

Soluzioni di automazione per la sorveglianza della sicurezza alimentare con MiSeq™ i100 Series

Librerie altamente uniformi e dati di alta qualità per il rilevamento di patogeni di origine alimentare

Riduzione degli interventi manuali

Prestazioni coerenti e affidabili

Copertura completa dei genomi batterici

Introduzione

La gestione della sicurezza alimentare è una parte essenziale della salute pubblica. Le malattie di origine alimentare correlate alla contaminazione microbica da batteri patogeni rappresentano una minaccia sostanziale per la salute umana. In particolare, i **ceppi batterici ricorrenti, emergenti o persistenti** (REP, recurring, emerging, or persisting), tra cui *E. coli* patogeno, *Listeria*, *Campylobacter*, *Shigella* e *Salmonella*, possono causare periodicamente epidemie acute.^{1,2}

L'utilizzo di metodi di laboratorio per sottotipizzare i batteri enterici, compresa la *Salmonella*, è stato fondamentale per identificare potenziali epidemie e collegare i batteri che causano malattie a fonti di epidemie. Negli Stati Uniti, la sorveglianza molecolare nazionale tramite sequenziamento di nuova generazione (NGS, Next-Generation Sequencing) previene ogni anno oltre 250.000 malattie da batteri enterici e consente di risparmiare mezzo miliardo di dollari in costi medici e perdita di produttività.^{3,4}

Sebbene il sequenziamento dell'intero genoma (WGS, Whole-Genome Sequencing) basato su NGS abbia fornito ai laboratori di microbiologia vantaggi significativi in termini di velocità, accuratezza e profondità delle informazioni, la preparazione delle librerie rimane un problema. L'automazione della preparazione delle librerie, utilizzando un sistema di gestione dei liquidi, genera librerie uniformi con meno interventi manuali e una ridotta probabilità di errore umano.⁵

Questa nota tecnica dimostra le prestazioni di un flusso di lavoro NGS completo che integra tre opzioni per automatizzare la preparazione delle librerie utilizzando Illumina DNA Prep con sequenziamento su MiSeq i100 Series e l'analisi con il software DRAGEN™ per una sorveglianza efficiente e accurata della sicurezza alimentare (Figura 1).⁶

Metodi

Campioni

Trentadue isolati di *Salmonella enterica* raccolti nell'ambito della sorveglianza di routine PulseNet⁷ sono stati coltivati su BBL Blood Agar Base senza aggiunta di sangue (BD, n. di catalogo 211037). Il DNA genomico (gDNA, genomic DNA) è stato estratto utilizzando il Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega, n. di catalogo A1120) con lievi modifiche al protocollo per l'isolamento del gDNA da batteri gram-negativi.⁸ Il gDNA purificato è stato quantificato con Qubit dsDNA BR Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, n. di catalogo. Q32853) prima della preparazione delle librerie.

Preparazione delle librerie

Le librerie pronte per il sequenziamento sono state preparate in triplicato utilizzando tre opzioni per le soluzioni automatizzate e un'opzione manuale per Illumina DNA Prep (Illumina, n. di catalogo 20060059). Per la normalizzazione della resa delle librerie, come input sono stati utilizzati 100 ng di gDNA estratto per campione. Per una dimensione ottimale dell'inserzione su MiSeq i100 Series, è stata inclusa un'ulteriore fase di purificazione delle microsferi con un rapporto tra microsferi e campione pari a 0,5 volte per rimuovere le inserzioni corte.⁹ Le tre soluzioni di automazione valutate includevano **Biomek NGenius Next Generation Library Prep System** (Beckman Coulter, n. di catalogo. C62), **Biomek i7 Automated Workstation** (Beckman Coulter, n. di catalogo B87585) e la **piattaforma Firefly** (SPT Labtech) (Tabella 1).

