

# Soluções de automação para vigilância da segurança alimentar com o MiSeq™ i100 Series

Bibliotecas altamente uniformes e dados de alta qualidade para detecção de patógenos transmitidos por alimentos

**Tempo de manuseio reduzido**

**Desempenho consistente e confiável**

**Cobertura abrangente de genomas bacterianos**

## Introdução

O gerenciamento da segurança alimentar é uma parte essencial da saúde pública. Doenças transmitidas por alimentos relacionadas à contaminação microbiana por bactérias patogênicas representam uma ameaça significativa à saúde humana. Em particular, **cepas bacterianas recorrentes, emergentes ou persistentes (REP)**, incluindo *E. coli* patogênica, *Listeria*, *Campylobacter*, *Shigella* e *Salmonella*, podem causar surtos agudos periodicamente.<sup>1,2</sup>

O uso de métodos laboratoriais para detectar subtipos de bactérias entéricas, incluindo *Salmonella*, tem sido fundamental para identificar possíveis surtos e relacionar doenças causadas por bactérias a fontes de surtos. Nos Estados Unidos, a vigilância molecular nacional por meio de sequenciamento de última geração (NGS) evita mais de 250.000 casos de doenças causadas por bactérias entéricas todos os anos e economiza meio bilhão de dólares em custos médicos e perda de produtividade.<sup>3,4</sup>

Embora o sequenciamento de genoma completo (WGS) com base em NGS tenha fornecido vantagens significativas em termos de velocidade, precisão e profundidade das informações para laboratórios de microbiologia, a preparação de bibliotecas continua sendo um gargalo. A automação da preparação de bibliotecas usando um sistema de manipulação de líquidos gera bibliotecas uniformes com menos tempo de manuseio e menos oportunidades de erro humano.<sup>5</sup>

Esta nota técnica demonstra o desempenho de um fluxo de trabalho abrangente de NGS que integra três opções para automatizar a preparação da biblioteca usando o Illumina DNA Prep com sequenciamento no MiSeq i100 Series e análise com o software DRAGEN™ para vigilância eficiente e precisa da segurança alimentar (**Figura 1**).<sup>6</sup>

## Métodos

### Amostras

Trinta e dois isolados de *Salmonella enterica* coletados como parte da vigilância de rotina PulseNet<sup>7</sup> foram cultivados em BBL Blood Agar Base sem a adição de sangue (BD, N.º do catálogo 211037). O DNA genômico (gDNA) foi extraído usando o Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega, N.º do catálogo A1120) com pequenas modificações ao protocolo para o isolamento de gDNA de bactérias gram-negativas.<sup>8</sup> O gDNA purificado foi quantificado com o Qubit dsDNA BR Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, N.º do catálogo Q32853) antes da preparação da biblioteca.

### Preparação da biblioteca

As bibliotecas prontas para sequenciamento foram preparadas em triplicata usando três opções para soluções automatizadas e uma opção manual para o Illumina DNA Prep (Illumina, N.º do catálogo 20060059). Para normalização do rendimento da biblioteca, 100 ng de gDNA extraído por amostra foram usados como material de entrada. Para o tamanho ideal do inserto no MiSeq i100 Series, inclui-se uma rodada adicional de purificação por beads com proporção de beads para amostra de 0,5× para remover insertos curtos.<sup>9</sup> As três soluções de automação avaliadas incluíram o **Biomek NGenius Next Generation Library Prep System** (Beckman Coulter, N.º do catálogo C62), a **estação de trabalho automatizada Biomek i7** (Beckman Coulter, N.º do catálogo B87585), e a **plataforma firefly** (SPT Labtech) (**Tabela 1**).



**Figura 1: Fluxo de trabalho abrangente de NGS para detecção de *Salmonella***

Combine soluções automatizadas para a preparação da biblioteca da Illumina com o sequenciamento no MiSeq i100 Series e DRAGEN secondary analysis para vigilância precisa do patógeno transmitido por alimentos *Salmonella*.

A qualidade e a concentração das bibliotecas amplificadas por PCR foram avaliadas usando o 4200 TapeStation System (Agilent Technologies, N.º do catálogo G2991BA) e o Qubit 1X dsDNA High Sensitivity (HS) Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, N.º do catálogo Q33231) antes do agrupamento.

