

Automatisierungslösungen für die Surveillance im Bereich Lebensmittelsicherheit mit der MiSeq™ i100 Series

Hochgradig einheitliche Bibliotheken und
hochwertige Daten für den Nachweis durch
Lebensmittel übertragener Pathogene

Weniger manueller
Aufwand

Konsistente,
zuverlässige
Performance

Umfassende
Coverage
bakterieller Genome

Einleitung

Die Gewährleistung der Lebensmittelsicherheit trägt wesentlich zur öffentlichen Gesundheit bei. Lebensmittelbedingte Erkrankungen im Zusammenhang mit einer mikrobiellen Kontamination durch pathogene Bakterien stellen eine erhebliche Gefahr für die Humangesundheit dar. Insbesondere **REP-Bakterienstämme (Recurring, Emerging, Persisting; wiederholt auftretend, neu auftretend, persistierend)**, einschließlich pathogener *E. coli*, *Listeria*, *Campylobacter*, *Shigella* und *Salmonella*, können periodisch akute Ausbrüche verursachen.^{1,2}

Die Verwendung von Labormethoden zur Subtypisierung von Enterobacteriaceae, einschließlich *Salmonella*, war entscheidend für die Ermittlung potenzieller Ausbrüche und die Verknüpfung von durch Bakterien verursachten Erkrankungen mit Ausbruchsquellen. In den USA verhindert die landesweite molekularbiologische Surveillance mithilfe von NGS (Next-Generation Sequencing, Sequenzierung der nächsten Generation) jährlich über 250.000 Erkrankungen durch enterische Bakterien und spart eine halbe Milliarde US-Dollar an Kosten für Behandlungen und Produktivitätsverluste ein.^{3,4}

Während die Genomsequenzierung (WGS, Whole-Genome Sequencing) auf Basis von NGS Mikrobiologielaboren erhebliche Vorteile bei Geschwindigkeit, Genauigkeit und Informationstiefe bietet, stellt die Bibliotheksvorbereitung weiterhin einen Engpass dar. Durch die Automatisierung der Bibliotheksvorbereitung anhand eines Liquid-Handling-Systems werden bei verringertem manuellen Aufwand und geringerem Potenzial für Bedienungsfehler einheitliche Bibliotheken generiert.⁵

In diesem technischen Hinweis wird die Performance eines umfassenden NGS-Workflows dargestellt, der drei Optionen zur Automatisierung der Bibliotheksvorbereitung mithilfe von Illumina DNA Prep mit der Sequenzierung auf der MiSeq i100 Series und der Analyse mit DRAGEN™-Software für eine effiziente und genaue Surveillance im Bereich Lebensmittelsicherheit vereint (**Abbildung 1**).⁶

Methoden

Proben

32 *Salmonella enterica*-Isolate, die im Rahmen der PulseNet-Routinesurveillance⁷ entnommen wurden, wurden auf BBL Blood Agar Base (ohne Zugabe von Blut) (BD, Katalog-Nr. 211037) kultiviert. Genomische DNA (gDNA) wurde mit dem Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega, Katalog-Nr. A1120) mit leicht abgeändertem Protokoll zur Isolierung von gDNA aus gramnegativen Bakterien extrahiert.⁸ Gereinigte gDNA wurde mit dem Qubit dsDNA BR Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Katalog-Nr. Q32853) vor der Bibliotheksvorbereitung quantifiziert.

Bibliotheksvorbereitung

Für die Sequenzierung geeignete Bibliotheken wurden in dreifacher Ausfertigung mit drei Optionen für automatisierte Lösungen und einer manuellen Option für Illumina DNA Prep (Illumina, Katalog-Nr. 20060059) vorbereitet. 100 ng extrahierte gDNA pro Probe wurden zur Normalisierung des Bibliotheksergebnisses als Zugabe verwendet. Zur Optimierung der Insert-Größe auf der MiSeq i100 Series wurde ein zusätzlicher Bead-Reinigungsdurchgang mit einem Bead-Proben-Verhältnis von 0,5-fach durchgeführt, um kurze Inserts zu entfernen.⁹ Die drei evaluierten Automatisierungslösungen waren das **Biomek NGenius Next Generation Library Prep System** (Beckman Counter, Katalog-Nr. C62), die **Biomek i7 Automated Workstation** (Beckman Coulter, Katalog-Nr. B87585) und die **Firefly-Plattform** (SPT Labtech) (**Tabelle 1**).

