

# Surveillance im Bereich Lebensmittelsicherheit mit der MiSeq™ i100 Series

Genauer Nachweis von durch Lebensmittel  
übertragenen Pathogenen



Weniger manueller  
Aufwand dank  
vereinfachter  
Bibliotheksvorbereitung



Kurze Laufzeiten der  
Sequenzierung und  
höhere Ausgabe



Zuverlässige Assemblierung  
hochwertiger  
Bakteriengenome

## Einleitung

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 möglichen Ausbruchquellen. Mit der zunehmenden Auflösung von Laborsubtypisierungsverfahren lassen sich Erkrankungen präziser mit einer Quelle verknüpfen. In den USA erfolgt die Verknüpfung potenzieller Ausbrüche über PulseNet, ein nationales Netzwerk für die molekularbiologische Surveillance von Magen-Darm-Erkrankungen im Zusammenhang mit Nahrungsmitteln, Wasser oder dem One-Health-Ansatz, die in über 80 bundesstaatlichen, lokalen und Bundeslaboren nachgewiesen werden. Das PulseNet-Netzwerk verhindert jährlich über 250.000 durch Enterobacteriaceae verursachte Erkrankungen, was sich in Einsparungen von einer halben Milliarde US-Dollar an Behandlungskosten und Produktivitätsverlust auszahlt.<sup>1,2</sup>

PulseNet begann Anfang der 2010er Jahre gemeinsam mit Bundespartnern von der US Food and Drug Administration (FDA) und dem US Department of Agriculture Food Safety and Inspection Service (USDA-FSIS) mit der Einführung der Genomsequenzierung (WGS, Whole-Genome Sequencing) auf Geräten von Illumina.<sup>3</sup> Mithilfe von WGS können Wissenschaftler des öffentlichen Gesundheitswesens potenzielle Ausbrüche durch den Nachweis von Stämmen in Fällen mit hoher genetischer Übereinstimmung und zur selben Zeit oder in derselben Region auftretenden Erkrankungen bestimmen.

Die WGS dient zudem der Bestimmung von Trends bei Bakterienstämmen, die durch die zuvor genutzten molekularbiologischen Verfahren mit geringerer Auflösung nicht charakterisiert wurden.<sup>4,5</sup> Diese Stämme traten entweder innerhalb bestimmter Zeiträume auf und verursachten Ausbrüche, traten neu auf und verursachten stärkere Erkrankungen oder führten über Monate bzw. sogar Jahre zu Erkrankungen. Die Centers for Disease Control and Prevention (CDC) führten für diese Stämme die Bezeichnung REP-Stämme ein (Reoccurring, Emerging and **Persisting, wiederkehrend, neu auftretend und persistierend**). REP-Stämme lassen sich anhand genetischer Verwandtschaft und anderer bestimmender Merkmale identifizieren, einschließlich Multi Drug Resistance, Virulenz oder anderer genetischer Marker. Da nur rund 10 % der in PulseNet erfassten krankheitsverursachenden Bakterien mit einem Ausbruch assoziiert sind, kann der Einsatz von WGS zur Bestimmung von REP-Stämmen weitere Erkrankungen verhindern, indem zusätzliche Stämme verknüpft werden, die unter Umständen auf eine gemeinsame Quelle zurückzuführen sind.

Der vorliegenden Anwendungshinweis zeigt den genauen Nachweis und die genaue Charakterisierung eines persistierenden Stammes des multiresistenten *Salmonella enterica*-Serotyps Infantis (REP JFX01) unter Verwendung eines effizienten NGS-Workflows, der Illumina DNA Prep, die MiSeq i100 Series und Analysetools von Drittanbietern vereint (**Abbildung 1**).



## Methoden

### Proben

Im Rahmen der PulseNet-Routinesurveillance entnommene Bakterienisolate 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) gemäß einem zuvor beschriebenen Protokoll zur Isolierung von gDNA aus gramnegativen Bakterien extrahiert.<sup>6</sup> Gereinigte gDNA wurde mit dem Qubit dsDNA BR Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Katalog-Nr. Q32853) vor der Bibliotheksvorbereitung quantifiziert.