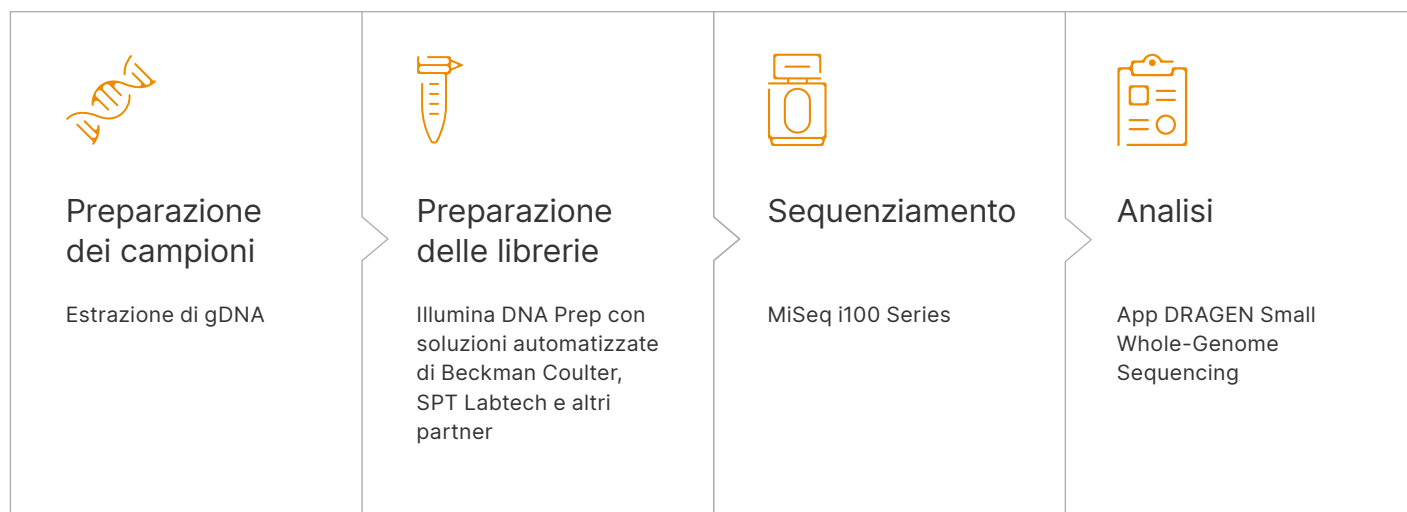


Figura 1: flusso di lavoro NGS end-to-end per il rilevamento della *Salmonella*

Combinare soluzioni automatizzate per la preparazione delle librerie Illumina con il sequenziamento su MiSeq i100 Series e l'analisi secondaria DRAGEN per una sorveglianza accurata del patogeno di origine alimentare *Salmonella*.

La qualità e la concentrazione delle librerie amplificate mediante PCR sono state valutate utilizzando 4200 TapeStation System (Agilent Technologies, n. di catalogo G2991BA) e Qubit 1X dsDNA High Sensitivity (HS) Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, n. di catalogo Q33231) prima del raggruppamento in pool.

Sequenziamento

Le librerie preparate sono state raggruppate in pool in base al volume e diluite a una concentrazione di caricamento di 60 pM (32 librerie/corsa). Il sequenziamento è stato eseguito su MiSeq i100 Plus System utilizzando una cella a flusso 25M con una configurazione della corsa di 2 × 301 bp. Per studi più ampi, le corse di sequenziamento possono essere estese fino a NextSeq™ 1000 System, NextSeq 2000 System o NovaSeq™ 6000 System.

Analisi dei dati

Al termine del sequenziamento, i dati sono stati inviati a BaseSpace™ Sequence Hub ed elaborati con FASTQ Toolkit (v2.2.6) per effettuare il downsampling dei set di dati a 700.000 letture paired-end (PE). L'analisi è stata eseguita utilizzando l'app DRAGEN Small Whole-Genome Sequencing (sWGS) (v4.3.13) al fine di ottenere la copertura del genoma, le metriche di profondità mediana e ulteriori metriche del saggio.

