

使用MiSeq™ i100系列测序仪 进行食品安全监测

食源性病原体的准确检测



通过简化文库制备
减少手动操作时间



测序运行时间更短，
通量更高



可靠组装高质量
细菌基因组

简介

使用实验室方法对肠道细菌（包括沙门氏菌）进行分型，对于识别潜在疫情并将致病菌与潜在感染源联系起来至关重要。随着实验室分型方法分辨率的提高，将病例与感染源精确关联的能力也随之增强。在美国，潜在疫情病例的关联工作通过PulseNet完成 - 这是一个覆盖全美80多个州、地方及联邦实验室的分子监测网络，专注于食源性、水源性及“一体化健康”相关的肠道疾病监测。PulseNet网络每年预防超过25万例肠道细菌感染，节省医疗成本及生产力损失达5亿美元^{1,2}。

21世纪10年代初，PulseNet联合美国食品药品监督管理局（FDA）及美国农业部食品安全检验局（USDA-FSIS）等联邦合作伙伴，开始采用因美纳测序平台开展全基因组测序（WGS）³。利用WGS，公共卫生科学家可通过识别病例中基因高度相似、且在同一时段或地理区域内引发疾病的菌株，锁定

潜在的疫情。WGS还能揭示传统低分辨率分子方法此前未能表征的细菌菌株演变趋势^{4,5}。例如某些菌株随时间推移反复出现并引发疫情、新发后导致感染率上升，或在数月乃至数年内持续存在并致病。美国疾病控制和预防中心（CDC）开始将这些菌株定义为复发、新现和持续存在菌株（简称REP菌株）。REP菌株可通过基因关联性及其他特征进行识别，包括多重耐药性、毒力因子或其他遗传标志物。由于PulseNet中仅约10%的致病菌与已知疫情相关联，利用WGS识别REP菌株，有望通过溯源共享共同感染源的菌株，阻断进一步传播。

本应用说明展示了一种高效的NGS工作流程，该流程整合了Illumina DNA Prep、MiSeq™ i100系列测序仪及第三方分析工具，可准确检测并表征一株持续存在的多重耐药肠沙门氏菌婴儿型（*Salmonella enterica* serotype Infantis, REP JFX01）（图1）。



图1：用于沙门氏菌检测的完整NGS工作流程
结合因美纳文库制备、MiSeq™ i100系列测序仪测序以及DRAGEN二级分析，实现对食源性病原体沙门氏菌的准确监测。

方法

样本

作为PulseNet常规监测的一部分，收集的细菌分离株在不添加血液的条件下接种于BBL血琼脂基础培养基（BD，货号211037）上进行培养。使用Wizard Genomic DNA Purification Kit（Promega，货号A1120），参照已发表的革兰阴性菌gDNA提取方案进行基因组DNA（gDNA）提取⁶。文库制备前，使用Qubit dsDNA BR Assay Kit（Thermo Fisher Scientific，货号Q32853）对纯化的gDNA进行定量。

文库制备

使用Illumina DNA Prep（因美纳，货号20060060）从100 ng提取的gDNA中手动制备测序就绪文库，并对方案进行调整以提高在MiSeq™ i100系列测序仪上的性能，包括增加一轮磁珠纯化（磁珠-样本比为0.5×）以去除短插入片段⁷。混合前，使用4200 TapeStation系统（Agilent Technologies，货号G2991BA）和Qubit 1X dsDNA High Sensitivity（HS）Assay Kit（Thermo Fisher Scientific，货号Q33231）评估PCR扩增文库的质量和浓度。

测序

制备好的文库参照已发表的方案⁶按体积进行混合，并稍作调整：在每个文库经定量和等摩尔混合后，增加一轮0.5×SPRI磁珠纯化。将混合文库稀释至60 pM的上机浓度（32个文库/运行）。在MiSeq™ i100 Plus测序仪上使用25M流动槽进行测序，运行配置为2×301 bp。对于更大规模的研究，可将测序运行规模扩展至NextSeq™ 1000、NextSeq™ 2000、NovaSeq™ 6000和NovaSeq™ X测序仪。

