

VINEO™ ZYGO *bailii* Test

Ref.: 354-8102

Instructions

Test to detect *Zygosaccharomyces bailii* using
real-time PCR

BIO-RAD

TABLE OF CONTENTS

- 1 - INTRODUCTION
 - 2 - PRINCIPLE BEHIND THE VINEO™ ZYGO *bailii* Test
 - 3 - KIT COMPOSITION
 - 4 - VALIDITY AND PRESERVATION
 - 5 - REQUIRED EQUIPMENT THAT IS NOT PROVIDED
 - 6 - PRECAUTIONS AND RECOMMENDATIONS
 - 7 - SAMPLING AND TRANSPORT OF SAMPLES
 - 8 - DNA EXTRACTION
 - 9 - REAL-TIME PCR
 - 10 - ANALYSIS OF THE DATA
 - 11 - INTERPRETATION OF THE RESULTS
 - 12 - CONFIRMATION PROTOCOL FROM ISOLATED COLONIES
 - 13 - TEST PERFORMANCE
- APPENDIX A - PCR AMPLIFICATION REAGENT MIXTURE PREPARATION TABLE
- APPENDIX B - PLATE SETUP FOR THE CFX96™ THERMOCYCLER
- APPENDIX C - PLATE SETUP FOR THE MiniOpticon™ THERMOCYCLER

1 - INTRODUCTION

Zygosaccharomyces bailii is a yeast responsible for significant economic losses in the food industry. Many acids and/or high sugar content such as fruit concentrates, wine, soft drinks, syrups, ketchup, mayonnaise, pickles, salad dressing... are normally considered stable in storage, ie they readily inactivate a wide range of food-borne microorganisms.

However, these products are susceptible to be spoiled by *Zygosaccharomyces bailii*. This is a particularly robust species to many stress conditions encountered in food matrices where other microorganisms are not able to grow or even survive. It is described, for its ability to ferment residual sugars in beverages such as wines and fruit juices.

In wines, its presence is difficult to detect by conventional culture methods that are long and non-specific. Rapid, specific and early detection of this yeast in the wine making process can allow to take measures to prevent and eliminate it before the onset of damage which it is responsible for olfactory and gustatory deviations, and unwanted sparkling.

Faced with traditional microbiological methods, molecular biology provides detection solutions with high levels of speed, sensitivity and specificity.

VINEO™ *ZYGO bailii* Test is a qualitative test used for specific detection of *Zygosaccharomyces bailii* in wines using the real-time polymerase chain technique (RT-PCR). A specific sequence of *Zygosaccharomyces bailii* is amplified and detected simultaneously by means of a fluorescent probe. Implementation of this test is used to obtain a qualitative result in 2 hours after DNA extraction (VINEO™ Extract DNA Kit, 354-8100). CFX Manager™ Industrial Diagnostic Edition is the analysis software adapted to these test and makes it possible to detect the *Zygosaccharomyces bailii* risk in the analyzed wine sample by an automatic and qualitative analysis.

The VINEO™ *ZYGO bailii* Test can also be used to confirm isolated colonies from a culture medium.

2 - PRINCIPLE BEHIND THE VINEO™ ZYGO *bailii* Test

This test is based on amplification and detection of DNA sequences using the real-time PCR technique. It uses primers and a DNA probe that are specific to *Zygosaccharomyces bailii*. Detection and analysis of the results are optimized for use with a thermocycler for Bio-Rad real-time PCR such as MiniOpticon™ or CFX96™.

During the PCR reaction, the primers will be hybridized in the target region and will then - catalyzed by the polymerase - lengthen in the 5'-3' direction using the desoxynucleotide triphosphate (dNTPs) present in the reagent mixture, thereby creating a complementary DNA sequence, called an amplicon.

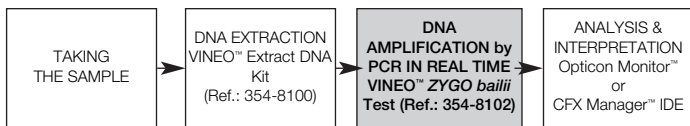
During PCR, oligonucleotidic probes that are specific to the target sequence will be hybridized with the amplicons. These probes, which are marked by fluorophores, only emit fluorescence when hybridization takes place. The probe that is linked to the target sequence of *Zygosaccharomyces bailii* is marked by a specific fluorophore. Intensity of fluorescence increases proportionally to the increase in quantity of amplification products in the PCR tube. The fluorescence that is generated in this way is directly measured by the optical module of the thermocycler.

