

Робота з наборами  
реагентів Seegene  
Allplex SARS-CoV-2 \  
FluA \ FluB \ RSV &  
RV Master Assay

---

- Лора Чернишова,
- Офіцер з лабораторій,
- Бюро ВОЗ в Україні
- [chernyshoval@who.int](mailto:chernyshoval@who.int)



**World Health  
Organization**

---

**Ukraine**

Мішень	Набір реагентів	Allplex™ RV Master Assay (Cat. No. RV10307X)	Allplex™ SARS-CoV-2/FluA/FluB/RSV Assay (Cat.No. RV10259X)
S ген SARS-CoV-2		✓	✓
N ген SARS-CoV-2		✓	✓
RdRP ген SARS-CoV-2		✓	✓
Вірус парагрипу людини (Human parainfluenza virus <b>(PIV)</b> )		✓	○
Вірус грипу А (Influenza A virus <b>(Flu A)</b> )		✓	✓
Вірус грипу В (Influenza B virus <b>(Flu B)</b> )		✓	✓
Аденовірус людини (Human adenovirus <b>(AdV)</b> )		✓	○
Риновірус людини (Human rhinovirus <b>(HRV)</b> )		✓	○
Метапневмовірус людини (Human metapneumovirus <b>(MPV)</b> )		✓	○
Респіраторно-синцитіальний вірус людини (Human respiratory syncytial virus <b>(RSV)</b> )		✓	✓
Екзогенний внутрішній контроль <b>(Exogenous IC)</b>		✓	✓
Ендогенний внутрішній контроль <b>(Endogenous IC)</b>		○	✓

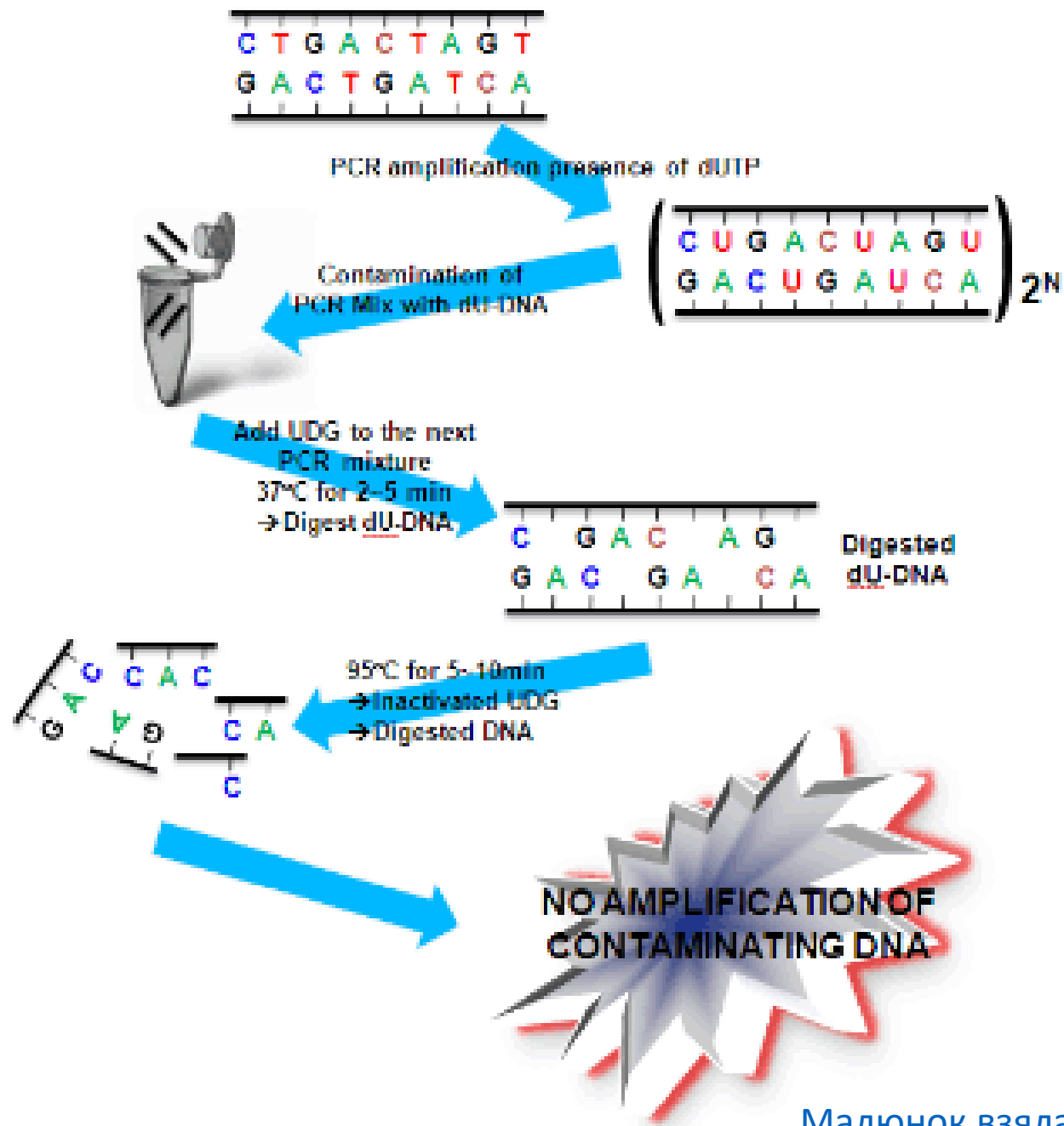
# Межа визначення (LoD)

Мішень	Набір реагентів	Allplex™ RV Master Assay		Allplex™ SARS-CoV-2/FluA/FluB/RSV Assay
		TCID50/мл	Копії\реакції	TCID50/мл
Одиниці виміру		TCID50/мл	Копії\реакції	TCID50/мл
S ген SARS-CoV-2		1.7 x 10 <sup>1</sup>	50	0.14
N ген SARS-CoV-2		1.7 x 10 <sup>1</sup>	50	0.14
RdRP ген SARS-CoV-2		1.7 x 10 <sup>1</sup>	50	0.14
SARS-CoV-2		7.5 x 10 <sup>0</sup>	-	0.028
Вірус парагрипу людини 1 типу (PIV1)		3.2 x 10 <sup>-1</sup>	100	
Вірус парагрипу людини 2 типу (PIV2)		8.8 x 10 <sup>-2</sup>	100	
Вірус парагрипу людини 3 типу (PIV3)		7.7 x 10 <sup>-1</sup>	100	
Вірус парагрипу людини 4 типу (PIV4)		3.6 x 10 <sup>-1</sup>	100	
Вірус грипу А (Flu A)		3.7 x 10 <sup>-1</sup>	100	
Flu A H1N1				4.57
Flu A H1N1pdm				0.417
Flu A H3N2				0.0701
Вірус грипу В (Flu B)		4.8 x 10 <sup>0</sup> UI/ml	100	0.126
Аденовірус людини (AdV)		2.2 x 10 <sup>-1</sup> U/mL	100	
Риновірус людини (HRV)		1.2 x 10 <sup>1</sup> U/mL	100	
Метапневмовірус людини (MPV)		1.7 x 10 <sup>0</sup>	100	
Респіраторно-синцитіальний вірус людини тип А (RSV-A)		5.4 x 10 <sup>-2</sup> U/mL	100	0.525
Респіраторно-синцитіальний вірус людини тип В (RSV-B)		5.3 x 10 <sup>-2</sup> U/mL	100	0.210

# Склад наборів

Позначка	Склад		Об'єм		Опис
	RV Master	SARS-CoV-2/FluA/FluB/R SV	RV Master	SARS-CoV-2/FluA/FluB /RSV	
<b>PRIMER</b>	RVM MOM	SC2FabR MOM	500 мкл		Суміш олігонуклеотидів (праймерів та зондів) для ампліфікації та детекції
<b>PREMIX</b>	EM8		500 мкл		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Зворотня транскриптаза</li> <li>• ДНК-полімераза</li> <li>• Урацил-ДНК глікозилаза (УДГ)</li> <li>• Буфер, що містить ДНТФ</li> </ul>
<b>CONTROL +</b>	RVM PC	SC2FabR PC	50 мкл	100 мкл	Позитивний контроль ампліфікації (PC) – суміш клонів патогенів та IC
<b>CONTROL IC</b>	RVM IC	RP-V IC 2	1000 мкл		Екзогенний внутрішній контроль (IC)
<b>WATER</b>	Вода, вільна від RNKаз		1000 мкл		Вода ультрачиста для ПЛР

