

МІЖНАРОДНА СТАНДАРТНА ОПЕРАЦІЙНА ПРОЦЕДУРА PULSENET INTERNATIONAL ДЛЯ СЕРТИФІКАЦІЇ ПЕРСОНАЛУ, ЯКИЙ ЗАЙМАЄТЬСЯ ПОВНОГЕНОМНИМ СЕКВЕНУВАННЯМ

Док. Номер PNIQ01

Вер. No. 01

Дата набуття чинності:

Сторінка 1 від 14

1. **МЕТА:** Описати процедуру сертифікації персоналу для повноцінної участі в діяльності з повногеномного секвенування організації PulseNet International.
2. **СФЕРА ЗАСТОСУВАННЯ:** Ця процедура поширюється на весь персонал організації PulseNet International, яка генерує дані про послідовності для роботи з епіднагляду в рамках роботи PulseNet International, і обмежується лише процесами мокрої лабораторії.
3. **ВИЗНАЧЕННЯ/ТЕРМІНИ:**
 - 3.1 **Алель (англ. Allele):** Одна з двох або більше альтернативних форм гена, які виникають внаслідок мутації і перебувають в одному сайті хромосоми.
 - 3.2 **APHL:** Асоціація лабораторій громадського здоров'я США.
 - 3.3 **ATCC:** Американська колекція типових культур. Некомерційна організація, яка збирає, зберігає та розповсюджує стандартні еталонні мікроорганізми, клітинні лінії та інші матеріали для досліджень і розробок.
 - 3.4 **BaseSpace:** Хмарне обчислювальне середовище Illumina для аналізу та управління даними секвенування наступного покоління, включаючи обмін даними.
 - 3.5 **CDC:** Центри з контролю та профілактики захворювань, м. Атланта, штат Джорджія, США.
 - 3.6 **cgMLST:** Типування багатолокусних послідовностей основного геному.
 - 3.7 **Оцінювач сертифікаційних файлів:** Особа, яка оцінює сертифікаційні файли
 - 3.8 **Сертифікаційні файли:** Fastq файли, подані учасниками мережі PulseNet для оцінки сертифікації повногеномного секвенування (ПГС).
 - 3.9 **Основний геном:** Гени, спільні для переважної більшості (напр., >98% всіх штамів *Listeria monocytogenes*) штамів одного виду.
 - 3.10 **Охоплення:** Середня кількість зчитувань, які включають даний нуклеотид у реконструйовану послідовність.
 - 3.11 **Критичні показники якості:** Середнє охоплення de novo, середня якість (Q score), довжина збірки, поширеність вторинних видів (контамінація), відсоток присутності основного геному, різниця алелів та hqSNP порівняно з еталоном та середня довжина зчитування. Невідповідність будь-якої з цих метрик призведе до відхилення заявки на сертифікацію.
 - 3.12 **Збірка de Novo:** Збірка послідовностей, створена з коротких необроблених зчитувань без використання референтного геному.
 - 3.13 **ДНК:** Дезоксирибонуклеїнова кислота
 - 3.14 **FASTQ:** текстовий формат для зберігання як біологічної послідовності, так і відповідних оцінок якості.
 - 3.15 **Сертифікований за Fastq:** Особа, яка сертифікована в лабораторних методах ПГС для отримання даних секвенування.
 - 3.16 **FTP:** Протокол передачі файлів; стандартний мережевий протокол, що використовується для передачі комп'ютерних файлів з одного хоста на інший через мережу Інтернет.
 - 3.17 **Gzip:** Формат файлів і програмне забезпечення, що використовується для стиснення та розпакування файлів для швидкої передачі даних через Інтернет
 - 3.18 **hqSNP:** високоякісний одонуклеотидний поліморфізм.

- 3.19 Lyve-SET:** конвеєр hqSNP, розроблений Katz *et al.* (2017), використовується Лабораторією кишкових захворювань Центру контролю та профілактики захворювань США (CDC) та є частиною робочого процесу в програмі Terra.Bio (Theiagen, Highlands Ranch, CO, США).
- 3.20 MB:** Мега база.
- 3.21 PNI:** Мережа PulseNet International
- 3.22 PT:** Перевірка кваліфікації.
- 3.23 QA/QC:** Забезпечення якості/контроль якості.
- 3.24 Оцінка якості:** Оцінка якості для кожної окремої позиції бази в послідовності, що вказує на точність розпізнавання нуклеотидних основ. Використовується оцінка Phred, де $Q = -10 \log$ (ймовірність помилки). Чим вищий показник якості, тим надійнішим є розпізнавання нуклеотидних основ. Q30 означає, що ймовірність неправильного виклику розпізнавання в цій позиції становить 1 до 1000.
- 3.25 Зчитування:** Одиниця безперервної послідовності ДНК (базових пар), отримана шляхом секвенування частини фрагментованої цільової ДНК.
- 3.26 СОП:** Стандартна операційна процедура.
- 3.27 Terra.Bio:** Хмарна платформа для аналізу послідовностей, розроблена Інститутом Броуда Массачусетського технологічного інституту та Гарвардським університетом і використовується компанією Theiagen Genomics (м. Хайлендс Ранч, штат Колорадо, США), щоб запропонувати платну спільну платформу для лабораторій громадського здоров'я з метою розміщення, аналізу та обміну даними (Libuit *et al.*, 2023).
- 3.28 TSV:** Значення, розділені табуляцією.
- 3.29 Звіт про сертифікацію WGS:** Звіт, який містить оцінку та результати аналізу сертифікаційних **файлів** учасника ПГС.
- 3.30 WGS:** Повногеномне секвенування (ПГС).

