

Soluciones de automatización para la vigilancia de la seguridad alimentaria con MiSeq™ i100 Series

Librerías de gran uniformidad y datos de alta calidad
para la detección de patógenos de origen alimentario

**Reducción del tiempo
de participación activa**

**Rendimiento
constante y fiable**

**Cobertura completa
de genomas
bacterianos**

Introducción

La gestión de la seguridad alimentaria es una parte esencial de la salud pública. Las enfermedades de origen alimentario relacionadas con la contaminación microbiana por bacterias patógenas representan una amenaza considerable para la salud humana. En particular, las **cepas bacterianas recurrentes, emergentes o persistentes (REP)**, incluidas *E. coli patógena*, *Listeria*, *Campylobacter*, *Shigella* y *Salmonella*, pueden causar periódicamente brotes agudos.^{1,2}

El uso de métodos de laboratorio para clasificar las bacterias entéricas, incluida *Salmonella*, ha sido fundamental para identificar posibles brotes y vincular las enfermedades causadas por bacterias con fuentes del brote. En Estados Unidos, la vigilancia molecular nacional mediante secuenciación de nueva generación (NGS, next-generation sequencing) evita más de 250 000 enfermedades por bacterias entéricas cada año y ahorra medio millón de dólares en costes médicos y pérdida de productividad.^{3,4}

Aunque la secuenciación del genoma completo (WGS) con NGS ha proporcionado ventajas significativas en la velocidad, la precisión y la profundidad de la información para los laboratorios de microbiología, la preparación de librerías sigue siendo un cuello de botella. La automatización de la preparación de librerías mediante un sistema de manipulación de líquidos genera librerías uniformes con menos tiempo de participación activa y menos oportunidades de error humano.⁵

Esta nota técnica demuestra el rendimiento de un flujo de trabajo de NGS completo que integra tres opciones para automatizar la preparación de librerías utilizando Illumina DNA Prep con secuenciación en MiSeq i100 Series y el análisis con el software DRAGEN™ para obtener eficiencia y precisión en la vigilancia de la seguridad alimentaria (figura 1).⁶

Métodos

Muestras

Treinta y dos cepas aisladas de *Salmonella enterica* recogidas como parte de la vigilancia rutinaria de PulseNet⁷ se cultivaron en base de agar con sangre BBL (sin añadir sangre) (BD, n.º de catálogo 211037). El ADN genómico (ADNg) se extrajo con Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega, n.º de catálogo A1120) con ligeras modificaciones en el protocolo para el aislamiento de ADNg de bacterias gramnegativas.⁸ El ADNg purificado se cuantificó con el kit de ensayo Qubit dsDNA BR (Thermo Fisher Scientific, n.º de catálogo Q32853) antes de la preparación de librerías.

Preparación de librerías

Las librerías listas para el secuenciador se prepararon por triplicado utilizando tres opciones para soluciones automatizadas y una opción manual para Illumina DNA Prep (Illumina, n.º de catálogo 20060059). Para normalizar el rendimiento de las librerías, se utilizaron como aporte 100 ng de ADNg extraído por muestra. Para obtener un tamaño de fragmento óptimo en MiSeq i100 Series, se incluyó una ronda adicional de purificación con bolas con una relación bola/muestra de 0,5x para eliminar fragmentos cortos.⁹ Las tres soluciones de automatización evaluadas fueron **Biomek NGenius Next Generation Library Prep System** (Beckman Counter, n.º de catálogo C62), **Biomek i7 Automated Workstation** (Beckman Coulter, n.º de catálogo B87585) y la **plataforma firefly** (SPT Labtech) (tabla 1).



Figura 1: Flujo de trabajo de NGS completo para la detección de *Salmonella*

Combine soluciones automatizadas para la preparación de librerías de Illumina con la secuenciación en MiSeq i100 Series y el análisis secundario de DRAGEN para una vigilancia precisa del patógeno de transmisión alimentaria *Salmonella*.

La calidad y la concentración de las librerías amplificadas por PCR se evaluaron con el 4200 TapeStation System (Agilent Technologies, n.º de catálogo G2991BA) y Qubit 1X dsDNA High Sensitivity (HS) Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, n.º de catálogo Q33231) antes de la agrupación.