# Як працює УДГ



# Біоматеріал

Мішень Набір реагентів	Allplex™ RV Master Assay (Cat. No. RV10307X)				Allplex™ SARS-CoV-2/FluA/FluB/RSV Assay (Cat.No. RV10259X)				
	Носоглотковий аспірат	Мазок з носоглотки	БАЛ	Мазок з ротоглотки	Носоглотковий аспірат	Мазок з носоглотки	БАЛ	Мазок з ротоглотки	Мокрота
<b>Біоматеріал</b>									
SARS-CoV-2	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Вірус парагрипу людини (PIV)	✓	✓	✓	○					
Вірус грипу А (Flu A)	✓	✓	✓	○	✓	✓	✓	○	○
Вірус грипу В (Flu B)	✓	✓	✓	○	✓	✓	✓	○	○
Аденовірус людини (AdV)	✓	✓	✓	○					
Риновірус людини (HRV)	✓	✓	✓	○					
Метапневмовірус людини (MPV)	✓	✓	✓	○					
Респіраторно-синцитіальний вірус людини (RSV)	✓	✓	✓	○	✓	✓	✓	○	○

# Відбір, зберігання та транспортування зразків

Manufacturer	Specimen collection device	Cat. No.
COPAN	ESwab	482CE
COPAN	ENAT PM 2ML PERNASAL APPLICATOR	606CS01P*
COPAN	UTM with Flocked Swabs	360C / 305C
DIAGNOSTIC HYBRIDS	UTM with Flexible Minitip Flocked Swab	403C / 406C
COPAN	MSwab <sup>®</sup> kit	6E012N / 6E013N
COPAN	MSwab <sup>®</sup> bulk	6E011N
Noble Biosciences	CTM (Clinical Virus Transport Medium)	UTNFS-3B-2-N1P / UTNFS-3B-2
SG Medical	GeneTM Set (GTS2)	T5001
SG Medical	GeneTM Set (GTS1)	T5002

- Відбір та транспортування зразків – у відповідності до національних та міжнародних стандартів.
- Зберігання зразків: при 2-8\*С не довше 3 днів з моменту відбору.
- Рекомендований об'єм мокроти – 3-5 мл.

# Попередня обробка зразків

## ***Мокрота:***

- Додайте 2 об'єми 1X PBS або фізіологічного розчину до 1 об'єму зразка в 15 мл пробірку з конічним дном та ретельно перемішайте.
- Перенесіть рекомендований об'єм зразка (*див. Наступний слайд*) в нову пробірку.
- Дотримуйтеся протоколу набору для екстракції.

*Примітка:* у випадку зразків без в'язкості етап попередньої обробки НЕ потрібен.



Автоматична  
екстракція  
зразків

Автоматична платформа для екстракції	Рекомендований набір для екстракції	Виробник	Номер за каталогом	Рекомендований об'єм екстракції \ елюції, мкл
KingFisher Flex	MagMAX™ Viral/Pathogen Nucleic Acid Isolation Kit	Thermo Fisher Scientific	A42352	200 \ 80
MagNA Pure 96	MagNA Pure 96 DNA and Viral NA Small Volume Kit	Roche Diagnostics	06543588001	200 \ 100

- **Автоматична екстракція:** на платформах Microlab NIMBUS IVD / STARlet IVD, Seegene NIMBUS / STARlet, Maelstrom™ Universal 9600, **KingFisher Flex, MagNA Pure 96 (Roche)**.
- Під **KingFisher Flex, MagNA Pure 96 (Roche)** валідовані усі види біоматеріалу окрім БАЛ.
- **Внутрішній контроль IC (10 мкл)** має бути доданий до зразка перед початком екстракції

# Приготування реакційної суміші

Allplex™ RV Master Assay  
(Cat. No. RV10307X)

Allplex™ SARS-CoV-2/FluA/FluB/RSV Assay  
(Cat.No. RV10259X)

5 мкл **RVM MOM**  
5 мкл **EM8**  
5 мкл **RNase-free Water** (води, вільної від RNКаз)

---

15 мкл  
Загальний об'єм реакційної суміші (мастерміксу)

15 мкл **реакційної суміші (мастерміксу)**  
5 мкл **очищеного зразка нуклеїнової кислоти**

---

20 мкл  
Загальний об'єм реакції

**Позитивний контроль ампліфікації (PC)** – додати **5 мкл RVM PC** замість зразка нуклеїнової кислоти  
**Негативний контроль ампліфікації (NC)** – додати **5 мкл води, вільної від RNКаз** замість зразка нуклеїнової кислоти

5 мкл **SC2FabR MOM**  
5 мкл **EM8**

---

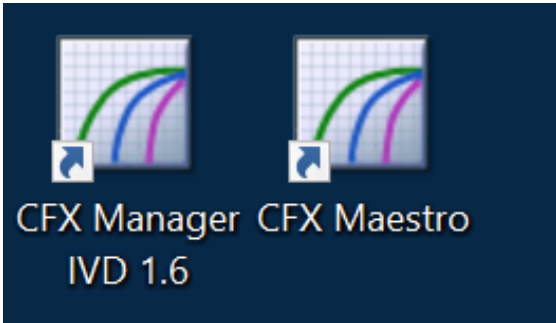
10 мкл  
Загальний об'єм реакційної суміші (мастерміксу)

10 мкл **реакційної суміші (мастерміксу)**  
10 мкл **очищеного зразка нуклеїнової кислоти**

---

20 мкл  
Загальний об'єм реакції

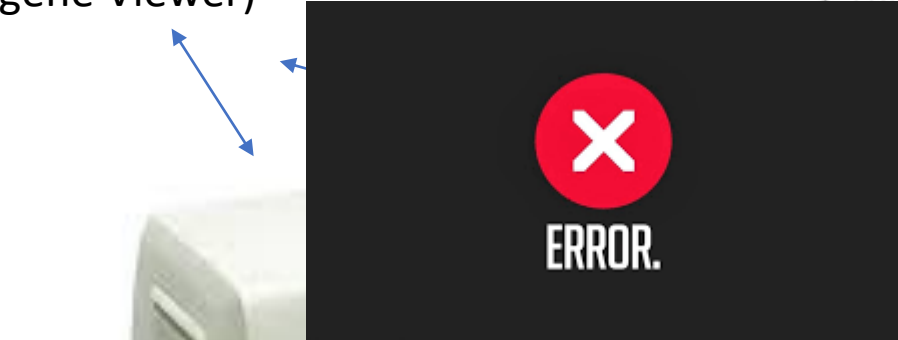
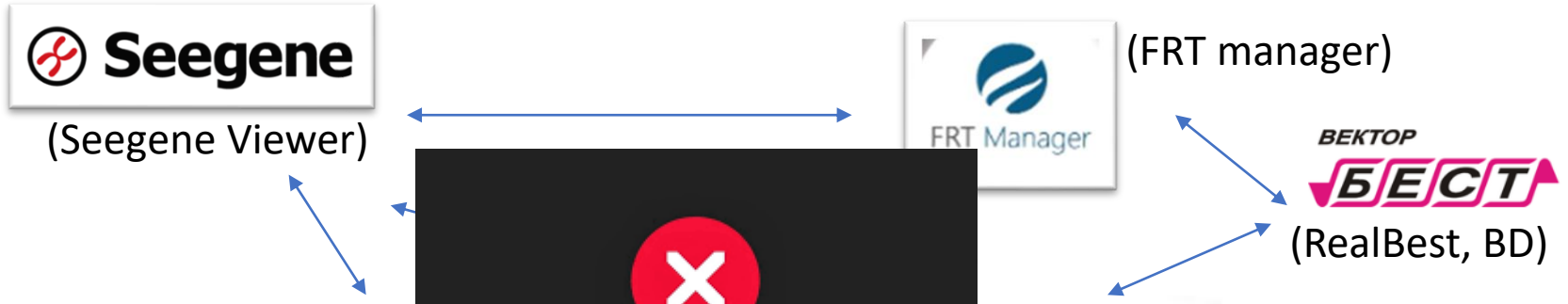
**Позитивний контроль ампліфікації (PC)** – додати **10 мкл SC2FabR PC** замість зразка нуклеїнової кислоти  
**Негативний контроль ампліфікації (NC)** – додати **10 мкл води, вільної від RNКаз** замість зразка нуклеїнової кислоти