4. ОБОВ'ЯЗКИ:

- 4.1 Особи, які виконують роботу, пов'язану з виконанням повногеномного секвенування у рамках роботи PulseNet International, повинні подати сертифікаційний файл(и) та отримати схвалення перед тим, як вони зможуть генерувати дані послідовностей для епіднагляду PulseNet.
- 4.1.1 Сертифікація є первинною оцінкою компетентності нещодавно навченого персоналу. Подані на сертифікацію файли повинні підтверджувати найвищий рівень компетентності заявника у створенні необроблених даних про послідовності.
- 4.1.2 Особи можуть бути сертифіковані за такими напрямками як: *сальмонела*, *ешерихія/шигела*, *лістерія*, *кампілобактерії* та *вібріони*.
- 4.2 Лабораторія вважається сертифікованою мережею PulseNet, якщо принаймні одна особа в лабораторії пройшла сертифікацію принаймні для одного організму
- 4.2.1 Щоб зберегти свій сертифікаційний статус в мережі PulseNet, лабораторія повинна взяти участь і успішно пройти щорічну перевірку кваліфікації (див. СОП PNIQ02 для отримання додаткової інформації).

МІЖНАРОДНА СТАНДАРТНА ОПЕРАЦІЙНА ПРОЦЕДУРА PULSENET INTERNATIONAL ДЛЯ СЕРТИФІКАЦІЇ ПЕРСОНАЛУ, ЯКИЙ ЗАЙМАЄТЬСЯ ПОВНОГЕНОМНИМ СЕКВЕНУВАННЯМ

Док. Номер PNIQ01

Вер. No. 01

Дата набуття чинності:

Сторінка 3 від 14

5. ПРОЦЕДУРА:

5.1 Учасники мережі PulseNet International купують у АТСС (<https://www.atcc.org>) набір лабораторних сертифікаційних штамів ПГС для організмів, за якими вони бажають пройти сертифікацію (якщо вони їх ще не мають).

5.1.1 Набір для лабораторної сертифікації ПГС включає кампілобактерії, ешерихії, лістерії, сальмонели та вібріони.

Рід/вид	Серотип	Номер АТСС	Позначення штаму	Ціна (дол. США) ²
<i>Campylobacter jejuni</i>	NA	ATCC 33560	CIP-702	\$269.00
<i>Кишкова паличка</i> ¹	O6:H1	ATCC 25922	Штам FDA Seattle 1946	\$77.00
<i>Listeria monocytogenes</i>	Lineage II	ATCC BAA-679	EGDe	\$431.00
<i>Salmonella enterica</i>	Typhimurium	ATCC 51812	U24	\$431.00
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	O3:K6	ATCC 17802	EB101 (P. Baumann 113)	\$77.00
Всього				\$1285.00

Таблиця 1. Штами АТСС, включені до сертифікаційної панелі PNI.

¹Охоплює також сертифікацію на *Shigella* spp.

²Ліофілізований препарат; ціна для США (жовтень 2023 року). Ціна буде залежати від місця доставки і в деяких випадках може бути значно вищою, ніж зазначено в таблиці.

5.1.2 Перейдіть на сайт АТСС, щоб створити обліковий запис/профіль для отримання точної ціни та розмістити замовлення: <https://www.atcc.org/web-profile/create-a-web-profile>

5.2 Заморозьте (-70°C) або зберігайте сертифікаційні штами відповідно до політики вашої лабораторії протягом одного тижня після їх отримання, щоб забезпечити наявність у вашій лабораторії запасних культур цього сертифікаційного набору PNI для подальшого використання, включаючи сертифікацію за вимогами мережі PulseNet додаткового персоналу. Уникайте багаторазових циклів заморожування/розморожування заморожених культур.