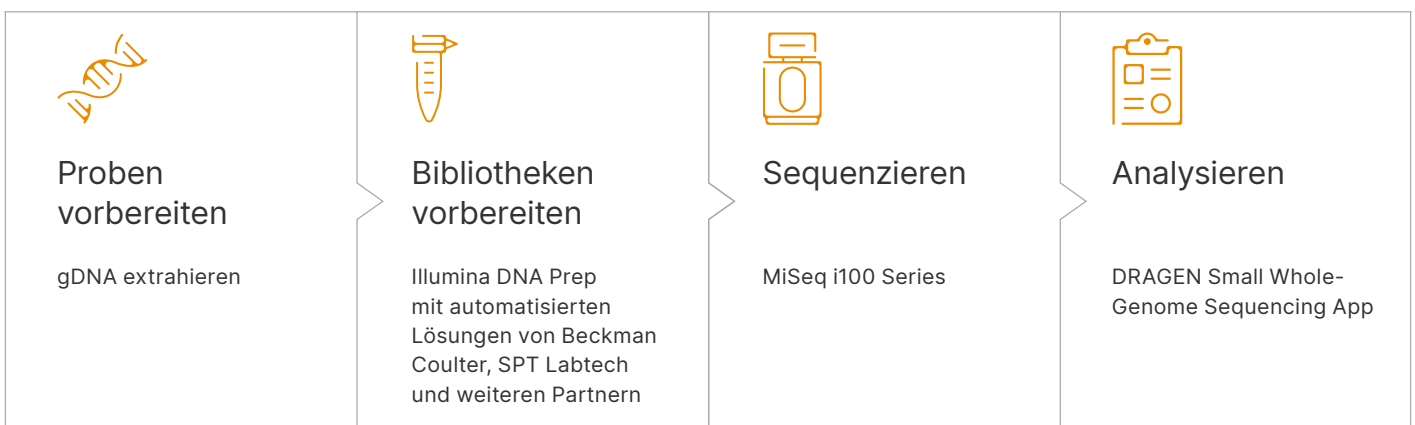


Abbildung 1: Umfassender NGS-Workflow für den *Salmonella*-Nachweis

Die Kombination aus automatisierten Lösungen für die Illumina-Bibliotheksvorbereitung mit der Sequenzierung auf der MiSeq i100 Series und der DRAGEN-Sekundäranalyse ermöglicht die genaue Surveillance durch Lebensmittel übertragener *Salmonella*.

Die Qualität und Konzentration der PCR-amplifizierten (Polymerase Chain Reaction, Polymerase-Kettenreaktion) Bibliotheken wurden mit dem TapeStation System 4200 (Agilent Technologies, Katalog-Nr. G2991BA) und dem Qubit 1X dsDNA High Sensitivity (HS) Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Katalog-Nr. Q33231) vor dem Poolen bestimmt.

Sequenzierung

Vorbereitete Bibliotheken wurden nach Volumen gepoolt und auf eine Ladekonzentration von 60 pM (32 Bibliotheken/Lauf) verdünnt. Die Sequenzierung wurde auf dem MiSeq i100 Plus System mit einer 25M-Fließzelle und einer Laufkonfiguration von 2 × 301 bp durchgeführt. Für größere Studien lassen sich Sequenzierumläufe auf das NextSeq™ 1000 System, das NextSeq 2000 System oder das NovaSeq™ 6000 System hochskalieren.