数据分析

测序完成后，数据流式传输至BaseSpace™ Sequence Hub，并使用DRAGEN™ FastQC + MultiQC应用程序进行分析，以提供通用统计数据和指标、序列映射和比对结果。

在PulseNet 2.0 Web应用程序中进行分析。在该应用程序中，计算了基于read和基于组装的质量控制（QC）指标⁵，使用PulseNet 2.0等位基因调用程序进行核心基因组多位点序列分型（cgMLST）⁶，通过SeqSero2进行血清分型⁸，采用AMRFinderPlus进行AMR分析⁹，并基于PlasmidFinder数据库进行质粒鉴定¹⁰。使用iTOL v7网页应用程序对cgMLST聚类树及相关基因型进行可视化¹¹。

结果

测序指标

运行20循环后即产生样本拆分数据（总运行时间14小时20分钟），证实文库定量和混合操作正确。MiSeq™ i100 Plus测序仪生成的测序数据显示，在2×301 bp的读长下，每个样本平均获得约1.88M条read，且≥97.5%的碱基质量在Q30以上（图2A）。观察到的read GC含量百分比大致呈正态分布，表明文库制备的测序化学和测序过程未表现出对高GC或低GC区域的明显偏倚（图2B）。

所测序的32个细菌分离株均表现出一致的高测序质量，Q-分值中位数为37.1（表1）。估计的覆盖深度范围为46.1×至109.9×，平均为71.9×。所有样本在PulseNet 2.0 沙门氏菌cgMLST分型方案中的核心基因位点检出率均>99%，表明基因组足够完整，可通过cgMLST进行聚类分析。

沙门氏菌血清型预测

使用SeqSero2软件对FASTQ文件进行分析，以预测沙门氏菌血清型。31个样本被正确预测为婴儿沙门氏菌（I 7:r:1,5），1个被正确预测为肠炎沙门氏菌（I 9:g,m:-）（图3）。

病原体分子分型

基于PulseNet 2.0沙门氏菌分型方案中3002个cgMLST基因位点的聚类分析，推断出样本组中各分离株之间的基因组相关性。样本聚类结果符合预期，其中被鉴定为REPJFX01的样本聚为一簇。其余未在REPJFX01中的婴儿沙门氏菌样本及一株

肠炎沙门氏菌样本则按预期各自独立成簇（图3）。使用基因位点*aroC*、*dnaN*、*hemD*、*hisD*、*purE*、*sucA*和*thrA*进行七基因多位点序列分型（ST）。所有32个样本的序列分型（ST）均与预期结果一致。所有32个样本的预测AMR均与预期结果一致，值得注意的是，在数据集的所有REP样本中均检测到REPJFX01菌株的特征性*gyrA*_D87Y突变（图3）。所有32个样本的质粒含量均与预期结果一致，且在所有REPJFX01菌株中均检测到IncFIB（pN55391）质粒，该质粒也是该REP菌株的界定特征（图3）。