5.3 Послідовність штамів згідно з методами, прийнятими в мережі PulseNet:

5.3.1 Будь-який метод екстракції ДНК, що дозволяє отримати ДНК, яка відповідає мінімальним вимогам до якості, викладеним у СОП PNL33 PulseNet, є прийнятним.

5.3.2 Прийнятними наборами для підготовки бібліотек є наступні: Illumina Nextera XT (PNL34), Illumina DNA Prep (PNL35, PNL44), Qiagen QIAseq FX (PNL36), KAPA HyperPlus (PNL37), NEBNext Ultra II FS (PNL42) та Illumina DNA PCR-Free (PNL43).

ПРИМІТКА: бібліотечні препарати з автоматизованих систем обробки рідин не приймаються.

5.3.3 Прийнятними платформами для секвенування є наступні: Illumina MiSeq (PNL38), Illumina MiniSeq (PNL39), Illumina iSeq (PNL40) та Illumina NextSeq.

ПРИМІТКА: хімія секвенування (довжина зчитування) менше 2x150 п.н. не приймається.

МІЖНАРОДНА СТАНДАРТНА ОПЕРАЦІЙНА ПРОЦЕДУРА PULSENET INTERNATIONAL ДЛЯ СЕРТИФІКАЦІЇ ПЕРСОНАЛУ, ЯКИЙ ЗАЙМАЄТЬСЯ ПОВНОГЕНОМНИМ СЕКВЕНУВАННЯМ

Док. Номер PNIQ01

Вер. No. 01

Дата набуття чинності:

Сторінка 4 від 14

- 5.3.3.1 Будь ласка, дотримуйтеся рекомендованого геномного навантаження, наведеного в Додатку PNIQ01-1. Допустимо включати рутинні ізоляти в один цикл секвенування з сертифікаційними штамами.
- 5.3.3.2 Переконайтеся, що вихідні файли fastq мають формат **.fastq.gz**
- 5.4 Надайте сертифікаційні файли fastq.gz оцінювачу сертифікаційних файлів.
- 5.4.1 **Лабораторії, що використовують Terra.Bio для аналізу послідовностей:**
- 5.4.1.1 Зверніться до компанії Theiagen (michelle.scribner@theiagen.com ; frank.ambrosio@theiagen.com), щоб отримати доступ до робочого простору оцінки якості PNI QA: https://app.terra.bio/#workspaces/theiagen-validations/PNI_Eval_Workspace/data

5.4.1.2 Підготуйте файли для завантаження в робочу область PNI QA Evaluation Workspace:

5.4.1.2.1 Збережіть сертифікаційні файли fastq.gz у папці локального диска.

5.4.1.2.2 Підготуйте файл метаданих .tsv для сертифікаційних зразків, використовуючи такі правила найменування:

5.4.1.2.2.1 Назва таблиць даних:

Установа: Назва установи_illuminaPE_id

наприклад: установа:USA_CDC_illuminaPE_id

5.4.1.2.2.1.1 Назва таблиці даних повинна містити назву вашої установи замість курсиву у наведеному вище прикладі. Назва не повинна містити пробілів або спеціальних символів, окрім символів підкреслення ("_"). Будь ласка, внесіть весь цей рядок (від e в entity до d в _id) у клітинку 1A таблиці метаданих.

ПРИМІТКА: ідентифікатор країни ставте перед назвою установи, якщо назва установи однакова в двох країнах, наприклад, CDC США та CDC Тайваню (USA_CDC; TW_CDC).

5.4.1.2.2.2 Зразок найменування:

Ідентифікатор Зразка НазваУстанови ІніціалиТехніка

наприклад: ATCC_33560_USA_CDC_et

ПРИМІТКА: ідентифікатор країни ставте перед назвою установи, якщо назва установи однакова в двох країнах, наприклад, CDC США та CDC Тайваню (USA_CDC; TW_CDC).

	A	B	C	D
1	entity:USA_CDC_illuminaPE_id	read1	read2	
2	ATCC_10708_USA_CDC_et	10708-C2-M3235-23-002_S17_L001_R1_001.fastq.gz	10708-C2-M3235-23-002_S17_L001_R2_001.fastq.gz	
3	ATCC_33560_USA_CDC_et	ATCC-33560A-M947-22-040_S5_L001_R1_001.fastq.gz	ATCC-33560A-M947-22-040_S5_L001_R2_001.fastq.gz	
4				
5				
6				

Малюнок 1. Скріншот файлу метаданих tsv, відкритого в Excel.

