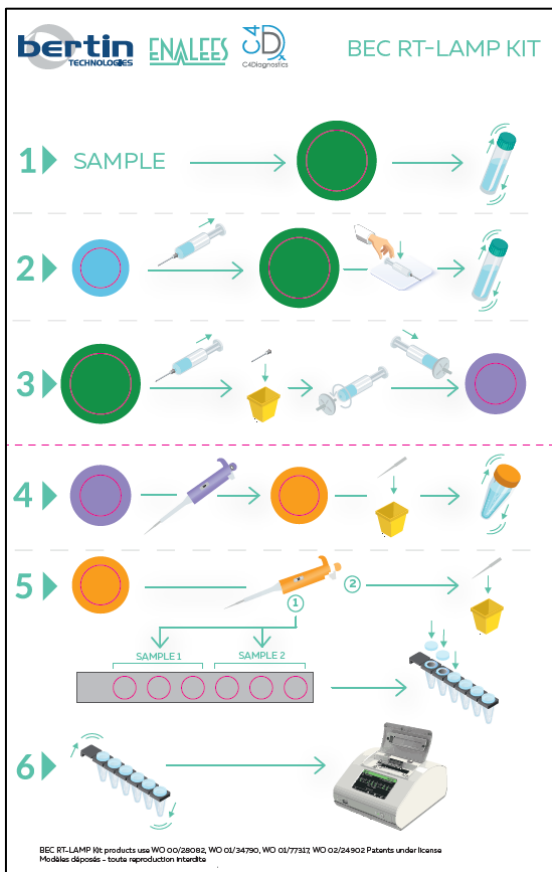



Figure 2: Rack that is provided for easy handling of the tubes.

### ▶ **BEC Reader device preparation**

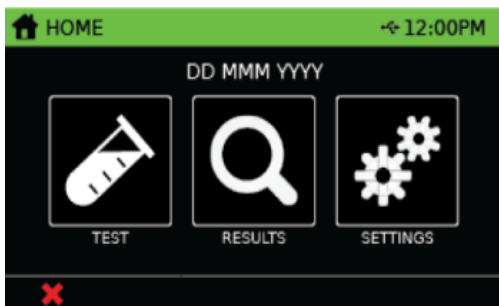
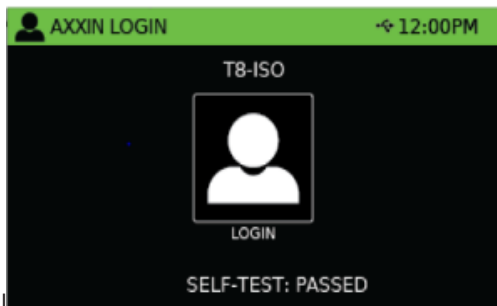
- Switch on the BEC Reader device by pushing  button in front of the device during 3 seconds. The screen turns on and the reader performs a self-test. The cover opens.



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

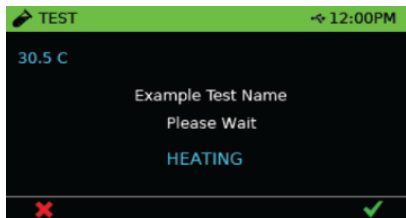


- Press on the screen and then press on TEST symbol

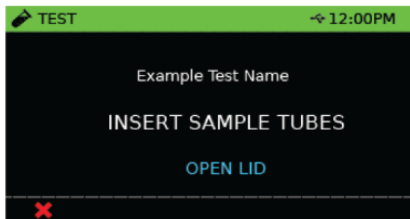




- From this stage, the reader goes into preheating until reaching the set temperature of 65 °C.



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



## ▶ **Test execution**

**CAUTION:** perform the steps 1 through 5 with the 1<sup>st</sup> sample, and then repeat these steps with the 2<sup>nd</sup> 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.
- c) Squeeze the swab against the inner side of the tube and discard the swab.
- d) 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  $\mu\text{L}$  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) For sample #1

- Open the orange tube in position 5.
- Open the microtubes of the strip and discard the strip of caps.
- Use the orange pipette fitted with a filter-tip to aspirate a 25  $\mu$ L volume from the orange tube and dispense this volume in tubes # 1, 2 and 3 (see Figure 1).

### **Use a new filter tip for each microtube**

- Close the orange tube.
- Discard the green, blue, violet and orange tubes

**CAUTION: Repeat steps 1 through 5 with the second sample**

b) For sample #2

- Open the orange tube in position 5.
- Use the orange pipette fitted with a filter-tip to aspirate a 25  $\mu$ L volume from the orange tube and dispense this volume in tubes # 4, 5 and 6 (see Figure 1).

### **Use a new filter tip for each microtube**

- Close the orange tube.
- Use the additional strip of caps to close the microtubes of the strip.
- Discard the green, blue, violet and orange tubes.

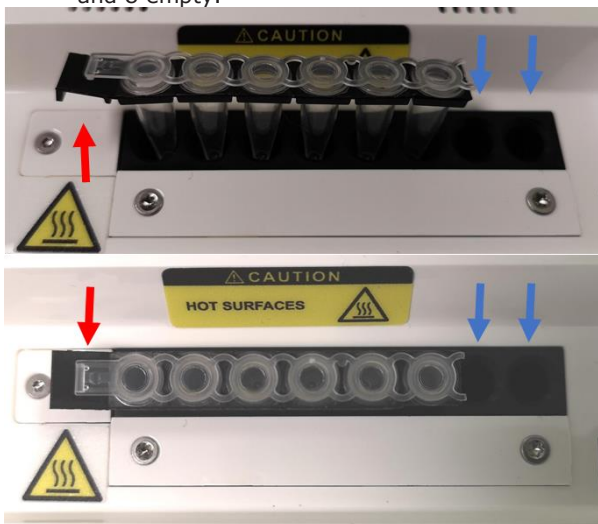
c) When the strip of microtubes is filled and closed, proceed immediately to step 6.