## Sequenciamento

As bibliotecas preparadas foram agrupadas por volume e diluídas a uma concentração de carregamento de 60 pM (32 bibliotecas/corrída). O sequenciamento foi realizado no MiSeq i100 Plus System usando uma lâmina de fluxo de 25M com configuração de corrida de  $2 \times 301$  bp. Para estudos maiores, as corridas de sequenciamento podem ser dimensionadas para os sistemas NextSeq™ 1000, NextSeq 2000 ou NovaSeq™ 6000.

## Análise de dados

Após a conclusão do sequenciamento, os dados foram transmitidos para o BaseSpace™ Sequence Hub e processados com o FASTQ Toolkit (v2.2.6) para reduzir os conjuntos de dados para 700.000 leituras tipo paired-end (PE). A análise foi realizada usando a aplicação DRAGEN Small Whole-Genome Sequencing (sWGS) (v4.3.13) para obter cobertura genômica, métricas de profundidade mediana e métricas de ensaio adicionais.

## Resultados

### Métricas de sequenciamento

O MiSeq i100 Plus System gerou dados de sequenciamento com média de  $\geq 96,5$  % das bases acima de Q30 e  $\geq 75$  % das leituras no filtro de passagem (PF) (Tabela 2). A concentração de bibliotecas preparadas com métodos automatizados e manuais foi comparável (Figura 2A).

Tabela 2: Métricas de sequenciamento e tempos de corrida com métodos de preparação de bibliotecas manuais e automatizados

Método	Média % Q30	% PF	Nº. total de PF de leitura de PE	Tempo da corrida de sequenciamento
Manual	97,95 $\pm$ 0,40	81,09 $\pm$ 8,4	64.122.141	14 h 13 min
Biomek NGenius	97,92 $\pm$ 0,18	77,72 $\pm$ 0,96	61.455.112	14 h 2 min
Biomek i7	96,67 $\pm$ 0,55	78,04 $\pm$ 2,79	61.710.695	14 h 2 min
SPT firefly	97,66 $\pm$ 0,13	75,31 $\pm$ 1,49	59.551.797	14 h 21 min

Tabela 1: Tempos do ensaio com métodos de preparação de bibliotecas manuais e automatizados

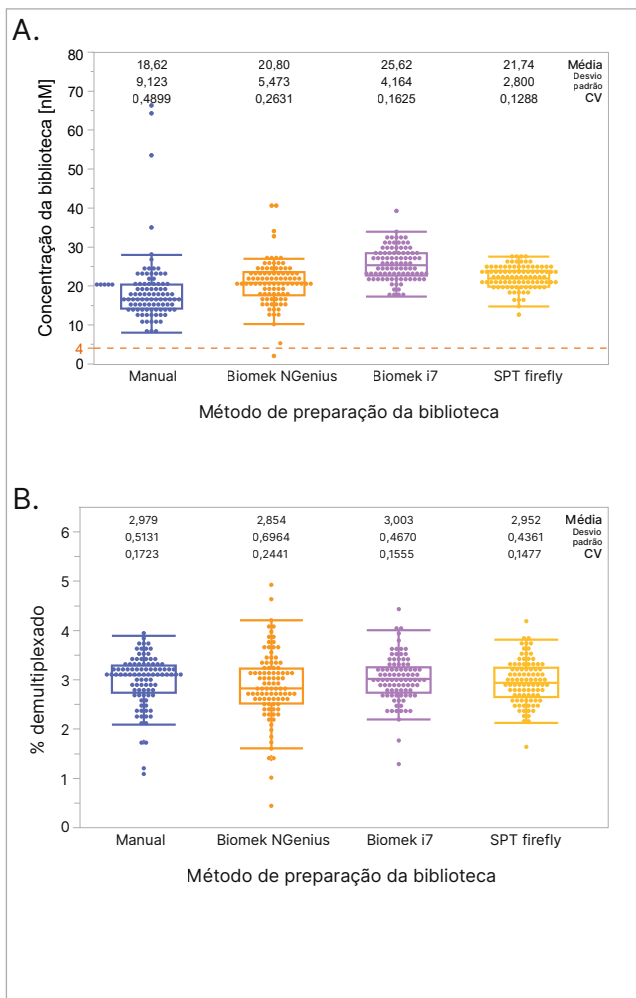
Método <sup>a</sup>	Tempo de automação	Tempo de manuseio	Tempo total do ensaio
Manual	N/A	60 a 90 min	Aprox. 4 a 4,5 h
Biomek NGenius	21 h 45 min	Aprox. 45 min	Aprox. 21 h 45 min <sup>b</sup>
Biomek i7	Aprox. 4 h 10 min	Aprox. 20 a 24 min	Aprox. 4 h 34 min
SPT firefly	3 h 8 min	Aprox. 20 a 22 min	Aprox. 3 h 28 min

