1. **ЦЕЛЬ:** Описать процедуру сертификации персонала для обеспечения полного участия в деятельности PulseNet International WGS.

2. **ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ:** Эта процедура применяется ко всему персоналу PulseNet, генерирующему данные последовательности для действий по наблюдению в сети PulseNet International, и ограничивается только процессами мокрой лаборатории.

3. **ОПРЕДЕЛЕНИЯ/ТЕРМИНЫ:**

3.1 Аллель: одна из двух или более альтернативных форм гена, которые возникают в результате мутации и находятся в одном и том же месте на хромосоме.
3.2 APHL: Ассоциация лабораторий общественного здравоохранения .
3.3 ATCC: Американская коллекция типовых культур. Некоммерческая организация, которая собирает, хранит и распространяет стандартные эталонные микроорганизмы, клеточные линии и другие материалы для исследований и разработок.
3.4 BaseSpace: облачная вычислительная среда Illumina для анализа и управления данными секвенирования следующего поколения, включая совместное использование данных.
3.5 CDC: Центры по контролю и профилактике заболеваний, Атланта, штат Джорджия, США
3.6 cgMLST : Типизация мультилокальной последовательности ядра генома.
3.7 Оценщик файлов сертификации: лицо, которое оценивает файлы сертификации.
3.8 Файлы сертификации: файлы Fastq, представленные участниками PulseNet для оценки сертификации WGS.
3.9 Основной геном: гены, общие для подавляющего большинства (например, >98% всех штаммов *Listeria monocytogenes*) штаммов одного и того же вида.
3.10 Охват: среднее количество считываний, которое включает данный нуклеотид в реконструированной последовательности.
3.11 Критические показатели качества: средний охват de novo, среднее качество (оценка Q), длина сборки, численность вторичных видов (загрязнение), процент присутствия основного генома, разница аллелей и hqSNP по сравнению с эталоном и средняя длина считывания. Несоблюдение любого из этих показателей приведет к отклонению подачи сертификата.
3.12 Сборка De Novo: Сборка последовательностей, полученная из коротких считываний RAW без использования эталонного генома.
3.13 ДНК : дезоксирибонуклеиновая кислота.
3.14 FASTQ: текстовый формат для хранения как биологической последовательности, так и соответствующих ей показателей качества.
3.15 Сертификация Fastq: лицо, сертифицированное по лабораторным методам WGS для получения данных секвенирования.
3.16 FTP: протокол передачи файлов; стандартный сетевой протокол, используемый для передачи компьютерных файлов с одного хоста на другой хост через Интернет.
3.17 Gzip: Формат файла и программное приложение, используемое для сжатия и распаковки файлов для быстрой передачи данных через Интернет.
3.18 hqSNP : Высококачественный однонуклеотидный полиморфизм .

3.19 Lyve-SET: метод hqSNP, разработанный Katz *et al.* (2017), используемый Лабораторией кишечных заболеваний, CDC, и внедренный в качестве рабочего процесса в Terra.Bio (Theiagen, Highlands Ranch, CO, USA).

3,20 МБ: мега-база .

3.21 PNI : Организация PulseNet International

3.22 PT: Проверка квалификации.

3.23 ОК/КК: Обеспечение качества/ контроль качества

3.24 Оценка Q: оценка качества для каждой отдельной базовой позиции в последовательности, указывающая на точность распознавания. Используются баллы Phred, где Q = -10log (вероятность ошибки). Чем выше показатель качества, тем надежнее распознавание базовых пар. Q30 означает вероятность 1 к 1000 неправильного распознавания в этой позиции.

3.25 Чтение: Единица непрерывной последовательности ДНК (на основе пар), полученная путем секвенирования части фрагментированной ДНК-мишени

3.26 СОП: Стандартная операционная процедура.

3.27 Terra.Bio: Облачная платформа для анализа последовательностей, разработанная Широким институтом Массачусетского технологического института и Гарвардским университетом и используемая Theiagen Genomics (ранчо Хайлендс, штат Колорадо, США), чтобы предложить бесплатную общую платформу для лабораторий общественного здравоохранения для размещения, анализа и обмена данными (Libuit *et al.,* 2023).

3.28 TSV: Значения, разделенные табуляцией.

3.29 Отчет о сертификации WGS : Отчет, содержащий оценку и результаты файлов сертификации участника программы WGS.