## 6) Step 6: Incubation

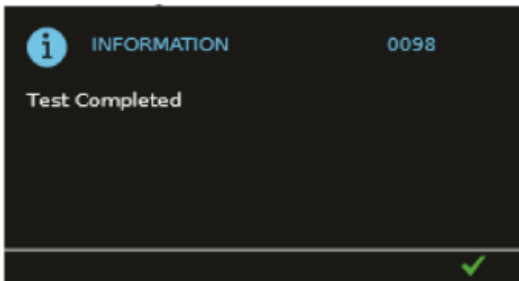
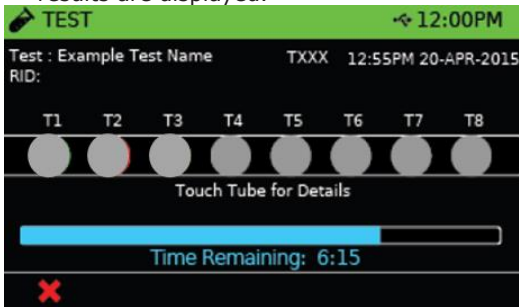
**CAUTION:** Make sure the BEC reader has reached the temperature set point (65°C).

- 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.
- 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:

Internal 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 <b>Sample is SARS-CoV-2 positive</b>
			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 <b>Sample is presumptive positive for SARS-CoV-2</b> <b>Repeat the test with a new sample.*</b>
			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) <b>Sample is SARS-CoV-2 positive</b>


Internal 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 <b>Sample is SARS-CoV-2 negative</b>
			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 RNase P human gene <b>Sample is SARS-CoV-2 positive</b>
			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 RNase P human gene <b>Sample is presumptive positive for SARS-CoV-2</b> <b>Repeat the test with a new sample.*</b>
			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 RNase P human gene <b>Sample is SARS-CoV-2 positive</b>
			RT-LAMP inhibition or reagent failure. <b>Repeat the test with a new sample.**</b>

\*: If the results of the initial test and repeat test are identical, use an alternative method for SARS-CoV-2 molecular detection such as RT-qPCR with a new sample.

\*\* : If the results of the initial test and repeat test are identical, please contact technical support.

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.

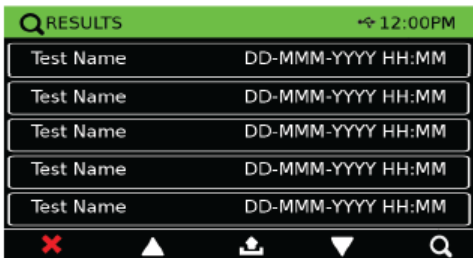
- Connect the provided USB stick in the plug-in front of the device



- 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.**

## ► Limitations

- Performance was evaluated with nasal and nasopharyngeal swab samples only, following the procedures described below. Failure to follow these procedures may result in assay failure or cause erroneous results.
- The test is a qualitative test and does not provide the quantitative value of detected organism present.
- This test cannot rule out diseases caused by other bacterial or viral pathogens.
- Interpretation of results should account for the possibility of false negative and false positive results (see table below).

Table: Potential causes of false negative and false positive results

<b>False negative results</b>	<b>False positive results</b>
Improper collection, handling and/or storage of samples	Improper handling of samples
Samples with a viral load below the limit of detection	Contamination of workspaces
Improper sample preparation before analysis	Opening of reaction tubes post-amplification
Virus mutations in the regions targeted by the test	Deviation from handbook protocol
The presence of RT-LAMP inhibitors or interfering substances	
Deviation from handbook protocol	

## ► **Quality Control**

In accordance with Bertin Technologies Quality Management System (ISO 9001:2015 and ISO 13485:2016), critical components of the kit are tested against predetermined specifications to ensure consistent product quality. Quality control testing is performed using standard templates with results compared to previous lots.



## ► **Performance characteristics**

### ▷ **With nasal swabs**

Clinical performance characteristics of BEC SARS-CoV-2 RT-LAMP kit for human samples was evaluated on nasal swab in a prospective study in Guadeloupe. Symptomatic and asymptomatic persons were included for this study.

For each person, one nasal swab and one nasopharyngeal swab were performed. The nasal swab was tested with the BEC SARS-CoV-2 RT-LAMP kit for human samples according to product instructions and the nasopharyngeal swab was eluted in viral transport media (VTM) and tested using the TaqPath™ COVID-19 CE-IVD RT-PCR kit from ThermoFisher Scientific (3 targeted viral regions of SARS-CoV-2: N, ORF1b and S).

The sensitivity and specificity of detection were determined using a panel of 71 individual nasal swabs by comparison with RT-qPCR results obtained on nasopharyngeal swabs. Of the 71 persons, 23 persons presented a negative RT-qPCR test and 48 persons presented a positive RT-qPCR test.