a. 96 amostras por corrida.  
b. O tempo de corrida do Biomek NGenius para processar 24 amostras é de 7 h e 15 min.

A porcentagem de leituras demultiplexadas, que representa a proporção do número total de leituras que foram atribuídas com sucesso a uma amostra com base em seu código de barras, apresentou valores comparáveis com um baixo coeficiente de variação (CV) ( $\leq 10$  %) entre métodos automatizados e manuais, indicando ainda que dados de boa qualidade foram obtidos com todos os métodos de preparação de biblioteca avaliados (Figura 2B).

### Tamanhos médios do inserto

O tamanho do inserto é um parâmetro importante na preparação da biblioteca de NGS e pode ser afetado pelas condições da reação de tagmentação, como tempo, temperatura e etapas de limpeza da biblioteca usando Illumina Purification Beads. A preparação automatizada da biblioteca resultou em um tamanho médio do inserto consistente e maior do que o observado na preparação manual da biblioteca (Figura 3).

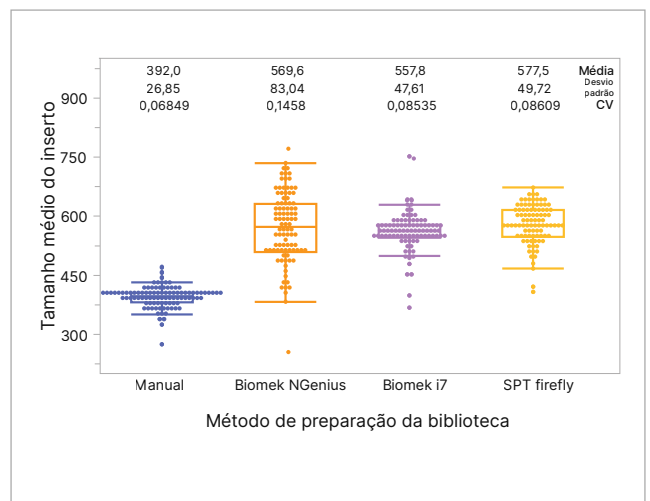


**Figura 2: Dados de alta qualidade com métodos automatizados**

(A) As concentrações de bibliotecas preparadas com vários métodos automatizados foram comparáveis à preparação manual, com valores de coeficiente de variação (CV) ligeiramente menores. (B) Os métodos automatizados de preparação de bibliotecas resultam em dados de sequenciamento de alta qualidade com valores % demultiplexados comparáveis aos da preparação manual de bibliotecas.