### Bibliotheksvorbereitung

Sequenzierungsfertige Bibliotheken wurden manuell aus 100 ng extrahierter gDNA mithilfe von Illumina DNA Prep (Illumina, Katalog-Nr. 20060060) mit zur Verbesserung der Performance auf der MiSeq i100 Series geänderten Protokoll vorbereitet, einschließlich eines zusätzlichen Durchgangs bei der Bead-Reinigung mit einem Bead-Proben-Verhältnis von 0,5-fach zur Entfernung kurzer Inserts.<sup>7</sup> Die Qualität und Konzentration durch PCR (Polymerase Chain Reaction, Polymerase-Kettenreaktion) amplifizierter 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 bewertet.

### Sequenzierung

Vorbereitete Bibliotheken wurden nach Volumen nach einem zuvor beschriebenen, leicht abgeänderten Protokoll gepoolt<sup>6</sup>, das einen zusätzlichen Durchgang bei der Bead-Reinigung mit 0,5-facher SPRI (Solid-Phase Reversible Immobilization, reversible Festphasenimmobilisierung) umfasste, die nach der Quantifizierung und dem äquimolaren Pooling der einzelnen Bibliotheken durchgeführt wurde. Gepoolte Bibliotheken wurden 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. Zur Durchführung umfangreicherer Studien können Sequenzierungsläufe auf dem NextSeq™ 1000 System, dem NextSeq 2000 System, dem NovaSeq™ 6000 System oder dem NovaSeq X System erfolgen.

### Datenanalyse

Nach Abschluss der Sequenzierung wurden die Daten an BaseSpace™ Sequence Hub gestreamt und mit der DRAGEN™ FastQC + MultiQC App analysiert.

Hierbei wurden allgemeine Statistiken und Metriken gewonnen sowie das Sequenz-Mapping und das Alignment durchgeführt. Zur Analyse wurde die PulseNet 2.0 Web Application verwendet. In dieser Anwendung wurden Read- und Assembly-basierte Metriken für die Qualitätssicherung (QC, Quality Control) berechnet.<sup>5</sup> Das cgMLST (Core Genome Multilocus Sequence Typing, Kerngenom-Multi-Locus-Sequenztypisierung) wurde mit dem Allel-Caller PulseNet 2.0 durchgeführt.<sup>6</sup> Die Serotypisierung wurde mit SeqSero2 durchgeführt.<sup>8</sup> Das AMR-Profil wurde mit AMRFinderPlus durchgeführt.<sup>9</sup> Plasmide wurden anhand der PlasmidFinder-Datenbanken identifiziert.<sup>10</sup> Der cgMLST-Baum und die zugehörigen Genotypen wurden mit der Webanwendung iTOL v7 visualisiert.<sup>11</sup>

## Ergebnisse

### Sequenzierungskennzahlen

Demultiplexing-Daten wurden nach 20 Zyklen mit einer Gesamtlaufzeit von 14 Stunden und 20 Minuten generiert. Anhand dieser wurde bestätigt, dass die Bibliotheken korrekt quantifiziert und gepoolt wurden. Das MiSeq i100 Plus System generierte Sequenzierungsdaten mit durchschnittlich 1,88 Mio. Reads je Probe bei einer Read-Länge von 2 × 301 bp mit ≥ 97,5 % der Basen über Q30 ([Abbildung 2A](#)). Der beobachtete GC-Gehalt der Reads entsprach im Wesentlichen der Normalverteilung, was darauf hindeutet, dass bei Bibliotheksvorbereitungsschemie und Sequenzierung keine starke Verzerrung in Richtung von Regionen mit höherem oder niedrigerem GC-Gehalt aufgetreten ist ([Abbildung 2B](#)).

Die 32 sequenzierten Bakterienisolate zeigten eine konsistent hohe Sequenzierungsqualität mit einem medianen Q-Score von 37,1 ([Tabelle 1](#)). Die geschätzte Coverage-Tiefe lag zwischen 46,1-fach und 109,9-fach, mit einem Durchschnitt von 71,9-fach. Der Prozentsatz der Kernloci des PulseNet 2.0 *Salmonella* cgMLST-Schemas betrug für sämtliche Proben > 99 %, was auf eine ausreichende Vollständigkeit des Genoms für das Clustering durch cgMLST hindeutet.

### Vorabbestimmung des *Salmonella*-Serotyps

FASTQ-Dateien wurden mit der SeqSero2-Software zur Vorabbestimmung des *Salmonella*-Serotyps analysiert. 31 Proben wurden korrekt als *Salmonella* Infantis (I 7:r:1,5) und eine korrekt als *Salmonella* Enteritidis (I 9:g,m:-) vorab bestimmt ([Abbildung 3](#)).