5.4.1.3 Завантажте файли fastq.gz та файл метаданих .tsv до Робочої області оцінки якості PNI QA Evaluation Workspace

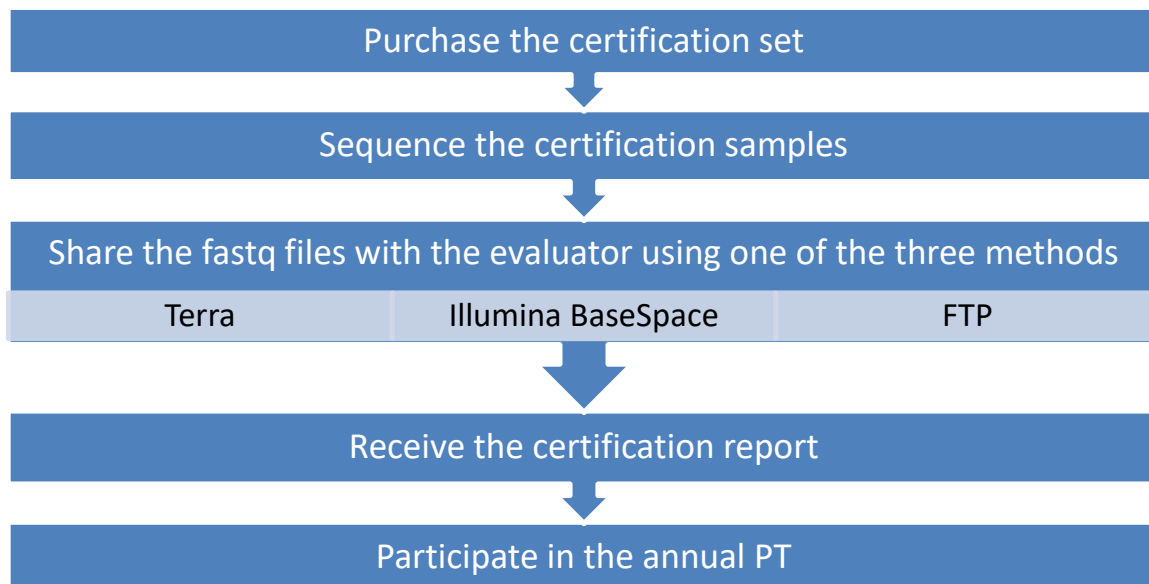
5.4.1.4 Необов'язково: Запустіть робочий процес "TheiaProk_Illumina_PE_PNV" для файлів сертифікації.

5.4.2 **Лабораторії, які не використовують Terra.Bio, але використовують Illumina BaseSpace:**

- 5.4.2.1 Файли fastq.gz повинні бути названі з використанням стандартного підходу до найменування файлів PulseNet: *Зразок-Ідентифікатор-Ініціали фахівця-Назва установи-Ідентифікатор приладу Illumina-Дата початку запуску*, наприклад, ATCC-33560-et-USA-CDC-M3235-231031
- ПРИМІТКА:** ідентифікатор країни ставте перед назвою установи, якщо назва установи однакова в двох країнах, наприклад, CDC США та CDC Тайваню (USA-CDC; TW-CDC).
- 5.4.2.1.1 Ідентифікатори приладів Illumina зазвичай мають наступні формати:
- 5.4.2.1.1.1 MiSeq MXXXXX
- 5.4.2.1.1.2 MiniSeq MNXXXXX
- 5.4.2.1.1.3 iSeq FSXXXXX
- 5.4.2.1.1.4 NextSeq VHXXXXXX/VLXXXXXX/NBXXXXXX/NSXXXXXX
- 5.4.2.1.2 Формат дати початку запуску: РікМісяцьДата (YYMMDD)
- 5.4.2.2 Поділіться **проектом**, що містить сертифікаційні fastq-файли, з pulsenetngslab@cdc.gov, який вказаний як співавтор в окремому проекті BaseSpace, призначеному для виконання сертифікації.
- 5.4.2.2.1 Назвіть проект, використовуючи наступний підхід до найменування: *Назва інституції_Сертифікація*, наприклад, USA_CDC_Certification
- ПРИМІТКА:** поставте ідентифікатор країни перед назвою установи, якщо назва установи однакова в двох країнах, наприклад, CDC США та CDC Тайваню (USA_CDC; TW_CDC).
- 5.4.2.3 Надішліть **Run** (постановку), що містить сертифікаційні зразки, [на адресу pulsenetngslab@cdc.gov](mailto:pulsenetngslab@cdc.gov)
- 5.4.3 **Лабораторії, які не використовують Terra.Bio або BaseSpace:**
- 5.4.3.1 Зверніться за адресою елю пошти pulsenetngslab@cdc.gov, щоб отримати інструкції щодо завантаження файлів fastq.gz на ftp-сайт PulseNet QA.
- 5.4.4 Повідомте оцінювачу сертифікаційних файлів про наявність сертифікаційних файлів електронною поштою pulsenetngslab@cdc.gov
- 5.4.4.1 Використовуйте рядок теми: Сертифікація PNI - *Назва установи*
- 5.4.4.2 Включіть наступну інформацію в тіло листа:
- 5.4.4.2.1 Ім'я та електронна адреса аналітика, який виконував підготовку бібліотеки та секвенування.
- 5.4.4.2.2 Набір для підготовки бібліотеки, що використовується для генерації сертифікаційних файлів.
- 5.4.4.2.3 Платформа секвенування, що використовується для генерації сертифікаційних файлів.
- 5.4.4.2.4 Якщо ви надаєте спільний доступ у BaseSpace: список імен файлів та назву проекту, в якому були розміщені файли.
- 5.5 Заявники отримують Сертифікаційний звіт ПГС, що підсумовує результати оцінки їхніх сертифікаційних файлів (див. Додаток PNIQ01-2 для прикладу Сертифікаційного звіту ПГС).
- 5.5.1 Сертифікаційні fastq-файли оцінюються на основі критеріїв, викладених у Додатку PNIQ01-3.