	<b>BEC SARS-CoV-2 RT-LAMP kit</b>
% Detection of samples with $C_T \leq 20^*$ (10 qRT-PCR positive samples)	100%
% Detection of samples with $C_T \leq 25^*$ (21 qRT-PCR positive samples)	91,9%
% Detection of samples with $C_T \leq 30^*$ (34 qRT-PCR positive samples)	77,9%
% Detection of samples with $C_T \leq 33^*$ (43 qRT-PCR positive samples)	64,3%
% Detection of samples with $C_T \leq 40^*$ (48 qRT-PCR positive samples)	58,3%
<b>Overall Detection Sensitivity (Se)</b> (Concordance with RT-qPCR to detect positives)	100% (samples with $C_T \leq 20$ ) 91,9% (samples with $C_T \leq 25$ ) 77,9% (samples with $C_T \leq 30$ ) 64,3% (samples with $C_T \leq 33$ ) 58,3% (samples with $C_T \leq 40$ )
<b>Overall Detection Specificity (Sp)</b> (Concordance with RT-qPCR to detect negatives)	100 %

\* $C_T$  values correspond to equivalent  $C_T$  values obtained with IP2 and IP4 RT-qPCR reference method.

### ▷ **With nasopharyngeal swabs**

Clinical performance characteristics of BEC SARS-CoV-2 RT-LAMP kit for human samples was evaluated on nasopharyngeal swab in a prospective study in the Parisian hospital La Pitié Salpêtrière. The study was carried out on persons hospitalized in the infectious disease department due to the covid-19. All persons enrolled in the study tested positive for covid-19 (RT-qPCR) upon admission.

For each person, two nasopharyngeal swabs were performed. One swab was tested with the BEC SARS-CoV-2 RT-LAMP kit for human samples according to product instructions and the other one was eluted in viral transport media (VTM) and tested using the TaqPath™ COVID-19 CE-IVD RT-PCR kit from ThermoFisher Scientific (3 targeted viral regions of SARS-CoV-2: N, ORF1b and S). All samples were analyzed within 3 hours after the sampling.

The sensitivity and specificity of detection were determined using a panel of 58 swabs by comparison with RT-qPCR results. Of the 58 persons, 22 persons presented a negative RT-qPCR test and 36 persons presented a positive RT-qPCR test.

	<b>BEC SARS-CoV-2 RT-LAMP kit</b>
% Detection of samples with $C_T \leq 20^*$ (0 qRT-PCR positive sample)	NA
% Detection of samples with $C_T \leq 25^*$ (2 qRT-PCR positive samples)	100%
% Detection of samples with $C_T \leq 30^*$ (13 qRT-PCR positive samples)	81,6%
% Detection of samples with $C_T \leq 33^*$ (26 qRT-PCR positive samples)	62,6%
% Detection of samples with $C_T \leq 40^*$ (36 qRT-PCR positive samples)	52,4%
<b>Overall Detection Sensitivity (Se)</b> (Concordance with RT-qPCR to detect positives)	100% (samples with $C_T \leq 25$ ) 81,6% (samples with $C_T \leq 30$ ) 62,6% (samples with $C_T \leq 33$ ) 52,4% (samples with $C_T \leq 40$ )
<b>Overall Detection Specificity (Sp)</b> (Concordance with RT-qPCR to detect negatives)	95 % (1 false positive)

\* $C_T$  values correspond to equivalent  $C_T$  values obtained with IP2 and IP4 RT-qPCR reference method.

## ▷ Analytical performance

Analytical performance of the BEC SARS-CoV-2 RT-LAMP kit has been evaluated by the Laboratory for Urgent Response to Biological Threats from the Environment and Infectious Risks Research and Expertise Unit of Pasteur Institute.

### ■ Analytical sensitivity

To determine the analytical sensitivity of the BEC RT-LAMP reaction, serial 10-fold dilutions of genomic SARS-CoV-2 were tested in parallel with the reference real-time RT-PCR developed by the National Reference Centre (NRC) for Respiratory Viruses in France (WHO Coronavirus disease COVID-19 technical guidance: Laboratory testing for 2019-nCoV in humans, available from [https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/whoinhouseassays.pdf?sfvrsn=de3a76aa\\_2](https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/whoinhouseassays.pdf?sfvrsn=de3a76aa_2)) and the BEC RT-LAMP reaction.

Each dilution of template RNA was tested 8 times.

**Table:** Analytical sensitivity (limit-of-detection) of the BEC RT-LAMP reaction as compared to the gold-standard RT-PCR assay

Assay	Target gene	Primer set ID	Quantified genomic SARS-CoV-2 RNA					
			10 genome copies			100 genome copies		
			Mean Cp	SD Cp	Detected replicates (out of 8)	Mean Cp	SD Cp	Detected replicates (out of 8)
<b>Real-time RT-PCR</b>								
<i>RdRp</i>		IP2 (FAM)	37.02	0.56	8	34.65	0.48	8
		IP4 (HEX)	38.18	0.86	7	35.05	0.36	8
<b>Real-time RT-LAMP</b>								
<i>N</i>		E	11.48	2.66	8	7.95	0.38	8
		<i>RdRp</i>	11.21	2.47	7	7.59	0.71	8

The BEC RT-LAMP reaction demonstrated a limit of detection of 10 genome copies per reaction.

Clinical sensitivity of the BEC RT-LAMP reaction was then evaluated on 62 extracts of respiratory samples from SARS-CoV-2 positive persons.

		RT-qPCR reference method results	
		POS	NEG
BEC RT-LAMP reaction results	POS	59	0
	NEG	3	53
Total		62	53

Clinical sensitivity of the BEC RT-LAMP reaction is 95%.

### - Analytical specificity

The BEC SARS-CoV-2 RT-LAMP kit allows the amplification of 2 targeted sequences in the following genes:

- RdRP Gene: target specific to betacoronavirus ( $\beta$ CoV) human pathogens belonging to B and C groups (SARS-CoV-2, SARS-CoV and MERS-CoV)
- N Gene: target specific to SARS-CoV-2

Analytical specificity of the BEC SARS-CoV-2 RT-LAMP kit was validated by *in silico* analysis of the primers in comparison with all SARS-CoV-2 and  $\beta$ CoV B and C groups sequences available in the worldwide databases (April 2020).