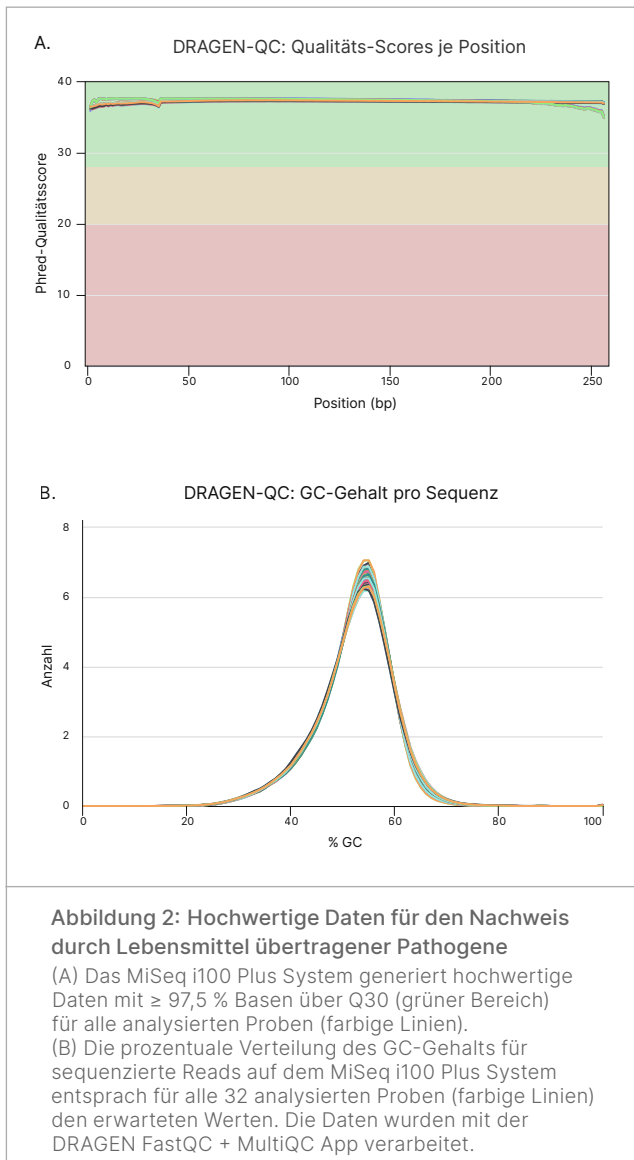
### Molekulare Typisierung von Pathogenen

Durch die Clusteranalyse von 3.002 cgMLST-Loci im PulseNet 2.0 *Salmonella*-Schema wurde der Grad der genomischen Beziehung zwischen den Isolaten im Probensatz ermittelt.

Das Proben-Clustering verlief wie erwartet, wobei als REPJFX01 typisierte Proben Cluster bildeten. Zusätzliche *Salmonella* Infantis-Proben und eine *Salmonella* Enteritidis-Probe wurden nicht wie erwartet separat als REPJFX01-Cluster typisiert (Abbildung 3). Es wurden sieben Gen-Multi-Locus-Sequenztypen (ST) mit *loci aroC, dnaN, hemD, hisD, purE, sucA* und *thrA* ermittelt. Die Sequenztypen (ST) entsprachen für alle 32 Proben dem erwarteten Ergebnis. Die vorab bestimmte AMR (antimikrobielle Resistenz) entsprach für alle 32 Proben den erwarteten Ergebnissen und insbesondere die für REPJFX01-Stämme charakteristische *gyrA\_D87Y*-Mutation wurde in allen REP-Proben des Datensatzes nachgewiesen (Abbildung 3). Der Plasmid-Gehalt entsprach für alle 32 Proben den erwarteten Ergebnissen und das IncFIB-Plasmid (pN55391) wurde in allen REPJFX01-Stämmen nachgewiesen, was ebenfalls ein bestimmendes Merkmal dieses REP-Stamms ist (Abbildung 3).