A synthetic DNA called the "Internal control" is added to each reaction. It is amplified at the same time as the target sequences of *Zygosaccharomyces bailii* but detected by a probe marked with a second fluorophore. It is used to bring out any reaction inhibiting phenomenon.

The software associated with the device calculates the relation between the intensity of the fluorescence and the amplification cycle automatically. This relation shows the presence or absence of *Zygosaccharomyces bailii* in the sample.

The results obtained by amplification of this DNA are analyzed by the CFX Manager™ IDE software that have been programmed to carry out an automatic and qualitative analysis. An interpretation of the risk linked to the presence of *Zygosaccharomyces bailii* is then proposed to the user.

This test is used to detect *Zygosaccharomyces bailii* in the DNA extracted from fermented drinks produced from grape and fermenting grape musts.



3 - KIT CONTENTS

Stoppers	Designation	Reagent	Volume
Pink	Fluorescent probes	Fluorescent probes	1 tube (0.55 mL)
White	Amplification mix	Amplification mix	2 tubes (2 x 2.2 mL)
Green	Negative PCR control	Negative PCR control	1 tube (0.5 mL)
Red	Positive PCR control	Positive PCR control	1 tube (0.5 mL)

This kit contains the quantity of reagent required for 96 reactions.

4 - VALIDITY AND PRESERVATION

On reception, the kit must be stored at temperatures between +2°C and +8°C. Each reagent stored between +2°C and +8°C can be used until the expiry date indicated on the tube.

NB: Do not freeze the reagents.

5 - REQUIRED EQUIPMENT THAT IS NOT PROVIDED

Equipment:

- Industrial Diagnostic CFX96™ Deepwell Touch real-time PCR detection system, 96 wells, ref. Bio-Rad: 359-4990
- Industrial Diagnostic CFX96™ real-time PCR detection system, 96 wells, ref. Bio-Rad: 359-3990
- CFX Manager™ Software, Industrial Diagnostic Edition, ref. Bio-Rad: 359-3893
- MiniOpticon™ system for real-time PCR, reaction block of 48 wells, ref. Bio-Rad: 359-3995
- Vortex
- Optionally: centrifuge with rotor for plates or strips (max. 2000 x G)
- 20 µL, 200 µL and 1000 µL micropipettes
- Multi-distributor such as combitip pipettes

Note: We recommend using an uninterruptible power supply with the thermocycler.

Consumables:

- For the plates, PCR tubes and stop caps:
 - White plates of 96 “Low-profile” wells, ref. Bio-Rad: MLL-9651
 - White plates of 48 “Low-profile” wells, ref. Bio-Rad: MLL-4851
 - Strips of 8 tubes of 200 μL “Low-profile”, ref. Bio-Rad: TLS-0851
 - Strips of 8 flat optical stop caps for tubes or plates of 0.2 mL wells, 120 strips ref. Bio-Rad: TCS-0803
- Cones for Combitip or multi-distributor, sterile when packaged individually
- Cones with sterile filters that are adaptable to 10 μL , 20 μL , 100 μL , 200 μL and 1000 μL micro-pipettes
- 2 mL and 5 mL sterile tubes
- Non-powdered latex or nitrile gloves
- Sterile distilled water
- 5% Chlorine Bleach
- Decontaminating agent such as DNA AWAY® or RNase AWAY®

6 - PRECAUTIONS AND RECOMMENDATIONS

- This trial must be carried out by staff who have had adequate training.
- Result quality depends on scrupulous compliance with Laboratory Good Practice, in particular in the area of PCR:
 - The equipment (pipettes, tubes etc.) must not go from one work station to another.
 - It is indispensable to use a positive and a negative control for each series of amplification reactions.
 - Do not use the reagents beyond their expiry date.
 - Subject the reagents in the kit to a vortex movement using the apparatus provided for this purpose before using them to work with homogeneous solutions.
 - Check the exactness and the precision of the pipettes as well as the proper functioning of the instruments.
 - Change gloves regularly and as soon as you suspect that they may have been contaminated.
 - Clean work surfaces regularly with a 5% solution of chlorine bleach and another agent such as DNA AWAY® or RNase AWAY®.
 - Wear non-powdered gloves so as not to leave fingerprints on the optical film used to seal the micro-plates. Do not write on the PCR tube stoppers. In both cases, recording the data by the device can be disturbed.