Risultati

Metriche di sequenziamento

MiSeq i100 Plus System ha generato dati di sequenziamento con una media di almeno il 96,5% delle basi che superano Q30 e di almeno il 75% delle letture che attraversano il filtro (PF) (Tabella 2). La concentrazione delle librerie preparate con metodi automatizzati e manuali era paragonabile (Figura 2A).

Tabella 1: tempi del saggio con metodi manuali e automatizzati per la preparazione delle librerie

Metodo ^a	Tempo di automazione	Interventi manuali	Durata totale del saggio
Manuale	N/A	60-90 min	Circa 4-4,5 ore
Biomek NGenius	21 ore e 45 min	Circa 45 min	Circa 21 ore e 45 min ^b
Biomek i7	Circa 4 ore e 10 min	Circa 20-24 min	Circa 4 ore e 34 min
SPT firefly	3 ore e 8 min	Circa 20-22 min	Circa 3 ore e 28 min

a. 96 campioni per corsa.
b. La durata della corsa di Biomek NGenius per elaborare 24 campioni è 7 ore e 15 minuti.

La percentuale di letture messe in demultiplex, che rappresenta la percentuale del numero totale di letture assegnate correttamente a un campione in base al suo codice a barre, mostra valori comparabili con un basso coefficiente di variazione (CV, coefficient of variation) (al massimo 10%) su metodi automatizzati e manuali, indicando inoltre che sono stati ottenuti dati di buona qualità con tutti i metodi di preparazione delle librerie valutati (Figura 2B).

Dimensioni mediane dell'inserzione

La dimensione dell'inserzione è un parametro importante nella preparazione delle librerie NGS e può essere influenzata dalle condizioni di reazione di tagmentazione come tempo, temperatura e fasi di pulizia delle librerie utilizzando Illumina Purification Beads. La preparazione automatizzata delle librerie ha determinato una dimensione mediana coerente dell'inserzione superiore a quella osservata con la preparazione manuale delle librerie (Figura 3).

Tabella 2: metriche di sequenziamento e tempi del saggio con metodi di preparazione delle librerie manuali e automatizzati

Metodo	% Q30 medio	% PF	N. totale di letture PE PF	Durata della corsa di sequenziamento
Manuale	97,95 ± 0,40	81,09 ± 8,4	64.122.141	14 ore e 13 min
Biomek NGenius	97,92 ± 0,18	77,72 ± 0,96	61.455.112	14 ore e 2 minuti
Biomek i7	96,67 ± 0,55	78,04 ± 2,79	61.710.695	14 ore e 2 minuti
SPT firefly	97,66 ± 0,13	75,31 ± 1,49	59.551.797	14 ore e 21 min