Secuenciación

Las librerías preparadas se agruparon por volumen y se diluyeron a una concentración de carga de 60 pM (32 librerías/experimento). La secuenciación se realizó en MiSeq i100 Plus System con una celda de flujo de 25 M con una configuración de experimento de 2 × 301 pb. En el caso de estudios más grandes, los experimentos de secuenciación se pueden ampliar a los sistemas NextSeq™ 1000, NextSeq 2000 o NovaSeq™ 6000.

Análisis de datos

Una vez finalizada la secuenciación, los datos se transmitieron a BaseSpace™ Sequence Hub y se procesaron con FASTQ Toolkit (v2.2.6) para reducir la muestra de los conjuntos de datos a 700 000 lecturas "paired-end" (PE). El análisis se realizó con la aplicación DRAGEN Small Whole-Genome Sequencing (sWGS) (v4.3.13) para obtener la cobertura del genoma, métricas de profundidad media y métricas de ensayo adicionales.

Resultados

Criterios de medición de secuenciación

MiSeq i100 Plus System generó datos de secuenciación con un promedio de $\geq 96,5\%$ de bases por encima de Q30 y $\geq 75\%$ de lecturas que superaron el filtro (PF) (tabla 2). La concentración de librerías preparadas con métodos automatizados y manuales fue similar (figura 2A).

Tabla 1: Tiempos de ensayo con métodos de preparación de librerías manuales y automatizados

| Método ^a | Tiempo de automatización | Tiempo de participación activa | Duración total del ensayo |
|---------------------|--------------------------|--------------------------------|---------------------------|
| Manual | N/D | 60-90 min | ~4-4,5 h |
| Biomek NGenius | 21 h 45 min | ~45 min | ~21 h 45 min ^b |
| Biomek i7 | ~4 h 10 min | ~20-24 min | ~4 h 34 min |
| SPT firefly | 3 h 8 min | ~20-22 min | ~3 h 28 min |

a. 96 muestras por experimento.
b. El tiempo de ejecución de Biomek NGenius para procesar 24 muestras es de 7 horas y 15 minutos.

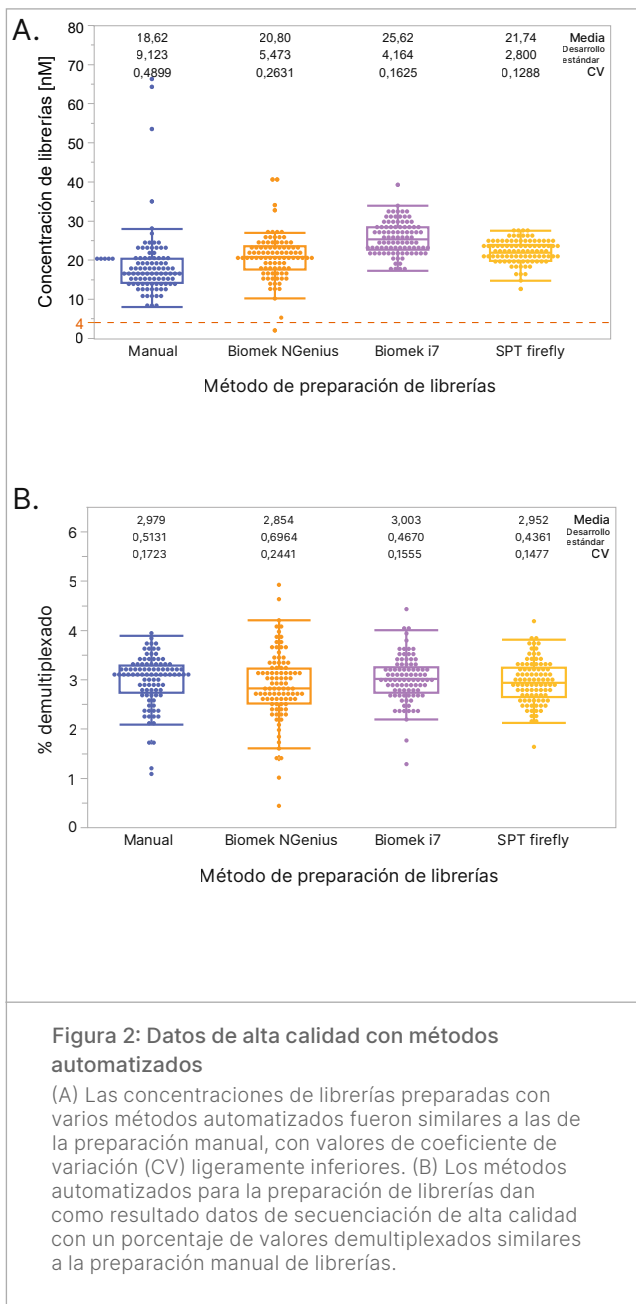
El porcentaje de lecturas demultiplexadas, que representa la proporción del número total de lecturas que se asignaron correctamente a una muestra en función de su código de barras, muestra valores similares con un coeficiente de variación (CV) bajo ($\leq 10\%$) en los métodos automatizados y manuales, lo que indica, además, que se obtuvieron datos de buena calidad con todos los métodos de preparación de librerías evaluados (figura 2B).