3.30 WGS: Полногеномное секвенирование

4. ОТВЕТСТВЕННОСТЬ:

4.1 Лица, выполняющие работу, связанную с PulseNet International WGS, должны представить файл(ы) сертификации и получить их одобрение, прежде чем иметь возможность генерировать данные последовательности для эпиднадзора PulseNet

4.1.1 Сертификация служит начальной оценкой компетентности вновь обученного персонала. Представленные файлы сертификации должны подтверждать наивысший уровень компетентности отправителя в создании необработанных данных последовательности.

4.1.2 Лица могут быть сертифицированы на *Salmonella*, *Escherichia/Shigella*, *Listeria, Campylobacter*и *Vibrio*.

4.2 Лаборатория считается сертифицированной PulseNet, если хотя бы один человек в лаборатории прошел сертификацию хотя бы для одного организма

4.2.1 Чтобы сохранить свой статус сертификации PulseNet, лаборатория должна участвовать и успешно проходить ежегодный тест на квалификацию (подробную информацию см. в СОП PNIQ02)

5. ПРОЦЕДУРА:

5.1 Участники PulseNet International приобретают лабораторный сертификационный штамм WGS для организмов, которые они хотят сертифицировать (если у них их еще нет), у ATCC (https://www.atcc.org).

5.1.1 Набор для лабораторной сертификации WGS включает *Campylobacter*, *Escherichia, Listeria, Salmonella* и *Vibrio*

Род/вид	Серотип	Номер ATCC	Обозначение штамма	Цена (долл. США)[2]
Campylobacter jejuni	Н/П	ATCC 33560	CIP-702	$ 269,00
Escherichia coli[1]	O6:H1	ATCC 25922	FDA штамм Сиэтл 1946	$77.00
Listeria monocytogenes	Линия II	ATCC BAA-679	EGDe	$431.00
Salmonella enterica	Typhimurium	ATCC 51812	U24	$431.00
Vibrio parahaemolyticus	O3:K6	ATCC 17802	EB101 (P. Baumann 113)	$77.00
Итого				**$1285.00**

Таблица 1. Штаммы ATCC, включенные в панель сертификации PNI

[1] Охватывает также сертификацию для *Shigella* spp.

[2] Лиофилизированный препарат; цены по прейскуранту для США (октябрь 2023 г.). Ценообразование будет зависеть от пункта назначения доставки и в некоторых случаях будет значительно выше, чем указано в таблице.

5.1.2 Перейдите на веб-сайт ATCC, чтобы создать учетную запись/профиль, чтобы получить точную цену и оформить заказ: https://www.atcc.org/web-profile/create-a-web-profile

5.2 Заморозьте (-70°C) или запасите сертификационные штаммы в соответствии с политикой вашей лаборатории в течение одной недели после их получения, чтобы гарантировать, что ваша лаборатория будет иметь стандартные культуры этой сертификации PNI для будущего использования, включая сертификацию PulseNet дополнительного персонала. Избегайте многократных проходов и циклов замораживания/размораживания для замороженных культур.

5.3 Последовательность штаммов в соответствии с методами, принятыми PulseNet:

5.3.1 Любой метод экстракции ДНК, производящий ДНК, который соответствует минимальным требованиям к качеству, изложенным в СОП PulseNet PNL33, является приемлемым

5.3.2 Приемлемыми наборами для подготовки библиотеки являются следующие: Illumina Nextera XT (PNL34), Illumina DNA Prep (PNL35, PNL44), Qiagen QIAseq FX (PNL36), KAPA HyperPlus (PNL37), NEBNext Ultra II FS (PNL42) и Illumina DNA PCR-Free (PNL43).

ПРИМЕЧАНИЕ: ***библиотечные препараты от автоматических систем для работы с жидкостями не принимаются.***

5.3.3 Приемлемыми платформами для секвенирования являются следующие: Illumina MiSeq (PNL38), Illumina MiniSeq (PNL39), Illumina iSeq (PNL40) и Illumina NextSeq. **ПРИМЕЧАНИЕ:** ***химия секвенирования (длины считывания) ниже 2x150 п.о. не принимается***.

5.3.3.1 Пожалуйста, следуйте рекомендуемым нагрузкам генома, изложенным в Приложении PNIQ01-1. Допустимо включать обычные изоляты в один и тот же цикл секвенирования с сертификационными штаммами.