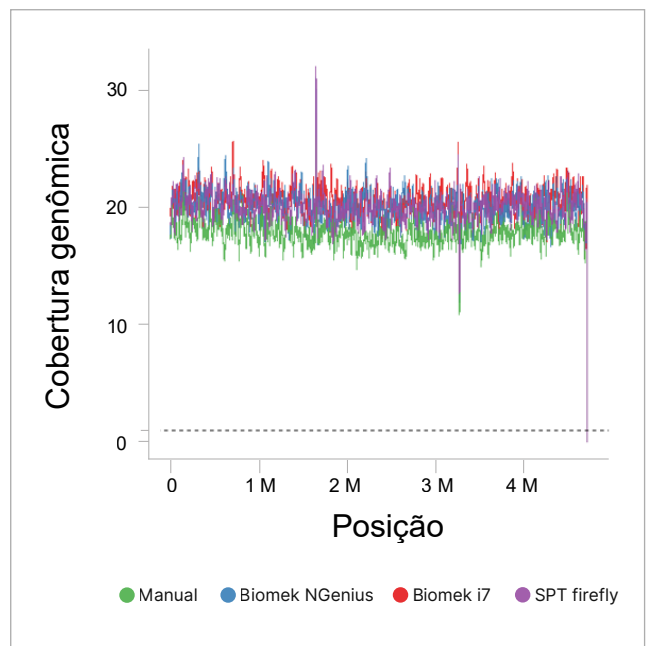
### Cobertura genômica

O DRAGEN sWGS analysis demonstrou que  $\geq 90\%$  do genoma de *Salmonella* foi coberto com profundidade de cobertura  $\geq 20\times$ , conforme mostrado por uma média móvel de cobertura em uma amostra representativa (Figura 4) e em 30 de 33 amostras analisadas (Figura 5). O menor tamanho médio do inserto com a preparação manual (Figura 3) pode explicar a menor profundidade de cobertura observada com a preparação manual (Figura 4), embora ainda atinja uma cobertura do genoma abrangente (Figura 5).



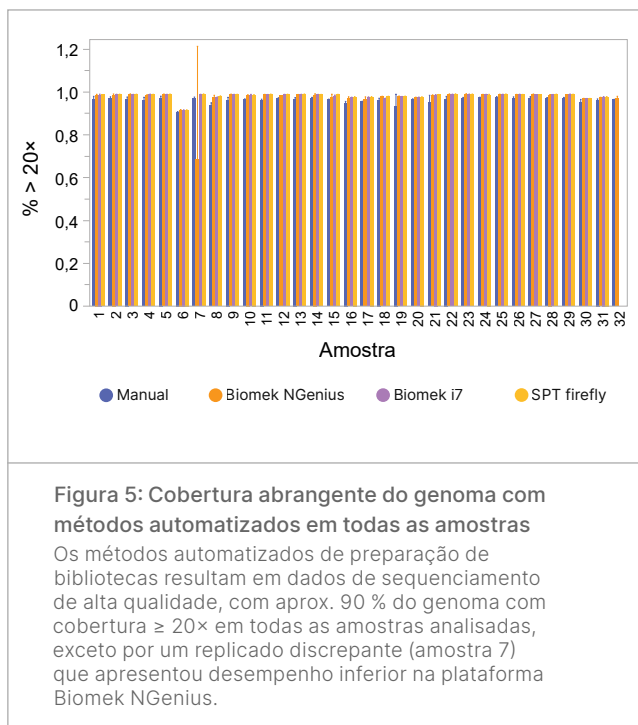
**Figura 3: Tamanho médio do inserto consistente com métodos automatizados**

O tamanho médio do inserto para métodos automatizados de preparação de bibliotecas é consistentemente maior do que o tamanho médio do inserto gerado com a preparação manual de bibliotecas.



**Figura 4: Cobertura do genoma com métodos automatizados**

Os métodos automatizados de preparação de bibliotecas resultam em dados de sequenciamento de alta qualidade, conforme mostrado por uma média contínua da cobertura do genoma em uma amostra representativa.



## Resumo

Doenças transmitidas por alimentos relacionadas à contaminação microbiana por bactérias constituem uma ameaça significativa à saúde humana. Os métodos automatizados geram bibliotecas uniformes com menos tempo de manuseio e menos oportunidades de erro humano. O MiSeq i100 Series pode incorporar métodos automatizados para a preparação de bibliotecas a fim de viabilizar um fluxo de trabalho rápido e abrangente de NGS que fornece dados de alta qualidade para vigilância eficaz como parte dos esforços de saúde pública.

Saiba mais →

[Illumina DNA Prep](#)

[MiSeq i100 Series](#)

**illumina**<sup>®</sup>

+1 (800) 809-4566, ligação gratuita (EUA) | tel. +1 (858) 202-4566  
techsupport@illumina.com | www.illumina.com

© 2026 Illumina, Inc. Todos os direitos reservados. Todas as marcas comerciais pertencem à Illumina, Inc. ou aos respectivos proprietários. Para obter informações específicas sobre marcas comerciais, consulte [www.illumina.com/company/legal.html](http://www.illumina.com/company/legal.html).  
M-GL-02913 PTB v1.0

## Referências

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. Published 2023 Jul 13. doi:10.3389/fpubh.2023.1195581
6. Illumina. [Food safety surveillance with the MiSeq i100 Series application note](#). Publicado em 28 de julho de 2025. Acessado em 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. Publicado em 4 de junho de 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://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). Publicado em 2024. Acessado em 15 de julho de 2025.