A complementary *in silico* analysis of the primers was performed in January 2021 to evaluate primers capability to detect both English and South African variant strains of SARS-CoV-2. The results of this analysis predicted that BEC SARS-CoV-2 RT-LAMP kit is able to amplify both variant strains. Comparative sequences analysis identified only one mismatch located on the first nucleotide of 5' end of one in six primers (F3) for RdRP detection. Due to its location on 5' end, this mismatch is not predicted to alter performance amplification.

Analytical specificity was evaluated experimentally using a panel of extracts of RNA from human pathogens viruses:

- Coronavirus OC43 (1 extracted strain)
- Coronavirus 229E (1 extracted strain)
- Influenza A/H1N1 (1 extracted strain)
- Influenza A/H3N2 (1 extracted strain)
- Influenza B (1 extracted strain)

No cross reactivity of the BEC SARS-CoV-2 RT-LAMP kit with the selected microorganisms was observed.

Analytical specificity was also evaluated with 45 extracts of respiratory samples from SARS-CoV-2 negative persons.

No false positive was observed.

## ► 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](mailto: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 human samples est un test de détection rapide du SARS-CoV-2 alliant une technologie d'extraction rapide d'ARN à partir de prélèvements nasaux ou nasopharyngés et un test moléculaire RT-LAMP ciblant 2 gènes du SARS-CoV-2. Ce test est pour une utilisation en recherche uniquement.

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

## ► Composants du kit

Nombre de tests dans un kit : 10.

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

Température d'expédition du kit: température ambiante (RT) ou + 4 ° C.

Le kit est stable à température ambiante pendant 2 semaines.

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 human samples	P04301	-	1 barrette de 6 micro-tubes +2 barrettes de bouchons	-
BEC SARS-CoV-2 Lysing Buffer (green)	P13300	Vert	2	1,050 mL
BEC SARS-CoV-2 Neutralization Buffer (blue)	P20300	Bleu	2	1 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)
  - o 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 nasaux ou nasopharyngés  
Exemples d'écouvillon :
  - iClean® Specimen Collection Flocked Swab
  - Dry Swabs 155C, COPAN Diagnostics
  - Dry Swabs 159C, COPAN Diagnostics.
- Equipement de protection individuelle de l'opérateur en accord avec la réglementation locale applicable.

## ► 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).
- La seringue munie de l'aiguille doit être manipulée avec précaution par l'opérateur. Pour éviter tout

risque de blessure, l'embout de protection de l'aiguille doit être remis sur celle-ci entre chaque étape de prélèvement et l'aiguille munie de son embout de protection doit être éliminée à la fin de la manipulation conformément aux règles de sécurité locales.

- 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.
- L'étalonnage des pipettes doit régulièrement être vérifié par l'opérateur
- 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 human samples est un kit qui permet la détection du virus SARS-CoV-2 à partir de prélèvements nasaux ou nasopharyngés, pour son utilisation en recherche uniquement (RUO).

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 détection 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 human 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 interne endogène permettant de s'assurer du bon déroulement de l'extraction et 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 human samples permet de tester 2 échantillons en parallèle.

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

- Pour les 2 échantillons de manière séquentielle :
  - L'extraction rapide de l'ARN viral avec une lyse chimique.
  - Une neutralisation des inhibiteurs d'amplification présents dans le lysat par précipitation avec des agents chaotropiques.
  - La filtration du lysat pour éliminer les

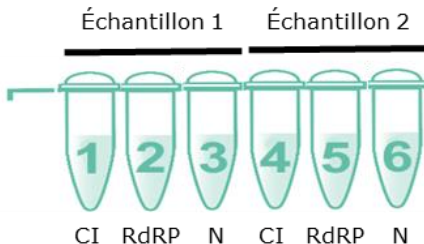
agrégats de débris cellulaires et de réactifs précipités lors de la neutralisation.

- 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.

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

- Gène RdRP : cible spécifique des betacoronavirus ( $\beta$ 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)
- RNase P, gène humain servant de contrôle interne des processus d'extraction et d'amplification - positions 1 et 4 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 25 min en fonction de la charge virale de l'échantillon analysé.



*Figure 5: Une barrette de 6 micro-tubes permettant l'amplification de 3 séquences des gènes RdRP, N et Rnase P (CI: contrôle interne) pour 2 échantillons.*

Le tampon de réaction utilisé pour réaliser l'amplification RT-LAMP contient le fluorochrome 6-FAM. Si le virus est présent dans l'échantillon, l'ADNc du SARS-CoV-2 est amplifié et le fluorochrome 6-FAM est incorporé dans les séquences nucléotidiques synthétisées. L'incubateur-lecteur BEC mesure le signal fluorescent émis sur le canal FAM par l'échantillon toutes les dix secondes pendant 25 minutes. Un algorithme analyse la pente et l'amplitude du signal fluorescent pour déterminer s'il y a une amplification significative.

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 avec les prélèvements nasaux et naso-pharyngés réalisés avec écouvillon.