Tabelle 1: Qualitätsmetriken auswählen

Probe	Durchschnittliche Qualität (Q-Score)	Geschätzte Coverage-Tiefe	Prozentsatz wichtiger Loci mit erfolgreichem Calling
1	37,1	76,7-fach	99,3 %
2	37,1	93,0-fach	99,3 %
3	37,1	68,3-fach	99,3 %
4	37,1	67,2-fach	99,2 %
5	37,1	65,5-fach	99,3 %
6	37,0	96,9-fach	99,4 %
7	37,1	77,3-fach	99,3 %
8	37,0	62,1-fach	99,3 %
9	37,1	59,9-fach	99,2 %
10	37,0	57,7-fach	99,2 %
11	37,0	63,4-fach	99,3 %
12	37,0	52,8-fach	99,3 %
13	37,1	86,2-fach	99,3 %
14	37,0	55,7-fach	99,3 %
15	37,0	66,8-fach	99,2 %
16	37,0	55,6-fach	99,4 %
17	37,1	109,9-fach	99,5 %
18	37,1	70,5-fach	99,5 %
19	37,0	54,8-fach	99,5 %
20	37,0	46,1-fach	99,5 %
21	37,1	77,0-fach	99,3 %
22	37,1	78,2-fach	99,2 %
23	37,1	76,6-fach	99,2 %
24	37,1	100,6-fach	99,2 %
25	37,1	80,1-fach	99,2 %
26	37,2	78,0-fach	99,2 %
27	37,1	63,0-fach	99,3 %
28	37,0	73,4-fach	99,3 %
29	37,1	88,8-fach	99,2 %
30	37,0	61,6-fach	99,5 %
31	37,1	71,3-fach	99,5 %
32	37,1	66,8-fach	99,4 %