Tamaño medio de los fragmentos

El tamaño del fragmento es un parámetro importante en la preparación de librerías de NGS y puede verse afectado por condiciones de reacción de tagmentación, como el tiempo, la temperatura y los pasos de limpieza de librerías con bolas de purificación de Illumina. La preparación de librerías automatizada dio como resultado una mediana de tamaño de fragmento uniforme que era mayor que la observada con la preparación manual de librerías (figura 3).

Tabla 2: Métricas de secuenciación y tiempos de ejecución con métodos de preparación de librerías manuales y automatizados

| Método | % de media de Q30 | % de PF | N.º total de lecturas PE PF | Duración del experimento de secuenciación |
|----------------|-------------------|--------------|-----------------------------|---|
| Manual | 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 |



Cobertura del genoma

El análisis de DRAGEN sWGS demostró que $\geq 90\%$ del genoma de *Salmonella* estaba cubierto con una profundidad de cobertura de $\geq 20x$, como se muestra al hacer una media móvil de la cobertura en una muestra representativa (figura 4) y en 30 de las 33 muestras analizadas (figura 5). La mediana más corta del tamaño del fragmento con la preparación manual (figura 3) puede explicar la menor profundidad de cobertura observada con la preparación manual (figura 4), aunque aún logra una cobertura completa del genoma (figura 5).