Pour le prélèvement naso-pharyngé, le protocole recommandé est le suivant :

- Pencher la tête de l'individu à 70 degrés vers l'arrière
- Insérer doucement l'écouvillon dans la narine parallèlement au palais jusqu'à sentir une résistance
- Effectuer plusieurs rotations avec l'écouvillon à l'intérieur de la cavité
- Laisser l'écouvillon en place pendant quelques secondes afin d'absorber les sécrétions
- Retirer doucement l'écouvillon tout en continuant les rotations
- Répéter le protocole dans la seconde narine avec le même écouvillon

Pour le prélèvement nasal, le protocole recommandé est le suivant :

- Insérer l'écouvillon dans la narine (1 à 2 cm)
- Effectuer 5 rotations à l'intérieur de la narine en frottant contre la paroi
- Répéter le protocole dans la seconde narine avec le même écouvillon

**L'écouvillon doit être stocké et/ou transporté à sec et à 4°C et analysé dans les 24 heures suivant le prélèvement.**

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.**

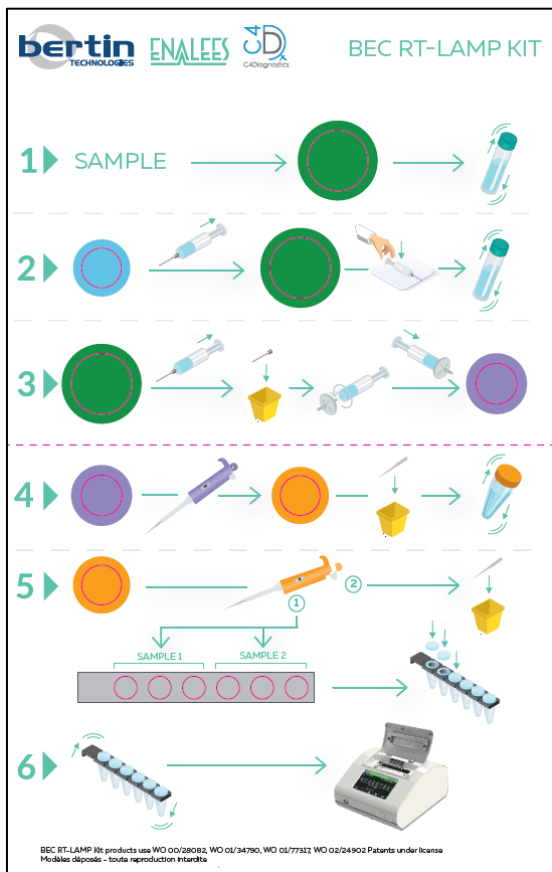



Figure 6: portoir fourni pour la manipulation des tubes.

## ▶ 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.

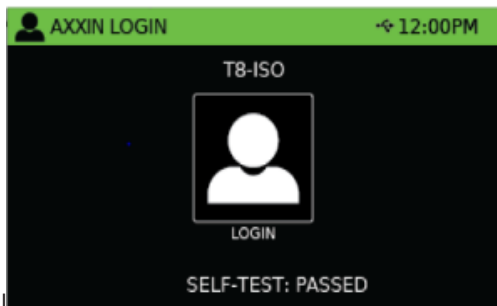


*Figure 7: Incubateur-lecteur "BEC Reader" avec localisation de la touche marche/arrêt.*

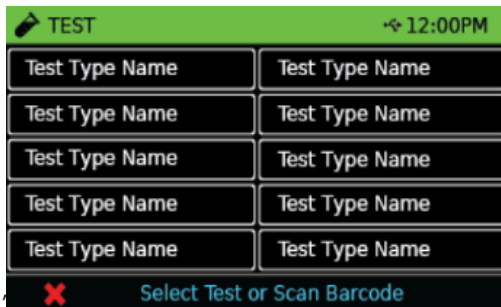




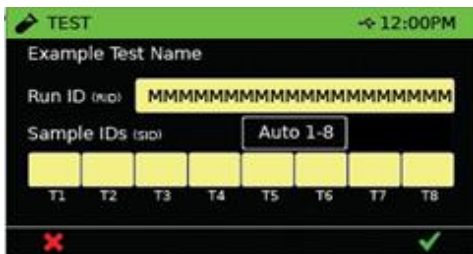
- Appuyer sur l'écran puis sélectionner le menu 'TEST'.



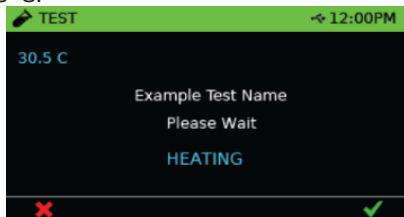
- Sélectionner le test 'BEC\_Human Test Vx.x'



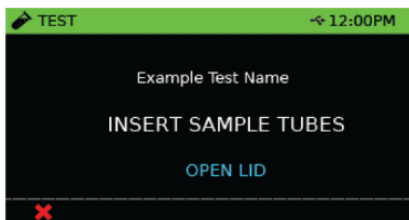
- Compléter le RunID : l'identifiant du fichier de résultats du run.
- Appuyer sur Auto 1-8 pour attribuer automatiquement un nom aux tubes. Passer à l'écran suivant en appuyant sur ✓.



- 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<sup>er</sup> échantillon, puis répéter ces étapes avec le 2<sup>e</sup> 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.
- c) Égoutter l'écouvillon contre la paroi du tube avant de le jeter.
- d) 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) Echantillon n°1 :

- Ouvrir le tube orange en position 5.
- Ouvrir les micro-tubes de la barrette et jeter la barrette de bouchons.
- Prélever un volume de 25  $\mu$ L du tube orange avec la pipette de précision orange équipée d'un cône à filtre et déposer ce volume dans les micro-tubes 1, 2 et 3 (cf. Figure 5).

**Utiliser un nouveau cône à filtre pour chaque puits.**

- Refermer le tube orange.
- Jeter les tubes vert, bleu, violet et orange.

ATTENTION : Répéter les étapes 1 à 5 avec le deuxième échantillon.