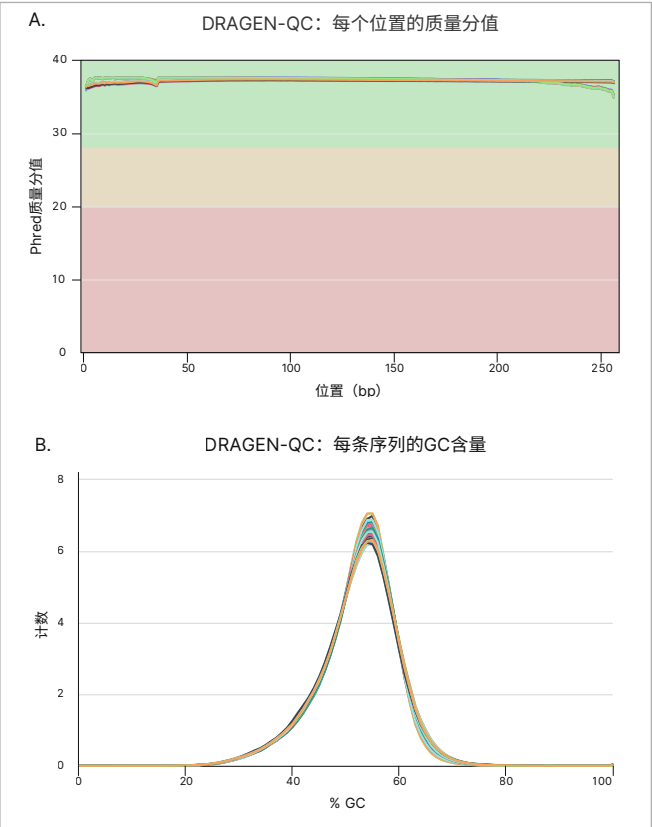


图2：用于食源性病原体检测的高质量数据
(A) 采用MiSeq™ i100 Plus测序仪对所有分析样本（彩色线）生成高质量数据，有≥ 97.5%的碱基高于Q30（绿色区域）。
(B) MiSeq™ i100 Plus测序仪上测序read的GC含量分布百分比符合全部32个分析样本的预期水平（彩色线）。数据使用DRAGEN FastQC + MultiQC应用程序处理。

表1：所选质量指标

样本	平均质量 (Q-分值)	估计覆盖深度	核心基因位点检出百分比
1	37.1	76.7×	99.3%
2	37.1	93.0×	99.3%
3	37.1	68.3×	99.3%
4	37.1	67.2×	99.2%
5	37.1	65.5×	99.3%
6	37.0	96.9×	99.4%
7	37.1	77.3×	99.3%
8	37.0	62.1×	99.3%
9	37.1	59.9×	99.2%
10	37.0	57.7×	99.2%
11	37.0	63.4×	99.3%
12	37.0	52.8×	99.3%
13	37.1	86.2×	99.3%
14	37.0	55.7×	99.3%
15	37.0	66.8×	99.2%
16	37.0	55.6×	99.4%
17	37.1	109.9×	99.5%
18	37.1	70.5×	99.5%
19	37.0	54.8×	99.5%
20	37.0	46.1×	99.5%
21	37.1	77.0×	99.3%
22	37.1	78.2×	99.2%
23	37.1	76.6×	99.2%
24	37.1	100.6×	99.2%
25	37.1	80.1×	99.2%
26	37.2	78.0×	99.2%
27	37.1	63.0×	99.3%
28	37.0	73.4×	99.3%
29	37.1	88.8×	99.2%
30	37.0	61.6×	99.5%
31	37.1	71.3×	99.5%
32	37.1	66.8×	99.4%