5.3.3.2 Убедитесь, что выходные файлы fastq имеют **формат** .fastq.gz

5.4 Поделитесь файлами сертификации fastq.gz с оценщиком файлов сертификации

5.4.1 **Лаборатории, использующие Terra.Bio для анализа последовательности:**

5.4.1.1 Свяжитесь с Theiagen(michelle.scribner@theiagen.com; frank.ambrosio@theiagen.com), чтобы получить доступ к рабочей области оценки качества PNI: https://app.terra.bio/#workspaces/theiagen-validations/PNI_Eval_Workspace/data

5.4.1.2 Подготовьте файлы для загрузки в рабочую область оценки качества PNI:

5.4.1.2.1Сохраните файлы сертификации fastq.gz в папку локального диска

5.4.1.2.2Подготовьте файл листа метаданных .tsv для сертификационных образцов, используя следующие соглашения о наименовании:

5.4.1.2.2.1 Соглашение о наименовании таблицы данных:

entity: NameOfInstitution_illuminaPE_ide.g

.: entity:USA_CDC_illuminaPE_id

5.4.1.2.2.1.1 Имя таблицы данных должно включать название вашего учреждения вместо курсива в приведенном выше примере. В названии не должно быть пробелов или специальных символов, за исключением подчеркивания («_»). Включите всю эту строку (от сущности e in до d in _id) в ячейку 1A электронной таблицы метаданных.

ПРИМЕЧАНИЕ: *поставьте идентификатор страны перед названием учреждения, если название учреждения совпадает в двух странах, например, CDC USA и CDC Taiwan (USA_CDC; TW_CDC).*

5.4.1.2.2.2 Соглашение о наименовании образцов

: **SampleIdentifier**_ *NameOfInstitution_InitialsOfTechniciane.g.*

: ATCC_33560_USA_CDC_et

ПРИМЕЧАНИЕ: *поставьте идентификатор страны перед названием учреждения, если название учреждения совпадает в двух странах, например, CDC USA и CDC Taiwan (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				

Рис. 1. Снимок экрана TSV-файла метаданных, открытого в Excel

5.4.1.3 Загрузите файлы fastq.gz и файл метаданных .tsv в рабочую область оценки QA PNI.

5.4.1.4 Опционально: Запустите рабочий процесс «TheiaProk_Illumina_PE_PHB» в файлах сертификации.

5.4.2 **Лаборатории, не использующие Terra.Bio, но использующие Illumina BaseSpace:**

5.4.2.1 Файлы fastq.gz должны быть названы с использованием стандартного соглашения об именовании файлов PulseNet: SampleIdentifyer-InitialsOfTecnician-NameOfInstitution-IlluminaInstrumentID-RunStartDate, например, ATCC-33560-et-USA-CDC-M3235-231031.

ПРИМЕЧАНИЕ: *поставьте идентификатор страны перед названием учреждения, если название учреждения совпадает в двух странах, например, CDC USA и CDC Taiwan (USA_CDC; TW_CDC)*.

5.4.2.1.1 Идентификаторы приборов Illumina обычно представлены в следующих форматах:

5.4.2.1.1.1 MiSeq MXXXX

5.4.2.1.1.2 MiniSeq MNXXXX

5.4.2.1.1.3 iSeq FSXXXX

5.4.2.1.1.4 NextSeq VHXXXXX/VLXXXXX/NBXXXXX/NSXXXXX

5.4.2.1.2 Формат даты начала постановки: ГодМесяцДата (YYMMDD)

5.4.2.2 Поделитесь **проектом** , содержащим файлы сертификации fastq, с pulsenetngslab@cdc.gov, указанным в качестве участника в отдельном проекте BaseSpace, предназначенном для сертификации.

5.4.2.2.1Назовите проект, используя следующее соглашение об именовании: NameOfInstitution_Certification, например, USA_CDC_Certification

ПРИМЕЧАНИЕ: *поставьте идентификатор страны перед названием учреждения, если название учреждения совпадает в двух странах, например, CDC USA и CDC Taiwan (USA_CDC; TW_CDC)*.

5.4.2.3 Поделитесь циклом, содержащим образцы сертификации, с пользователем pulsenetngslab@cdc.gov, указанным в качестве участника.