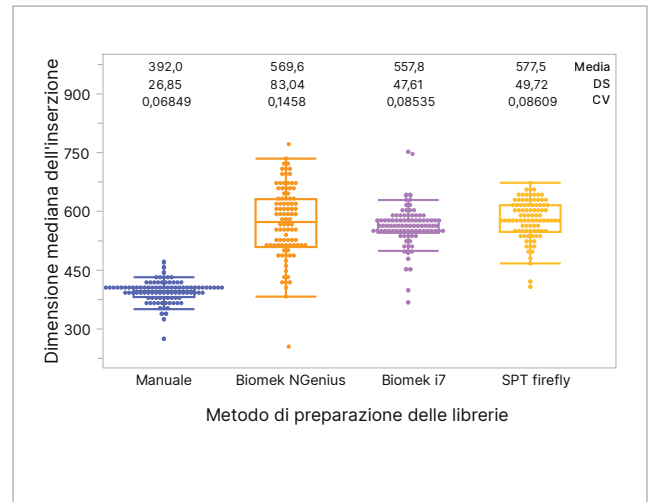
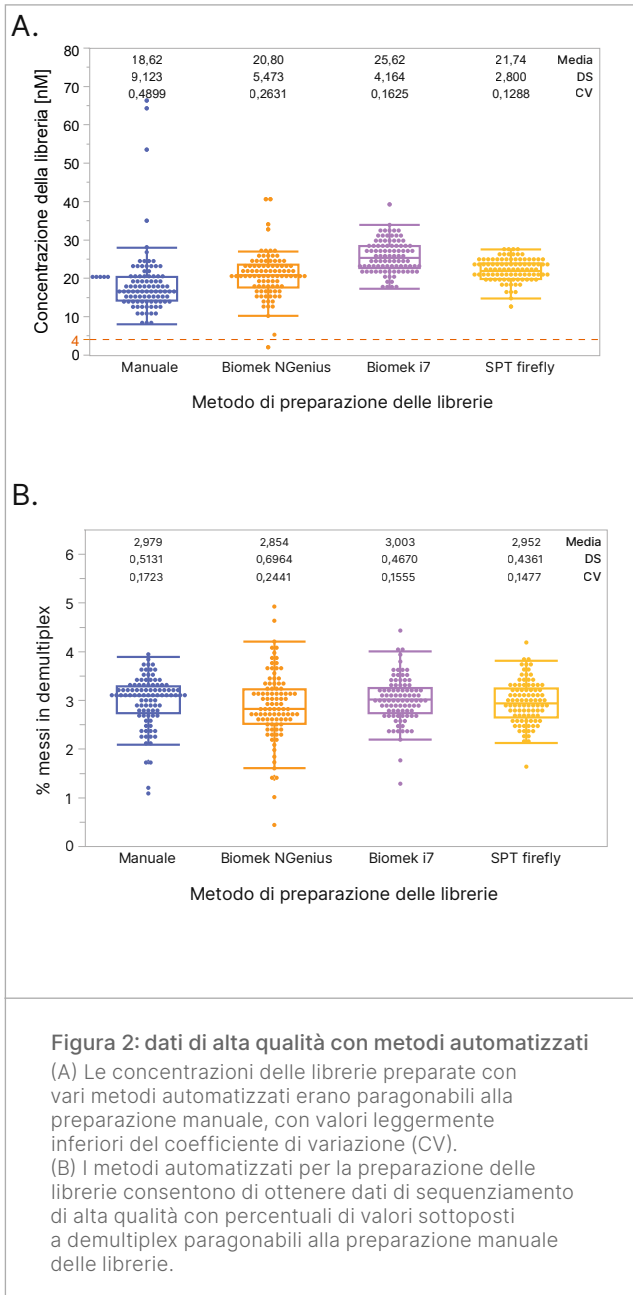
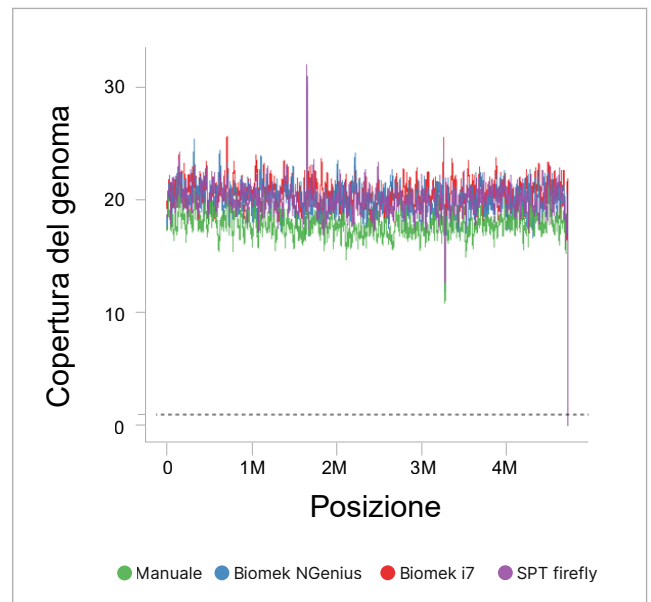