We strongly recommend that you read the complete protocol before beginning the trial.

Follow the suggested protocol scrupulously.

7 - SAMPLING AND TRANSPORT OF SAMPLES

Wine samples are collected under aseptic conditions in sterile glass or polyethylene recipients or recipients made out of similar material.

The samples must be submitted to the laboratory as quickly as possible, preferably within 24 and not more than 48 after taking the sample. If the samples are transported and analysed within 24 h, transport and storage take place at ambient temperature (+18°C to +30°C). If the samples are transported and analysed within 48 h, transport and storage take place at between +2°C to +8°C.

8 - DNA EXTRACTION

DNA extraction must be carried out using the kit developed by Bio-Rad to extract DNA from wine sample: VINEO™ Extract DNA Kit (ref. Bio-Rad 354-8100).

9 - REAL-TIME PCR

1. Starting up the PCR apparatus

Switch the thermocycler and the computer on in that order and start up the Opticon Monitor software. For more information and for the definition of software parameters, see the user guide for the Bio-Rad thermocycler for the VINEO™ ZYGO *bailii* Test.

2. Preparing PCR reactions

2.1 Prepare the VINEO™ ZYGO *bailii* Test reagent mixture by mixing (40 µL/sample) the **amplification solution** (tube with white stopper) and (5 µL/sample) the **fluorescent probes** (tube with pink stopper). Carry out the reagent mixture on the basis of the number of samples and controls to be analysed (at least 1 positive PCR control and 1 negative control must be used per plate). The PCR amplification reagent mixture preparation table in **Appendix A** indicates the required quantities of each reagent to be mixed on the basis of the number of samples to be analysed. Do not forget to include the 2 control points.

Note: do not mix reagent batches.

2.2 After preparation, the reagent mix (amplification and probe solutions) must be used immediately, or can be stored for **2 hours between +2°C and +8°C**.

2.3 Distribute **45 µL** of this reagent mixture per well according to the defined plate surface. **Appendices B and C** propose plate surfaces to be used for the CFX96™ and MiniOpticon™ thermocyclers respectively.

Add **5 µL** of sample or negative control or PCR positive control and seal the wells on the plate or the strips hermetically. It is important to insist on sealing the wells and the strips to avoid any evaporation phenomenon during the PCR reaction.

It is important to avoid the presence of bubbles at the bottom of the wells by pipetting cautiously. To eliminate bubbles after sealing the plate or closing the PCR strips, you may centrifuge the plate of PCR strips briefly. The plate can be store at **+2°C to +8°C for 2 hours**.

2.4 Put the plate or the PCR strips into the thermocycler. Make sure that they are correctly oriented (well A1 at the top left).
Close the reaction module.

3. Starting the amplification reaction

To restart the PCR, refer to the user guide for the Bio-Rad thermocycler for the VINEO™ ZYGO *bailii* Test.

10 - ANALYSIS OF THE DATA

Data analysis can be carried out directly at the end of the amplification reaction or later by re-opening the data file. To open the data files and analyse the results of the PCR, refer to the user guide for the Bio-Rad thermocycler for the VINEO™ ZYGO *bailii* Test.

11 - INTERPRETATION OF THE RESULTS

To obtain the analysis results, you only have to read the values of Cq (Cycle quantification): value of the amplification cycle from which fluorescence increases significantly above background noise.

You must use the the Opticon Monitor™ software (version 3.3 and higher) or the CFX Manager™ software Industrial Diagnostic Edition for an automated interpretation. A complete report may be printed (cf. software instructions).

1. Controls

In case of manual analysis, before a final interpretation of the results, you have to check the results of the negative and positive controls.

For the test to be valid, the results of the negative and positive controls must be as follows:

	Detection of <i>Zygosaccharomyces bailii</i> (FAM)	Control HEX
Negative control	$Cq = N/A^*$	$25 \leq Cq \leq 40$
Positive PCR control	$27 \leq Cq \leq 37$	Not significant

* N/A means "Not Applicable". The software indicates N/A for the Cq of a sample when the fluorescence curve does not cross the threshold.