CFX Manager IVD 1.6  
CFX Maestro IVD 1.6

Безлад в програмному забезпеченні

### Програми-інтерпретатори



IVD прилад



HE-IVD прилад

#### Власне ПЗ:

- CFX Manager™ Software-IVD v1.6
- CFX Manager™ Dx v3.1 (оновлена версія)

#### Власне ПЗ:

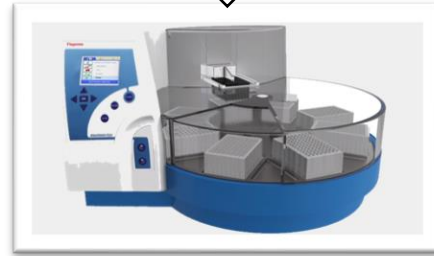
- CFX Manager™ Software v3.1
- BioRad CFX Maestro (оновлена версія)

# Розділяємо ПОТОКИ

Транспортування



Екстракція НК



CFX1  
(IVD)  
Seegene



CFX2  
(не-IVD)  
FRTM  
RealBest  
...

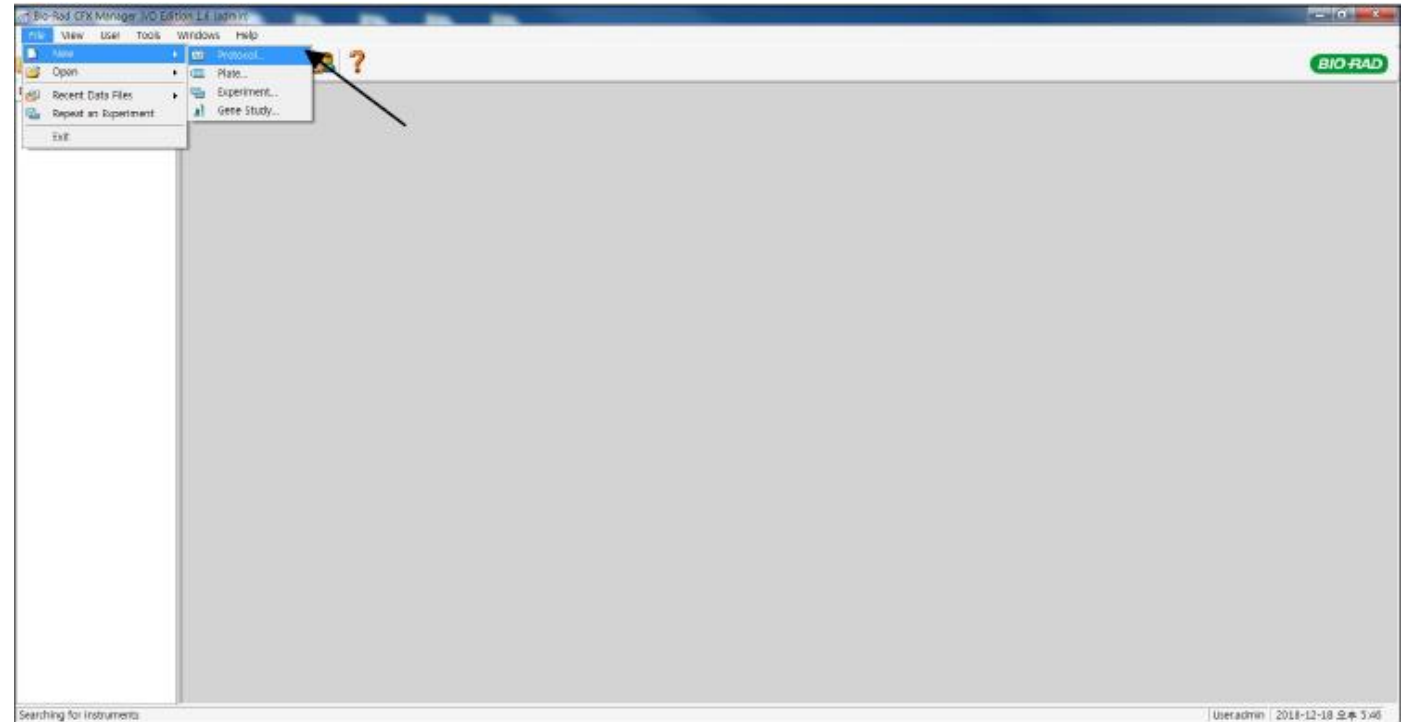


1. Не встановлюйте кілька версій CFX-manager на один комп'ютер\*
2. Виконуйте постановки на наборах SeeGene за можливості тільки на IVF-CFX приладах
3. Розділіть потоки зразків між приладами\*\*
4. За відсутності IVD-CFX прилада використовуйте не версію BioRad Maestro, а попередню, CFX manager 3.1

Програмування ампліфікатора  
(версії ПЗ *CFX Manager™  
Software-IVD v1.6* або *CFX  
Manager™ Dx Software v3.1.*)

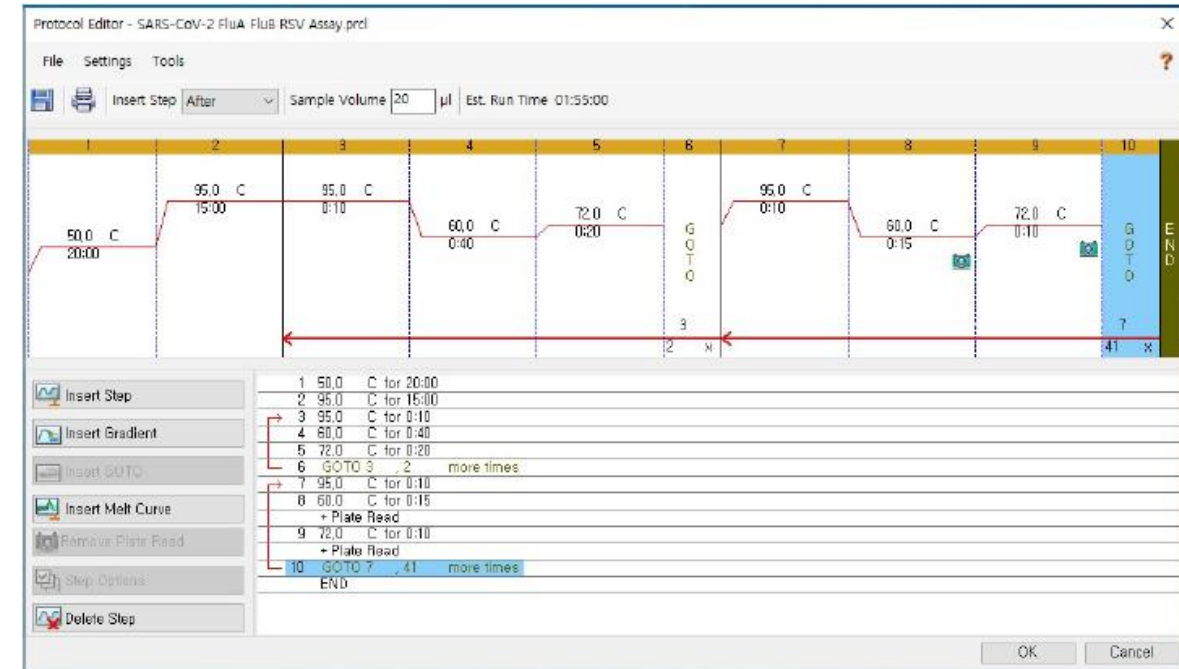
---

1. В головному меню оберіть  
“File” → “New” →  
“Protocol”