- 5.5.2 Якщо подані сертифікаційні файли проходять сертифікаційну оцінку, заявник вважається сертифікованим до тих пір, поки він залишається в своїй поточній лабораторії, а ця лабораторія успішно проходить щорічну перевірку кваліфікації (SOP PNIQ02). Усі сертифіковані Fastq особи повинні виконувати рутинне секвенування щонайменше кожні шість місяців.
- 5.5.3 Якщо подані сертифікаційні файли не пройшли сертифікаційну оцінку, особі потрібно буде переглянути коментарі щодо усунення недоліків, отриманих від оцінювача, і подати їх повторно, як тільки результати покращаться.
- 5.5.3.1 Якщо заявник не пройшов сертифікацію тричі, він не зможе подати заявку знову протягом шести місяців. Перед повторною подачею заявки учасник повинен буде попрацювати зі своєю координуючою лабораторією до досягнення задовільних результатів. Це включає, але не обмежується усуненням недоліків і навчанням протоколам PulseNet WGS.

6. ТЕХНОЛОГІЧНА КАРТА:



7. ПОВ'ЯЗАНІ З ЦИМ ДОКУМЕНТИ:

7.1. Доступно за [посиланням: https://www.aphl.org/programs/food_safety/Pages/PulseNet-International-SOPs.aspx](https://www.aphl.org/programs/food_safety/Pages/PulseNet-International-SOPs.aspx)

Номер документа	Назва
PNL33	Виділення ДНК та СОП контролю якості
PNL34	СОП підготовки бібліотеки Illumina Nextera XT
PNL35	СОП для підготовки бібліотеки Illumina DNA Prep

МІЖНАРОДНА СТАНДАРТНА ОПЕРАЦІЙНА ПРОЦЕДУРА PULSENET INTERNATIONAL ДЛЯ СЕРТИФІКАЦІЇ ПЕРСОНАЛУ, ЯКИЙ ЗАЙМАЄТЬСЯ ПОВНОГЕНОМНИМ СЕКВЕНУВАННЯМ

Док. Номер PNIQ01

Вер. No. 01

Дата набуття чинності:

Сторінка 7 від 14

PNL36	СОП підготовки бібліотеки Qiagen QIAseq FX
PNL37	СОП підготовки бібліотеки KAPA HyperPlus
PNL38	Секвенування на MiSeq SOP
PNL39	Секвенування на MiniSeq SOP
PNL40	Секвенування на iSeq SOP
PNL42	СОП підготовки бібліотеки NEBNext Ultra II FS
PNL43	Illumina ДНК ПЛР-безкоштовна бібліотека СОП для підготовки бібліотеки
PNL44	СОП для швидкої підготовки бібліотеки PulseNet
PNQ07	Illumina Sequence Data QC SOP

8. ВИКОРИСТАНА ЛІТЕРАТУРА:

- 8.1 Katz L.S., Griswold T., Williams-Newkirk A.J., Wager, D., Petkau, A., Sieffert, C., Van Domselaar, G., Deng, X., Carleton, H.A. (2017). A Comparative Analysis of the Lyve-SET Phylogenomics Pipeline for Genomic Epidemiology of Foodborne Pathogens. *Frontiers Microbiol.* 8:375.
- 8.2 Libuit K.G., Doughty E.L., Otieno J.R., Ambrosio F., Kapsak C.J., Smith E.A., Wright S.M., Scribner M.R., Petit III R.A., Mendes C.I., Huergo M., Legacki G., Loreth C., Park D.J., Sevinsky J.R. (2023) Accelerating bioinformatics implementation in public health. *Microbial Genomics* 9:001051.