Datenanalyse

Im Anschluss an die Sequenzierung wurden die Daten an BaseSpace™ Sequence Hub gestreamt und mit dem FASTQ Toolkit (v2.2.6) einem Downsampling auf 700.000 Paired-End(PE)-Reads unterzogen. Die Analyse wurde mit der DRAGEN Small Whole-Genome Sequencing (sWGS) App (v4.3.13) durchgeführt. Hierbei wurden die Genom-Coverage, Metriken zur medianen Tiefe und zusätzliche Assaymetriken ermittelt.

Ergebnisse

Sequenzierungsmetriken

Mit dem MiSeq i100 Plus System wurden Sequenzierungsdaten mit durchschnittlich $\geq 96,5$ % der Basen über Q30 und ≥ 75 % Reads nach Filterung (PF, Passing Filter) generiert ([Tabelle 2](#)). Die Konzentration der mit automatisierten und manuellen Methoden vorbereiteten Bibliotheken war vergleichbar ([Abbildung 2A](#)).

Tabelle 1: Assay-Zeit mit manuellen und automatisierten Methoden zur Bibliotheksvorbereitung

Methode ^a	Automatisierungsdauer	Manueller Aufwand	Assay-Zeit insgesamt
Manuell	n. z.	60–90 min	ca. 4–4,5 h
Biomek NGenius	21 h 45 min	ca. 45 min	ca. 21 h 45 min ^b
Biomek i7	ca. 4 h 30 min	ca. 20–24 min	ca. 4 h 34 min
SPT firefly	3 h 8 min	ca. 20–22 min	ca. 3 h 28 min

a. 96 Proben pro Lauf.
b. Die Laufzeit von Biomek NGenius zur Verarbeitung von 24 Proben beträgt 7 h 15 min.

Die Werte für den prozentualen Anteil demultiplexierter Reads, d. h. der Anteil an der Gesamtzahl der Reads, die einer Probe anhand ihres Barcodes zugeordnet werden konnten, sind vergleichbar. Der Variationskoeffizient (CV, Coefficient of Variation) ist bei automatisierten und manuellen Methoden niedrig (≤ 10 %), was einen weiteren Anhaltspunkt dafür liefert, dass alle untersuchten Methoden zur Bibliotheksvorbereitung Daten von guter Qualität erbrachten ([Abbildung 2B](#)).

Mediane Insert-Größen

Bei der Insert-Größe handelt es sich um einen wichtigen Parameter bei der Vorbereitung der NGS-Bibliothek, der durch die Bedingungen der Tagmentierungsreaktion wie Zeit, Temperatur und Bibliotheksbereinigungsschritte mit Illumina-Reinigungsbeads beeinflusst wird. Die automatisierte Bibliotheksvorbereitung lieferte eine konsistente mediane Insert-Größe über dem für die manuelle Bibliotheksvorbereitung beobachteten Wert ([Abbildung 3](#)).

Tabelle 2: Sequenzierungsmetriken und Laufzeiten mit manuellen und automatisierten Methoden zur Bibliotheksvorbereitung

Methode	Mittelwert % Q30	% PF	Gesamtzahl der PE-Reads nach Filterung	Laufzeit der Sequenzierung
Manuell	97,95 ± 0,40	81,09 ± 8,4	64.122.141	14 h 13 min
Biomek NGenius	97,92 ± 0,18	77,72 ± 0,96	61.455.112	14 h 2 min
Biomek i7	96,67 ± 0,55	78,04 ± 2,79	61.710.695	14 h 2 min
SPT firefly	97,66 ± 0,13	75,31 ± 1,49	59.551.797	14 h 21 min