Програмування ампліфікатора  
 (версії ПЗ *CFX Manager™  
 Software-IVD v1.6* або *CFX  
 Manager™ Dx Software v3.1.*)

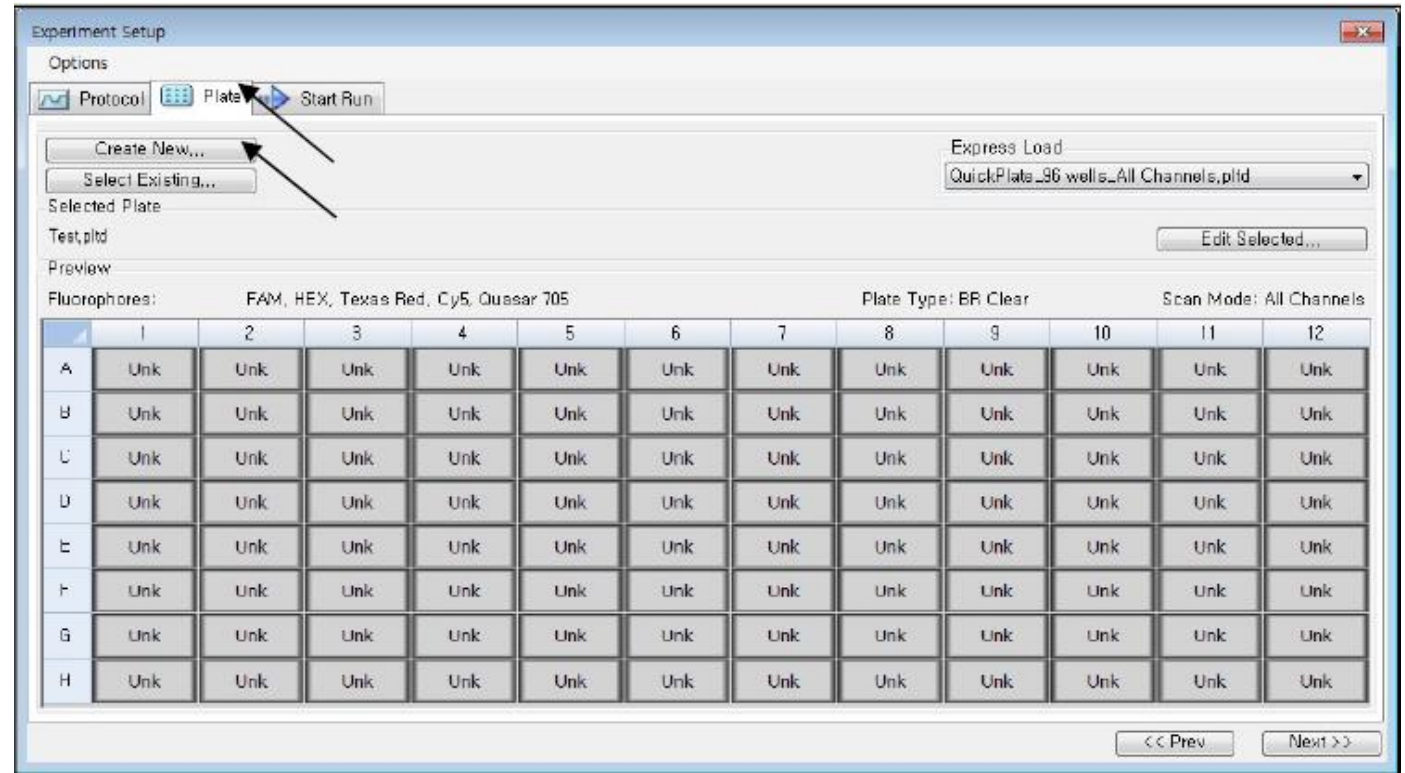
Step	No. of cycles	Temperature	Duration
1	1	50°C	20 min
2		95°C	15 min
3	3	95°C	10 sec
4		60°C	40 sec
5		72°C	20 sec
6	GOTO Step 3, 2 more times		
7	42	95°C	10 sec
8*		60°C	15 sec
9*		72°C	10 sec
10	GOTO Step 7, 41 more times		



**Увага!** Детекція флуоресцентного сигналу двічі за цикл ампліфікації: при 60°C і при 72°C  
 Натисніть «**OK**» та збережіть протокол, щоб відкрити вікно “**Experiment Setup**”

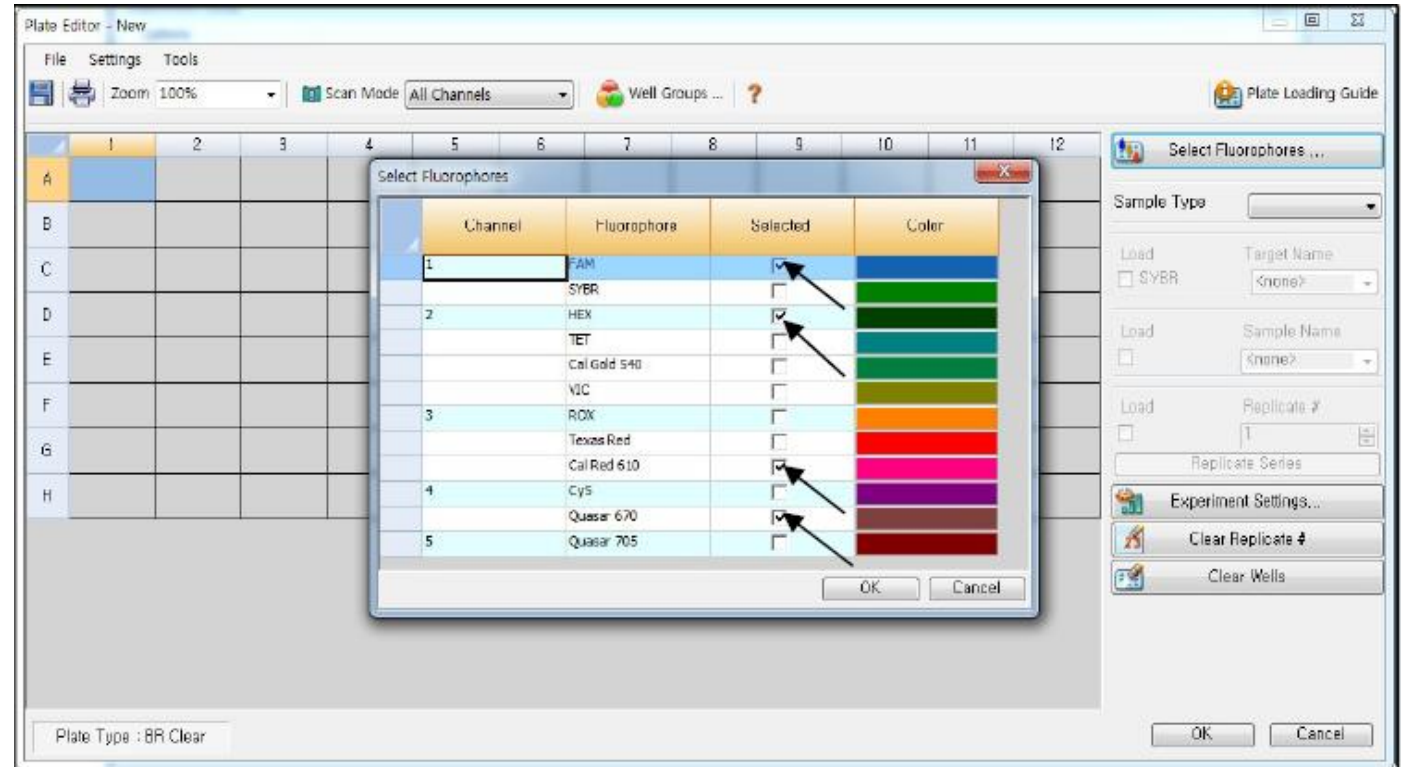
Програмування ампліфікатора  
(версії ПЗ *CFX Manager™  
Software-IVD v1.6* або *CFX  
Manager™ Dx Software v3.1.*)

2. Перейдіть до налаштувань  
плашки. У вкладці «**Plate**» в окні  
«**Experiment Setup**» натисніть  
«**Create New**», щоб відкрити  
вікно «**Plate Editor**»



Програмування ампліфікатора  
(версії ПЗ *CFX Manager™  
Software-IVD v1.6* або *CFX  
Manager™ Dx Software v3.1.*)

3. Натисніть **“Select  
Fluorophores”** щоб обрати  
флуорофори **FAM, HEX, Cal Red  
610, Quasar 670\*\*** та **Quasar  
705\*** після чого натисніть **“OK”**.