9. КОНТАКТИ:

9.1 Лабораторія NGS PulseNet Центру контролю та профілактики захворювань США:

pulsenetngslab@cdc.gov

9.2 Міжнародний координатор із забезпечення якості PulseNet Ейя Тріес:

9.3 ehyytia-trees@cdc.gov

9.4 Тейаген:

9.4.1 Мішель Скрібнер: michelle.scribner@theiagen.com

9.4.2 Френк Амбросіо: frank.ambrosio@theiagen.com

10. ЗМІНИ: ВІДСУТНІ

11. ПІДПИСИ ПРО ЗГОДУ:

Затверджено _____ Дата: _____
Персонал PulseNet QA/QC

Затверджено _____ Дата: _____

**МІЖНАРОДНА СТАНДАРТНА ОПЕРАЦІЙНА ПРОЦЕДУРА PULSENET INTERNATIONAL ДЛЯ
СЕРТИФІКАЦІЇ ПЕРСОНАЛУ, ЯКИЙ ЗАЙМАЄТЬСЯ ПОВНОГЕНОМНИМ СЕКВЕНУВАННЯМ**

Док. Номер PNIQ01

Вер. No. 01

Дата набуття чинності:

Сторінка 8 від 14

Технічний керівник PulseNet WGS

Затверджено _____ Дата: _____
Міжнародний координатор PulseNet

Затверджено _____ Дата: _____
Керівник групи реагування та управління спалахами PulseNet

Затверджено _____ Дата: _____
Завідувач сектору лабораторії кишкових захворювань

МІЖНАРОДНА СТАНДАРТНА ОПЕРАЦІЙНА ПРОЦЕДУРА PULSENET INTERNATIONAL ДЛЯ СЕРТИФІКАЦІЇ ПЕРСОНАЛУ, ЯКИЙ ЗАЙМАЄТЬСЯ ПОВНОГЕНОМНИМ СЕКВЕНУВАННЯМ

Док. Номер PNIQ01

Вер. No. 01

Дата набуття чинності:

Сторінка 9 від 14

Додаток PNIQ01-1: Прийнятні набори для підготовки бібліотек, платформи для секвенування, хімічні реактиви для секвенування та перевірені ємності для завантаження ДНК

Nextera XT¹, Illumina (PNL34)

Набір для секвенування Illumina Sequencing Kit	Навантаження ДНК (Мб)
MiSeq v2, 300	60
MiSeq v2, 500	80
MiSeq v3, 600 ² без <i>E. coli/Shigella/Vibrio</i>	200
MiSeq v3, 600 ⁽²⁾ <i>E. coli/Shigella/Vibrio</i>	175
MiSeq Micro, 300	35
MiSeq Nano, 500	13
Середній вихід MiniSeq	60
Високий вихід MiniSeq	100

¹Хімія 300 циклу неприйнятна для *Escherichia, Shigella* або *Vibrio*

²Рекомендується виконати 500 циклів для отримання кращих показників якості R2

Illumina DNA Prep (DNA Flex) (PNL35)

Набір для секвенування Illumina Sequencing Kit	Навантаження ДНК (Мб)
MiSeq v2 300	90
MiSeq v2 500	100
MiSeq v3 600 ¹ без <i>E. coli/Shigella/Vibrio</i>	200
MiSeq v3 600 ⁽¹⁾ <i>E. coli/Shigella/Vibrio</i>	175
Micro 300 без <i>E. coli/Shigella/Vibrio</i>	35
Micro 300 <i>E. coli/Shigella/Vibrio</i>	30
Nano 500	13
Nano 300 без <i>E. coli/Shigella/Vibrio</i>	13
Nano 300 <i>E. coli/Shigella/Vibrio</i>	10
Середній вихід MiniSeq	60
Високий вихід MiniSeq	100
iSeq <i>E. coli/Shigella/Vibrio</i>	25
iSeq без <i>E. coli/Shigella/Vibrio</i>	35
NextSeq 1000/2000 P1 300	400 ²

¹Рекомендується виконати 500 циклів для отримання кращих показників якості R2

²Валідація не завершена

QIAseq FX, Qiagen (PNL36)

Набір для секвенування Illumina Sequencing Kit	Навантаження ДНК (Мб)
MiSeq v2 300	80
MiSeq v2 500	100

KAPA HyperPlus, Roche (PNL37)

Набір для секвенування Illumina Sequencing Kit	Навантаження ДНК (Мб)
--	-----------------------

МІЖНАРОДНА СТАНДАРТНА ОПЕРАЦІЙНА ПРОЦЕДУРА PULSENET INTERNATIONAL ДЛЯ СЕРТИФІКАЦІЇ ПЕРСОНАЛУ, ЯКИЙ ЗАЙМАЄТЬСЯ ПОВНОГЕНОМНИМ СЕКВЕНУВАННЯМ

Док. Номер PNIQ01

Вер. No. 01

Дата набуття чинності:

Сторінка 10 від 14

MiSeq v2 300, без <i>E. coli/Shigella/Vibrio</i>	80
MiSeq v2 300, <i>E. coli/Shigella/Vibrio</i>	75
MiSeq v2 500	100

NEBNext Ultra II FS (PNL42)

Набір для секвенування Illumina Sequencing Kit	Навантаження ДНК (Мб)
MiSeq v2 300, без <i>E. coli/Shigella/Vibrio</i>	90
MiSeq v2 300, <i>E. coli/Shigella/Vibrio</i>	75
MiSeq v2 500	100

Illumina ДНК ПЛР-безкоштовна (PNL43)

Набір для секвенування Illumina Sequencing Kit	Навантаження ДНК (Мб)
MiSeq v2 300	90
MiSeq v2 500	100

PulseNet Rapid Prep (PNL44)

Набір для секвенування Illumina Sequencing Kit	Навантаження ДНК (Мб)
MiSeq v2 300	80
MiSeq v2 500	100

МІЖНАРОДНА СТАНДАРТНА ОПЕРАЦІЙНА ПРОЦЕДУРА PULSENET INTERNATIONAL ДЛЯ СЕРТИФІКАЦІЇ ПЕРСОНАЛУ, ЯКИЙ ЗАЙМАЄТЬСЯ ПОВНОГЕНОМНИМ СЕКВЕНУВАННЯМ

Док. Номер PNIQ01

Вер. No. 01

Дата набуття чинності:

Сторінка 11 від 14

Додаток PNIQ01-2: Приклад сертифікаційного звіту WGS Fastq

Ідентифікатор лабораторії - ПГС

Відділення лабораторії кишкових захворювань
CDC/NCEZID/DFWED

Звіт про сертифікацію файлів WGS Fastq
Міжнародні сертифікаційні штами PulseNet для
QA/QC



Сертифікаційний набір:

Набір для сертифікації PNI WGS Fastq:
*Ешерихії, сальмонели, лістерії,
кампілобактерії та вібріони*

Лабораторія, що подає файли:

Надано

Бібліотечний набір:

Тип секвенатора:

Дата передачі файлів Fastq

оцінювачу:

Fastq Імена файлів:

Штам кишкової палички ATCC-25922		
Статистика QC	Значення QC (прийнятне значення)	Коментарі
Середня якість	(≥ 30.0)	
Середнє охоплення	($\geq 40x$)	
Рід/вид/серотип	(<i>Escherichia coli</i> O6:H1)	
Середня довжина читання	(Хімія 300 циклу: ≥ 135 б.п.; Хімія 500 циклу: ≥ 225 б.п..)	
Чисельність вторинних видів	(≤ 0.01)	
Кількість hqSNPs порівняно з еталонним показником	(< 1/MB)	
Розмір зібраного геному	(5,14 МБ, 5% похибка 4,88-5,40)	

<i>Salmonella enterica</i> sp. <i>enterica</i> серовар Typhimurium штама ATCC-51812		
Статистика QC	Значення QC (прийнятне значення)	Коментарі
Середня якість	(≥ 30.0)	
Середнє покриття	($\geq 30x$)	
Рід/вид/серовар	(<i>Salmonella enterica</i> sp. <i>enterica</i> серовар Typhimurium)	
Середня довжина читання	(Хімія 300 циклу: ≥ 135 б.п.; Хімія 500 циклу: ≥ 225 б.п..)	
Чисельність вторинних видів	(≤ 0.01)	

МІЖНАРОДНА СТАНДАРТНА ОПЕРАЦІЙНА ПРОЦЕДУРА PULSENET INTERNATIONAL ДЛЯ СЕРТИФІКАЦІЇ ПЕРСОНАЛУ, ЯКИЙ ЗАЙМАЄТЬСЯ ПОВНОГЕНОМНИМ СЕКВЕНУВАННЯМ

Док. Номер PNIQ01

Вер. No. 01

Дата набуття чинності:

Сторінка 12 від 14

Кількість hqSNPs порівняно з еталонним показником	(< 1/МВ)	
Розмір зібраного геному	(4,94 МБ, 5% похибка 4,69-5,19)	

Штам <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC-ВАА679		
Статистика QC	Значення QC (прийнятне значення)	Коментарі
Середня якість	(≥ 30.0)	
Середнє покриття	($\geq 20x$)	
Рід/вид	(<i>Listeria monocytogenes</i>)	
Середня довжина читання	(Хімія 300 циклу: ≥ 135 б.п.; Хімія 500 циклу: ≥ 225 б.п.)	
Чисельність вторинних видів	(≤ 0.01)	
Кількість hqSNPs порівняно з еталонним показником	(< 1/МВ)	
Розмір зібраного геному	(2,91 МБ, 5% похибка 2,76-3,06)	