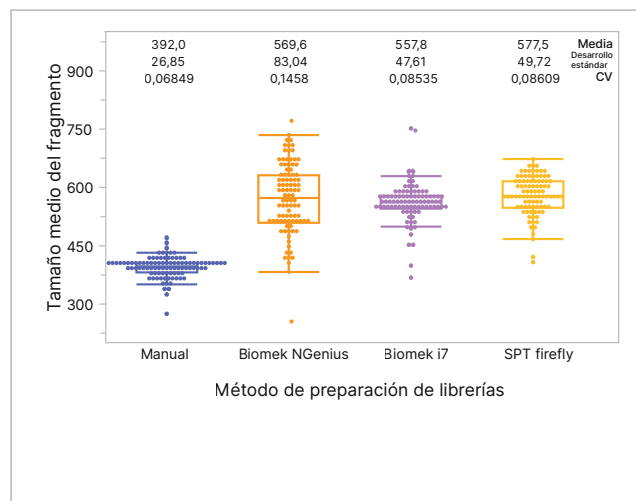
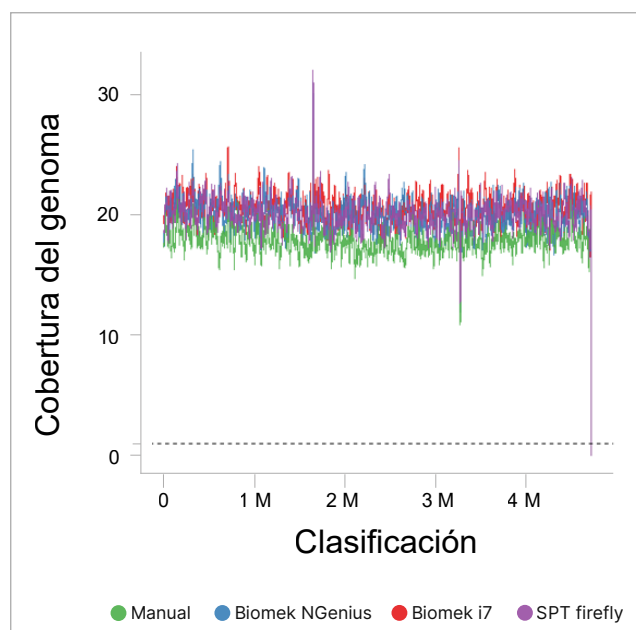
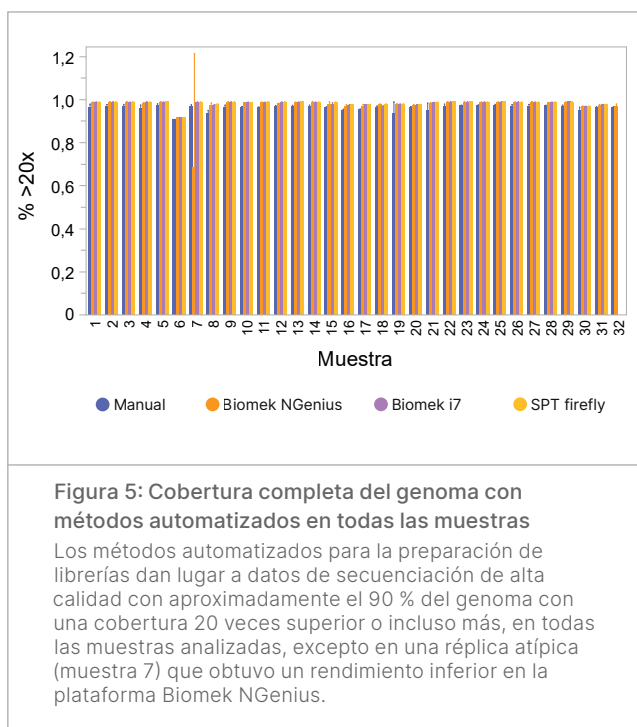


Figura 3: Mediana de tamaño de fragmento uniforme con métodos automatizados

La mediana del tamaño del fragmento para los métodos de preparación de librerías automatizadas fue sistemáticamente mayor que la mediana del tamaño del fragmento generado con la preparación manual de librerías.





Bibliografía

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. Fecha de publicación: 13 de julio de 2023. doi:10.3389/fpubh.2023.1195581
6. Illumina. [Food safety surveillance with the MiSeq i100 Series application note](#). Fecha de publicación: 28 de julio de 2025. Fecha de consulta: 1 de agosto de 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. Fecha de publicación: 4 de junio de 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). Año de publicación: 2024. Fecha de consulta: 15 de julio de 2025.

Resumen

Las enfermedades de origen alimentario relacionadas con la contaminación microbiana por bacterias representan una amenaza considerable para la salud humana. Los métodos automatizados generan librerías uniformes con menos tiempo de participación activa y menos oportunidades de error humano. MiSeq i100 Series puede incorporar métodos automatizados en la preparación de librerías para permitir un flujo de trabajo de NGS rápido y completo que proporcione datos de alta calidad para una vigilancia eficaz como parte de las medidas adoptadas por las instituciones de salud pública.

Más información →

[Illumina DNA Prep](#)

[MiSeq i100 Series](#)

illumina[®]

1 800 809 4566 (llamada gratuita, EE. UU.) | tel.: +1 858 202 4566
techsupport@illumina.com | www.illumina.com

© 2026 Illumina, Inc. Todos los derechos reservados. Todas las marcas comerciales pertenecen a Illumina, Inc. o a sus respectivos propietarios. Si desea consultar información específica sobre las marcas comerciales, consulte www.illumina.com/company/legal.html.
M-GL-02913 ESP v1.0