If the results of the positive and negative PCR controls are different from those described in the table below, you have to begin the PCR again.

2. Samples

A sample is considered to be **positive** for *Zygosaccharomyces bailii* if the value of $10 \leq Cq \leq 40$ is obtained for the FAM fluorophore.

If no value is obtained for Cq_{FAM} ($Cq_{FAM} = N/A$), the interpretation of the result depends on the value of the internal control:

- A sample is considered to be **negative** for *Zygosaccharomyces bailii* if no value of Cq is obtained for the FAM fluorophore ($Cq_{FAM} = N/A$ and if the Cq of the internal control is greater than or equal to 25. ($Cq_{HEX} \geq 25$).
- An N/A value for the Cq_{HEX} of the internal control indicates that an inhibition phenomenon of the PCR reaction has probably occurred, if the Cq_{FAM} of the target is also N/A. In this case, the DNA sample must be diluted (to $1/10^{\text{th}}$ for example) in sterile distilled water and then subjected to a new PCR.
- If the Cq_{HEX} of the internal control is less than 25, it is impossible to interpret the result. Check that the threshold was set correctly or that the raw curve shows an aspect characteristic of exponential amplification. If the observed curve is not correct, it will be necessary to repeat the PCR test for this sample.

Interpretation of results obtained for the samples:

Detection of <i>Zygosaccharomyces bailii</i> (FAM)	Detection of the internal control	Interpretation
Cq \geq 10***	Not significant	Positive
Cq = N/A	Cq _{HEX} \geq 25	Negative
Cq = N/A	Cq = N/A	Inhibition**

***: In the event of a null value for a sample and its internal control (Cq = N/A), the analysis must be done again with the diluted DNA sample (diluted to 1/5^m or to 1/10^m for example).*

****: A value less than 10 may be obtained; check whether the curve as raw data shows an aspect that is characteristic of exponential amplification (flat base line and regular increase in fluorescence followed by a plateau). If the observed curve is correct, the sample for the presence of Zygosaccharomyces bailii may be considered to be positive. Otherwise, the interpretation of the result depends on the value of the internal control, as is explained in the previous paragraphs.*

12 - CONFIRMATION PROTOCOL FROM ISOLATED COLONIES

You can use the VINEO™ ZYGO *bailii* Test to confirm isolated colonies on agarose gel.

1. Puncture an isolated colony, whether it comes from a selective medium or not, using a toothpick or a 1 μ L piercing instrument, or any other consumable adapted to this purpose (a pipette cone for example).
2. Resuspend the colony in 100 μ L of R2 in an Eppendorf tube (it is possible to resuspend the colony in steril physiological water, PCR efficiency can then be affected). Homogenise the suspension by means of a vortex.
3. Put 5 μ L of suspension in 45 μ L of PCR reagent mixture (cf. part 9.2 Real-time PCR) and follow the rest of the VINEO™ ZYGO *bailii* Test method to obtain and interpret results. **Note: a qualitative analysis is made from the PCR carried out on this suspension. The signal obtained by PCR is often quite high because the quantity of cells sampled and analysed by PCR using this method is quite significant.**

13 - TEST PERFORMANCE

The VINEO™ ZYGO *bailii* Test is specific for detecting *Zygosaccharomyces bailii*. You can detect the yeast from:

- 27 CFU/mL of wine using the DNA extraction protocol described in the VINEO™ Extract DNA Kit for 1.8 mL.
- 1 CFU/mL of wine according to the protocol starting from 45 mL for the analysis of which requires a high level of analytic sensitivity.

APPENDIX A - PCR AMPLIFICATION REAGENT MIXTURE PREPARATION TABLE

Use this table to determine the required quantities of fluorescent probes and amplification solution to prepare the PCR reagent mixture. **Calculation of the number of samples must include the positive PCR control and the negative control.**

Number of samples	Fluorescent probes (µL) (Pink stopper)	Amplification solution (µL) (White stopper)
1	5	40
2	11	86
3	16	130
4	22	173
5	27	216
6	32	259
7	38	302
8	43	346
9	49	389
10	54	432
11	59	475
12	65	518
13	70	562
14	76	605
15	81	648
16	86	691
17	92	734
18	97	778
19	103	821
20	108	864
21	113	907
22	119	950
23	124	994
24	130	1037
25	135	1080
26	140	1123
27	146	1166
28	151	1210
29	157	1253
30	162	1296
31	167	1339
32	173	1382
33	178	1426
34	184	1469
35	189	1512
36	194	1555
37	200	1598
38	205	1642
39	211	1685
40	216	1728
41	221	1771
42	227	1814
43	232	1858
44	238	1901
45	243	1944
46	248	1987
47	254	2030
48	259	2074