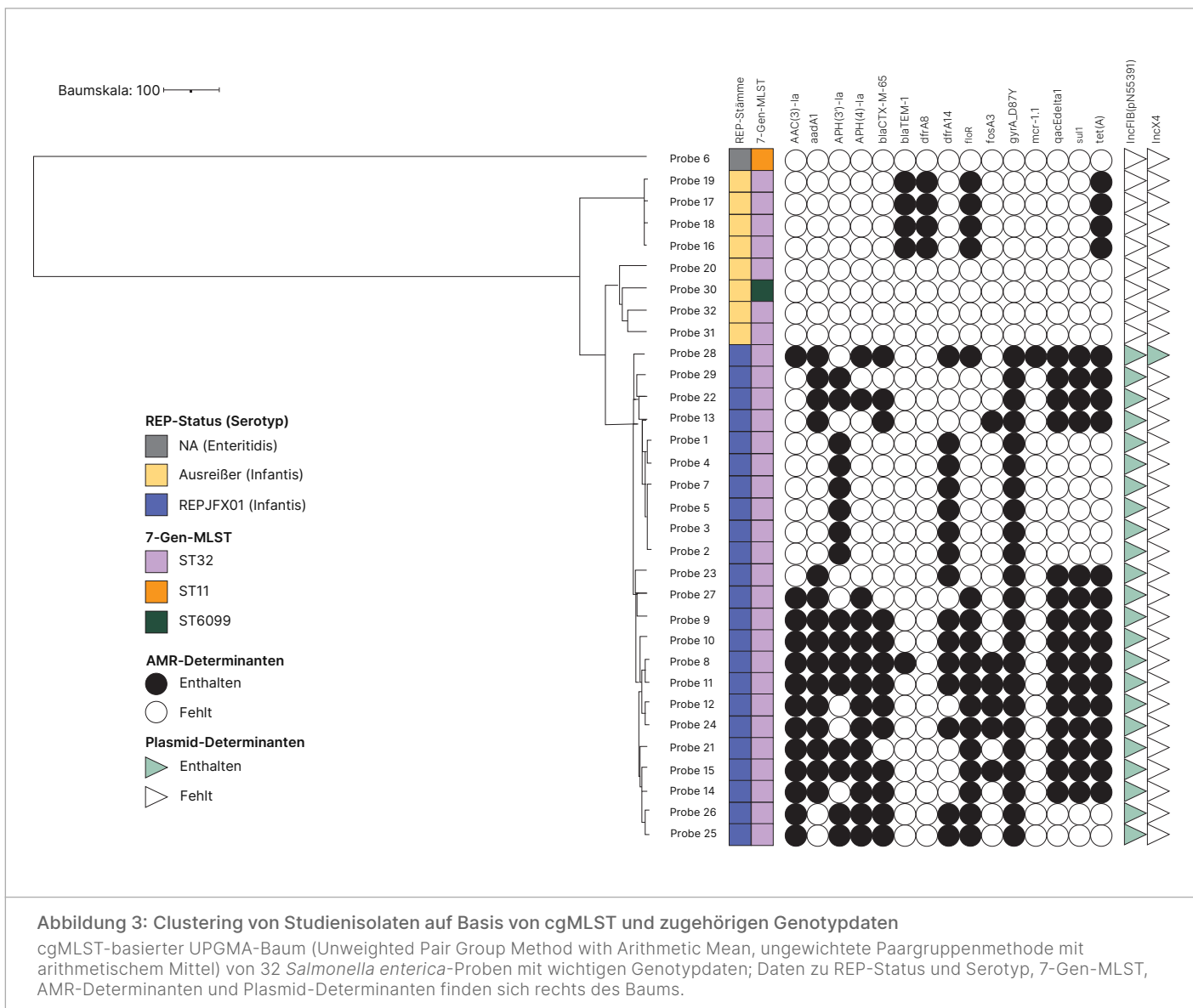


Abbildung 3: Clustering von Studienisolaten auf Basis von cgMLST und zugehörigen Genotypdaten

cgMLST-basierter UPGMA-Baum (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean, ungewichtete Paargruppenmethode mit arithmetischem Mittel) von 32 *Salmonella enterica*-Proben mit wichtigen Genotypdaten; Daten zu REP-Status und Serotyp, 7-Gen-MLST, AMR-Determinanten und Plasmid-Determinanten finden sich rechts des Baums.

## Zusammenfassung

Lebensmittelbedingte Erkrankungen im Zusammenhang mit einer mikrobiellen Kontamination durch Bakterien stellen eine erhebliche Gefahr für die Humangesundheit dar. Die MiSeq i100 Series ermöglicht einen schnellen, umfassenden NGS-Workflow, der einen hochpräzisen Nachweis bakterieller, durch Lebensmittel übertragener Pathogene zur effektiven Surveillance im Rahmen des öffentlichen Gesundheitswesens ermöglicht.

## Weitere Informationen

[Illumina DNA Prep](#)

[MiSeq i100 Series](#)

## Quellen

- 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
- 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
- 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
- Tolar B, Joseph LA, Schroeder MN, et al. [An Overview of PulseNet USA Databases](#). *Foodborne Pathog Dis*. 2019;16(7):457-462. doi:10.1089/fpd.2019.2637
- Leeper MM, Tolar BM, Griswold T, et al. [Evaluation of whole and core genome multilocus sequence typing allele schemes for Salmonella enterica outbreak detection in a national surveillance network, PulseNet USA](#). *Front Microbiol*. 2023;14:1254777. Veröffentlicht am 21. September 2023. doi:10.3389/fmicb.2023.1254777
- 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
- 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. Abgerufen am 5. Februar 2025.
- Zhang S, den Bakker HC, Li S, et al. [SeqSero2: Rapid and Improved Salmonella Serotype Determination Using Whole-Genome Sequencing Data](#). *Appl Environ Microbiol*. 2019;85(23):e01746-19. Veröffentlicht am 14. November 2019. doi:10.1128/AEM.01746-19
- Feldgarden M, Brover V, Gonzalez-Escalona N, et al. [AMRFinderPlus and the Reference Gene Catalog facilitate examination of the genomic links among antimicrobial resistance, stress response, and virulence](#). *Sci Rep*. 2021;11(1):12728. Veröffentlicht am 16. Juni 2021. doi:10.1038/s41598-021-91456-0
- Carattoli A, Zankari E, García-Fernández A, et al. [In silico detection and typing of plasmids using PlasmidFinder and plasmid multilocus sequence typing](#). *Antimicrob Agents Chemother*. 2014;58(7):3895-3903. doi:10.1128/AAC.02412-14
- Letunic I, Bork P. [Interactive Tree of Life \(iTOL\) v6: recent updates to the phylogenetic tree display and annotation tool](#). *Nucleic Acids Res*. 2024;52(W1):W78-W82. doi:10.1093/nar/gkae268



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

© 2025 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](http://www.illumina.com/company/legal.html).  
M-GL-02912 DEU v2.0