5.4.3 **Лаборатории, не использующие Terra.Bio или BaseSpace:**

5.4.3.1 Свяжитесь с pulsenetngslab@cdc.gov, чтобы получить инструкции по загрузке файлов fastq.gz на сайт PulseNet QA ftp

5.4.4 Сообщите специалисту по оценке файлов сертификации о наличии файлов сертификации по электронной почте pulsenetngslab@cdc.gov

5.4.4.1 Используйте строку темы: Сертификация PNI – *NameOfInstitution*

5.4.4.2 Включите следующую информацию в тело письма:

5.4.4.2.1 Имя и адрес электронной почты аналитика, который выполнял подготовку и секвенирование библиотеки

5.4.4.2.2 Комплект для подготовки библиотеки, используемый для создания файлов сертификации

5.4.4.2.3 Используемая платформа секвенирования генерирует файлы сертификации

5.4.4.2.4 При совместном использовании в BaseSpace: список представленных имен файлов и имя проекта, в котором были размещены файлы

5.5 Заявители получат Отчет о сертификации WGS, обобщающий результаты оценки их файлов сертификации (см. Приложение PNIQ01-2 для примера Отчета о сертификации WGS).

5.5.1 Файлы сертификатов Fastq оцениваются на основе критериев, изложенных в Приложении PNIQ01-3.

5.5.2 Если представленные сертификационные файлы проходят сертификационную оценку, заявитель считается сертифицированным до тех пор, пока он остается в своей текущей лаборатории, и эта лаборатория успешно проходит ежегодное тестирование квалификации (СОП PNIQ02). Все лица, сертифицированные FastQ, должны выполнять рутинное секвенирование не реже одного раза в шесть месяцев.

5.5.3 Если представленные файлы сертификации не проходят сертификационную оценку, лицу необходимо будет просмотреть комментарии по устранению неполадок, полученные от оценщика, и повторно отправить их после улучшения результатов

5.5.3.1 Если заявитель трижды не прошел сертификацию, ему не будет разрешено подавать заявку снова в течение шести месяцев. Перед повторной отправкой сотрудник должен будет работать со своей координирующей лабораторией до тех пор, пока не будут достигнуты удовлетворительные результаты. Это включает, помимо прочего, устранение неисправностей и обучение протоколам PulseNet WGS.

6. БЛОК СХЕМА:

7. СООТВЕТСТВУЮЩИЕ ДОКУМЕНТЫ:

7.1. Доступно по адресу https://www.aphl.org/programs/food_safety/Pages/PulseNet-International-SOPs.aspx

Номер документа	Название
PNL33	**СОП по экстракции ДНК и контролю качества**
PNL34	**СОП по подготовке библиотеки Illumina Nextera XT**
PNL35	**СОП по подготовке библиотеки для подготовки ДНК Illumina**
PNL36	**СОП по подготовке библиотеки Qiagen QIAseq FX**
PNL37	**СОП по подготовке библиотеки KAPA HyperPlus**
PNL38	**СОП по секвенированию на апарате MiSeq**
PNL39	**СОП по секвенированию на апарате MiniSeq**
PNL40	**СОП по секвенированию на апарате iSeq**
PNL42	**СОП по подготовке библиотеки NEBNext FS Ultra II SOP**
PNL43	**СОП по подготовке библиотеки Illumina DNA PCR-Free**
PNL44	**СОП для быстрой подготовки библиотеки PulseNet**
PNQ07	**СОП Illumina Sequence Data QC**

8. ЛИТЕРАТУРА:

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. КОНТАКТЫ:

9.1 Лаборатория CDC USA PulseNet NGS Laboratory: pulsenetngslab@cdc.gov

9.2 Международный координатор по обеспечению качества PulseNet Eija Trees: ehyytia-trees@cdc.gov

9.3 Theiagen:

9.3.1 Мишель Скрибнер: michelle.scribner@theiagen.com

9.3.2 Фрэнк Амброзио: frank.ambrosio@theiagen.com

10. ПОПРАВКИ: НЕТ ДАННЫХ

11. УТВЕРЖДАЮЩИЕ ПОДПИСИ:

Утверждено:_____ Дата: _____
Персонал ОК/КК PulseNet

Утверждено: _____ Дата: _____
Технический руководитель PulseNet WGS

Утверждено: _____ Дата: _____
Международный координатор PulseNet

Утверждено: _____ Дата: _____
Руководитель группы по реагированию и борьбе со вспышками PulseNet

Утверждено: _____ Дата: _____
Заведующий лабораторией кишечных болезней

Приложение PNIQ01-1: Приемлемые наборы для подготовки библиотек, платформы для секвенирования, химия секвенирования и валидированные емкости для загрузки ДНК

Nextera XT1, Illumina (PNL34)