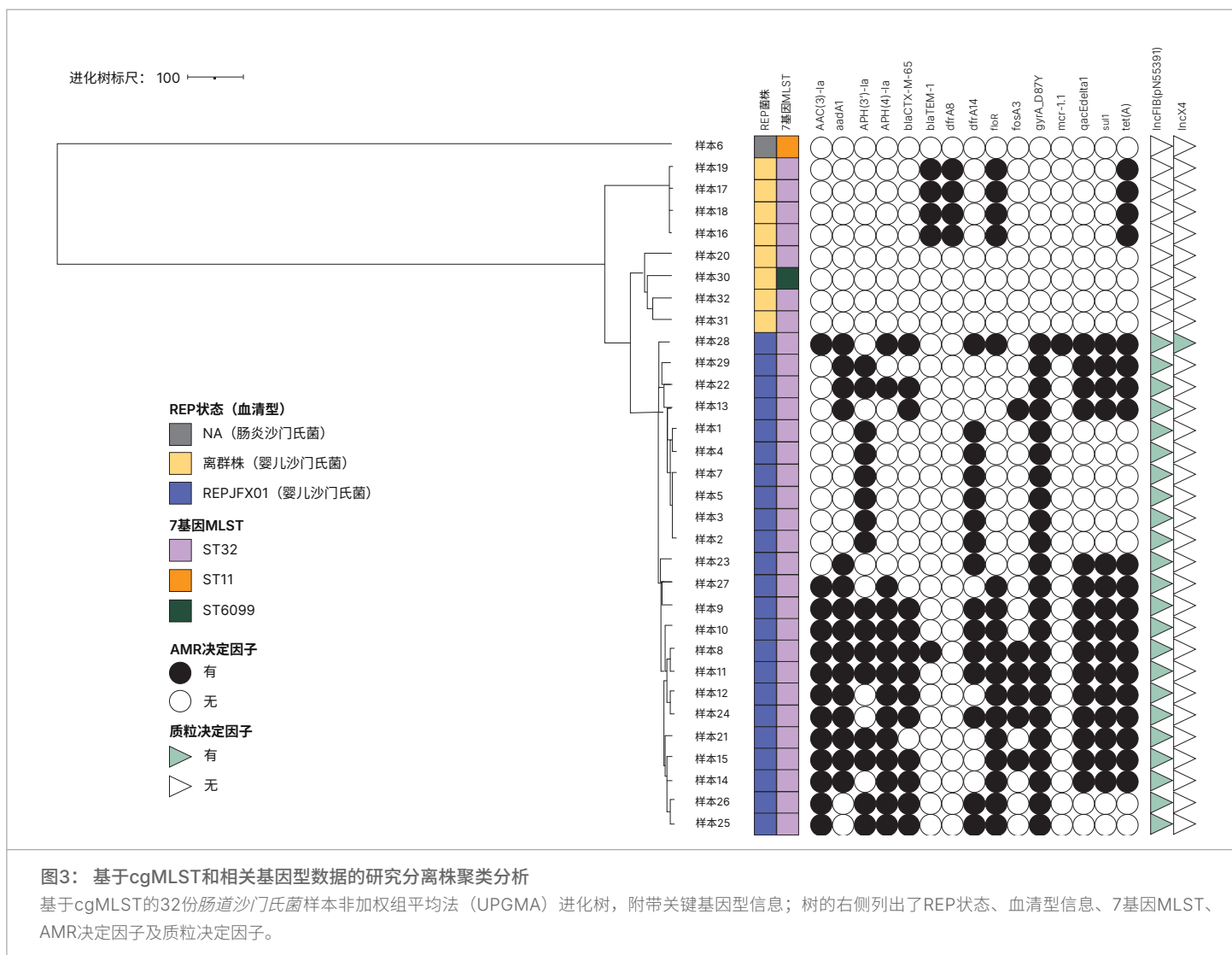


图3: 基于cgMLST和相关基因型数据的研究分离株聚类分析

基于cgMLST的32份肠道沙门氏菌样本非加权组平均法 (UPGMA) 进化树, 附带关键基因型信息; 树的右侧列出了REP状态、血清型信息、7基因MLST、AMR决定因子及质粒决定因子。

总结

由细菌微生物污染引起的食源性疾病对人类健康构成重大威胁。MiSeq™ i100系列测序仪可提供快速、全面的新一代测序（NGS）工作流程，实现对细菌性食源性病原体的高准确度检测，为公共卫生工作中的有效监测提供支持。

了解更多

[Illumina DNA Prep](#)

[MiSeq™ i100系列测序仪](#)

参考文献

- 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. Published 2023 Sep 21. 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. Published 2025 Jun 4. 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](#). Published 2024. Accessed February 5, 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. Published 2019 Nov 14. 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. Published 2021 Jun 16. 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

Illumina中国

上海办公室 • 电话 (021) 6032-1066 • 传真 (021) 6090-6279
 北京办公室 • 电话 (010) 8441-6900 • 传真 (010) 8455-4855
 技术支持热线 400-066-5835 • chinasupport@illumina.com
 市场销售热线 400-066-5875 • china_info@illumina.com • www.illumina.com.cn

© 2026 Illumina, Inc. 保留所有权利。所有商标均为因美纳公司或其各自所有者的财产。
 关于具体的商标信息，请访问www.illumina.com.cn/company/legal.html。
 M-GL-02912 v2.0



因美纳企业动态



因美纳市场助手



因美纳中国官方商城

illumina®