### b) Echantillon n°2 :

- Ouvrir le tube orange en position 5.
- Prélever un volume de 25  $\mu$ L du tube orange avec la pipette de précision orange équipée d'un cône à filtre et déposer ce volume dans les micro-tubes 4, 5 et 6 (cf. Figure 5).

**Utiliser un nouveau cône à filtre pour chaque puits.**

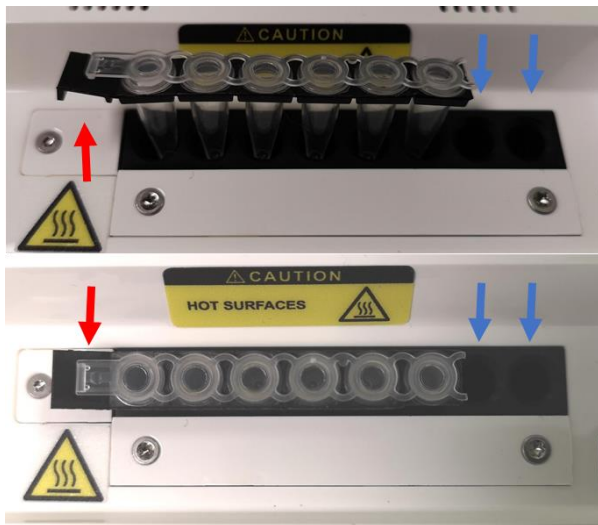
- Refermer le tube orange.
- Refermer les micro-tubes de la barrette avec la barrette de bouchons additionnelle.
- Jeter les tubes vert, bleu, violet et orange.

### c) Lorsque la barrette de micro-tubes est remplie et fermée, procéder immédiatement à l'étape 6.

## 6) Etape 6 : Incubation

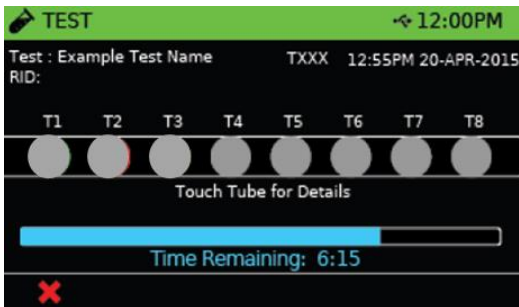
ATTENTION : Vérifier que l'incubateur-lecteur a atteint la température de consigne (65°C).

- 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.

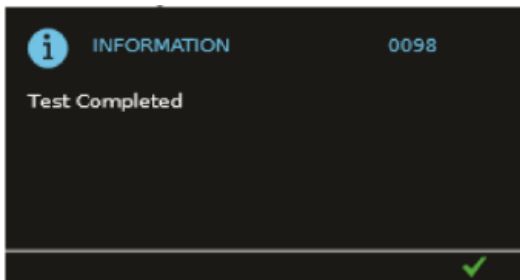


*Figure 8: Insertion de la barrette de micro-tubes dans l'incubateur-lecteur. Les flèches rouges indiquent la position du détrompeur noir à l'extrémité gauche du support de micro-tubes. Les flèches bleues indiquent les positions 7 et 8 laissées vides.*

- 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 puits 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 <b>Echantillon positif pour le SARS-CoV-2</b>
			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 <b>Echantillon présumé positif pour le SARS-CoV-2</b> <b>Répétez le test à partir d'un nouvel échantillon.*</b>
			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) <b>Echantillon positif pour le SARS-CoV-2</b>

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 <b>Echantillon négatif pour le SARS-CoV-2</b>
			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 humain RNase P <b>Echantillon positif pour le SARS-CoV-2</b>
			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 humain RNase P <b>Echantillon présumé positif pour le SARS-CoV-2</b> <b>Répétez le test à partir d'un nouvel échantillon.*</b>
			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 humain RNase P <b>Echantillon positif pour le SARS-CoV-2</b>

Contrôle interne	Gène RdRP	Gène N	Interprétation des résultats
			Inhibition de la RT-LAMP ou défaillance des réactifs. <b>Répétez le test à partir d'un nouvel échantillon.**</b>

\* : si le résultat du deuxième test est identique au premier test, veuillez refaire le test à partir d'un nouvel échantillon en utilisant une méthode de détection du SARS-CoV-2 différente, comme par exemple la RT-qPCR.


\*\* : si le résultat du deuxième test est identique au premier test, veuillez contacter le support technique.

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.**

## ► Limites

- L'évaluation des performances du kit a été réalisée à partir de prélèvements nasaux et nasopharyngés uniquement selon les instructions détaillées ci-dessus. Le non-respect de ces instructions ou l'utilisation d'autres types d'échantillons peut être à l'origine d'une baisse ou d'une perte de performances ou de l'obtention de résultats inexploitable.
- Ce test permet de réaliser une détection qualitative uniquement. Le test ne permet pas de quantifier le nombre de particules virales contenues dans un échantillon.
- Ce test ne permet pas d'exclure des maladies causées par d'autres agents pathogènes bactériens ou viraux.
- L'interprétation des résultats doit être réalisée en prenant en compte les causes potentielles d'obtention d'un résultat faux-négatif ou faux-positif (voir tableau ci-dessous)

Tableau: Causes potentielles d'obtention d'un faux-négatif ou faux-positif

<b>Résultat faux-négatif</b>	<b>Résultat faux-positif</b>
Echantillon prélevé, transporté ou stocké dans de mauvaises conditions	Erreur dans la manipulation des échantillons prélevés
Concentration en virus inférieure à la limite de détection du test	Contamination de l'espace de travail

Erreur de manipulation lors de la préparation de l'échantillon (phase d'extraction)	Ouverture des tubes de réaction après l'amplification.
Mutations virales dans les régions ciblées par le test	Non respect des instructions du manuel utilisateur
Présence d'inhibiteurs de RT-LAMP ou de substances interférentes dans l'échantillon	
Non respect des instructions du manuel utilisateur	

## ► **Contrôle qualité**

Conformément au système de Management de la Qualité en vigueur chez Bertin Technologies (ISO 9001:2015 and ISO 13485:2016), l'ensemble des composants critiques du kit sont testés selon des spécifications établies afin de garantir une qualité de produit constante. Chaque lot de kit subit différents tests de Contrôle Qualité et les résultats de ces tests sont comparés aux résultats obtenus avec les précédents lots.