Комплект для секвенирования Illumina	Загрузка ДНК (Мб)
MiSeq v2, 300	60
MiSeq v2, 500	80
MiSeq v3, 600[2] no *E. coli/Shigella/Vibrio*	200
MiSeq v3, 6002 *E. coli/Shigella/Vibrio*	1
MiSeq Micro, 300	35
MiSeq Nano, 500	13
MiniSeq Mid Output	60
MiniSeq High Output	100

[1] Химия 300 циклов не приемлема для *Escherichia, Shigella* или *Vibrio*
[2] Рекомендовано выполнить 500 циклов для улучшения показателей качества R2

Illumina DNA Prep (DNA Flex) (PNL35)

Комплект для секвенирования Illumina	Загрузка ДНК (Мб)
MiSeq v2, 300	90
MiSeq v2, 500	100
MiSeq v3 600[1] no *E. coli/Shigella/Vibrio*	200
MiSeq v3 600[1] *E. coli/Shigella/Vibrio*	175
Micro 300 no *E. coli/Shigella/Vibrio*	35
Micro 300 *E. coli/Shigella/Vibrio*	30
Nano 500	13
Nano 300 no *E. coli/Shigella/Vibrio*	13
Nano 300 *E. coli/Shigella/Vibrio*	10
MiniSeq Mid Output	60
MiniSeq High Output	100
iSeq *E. coli/Shigella/Vibrio*	25
iSeq no *E. coli/Shigella/Vibrio*	35
NextSeq 1000/2000 P1 300	400[2]

[1] Рекомендовано выполнить 500 циклов для улучшения показателей качества R2
[2] Валидация не завершена

QIAseq FX, Qiagen (PNL36)

Комплект для секвенирования Illumina	Загрузка ДНК (Мб)
MiSeq v2, 300	80
MiSeq v2, 500	100

KAPA HyperPlus, Roche (PNL37)

Комплект для секвенирования Illumina	Загрузка ДНК (Мб)
MiSeq v2 300, no *E. coli/Shigella/Vibrio*	80
MiSeq v2 300, *E. coli/Shigella/Vibrio*	75
MiSeq v2, 500	100

NEBNext Ultra II FS (PNL42)

Комплект для секвенирования Illumina	Загрузка ДНК (Мб)
MiSeq v2 300, *без E. coli/Shigella/Vibrio*	90
MiSeq v2 300, *E. coli/Shigella/Vibrio*	75
MiSeq v2, 500	100

Illumina DNA PCR-Free (PNL43)

Комплект для секвенирования Illumina	Загрузка ДНК (Мб)
MiSeq v2, 300	90
MiSeq v2, 500	100

Быстрая подготовка PulseNet

Комплект для секвенирования Illumina	Загрузка ДНК (Мб)
MiSeq v2, 300	80
MiSeq v2, 500	100

Приложение PNIQ01-2: Пример отчета о сертификации WGS Fastq

Идентификатор лаборатории – WGS

Лабораторное отделение кишечных болезней
CDC/NCEZID/DFWED
Отчет о сертификации файлов WGS Fastq
Международные сертификационные штаммы
PulseNet для ОК/КК

Набор для сертификации: Набор для сертификации PNI WGS Fastq: *Escherichia, Salmonella, Listeria, Campylobacter* и *Vibrio*

Отправка лабораторных файлов:

Направлено:

Набор для подготовка библиотеки:

Тип секвенсора:

Файлы Date Fastq Files направлены оценщику:

Имена файлов Fastq:

***Escherichia coli* штамм ATCC-25922**		
Статистика КК	**Значение КК (приемлемое значение)**	**Комментарии**
Среднее качество	(≥ 30.0)	
Средний охват	(≥ 40x)	
Род/вид/серотип	(*Escherichia coli* O6:H1)	
Средняя длина считывания	(300 циклов химии: ≥ 135 п.о.; 500 циклов химии: ≥ 225 п.о.)	
Численность вторичных видов	(≤ 0.01)	
Количество hqSNPs по сравнению с эталоном	(< 1/МБ)	
Размер собранного генома	(5,14 МБ, погрешность 5% 4,88-5,40)	

***Salmonella enterica* sp. *enterica* серовар Typhimurium штамм ATCC-51812**		
Статистика КК	**Значение КК (приемлемое значение)**	**Комментарии**
Среднее качество	(≥ 30.0)	
Средний охват	(≥ 30x)	
Род/вид/серовар	(*Salmonella enterica* sp. *enterica* серовар Typhimurium)	
Средняя длина считывания	(300 циклов химии: ≥ 135 п.о.; 500 циклов химии: ≥ 225 п.о.)	