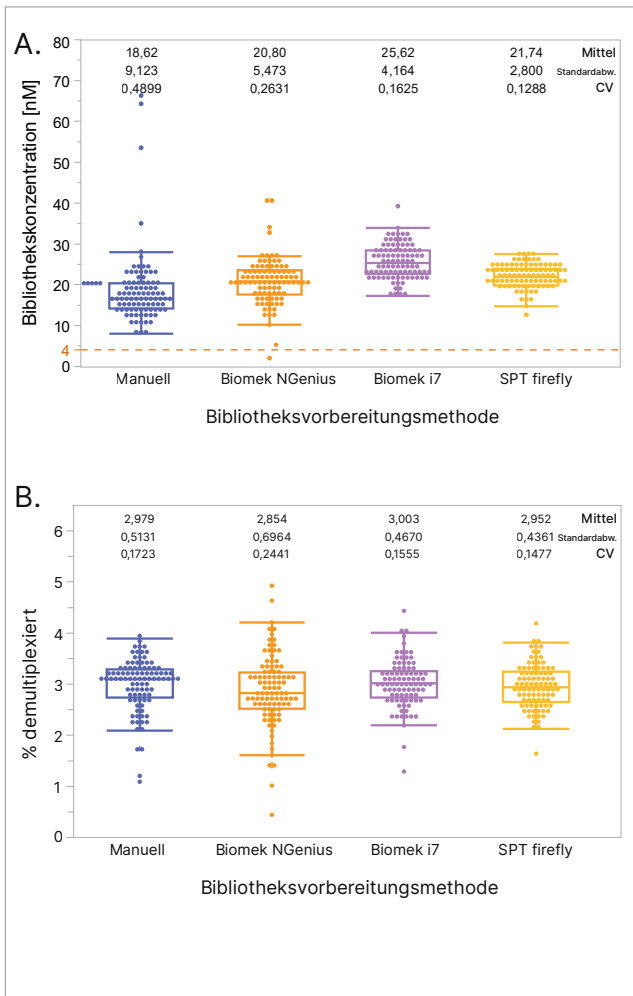


Abbildung 2: Automatisierte Methoden liefern hochwertige Daten

(A) Die Konzentrationen der Bibliotheken, die mit unterschiedlichen automatisierten Methoden vorbereitet wurden, waren mit jenen bei der manuellen Vorbereitung vergleichbar – bei geringfügig niedrigeren Variationskoeffizienten (CV). (B) Automatisierte Methoden zur Bibliotheksvorbereitung lieferten qualitativ hochwertige Sequenzierungsdaten mit Werten für den prozentualen demultiplexierten Anteil, die mit jenen der manuellen Bibliotheksvorbereitung vergleichbar sind.

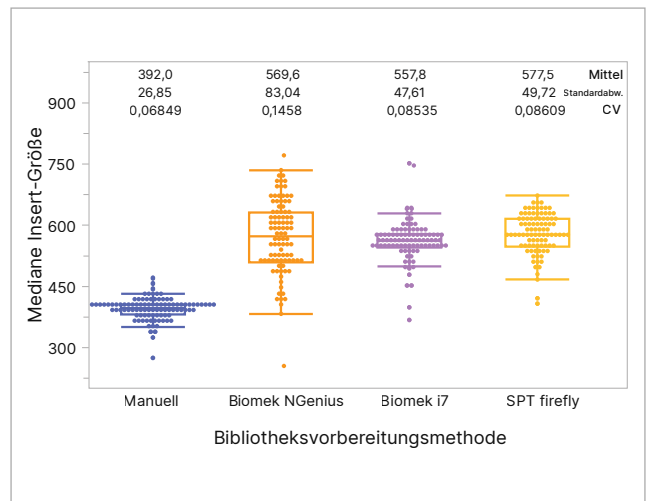


Abbildung 3: Einheitliche mediane Insert-Größe bei automatisierten Methoden

Die mediane Insert-Größe war bei automatisierten Bibliotheksvorbereitungsmethoden durchgehend größer als die bei der manuellen Bibliotheksvorbereitung erzielte mediane Insert-Größe.