## ► **Performances**

### ▷ **Sur prélèvements nasaux**

Les performances cliniques du kit BEC SARS-CoV-2 RT-LAMP for human samples ont été évaluées sur des prélèvements nasaux dans le cadre d'une étude prospective réalisée en Guadeloupe. Cette étude incluait des individus



symptomatiques et asymptomatiques.

Pour chaque individu, un prélèvement nasal et un prélèvement nasopharyngé ont été réalisés. L'écouvillon nasal était analysé avec le kit BEC SARS-CoV-2 RT-LAMP for human samples selon les instructions détaillées ci-dessus et l'écouvillon nasopharyngé était élué en milieu de transport puis analysé en RT-qPCR avec le kit TaqPath™ COVID-19 CE-IVD RT-PCR de ThermoFisher Scientific (amplification de 3 régions cibles du SARS-CoV-2 : N, ORF1b and S).

La sensibilité et la spécificité de détection ont été déterminées à partir de 71 prélèvements. Les résultats d'analyse des prélèvements nasaux avec le kit BEC SARS-CoV-2 RT-LAMP for human samples ont été comparés aux résultats d'analyse par RT-qPCR des prélèvements nasopharyngés correspondants. Sur les 71 individus prélevés, 23 individus présentaient un test RT-qPCR négatif et 48 individus présentaient un test RT-qPCR positif.

	<b>Kit BEC SARS-CoV-2 RT-LAMP for human samples</b>
% Détection des échantillons avec un $C_T \leq 20^*$ (10 échantillons positifs en qRT-PCR)	100%
% Détection des échantillons avec un $C_T \leq 25^*$ (21 échantillons positifs en qRT-PCR)	91,9%
% Détection des échantillons avec un $C_T \leq 30^*$ (34 échantillons positifs en qRT-PCR)	77,9%
% Détection des échantillons avec un $C_T \leq 33^*$ (43 échantillons positifs en qRT-PCR)	64,3%
% Détection des échantillons avec un $C_T \leq 40^*$ (48 échantillons positifs en qRT-PCR)	58,3%
<b>Sensibilité de Détection (Se)</b> (Concordance avec les échantillons positifs en RT-qPCR)	100% (échantillons avec $C_T \leq 20$ ) 91,9% (échantillons avec $C_T \leq 25$ ) 77,9% (échantillons avec $C_T \leq 30$ ) 64,3% (échantillons avec $C_T \leq 33$ ) 58,3% (échantillons avec $C_T \leq 40$ )
<b>Spécificité de Détection (Sp)</b> (Concordance avec les échantillons négatifs en RT-qPCR)	100 %

\*Les valeurs de  $C_T$  correspondent à des équivalents de  $C_T$  obtenus avec la méthode de RT-qPCR IP2 and IP4 de référence.

## ▷ **Sur prélèvements nasopharyngés**

Les performances cliniques du kit BEC SARS-CoV-2 RT-LAMP for human samples ont été évaluées sur des prélèvements nasopharyngés dans le cadre d'une étude prospective réalisée à l'Hôpital parisien La Pitié Salpêtrière.

Les individus inclus dans cette étude ont été recrutés lors de leur hospitalisation dans le Service des maladies infectieuses et tropicales de l'Hôpital. Tous les individus recrutés pour l'étude ont été testés positifs au SARS-CoV-2 par RT-qPCR lors de leur admission à l'hôpital (préalablement à la réalisation de l'étude).

Pour chaque individu, deux prélèvements nasopharyngés ont été réalisés. Un écouvillon a été analysé avec le kit BEC SARS-CoV-2 RT-LAMP for human samples selon les instructions détaillées ci-dessus et le second écouvillon a été élué en milieu de transport puis analysé en RT-qPCR avec le kit TaqPath™ COVID-19 CE-IVD RT-PCR de ThermoFisher Scientific (amplification de 3 régions cibles du SARS-CoV-2 : N, ORF1b and S). L'ensemble des échantillons ont été analysés dans les 3 heures suivant le prélèvement.

La sensibilité et la spécificité de détection ont été déterminées à partir de 56 prélèvements. Les résultats d'analyse avec le kit BEC SARS-CoV-2 RT-LAMP for human samples ont été comparés aux résultats d'analyse par RT-qPCR des prélèvements correspondants. Sur les 56 individus prélevés, 22 individus présentaient un test RT-qPCR négatif et 36 individus présentaient un test RT-qPCR positif.