# Програмування ампліфікатора (версії ПЗ *CFX Manager™ Software-IVD v1.6* або *CFX Manager™ Dx Software v3.1.*)

4. Оберіть лунки зі зразками, та задайте тип зразка **“Sample Type”** у випадяючому меню\*

- *Unknown*: зразки

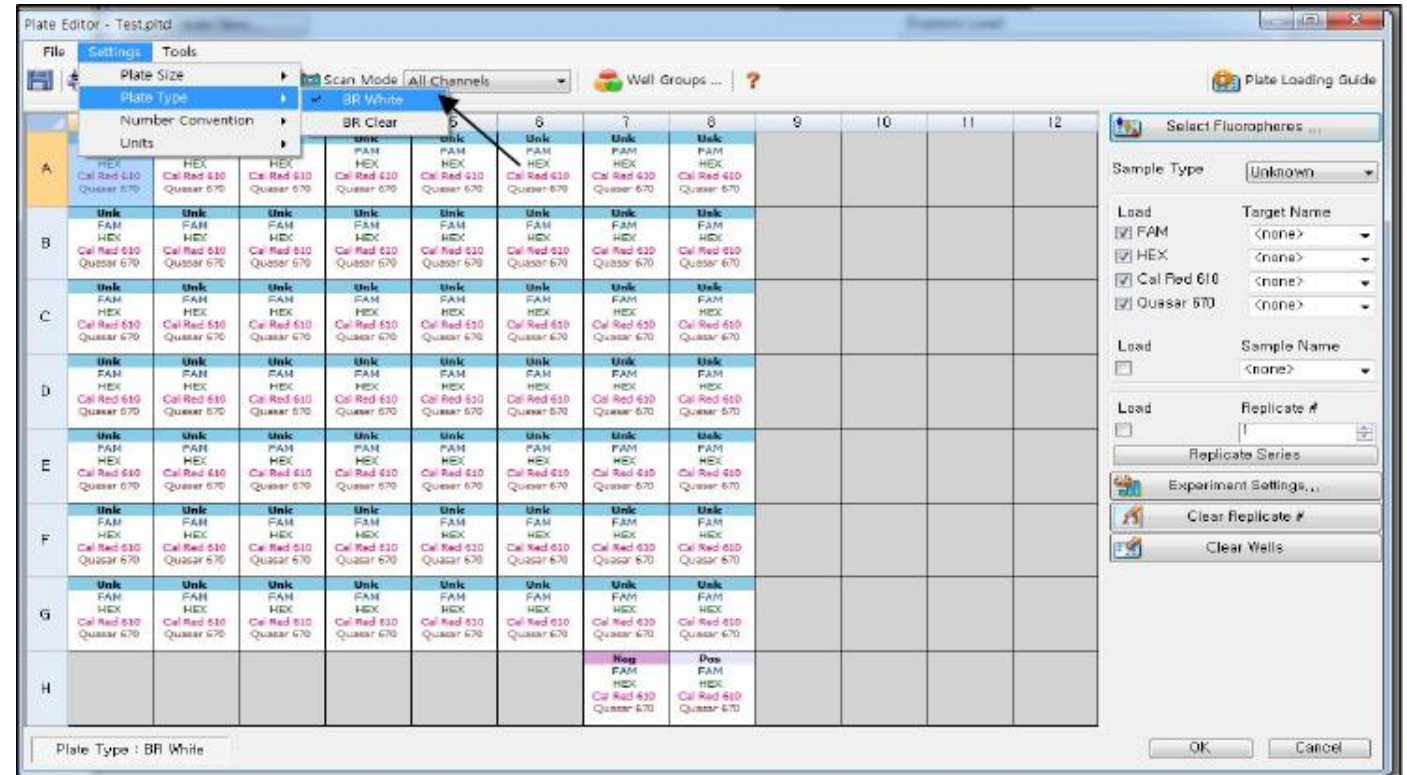
- *Negative Control* – негативний контроль

- *Positive Control* – позитивний контроль

5. Встановіть галочку у відповідних чек-боксах (**FAM, HEX, Cal Red 610, Quasar 670\*\* та Quasar 705\***) щоб визначити, які саме флуорофори детектуються у відповідних лунках.

6. Задайте номери зразків (**“Sample Name”**) та натисніть **enter**.

7. В налаштуваннях **“Settings”** вікна **“Plate Editor”** головного меню оберіть розмір **“Plate Size”** (96 wells) та тип плашки **“Plate Type”** (BR White). Натисніть **«Ok»** та збережіть нову плашку

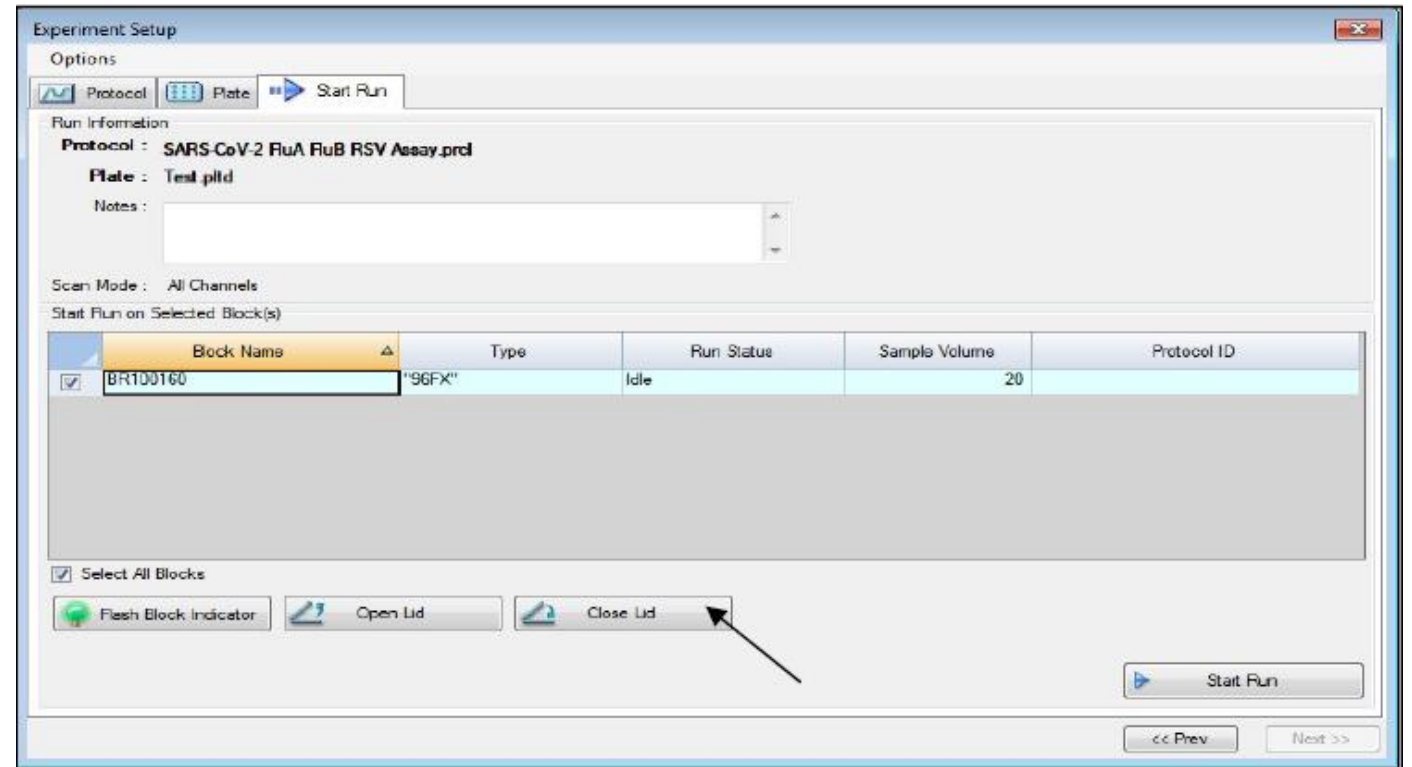


Програмування ампліфікатора  
(версії ПЗ *CFX Manager™  
Software-IVD v1.6* або *CFX  
Manager™ Dx Software v3.1.*)

8. Перейдіть у вкладку “**Start Run**” вікна “**Experiment Setup**”, натисніть “**Close Lid**” щоб закрити кришку ампліфікатора.