Численность вторичных видов	(≤ 0.01)	
Количество hqSNPs по сравнению с эталоном	(< 1/ МВ)	
Размер собранного генома	(4,94 МБ, погрешность 5% 4,69-5,19)	

***Штамм Listeria monocytogenes* ATCC-BAA679**		
Статистика КК	**Значение КК (приемлемое значение)**	**Комментарии**
Среднее качество	(≥ 30.0)	
Средний охват	(≥ 20x)	
Род/вид	*(Listeria monocytogenes)*	
Средняя длина считывания	(300 циклов химии: ≥ 135 п.о.; 500 циклов химии: ≥ 225 п.о.)	
Численность вторичных видов	(≤ 0.01)	
Количество hqSNPs по сравнению с эталоном	(< 1/МБ)	
Размер собранного генома	(2,91 МБ, погрешность 5% 2,76-3,06)	

Штамм *Campylobacter jejuni* ATCC-33560		
Статистика КК	**Значение КК (приемлемое значение)**	**Комментарии**
Среднее качество	(≥ 30.0)	
Средний охват	(≥ 20x)	
Род/вид	*(Campylobacter jejuni)*	
Средняя длина считывания	(300 циклов химии: ≥ 135 п.о.; 500 циклов химии: ≥ 225 п.о.)	
Численность вторичных видов	(≤ 0.01)	
Количество hqSNPs по сравнению с эталоном	(< 1/МБ)	
Размер собранного генома	(1,73 МБ, погрешность 5% 1,64-1,82)	

Штамм *Vibrio parahaemolyticus* ATCC-17802		
Статистика КК	**Значение КК (приемлемое значение)**	**Комментарии**
Среднее качество	(≥ 30.0)	
Средний охват	(≥ 40x)	
Род/вид	*(Vibrio parahaemolyticus)*	
Средняя длина считывания	(300 циклов химии: ≥ 135 п.о.; 500 циклов химии: ≥ 225 п.о.)	
Численность вторичных видов	(≤ 0.01)	
Количество hqSNPs по сравнению с эталоном	(< 1/МБ)	
Размер собранного генома	(5,06 МБ, погрешность 5% 4,81-5,31)	

Результат сертификации ОК/КК:

Файлы *Escherichia* Fastq: **Удовлетворительно Требует улучшения**

Файлы *Salmonella* Fastq: **Удовлетворительно Требует улучшения**

Файлы *Listeria* Fastq: **Удовлетворительно Требует улучшения**

Файлы *Campy* Fastq: **Удовлетворительно Требует улучшения**

Файлы *Vibrio* Fastq: **Удовлетворительно Требует улучшения**

Сертификация действительна до тех пор, пока лаборатория успешно проходит ежегодные квалификационные испытания.

Приложение PNIQ01-3: Критические пороговые значения показателей качества/допустимые диапазоны для сертификации PulseNet

Организм	Средняя длина считывания (п.о.)[1]	разность hqSNP по сравнению с эталоном	Средний охват denovo[2]	Среднее качество[3]	Длина сборки (МБ)[4]	Численность вторичных видов	% присутствия основы[5]	Разница аллелей по сравнению с эталоном[5]
Listeria monocytogenes	135/225	< 1/МБ	≥ 20x	≥ 30	2.8-3.2	≤ 1.0	≥ 95	≤ 3
Escherichia coli	135/225	< 1/МБ	≥ 40x	≥ 30	4.9-6.0	≤ 1.0	≥ 85	≤ 3
Salmonella enterica	135/225	< 1/МБ	≥ 30x	≥ 30	4.4-5.7	≤ 1.0	≥ 85	≤ 3
Campylobacter jejuni	135/225	< 1/МБ	≥ 20x	≥ 30	1.4-2.2	≤ 1.0	≥ 85	≤ 3
Vibrio parahaemolyticus	135/225	< 1/МБ	≥ 40x	≥ 30	4.9-5.5	≤ 1.0	НД[6]	НД[6]

[1]Средняя для R1 и R2 длина считывания перед обрезкой
[2]После обрезки по качеству
[3]Среднее значение Q для R1 и R2 до обрезки
[4]Длины сборки последовательности, перечисленные в таблице, относятся ко всему виду. Для сертификации Fastq длины сборки зависят от штамма на основе эталонной последовательности, сгенерированной Центром CDC с погрешностью ± 5%.
[5]Не относится к последовательностям, проанализированным с помощью Terra.Bio.
[6]Схема cgMLST для *Vibrio* все еще находится в стадии разработки.