	<b>Kit BEC SARS-CoV-2 RT-LAMP for human samples</b>
% Détection des échantillons avec un $C_T \leq 20^*$ (0 échantillon positif en qRT-PCR)	NA
% Détection des échantillons avec un $C_T \leq 25^*$ (2 échantillons positifs en qRT-PCR)	100%
% Détection des échantillons avec un $C_T \leq 30^*$ (13 échantillons positifs en qRT-PCR)	81,6%
% Détection des échantillons avec un $C_T \leq 33^*$ (26 échantillons positifs en qRT-PCR)	62,6%
% Détection des échantillons avec un $C_T \leq 40^*$ (36 échantillons positifs en qRT-PCR)	52,4%
<b>Sensibilité de Détection (Se)</b> (Concordance avec les échantillons positifs en RT-qPCR)	100% (échantillon avec $C_T \leq 25$ ) 81,6% (échantillon avec $C_T \leq 30$ ) 62,6% (échantillon avec $C_T \leq 33$ ) 52,4% (échantillon avec $C_T \leq 40$ )
<b>Spécificité de Détection (Sp)</b> (Concordance avec les échantillons négatifs en RT-qPCR)	95 % (1 échantillon faux-positif)

\*Les valeurs de  $C_T$  correspondent à des équivalents de  $C_T$  obtenus avec la méthode de RT-qPCR IP2 and IP4 de référence.

## ► Performances analytiques

Les essais d'évaluation des performances analytiques du kit BEC SARS-CoV-2 RT-LAMP ont été réalisés par le Pôle d'Identification Virale de la Cellule d'Intervention Biologique d'Urgence (CIBU) de l'Institut Pasteur.

### ■ Sensibilité analytique

La sensibilité analytique de la réaction de RT-LAMP du kit a été déterminée sur des dilutions en série d'ARN génomique de SARS-CoV-2. L'analyse a été réalisée en parallèle avec la méthode de RT-PCR de référence développée par le Centre National de Référence (CNR) des virus respiratoires en France (WHO Coronavirus disease COVID-19 technical guidance: Laboratory testing for 2019-nCoV in humans, available from

[https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/whoinhouseassays.pdf?sfvrsn=de3a76aa\\_2](https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/whoinhouseassays.pdf?sfvrsn=de3a76aa_2)) et avec la RT-LAMP du kit BEC.

Chaque dilution d'ARN a été testée 8 fois.

Tableau: Sensibilité analytique (LoD) de la réaction de RT-LAMP du kit comparée à la RT-PCR de référence

Assay	Target gene	Primer set ID	Quantified genomic SARS-CoV-2 RNA					
			10 genome copies			100 genome copies		
			Mean Cp	SD Cp	Detected replicates (out of 8)	Mean Cp	SD Cp	Detected replicates (out of 8)
<b>Real-time RT-PCR</b>								
<i>RdRp</i>		IP2 (FAM)	37.02	0.56	8	34.65	0.48	8
		IP4 (HEX)	38.18	0.86	7	35.05	0.36	8
<b>Real-time RT-LAMP</b>								
<i>N</i>		E	11.48	2.66	8	7.95	0.38	8
		<i>RdRp</i>	11.21	2.47	7	7.59	0.71	8

La sensibilité analytique de la réaction de RT-LAMP du kit est de 10 copies par réaction.

La sensibilité clinique de la réaction de RT-LAMP du kit a ensuite été évaluée sur 62 extraits d'échantillons respiratoires de cas suspects diagnostiqués positifs pour le SARS-CoV-2.

		RT-qPCR méthode de référence	
		POS	NEG
Résultats de la réaction BEC RT-LAMP	POS	59	0
	NEG	3	53
	Total	62	53

La sensibilité clinique de la réaction de RT-LAMP du kit est de 95%.

### - Spécificité analytique

Le kit BEC SARS-CoV-2 RT-LAMP for human samples permet l'amplification de 2 séquences cibles des genes suivants :

- RdRP Gene : cible spécifique de betacoronavirus (βCoV) pathogènes humains appartenant aux groupes B et C (SARS-CoV-2, SARS-CoV et MERS-CoV)
- N Gene : cible spécifique du SARS-CoV-2

La spécificité de reconnaissance des amorces de RT-LAMP du kit a été initialement validée *in silico* d'après l'analyse des séquences disponibles dans les bases de données internationales (avril 2020).

Une analyse *in silico* complémentaire a été réalisée en janvier 2021 afin d'évaluer la capacité des amorces de RT-LAMP à détecter les nouveaux variants anglais et sud-africain du SARS-CoV-2. Les résultats de cette analyse montrent que le kit BEC SARS-CoV-2 permet l'amplification des deux variants. L'analyse comparative des séquences a identifié une seule discordance située sur le premier nucléotide de l'extrémité 5' de l'amorce F3 du set codant pour le gène RdRP. Du fait de sa localisation à l'extrémité 5' de l'amorce, cette discordance n'a théoriquement aucun impact sur la capacité d'amplification du gène RdRP.

La spécificité analytique a été évaluée expérimentalement sur un panel d'extraits de virus à ARN pathogènes pour l'homme :

- Coronavirus OC43 (1 souche extraite)
- Coronavirus 229E (1 souche extraite)
- Influenza A/H1N1 (1 souche extraite)
- Influenza A/H3N2 (1 souche extraite)
- Influenza B (1 souche extraite)

Aucune détection croisée n'a été mise en évidence avec les virus listés ci-dessus.

La spécificité analytique a également été évaluée sur 45 extraits d'échantillons respiratoires de cas suspects diagnostiqués négatifs pour le SARS-CoV-2.

Aucun faux positif n'a été observé.

## ► 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](mailto: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.



## NOUS CONTACTER / CONTACT US



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



+33 (0)139 306 036



tech@bertin-bioreagent.com



**EU webstore: [Bertin-bioreagent.com](http://Bertin-bioreagent.com)**  
**US webstore: [Bertin-corp.com](http://Bertin-corp.com)**