Number of samples	Fluorescent probes (µL) (Pink stopper)	Amplification solution (µL) (White stopper)
49	265	2117
50	270	2160
51	275	2203
52	281	2246
53	286	2290
54	292	2333
55	297	2376
56	302	2419
57	308	2462
58	313	2506
59	319	2549
60	324	2592
61	329	2635
62	335	2678
63	340	2722
64	346	2765
65	351	2808
66	356	2851
67	362	2894
68	367	2938
69	373	2981
70	378	3024
71	383	3067
72	389	3110
73	394	3154
74	400	3197
75	405	3240
76	410	3283
77	416	3326
78	421	3370
79	427	3413
80	432	3456
81	437	3499
82	443	3542
83	448	3586
84	454	3629
85	459	3672
86	464	3715
87	470	3758
88	475	3802
89	481	3845
90	486	3888
91	491	3931
92	497	3974
93	502	4018
94	508	4061
95	513	4104
96	518	4147

APPENDIX B

PLATE SETUP FOR THE CFX96™ THERMOCYCLER

The first 2 wells in column 1 may be used to analyse the 2 control points. The other wells in the plate will be used for the samples to be analysed.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	C+											
B	NC											
C	Sample											
D	Sample											
E	Sample											
F	...											
G												
H												

NC: Negative PCR control

C+: Positive PCR control

APPENDIX C

PLATE SETUP FOR THE MiniOpticon™ THERMOCYCLER

The first 2 wells in column 1 may be used to analyse the 2 control points. The other wells in the plate will be used for the samples to be analysed.

	1	2	3	4	5	6
A	C+					
B	NC					
C	Sample					
D	Sample					
E	Sample					
F	...					
G						
H						

NC: Negative PCR control

C+: Positive PCR control

NOTICE OF CONCERN TO THE PURCHASER: LIMITED LICENSE

Use of this product is covered by one or more of the following US patents and the corresponding patent claims outside the United States: 5 079 352, 5 789 224, 5 618 711, 6 127 155, 5 677 152 (claims 1 to 23 only) and 5 773 258 (claims 1 and 6 only) and by the claims outside the United States that correspond to US patent n° 4 889 818. The purchase of this product includes limited immunity from legal proceedings that may not be transferred according to the claims of previous patents when this quantity of product is solely used for alimentary analysis, environmental and industrial microbiology purposes including publication of the results of the purchaser's activities in return for payment or other commercial counterpart, and when it is also used for the purchaser's own research purposes. No right according to any patent claim (such as the claims of method 5'-nuclease in US patents n° 5 210 015 and 5 487 972) is not expressly transferred whether by implication or preclusion. Further information on the purchase of licenses may be obtained by contacting the Director of Licenses, Applied Biosystems, 850 Lincoln Centre Drive, Foster City, California 94404, United States.

VINEO™ ZYGO *bailii* Test

Réf. : 354-8102

Notice d'utilisation

**Test pour la détection par PCR en temps réel de
*Zygosaccharomyces bailii***

BIO-RAD

SOMMAIRE

- 1 - INTRODUCTION
 - 2 - PRINCIPE DU VINEO™ ZYGO *bailii* Test
 - 3 - COMPOSITION DU KIT
 - 4 - VALIDITE ET CONSERVATION
 - 5 - EQUIPEMENT ET MATERIEL NECESSAIRES NON FOURNIS
 - 6 - PRECAUTIONS ET RECOMMANDATIONS
 - 7 - PRELEVEMENT ET TRANSPORT DES ECHANTILLONS
 - 8 - EXTRACTION DE L'ADN
 - 9 - PCR EN TEMPS REEL
 - 10 - ANALYSE DES DONNEES
 - 11 - INTERPRETATION DES RESULTATS
 - 12 - PROTOCOLE DE CONFIRMATION A PARTIR DE COLONIES ISOLEES
 - 13 - PERFORMANCES DU TEST
- ANNEXE A - TABLEAU DE PREPARATION DU MELANGE
REACTIONNEL D'AMPLIFICATION PCR
- ANNEXE B - PLAN DE PLAQUE A UTILISER SUR LE
THERMOCYCLEUR CFX96™
- ANNEXE C - PLAN DE PLAQUE A UTILISER SUR LE
THERMOCYCLEUR MiniOpticon™