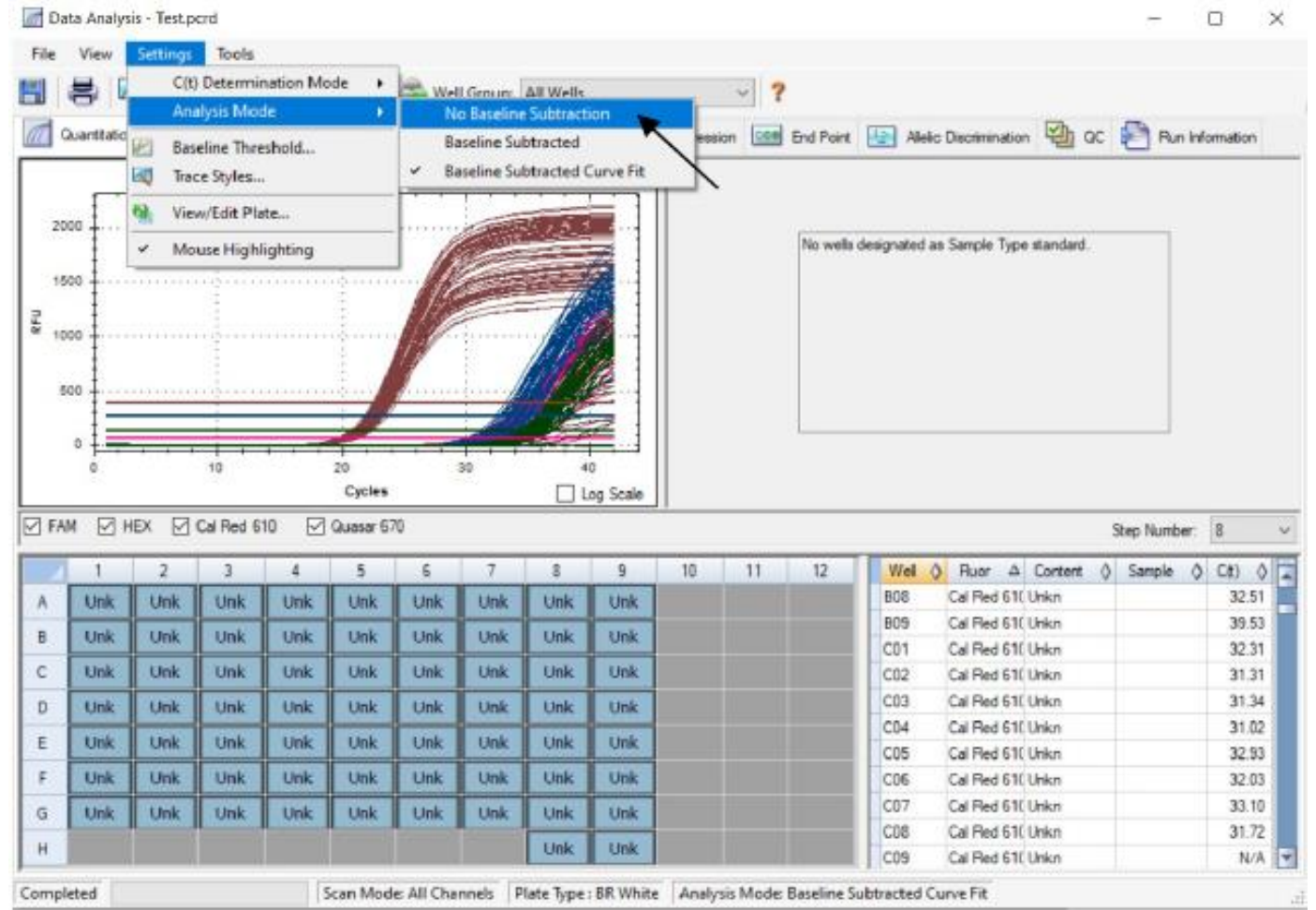
9. Натисніть “**Start Run**”.

10. Збережіть файл постановки в «**Моїх документах**» або в спеціальній папці. Введіть ім'я файла, натисніть “**SAVE**”, щоб розпочати пробіг.