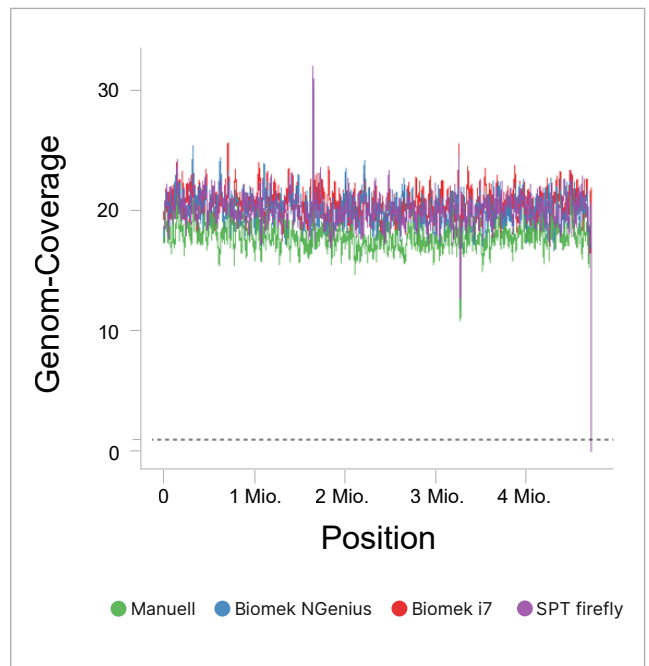
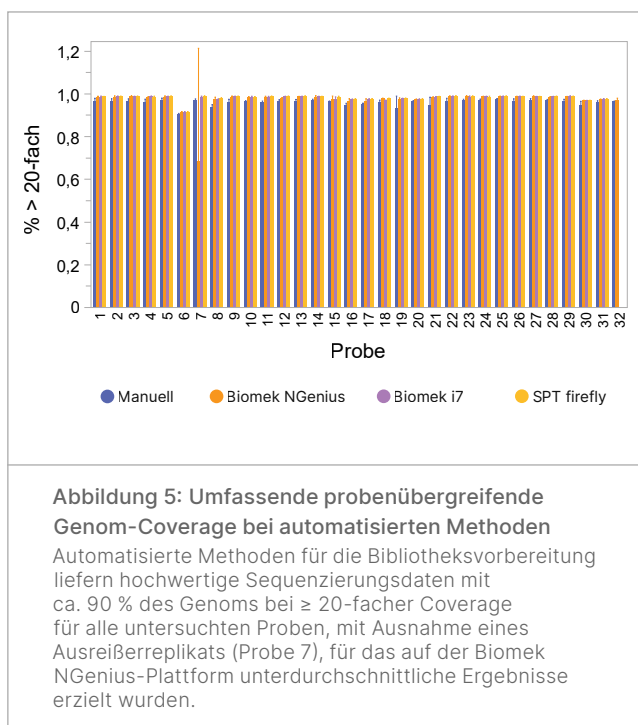


Abbildung 4: Genom-Coverage bei automatisierten Methoden

Automatisierte Methoden für die Bibliotheksvorbereitung liefern hochwertige Sequenzierungsdaten, wie durch einen gleitenden Durchschnitt der Genom-Coverage in einer repräsentativen Probe gezeigt.

Genom-Coverage

Die DRAGEN sWGS-Analyse ergab eine Coverage von $\geq 90\%$ des *Salmonella*-Genoms bei ≥ 20 -facher Coverage-Tiefe, wie durch einen gleitenden Mittelwert der Coverage in einer repräsentativen Probe ([Abbildung 4](#)) und über 30 von 33 untersuchten Proben ([Abbildung 5](#)) gezeigt werden konnte. Die geringere mediane Insert-Größe bei manueller Vorbereitung ([Abbildung 3](#)) kann die geringere Coverage-Tiefe bei manueller Vorbereitung ([Abbildung 4](#)) erklären, wobei weiterhin eine umfassende Coverage des Genoms erreicht wird ([Abbildung 5](#)).



Zusammenfassung

Lebensmittelbedingte Erkrankungen im Zusammenhang mit einer mikrobiellen Kontamination durch Bakterien stellen eine erhebliche Gefahr für die Humangesundheit dar. Mit automatisierten Methoden lassen sich bei verringertem manuellen Aufwand und geringerem Potenzial für Bedienungsfehler einheitliche Bibliotheken generieren. Die Möglichkeit zur Integration von automatisierten Methoden für die Bibliotheksvorbereitung in die MiSeq i100 Series sorgt für einen schnellen, umfassenden NGS-Workflow, der hochwertige Daten für die wirksame Surveillance zur Gewährleistung der öffentlichen Gesundheit liefert.