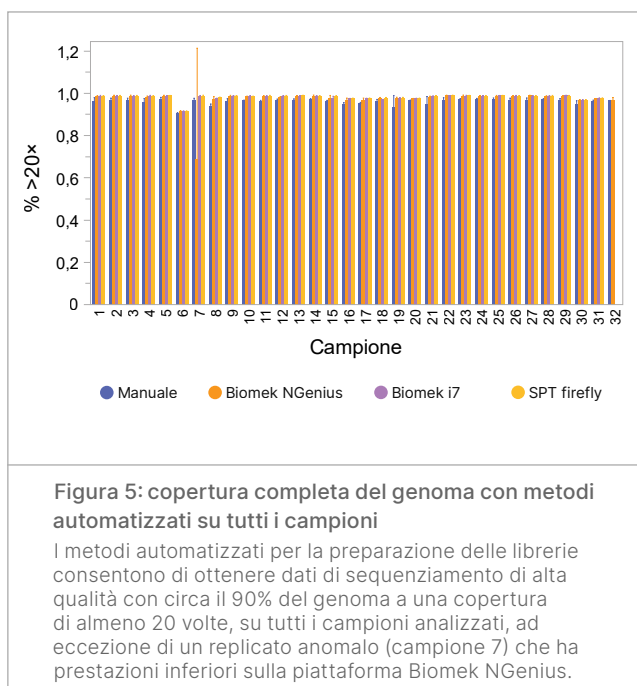
Figura 3: dimensione mediana coerente dell'inserzione con metodi automatizzati

La dimensione mediana dell'inserzione per i metodi di preparazione automatizzata delle librerie era costantemente superiore alla dimensione mediana dell'inserzione generata con la preparazione manuale delle librerie.



Copertura del genoma

L'analisi DRAGEN sWGS ha dimostrato che è stato coperto almeno il 90% del genoma *Salmonella* a una profondità di copertura di almeno 20 volte, come mostrato da una media mobile della copertura in un campione rappresentativo (Figura 4) e su 30 campioni analizzati su 33 (Figura 5). La dimensione mediana più corta dell'inserzione con preparazione manuale (Figura 3) può spiegare la profondità di copertura inferiore osservata con la preparazione manuale (Figura 4), sebbene realizzi comunque una copertura completa del genoma (Figura 5).



Bibliografia

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. Pubblicato il 13 luglio 2023. doi:10.3389/fpubh.2023.1195581.
6. Illumina. [Food safety surveillance with the MiSeq i100 Series application note](#). Pubblicato il 28 luglio 2025. Consultato il 1° agosto 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. Pubblicato il 4 giugno 2025. doi:10.3390/microorganisms13061310.
9. Illumina. [Maximizing performance on the MiSeq i100 Series](#). [illumina.com/content/dam/illumina/gcs/assembly-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/assembly-assets/marketing-literature/miseq-i100-library-optimization-technote-m-gl-03322/miseq-i100-library-optimization-technote-m-gl-03322.pdf). Pubblicato nel 2024. Consultato il 15 luglio 2025.

Riepilogo

Le malattie di origine alimentare correlate alla contaminazione microbica da batteri rappresentano una minaccia sostanziale per la salute umana. I metodi automatizzati generano librerie uniformi con meno interventi manuali e meno opportunità di errore umano. MiSeq i100 Series può incorporare metodi automatizzati per la preparazione delle librerie per consentire un flusso di lavoro NGS rapido e completo che fornisce dati di alta qualità per una sorveglianza efficace nell'ambito degli sforzi di salute pubblica.

Ulteriori informazioni →

[Illumina DNA Prep](#)

[MiSeq i100 Series](#)

illumina[®]

Numero verde 1.800.809.4566 (U.S.A.) | Tel. +1.858.202.4566
techsupport@illumina.com | www.illumina.com

© 2026 Illumina, Inc. Tutti i diritti riservati. Tutti i marchi di fabbrica sono di proprietà di Illumina, Inc. o dei rispettivi proprietari. Per informazioni specifiche sui marchi di fabbrica, visitare la pagina web www.illumina.com/company/legal.html.
M-GL-02913 ITA v1.0