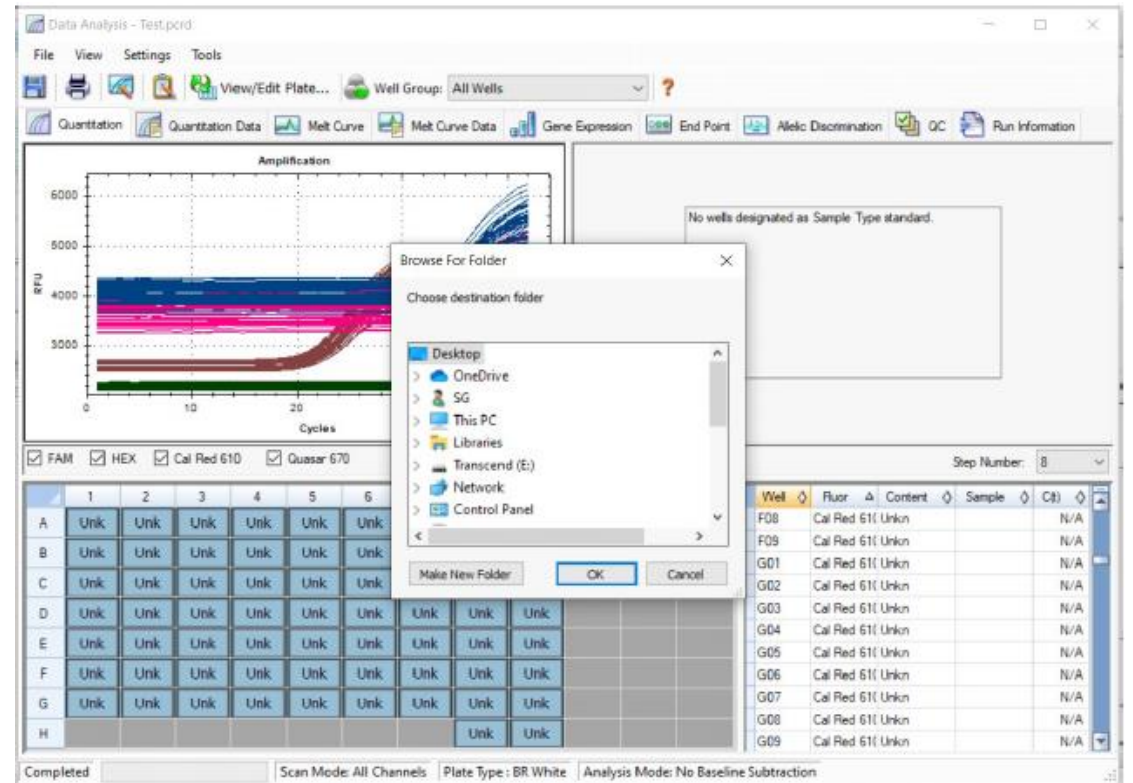
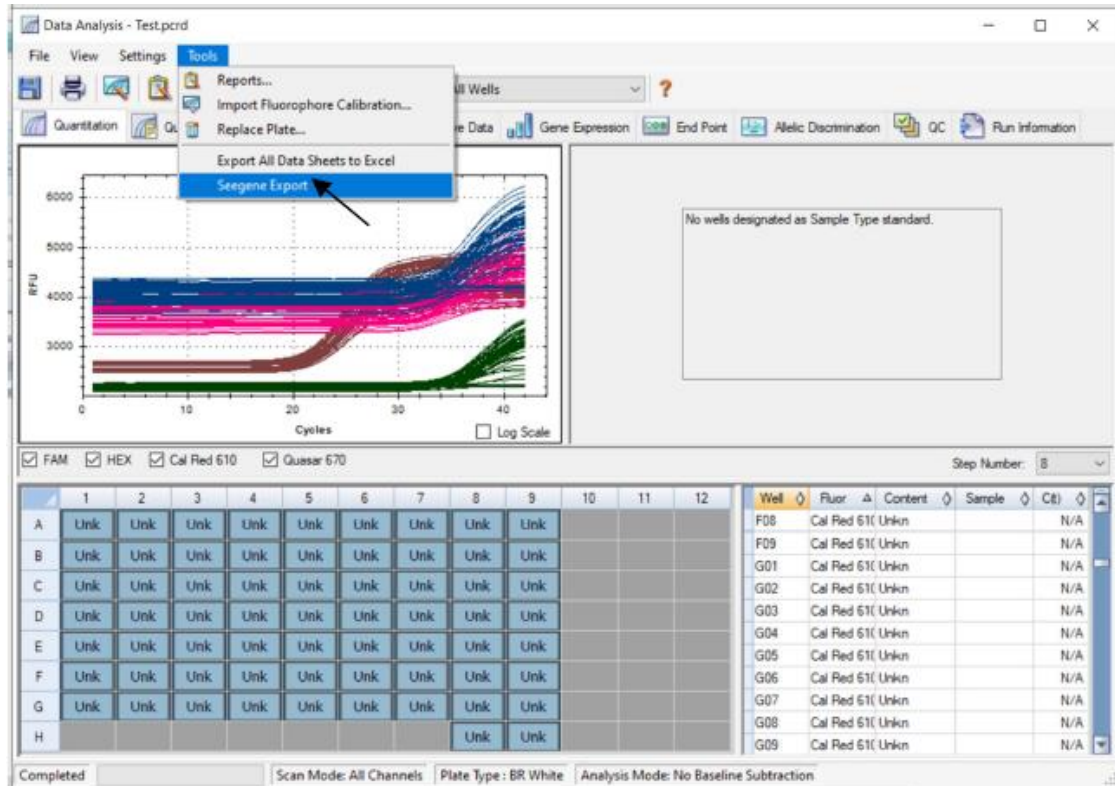
## Аналіз результатів (вивантаження сирих даних з ПЗ ампліфikatora)

1. Створіть спеціальну папку для вивантаження результатів. В цій папці за допомогою 'Seegene Export' функції будуть створені папки "QuantStep8"\* та "QuantStep9"\* і в них будуть автоматично зберігатися амплікаційні дані.
2. Після закінчення постановки перейдіть у вкладку "Quantitation", щоб побачити результати.
3. Оберіть в Settings menu (меню налаштувань) → Analysis Mode (тип аналізу) → No Baseline Subtraction (без побудови базової лінії)



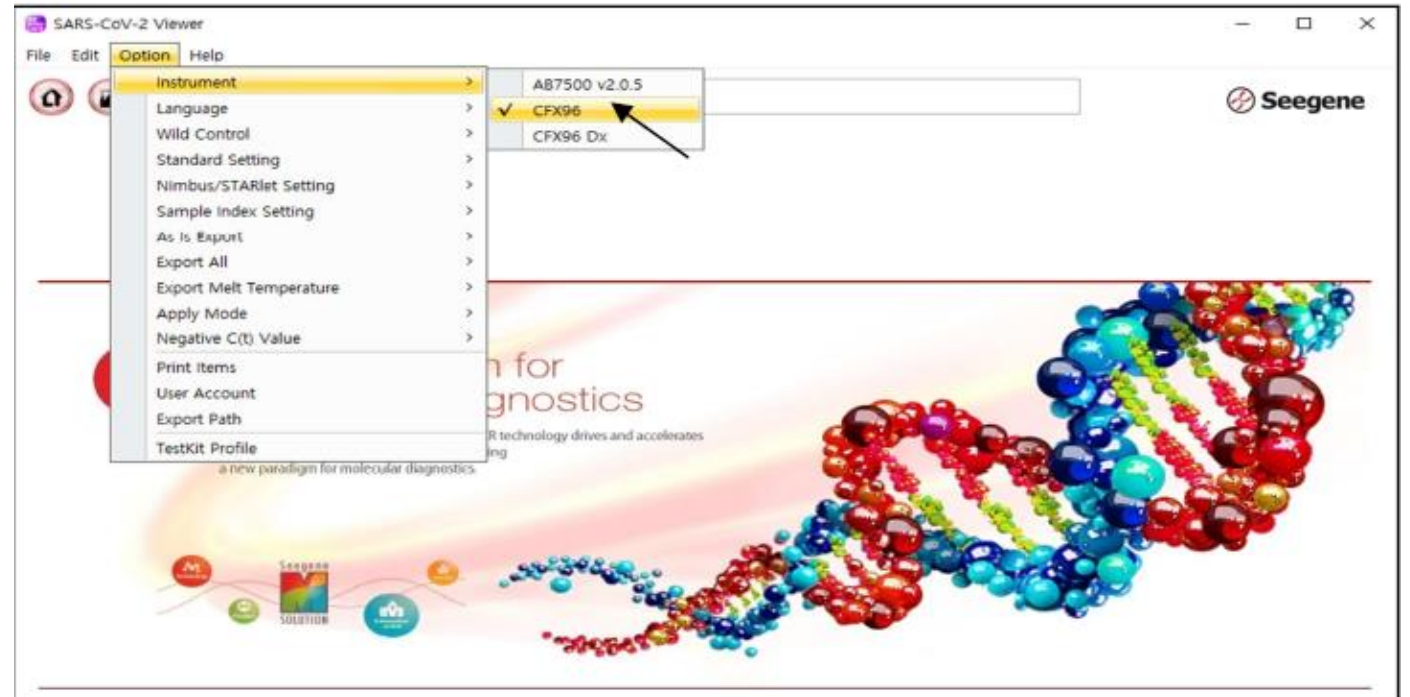
Аналіз результатів  
(вивантаження сирих даних  
з ПЗ ампліфікатора)

4. Оберіть **“Seegene Export”** в меню **Tools**. Вкажіть місце зберігання файлів експорту та натисніть **“OK”**.



## Аналіз результатів (завантаження та аналіз даних в Seegene Viewer)

5. Відкрийте програму **Seegene Viewer** та натисніть **“Option”** щоб обрати прилад CFX96 або CFX96 Dx у випадяючому вікні **“Instrument”**.



