

Guide de détection rapide du SARS-CoV-2 directement à partir des échantillons cliniques en utilisant la réaction colorimétrique RT-LAMP.

Language: French

Translator: Dr. Nicolas Santiquet



Résumé de la méthode : Ce protocole est destiné à la détection du SARS-CoV-2 directement à partir d'échantillons cliniques (prélèvement naso-pharyngé placé dans un milieu de culture viral de transport) en seulement 30 minutes. Le seul équipement nécessaire est un bloc thermique chauffant. Aucune isolation ou purification d'ARN n'est nécessaire. La méthode consiste en une transcription inverse (reverse transcription), une amplification isotherme médiée par boucle (loop-mediated isothermal amplification (LAMP)) utilisant 6 amorces (primers) conçues sur mesure (3 jeux d'amorces) afin d'amplifier l'ARN viral. Le résultat est direct et visuel grâce à un indicateur colorimétrique.

Pour réaliser ce test il faut un mélange des 6 amorces, du tampon de lyse, des réactifs d'amplification et la solution de colorimétrie. Le mélange d'amorces est placé dans un tube à centrifugation. L'échantillon clinique est ensuite placé dans le tube contenant le mélange d'amorces, le tout est mélangé et ensuite la moitié de la solution est mise dans un autre tube. Les deux tubes sont ensuite placés dans le bloque thermique chauffant à 63.0°C pendant 30 minutes. Par la suite, les tubes sont retirés du bloque et placés sur la glace pendant 1 min. Le résultat se voit immédiatement à l'œil nu. Une couleur rouge indique un résultat négatif (absence du virus) et une couleur jaune indique un résultat positif (présence du virus).

Ci-dessous vous pouvez trouver un guide détaillé, étape par étape du protocole. Ce guide se divise en 3 parties. La première partie est une liste des solutions et du matériel nécessaires. La seconde partie est une liste d'instruction pour préparer les réactifs. La troisième partie est le protocole en lui-même pour réaliser le test.

Réactifs et matériel :

1. LAMP primers (FIP, BIP, LF, LB, F3, B3)
1. Nuclease-free water (eau sans Nuclease) (Ambion, AM9937).
2. 100mM dUTP,
3. 0.5µL UDG, and
4. 5mM SYTO 9 (Invitrogen, S34854)
5. 1250µL WarmStart® Colorimetric LAMP 2X Master Mix (DNA & RNA) (NEB, M1800L).
6. TE buffer pH 8.0
7. Tween-20

8. 1% Thermolabile Proteinase K (NEB, P8111S),
9. 2% ezDNase (Invitrogen, 11766051),
10. 0.3ng/ μ L human genomic DNA (ADN génomique humain)
11. 1.5mL LoBind microcentrifuge tube (Eppendorf, 022431021)
12. Glace et un contenant pour mettre la glace.
13. Pipette de transfert sterile (Fisherbrand, 13-711-20)
14. 63.0°C Bloque thermique chauffant (Fisherbrand, 14-955-219)

Préparation :

1. Un mélange d'amorces 25 fois concentré de LAMP est préparé (CUFC-FIP, CUFC-BIP, CUFC-LF, CUFC-LB, CUFC-F3, CUFC-B3) en mélangeant 40 μ M de CUFC-FIP et de CUFC-BIP, 10 μ M de CUFC-LF et de CUFC-LB, et 5 μ M de CUFC-F3 et de CUFC-B3 dans de l'eau sans nucléases (Ambion, AM9937).
2. Une solution colorimétrique RT-LAMP concentrée 2 fois est préparée en ajoutant 3.5 μ L de 100mM dUTP, 0.5 μ L d'UDG, et 0.25 μ L de 5mM SYTO 9 (Invitrogen, S34854) dans 1250 μ L de WarmStart® Colorimetric LAMP 2X Master Mix (DNA & RNA) (NEB, M1800L).
3. Le mélange de réaction est préparé en mélangeant 125 μ L de solution colorimétrique RT-LAMP concentrée 2 fois, 10 μ L du mélange d'amorces de LAMP, 95 μ L d'eau sans nucléases pour une réaction de 250 μ L. Volume de réaction à adapter en fonction du nombre d'échantillons à tester.
4. Le tampon de lyse concentré 0.1 fois à pH 8.0 avec 0.1% de Tween-20, 1% de protéinase K thermolabile (NEB, P8111S), 2% d'ezDNase (Invitrogen, 11766051), 0.3ng/ μ L d'ADN génomique humain provenant d'un sujet male sain. Pour une réaction, mélanger 460 μ L du mélange de réaction avec 20 μ L du tampon de lyse dans un tube d'1.5ml (LoBind microcentrifuge tube (Eppendorf, 022431021)) et maintenir sur la glace jusqu'à l'utilisation finale.

Réaliser le test :

1. Ajouter 20 μ L de l'échantillon clinique dans un tube 1.5mL (LoBind microcentrifuge tube (Eppendorf, 022431021)) contenant le mélange de réaction (460 μ L) et le tampon de lyse (20 μ L)

1b: Méthode Alternative: Ajouter 10 μ L de l'échantillon Clinique directement dans un tube 1.5mL (LoBind microcentrifuge tube (Eppendorf, 022431021)) contenant le mélange de réaction (230 μ L) et le tampon de lyse (10 μ L). Répéter avec un 2eme tube. Passer directement à l'étape 4

2. Mélanger en utilisant une pipette de transfert stérile (Fisherbrand, 13-711-20)
3. Aliquoter 250µL des 500µL dans un nouveau tube 1.5mL (LoBind microcentrifuge tube (Eppendorf, 022431021))
4. Mettre les 2 tubes avec 250µL dans chaque tube dans le bloque thermique chauffant a 63.0°C (Fisherbrand, 14-955-219)
5. Incuber les tubes pendant 30min a 63.0°C.
6. Après les 30 min d'incubation, mettre les tubes sur la glace pendant 1min pour arrêter la réaction.
7. Lire le résultat colorimétrique
 - ❖ Rouge=Négatif
 - ❖ Jaune=Positif

Table 1. Séquence des amorces LAMP pour la détection du SARS-Cov-2

Amorce	Séquence
Nom	
CUFC1-F3	TGGATACAACCTAGCTACAGAGAAG
CUFC1-B3	AGCCAAAGACCGTTAAGTGTA
CUFC1-FIP	GTGGTGGTTGGTAAAGAACATCAGACTTGTTGTCATCTCGCAAAGG
CUFC1-BIP	CCTCTATCACCTCAGCTGTTTTGCTGTACCATACAACCCTCAACTT
CUFC1-LF	ACCTGAGTTACTGAAGTCATTGAGA
CUFC1-LB	TGGTTTTAGAAAAATGGCATTCCC