Штам <i>Campylobacter jejuni</i> ATCC-33560		
Статистика QC	Значення QC (прийнятне значення)	Коментарі
Середня якість	(≥ 30.0)	
Середнє покриття	($\geq 20x$)	
Рід/вид	(<i>Campylobacter jejuni</i>)	
Середня довжина читання	(Хімія 300 циклу: ≥ 135 б.п.; Хімія 500 циклу: ≥ 225 б.п.)	
Чисельність вторинних видів	(≤ 0.01)	
Кількість hqSNPs порівняно з еталонним показником	(< 1/МВ)	
Розмір зібраного геному	(1,73 МБ, 5% похибка 1,64-1,82)	

Штам <i>Vibrio parahaemolyticus</i> ATCC-17802		
Статистика QC	Значення QC (прийнятне значення)	Коментарі
Середня якість	(≥ 30.0)	
Середнє покриття	($\geq 40x$)	
Рід/вид	(<i>Vibrio parahaemolyticus</i>)	
Середня довжина читання	(Хімія 300 циклу: ≥ 135 б.п.; Хімія 500 циклу: ≥ 225 б.п.)	
Чисельність вторинних видів	(≤ 0.01)	
Кількість hqSNPs порівняно з еталонним показником	(< 1/МВ)	
Розмір зібраного геному	(5.06 МБ, 5% похибка 4.81-5.31)	

**МІЖНАРОДНА СТАНДАРТНА ОПЕРАЦІЙНА ПРОЦЕДУРА PULSENET INTERNATIONAL ДЛЯ
СЕРТИФІКАЦІЇ ПЕРСОНАЛУ, ЯКИЙ ЗАЙМАЄТЬСЯ ПОВНОГЕНОМНИМ СЕКВЕНУВАННЯМ**

Док. Номер PNIQ01

Вер. No. 01

Дата набуття чинності:

Сторінка 13 від 14

Результат сертифікації QA/QC:

Файли *Escherichia* Fastq: **Задовільно** Потребує покращення

Файли *сальмонели* Fastq: **Задовільно** Потребує покращення

Файли *Listeria* Fastq: **Задовільно** Потребує покращення

Файли *Campy* Fastq: **Задовільно** Потребує покращення

Файли *Vibrio* Fastq: **Задовільно** Потребує покращення

Сертифікація дійсна до тих пір, поки лабораторія успішно проходить щорічні кваліфікаційні випробування.

МІЖНАРОДНА СТАНДАРТНА ОПЕРАЦІЙНА ПРОЦЕДУРА PULSENET INTERNATIONAL ДЛЯ СЕРТИФІКАЦІЇ ПЕРСОНАЛУ, ЯКИЙ ЗАЙМАЄТЬСЯ ПОВНОГЕНОМНИМ СЕКВЕНУВАННЯМ

Док. Номер PNIQ01

Вер. No. 01

Дата набуття чинності:

Сторінка 14 від 14

Додаток PNIQ01-3 : Порогові значення критичних показників якості/допустимі діапазони для сертифікації PulseNet

Організм	Середня довжина зчитування (біт) ¹	Різниця hqSNP порівняно з еталоном	Середнє покриття depono ²	Середня якість ³	Довжина збірки (МБ) ⁴	Чисельність вторинних видів	% Ядро присутнє ⁵	Різниця алелів порівняно з еталоном ⁵
<i>Listeria monocytogenes</i>	135/225	< 1/MB	≥ 20x	≥ 30	2.8-3.2	≤ 1.0	≥ 95	≤ 3
<i>Escherichia coli</i>	135/225	< 1/MB	≥ 40x	≥ 30	4.9-6.0	≤ 1.0	≥ 85	≤ 3
<i>Salmonella enterica</i>	135/225	< 1/MB	≥ 30x	≥ 30	4.4-5.7	≤ 1.0	≥ 85	≤ 3
<i>Campylobacter jejuni</i>	135/225	< 1/MB	≥ 20x	≥ 30	1.4-2.2	≤ 1.0	≥ 85	≤ 3
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	135/225	< 1/MB	≥ 40x	≥ 30	4.9-5.5	≤ 1.0	NA ⁶	NA ⁶

¹Середнє значення для довжини зчитування R1 та R2 до обрізання.

²Після якісного обрізання.

³Середнє значення для R1 і R2 Q оцінок до обрізання.

⁽⁴⁾ Наведені в таблиці довжини збірок послідовностей застосовуються до всього виду. Для сертифікації fastq довжина збірки залежить від штаму на основі референтної послідовності, згенерованої CDC, з похибкою ±5%.

⁵Не поширюється на послідовності, проаналізовані за допомогою Terra.Bio.

⁶Схема cgMLST для *Vibrio* все ще розробляється.