Weitere Informationen →

[Illumina DNA Prep](#)

[MiSeq i100 Series](#)

illumina[®]

1 800 8094566 (USA, gebührenfrei) | +1 858 2024566 (Tel. außerhalb der USA)
techsupport@illumina.com | www.illumina.com

© 2026 Illumina, Inc. Alle Rechte vorbehalten. Alle Marken sind Eigentum von Illumina, Inc. bzw. der jeweiligen Inhaber. Spezifische Informationen zu Marken finden Sie unter www.illumina.com/company/legal.html.
M-GL-02913 DEU v1.0

Quellen

1. Tyson GH, Li C, Harrison LB, et al. [A Multidrug-Resistant Salmonella Infantis Clone is Spreading and Recombining in the United States](#). *Microb Drug Resist.* 2021;27(6):792-799. doi:10.1089/mdr.2020.0389
2. Hutchinson JA, Wheeler C, Mohle-Boetani JC. [Outbreak epidemiologically linked with a composite product of beef, mechanically separated chicken and textured vegetable protein contaminated with multiple serotypes of Salmonella enterica including multidrug-resistant Infantis, California 2016](#). *Epidemiol Infect.* 2018;146(4):430-436. doi:10.1017/S0950268817002941
3. Scharff RL, Besser J, Sharp DJ, Jones TF, Peter GS, Hedberg CW. [An Economic Evaluation of PulseNet: A Network for Foodborne Disease Surveillance](#). *Am J Prev Med.* 2016;50 (5 Suppl 1):S66-S73. doi:10.1016/j.amepre.2015.09.018
4. Ribot EM, Freeman M, Hise KB, Gerner-Smidt P. [PulseNet: Entering the Age of Next-Generation Sequencing](#). *Foodborne Pathog Dis.* 2019;16(7):451-456. doi:10.1089/fpd.2019.2634
5. Socea JN, Stone VN, Qian X, Gibbs PL, Levinson KJ. [Implementing laboratory automation for next-generation sequencing: benefits and challenges for library preparation](#). *Front Public Health.* 2023;11:1195581. Veröffentlicht am 13. Juli 2023 doi:10.3389/fpubh.2023.1195581
6. Illumina. [Food safety surveillance with the MiSeq i100 Series application note](#). Veröffentlicht am 28. Juli 2025. Aufgerufen am 1. August 2025.
7. Stevens EL, Carleton HA, Beal J, et al. [Use of Whole Genome Sequencing by the Federal Interagency Collaboration for Genomics for Food and Feed Safety in the United States](#). *J Food Prot.* 2022;85(5):755-772. doi:10.4315/JFP-21-437
8. Leeper MM, Schroeder MN, Griswold T, et al. [Validation of Core and Whole-Genome Multi-Locus Sequence Typing Schemes for Shiga-Toxin-Producing E. coli \(STEC\) Outbreak Detection in a National Surveillance Network, PulseNet 2.0, USA](#). *Microorganisms.* 2025;13(6):1310. Veröffentlicht am 4. Juni 2025. doi:10.3390/microorganisms13061310
9. Illumina. [Maximizing performance on the MiSeq i100 Series](#). [illumina.com/content/dam/illumina/gcs/assembled-assets/marketing-literature/miseq-i100-library-optimization-technote-m-gl-03322/miseq-i100-library-optimization-technote-m-gl-03322.pdf](https://www.illumina.com/content/dam/illumina/gcs/assembled-assets/marketing-literature/miseq-i100-library-optimization-technote-m-gl-03322/miseq-i100-library-optimization-technote-m-gl-03322.pdf). Veröffentlicht 2024. Aufgerufen am 15. Juli 2025.