## Аналіз результатів (завантаження та аналіз даних в Seegene Viewer)

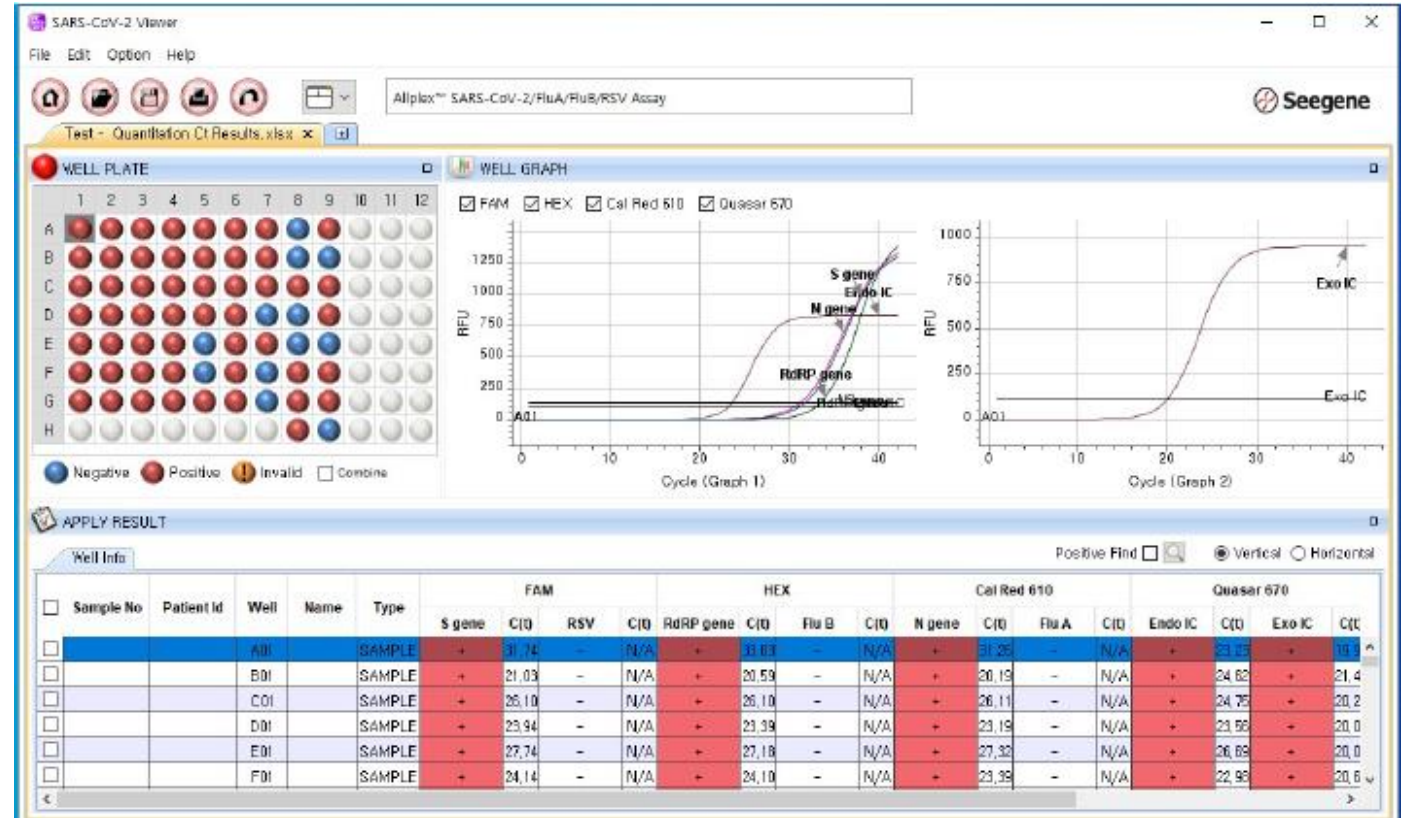
6. Натисніть **“Open”**, знайдіть та оберіть попередньо збережений в папці **“QuantStep8”** файл результатів, та оберіть назву набору реагентів з меню **“PRODUCT”**.

The screenshot displays the Seegene SARS-CoV-2 Viewer interface. At the top, there is a menu bar with 'File', 'Edit', 'Option', and 'Help'. Below the menu bar are several icons and a 'PRODUCT' dropdown menu. The main area is divided into three sections: 'WELL PLATE' showing a grid of wells (A-H, 1-12) with color-coded results (Negative, Positive, Invalid, Combine); 'WELL GRAPH' showing two line graphs of RFU vs Cycle for FAM, HEX, Cal Red 610, and Quasar 670; and 'APPLY RESULT' showing a table of well information.

Well Info	Sample No	Patient Id	Well	Name	Type	FAM	HEX	Cal Red 610	Quasar 6...	Auto Interpretation	Comment
<input type="checkbox"/>			A01		SAMPLE						
<input type="checkbox"/>			B01		SAMPLE						
<input type="checkbox"/>			C01		SAMPLE						
<input type="checkbox"/>			D01		SAMPLE						
<input type="checkbox"/>			E01		SAMPLE						
<input type="checkbox"/>			F01		SAMPLE						
<input type="checkbox"/>			G01		SAMPLE						
<input type="checkbox"/>			A02		SAMPLE						
<input type="checkbox"/>			B02		SAMPLE						
<input type="checkbox"/>			C02		SAMPLE						
<input type="checkbox"/>			D02		SAMPLE						

# Аналіз результатів (завантаження та аналіз даних в Seegene Viewer)

## 7. Перевірте результати для кожного зразка окремо



## Allplex™ SARS-CoV-2/FluA/FluB/RSV Assay

### Інтерпретація результатів. Критерії валідності постановок

- Валідність контролів

Control	Seegene Viewer Result								Auto Interpretation
	FAM (C <sub>t</sub> )		HEX (C <sub>t</sub> )		Cal Red 610 (C <sub>t</sub> )		Quasar670 (C <sub>t</sub> )		
	S gene	RSV	RdRP gene	Flu B	N gene	Flu A	Endo IC	Exo IC	
SC2FabR Positive Control	≤ 40	≤ 40	≤ 40	≤ 40	≤ 40	≤ 40	≤ 40	≤ 40	Positive Control(+)
Negative Control	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	Negative Control(-)

## Allplex™ RV Master Assay

### Негативний контроль ампліфікації

Seegene Viewer Result (C <sub>t</sub> )										Auto Interpretation
FAM		HEX		Cal Red 610		Quasar 670	Quasar 705		Quasar 670	
SC2-S/N	SC2-RdRP	PIV	Flu B	AdV	Flu A	HRV	MPV	RSV	IC	
N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	Negative Control(-)

### Позитивний контроль ампліфікації

Seegene Viewer Result (C <sub>t</sub> )										Auto Interpretation
FAM		HEX		Cal Red 610		Quasar 670	Quasar 705		Quasar 670	
SC2-S/N	SC2-RdRP	PIV	Flu B	AdV	Flu A	HRV	MPV	RSV	IC	
13≤C <sub>t</sub> ≤29	13≤C <sub>t</sub> ≤29	13≤C <sub>t</sub> ≤29	13≤C <sub>t</sub> ≤29	13≤C <sub>t</sub> ≤29	13≤C <sub>t</sub> ≤29	13≤C <sub>t</sub> ≤29	13≤C <sub>t</sub> ≤29	13≤C <sub>t</sub> ≤29	13≤C <sub>t</sub> ≤29	Positive Control(+)



# Інтерпретація результатів по каналах детекції

Флуорофори	Allplex™ RV Master Assay		Allplex™ SARS-CoV-2/FluA/FluB/RSV Assay	
	Мішень 1	Мішень 2	Мішень 1	Мішень 2
FAM	SC2-S/N ( $\leq 42$ )	SC2-RdRP ( $\leq 42$ )	S gene ( $\leq 40$ )	RSV ( $\leq 40$ )
HEX	PIV ( $\leq 42$ )	Flu B ( $\leq 42$ )	RdRP gene ( $\leq 40$ )	Flu B ( $\leq 40$ )
Cal Red 610	AdV ( $\leq 42$ )	Flu A ( $\leq 42$ )	N gene ( $\leq 40$ )	Flu A ( $\leq 40$ )
Quasar 670	HRV ( $\leq 42$ )	IC ( $\leq 38$ )	Endo IC ( $\leq 40$ )	Exo IC ( $\leq 40$ )
Quasar 705	MPV ( $\leq 39$ )	RSV ( $\leq 38$ )	-	-

# Відео

- TOCE™ технологія -  
<https://www.youtube.com/watch?v=ktNrFlt6QW4>
- DPO™ технологія -  
<https://www.youtube.com/watch?v=AETLyuv1PvU>
- MuDT™ технологія -  
<https://www.youtube.com/watch?v=HAJ1E9Nk1-c>

Дякую за увагу!

---