1 - INTRODUCTION

Zygosaccharomyces bailii est une levure responsable de pertes économiques importantes dans l'industrie agroalimentaire. De nombreux produits acides et/ou à haute teneur en sucres tels que des fruits concentrés, le vin, les boissons gazeuses, les sirops, le ketchup, la mayonnaise, les cornichons, la vinaigrette... sont normalement considérés comme stables à la conservation, c'est à dire qu'ils inactivent facilement un large éventail de micro-organismes d'origine alimentaire.

Cependant, ces produits restent sensibles à la détérioration par *Zygosaccharomyces bailii*. C'est une espèce particulièrement résistante à de nombreuses conditions de stress rencontrées dans des matrices alimentaires où d'autres microorganismes ne sont pas capables de croître voire de subsister. Elle est notamment décrite pour sa capacité de fermentation des sucres résiduels présents dans les boissons de type vins et jus de fruits.

Dans les vins, sa présence est difficile à détecter par les méthodes de culture classiques qui sont longues et non spécifiques. La détection rapide, spécifique et précoce de cette levure dans le processus d'élaboration des vins permet de prendre des mesures de prévention et de l'éliminer avant l'apparition des détériorations dont elle est responsable : déviations olfactives, gustatives et effervescence non désirée.

Face aux méthodes microbiologiques traditionnelles, la biologie moléculaire apporte des solutions de détection à de hauts niveaux de rapidité, de sensibilité et surtout de spécificité.

VINEO™ ZYGO *bailii* Test est un test qualitatif permettant la détection spécifique de *Zygosaccharomyces bailii* dans les vins par la technique de polymérisation en chaîne en temps réel (RT-PCR). Une séquence d'ADN spécifique de *Zygosaccharomyces bailii* est amplifiée et détectée simultanément grâce à une sonde fluorescente. La mise en œuvre de ce test permet l'obtention d'un résultat en 2 h après l'extraction d'ADN réalisée avec le VINEO™ Extract DNA Kit, ref. 354-8100. Le logiciel d'analyse adapté à ce test CFX Manager™ Industrial Diagnostic Edition, permet par une analyse automatique et qualitative de détecter le risque *Zygosaccharomyces bailii* dans l'échantillon de vin analysé.

Le VINEO™ ZYGO *bailii* Test peut également être utilisé pour la confirmation de colonies isolées à partir d'un milieu de culture.

2 - PRINCIPE DU VINEO™ ZYGO *bailii* Test

Ce test repose sur l'amplification et la détection de séquences d'ADN par la technique de PCR en temps réel. Il utilise des amorces et une sonde d'ADN spécifiques de *Zygosaccharomyces bailii*. La détection et l'analyse des résultats sont optimisées pour l'utilisation avec un thermocycleur pour la PCR en temps réel Bio-Rad, tel que le MiniOpticon™ ou le CFX96™.

Au cours de la réaction de PCR, les amorces vont s'hybrider à la région cible puis la Taq polymérase permettra l'allongement de la séquence ADN dans le sens 5'-3' en utilisant les désoxynucléotides triphosphates (dNTPs) présents dans le mélange réactionnel, créant ainsi une séquence complémentaire d'ADN, appelée amplicon.

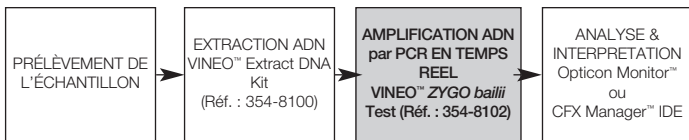
Pendant la PCR, des sondes oligonucléotidiques, spécifiques de la séquence cible, vont s'hybrider aux amplicons. Ces sondes, marquées par des fluorophores, émettent de la fluorescence uniquement quand l'hybridation a lieu. La sonde qui se lie à la séquence cible de *Zygosaccharomyces bailii* est marquée par un fluorophore spécifique. L'intensité de fluorescence augmente proportionnellement avec l'augmentation de la quantité des produits d'amplification dans le tube PCR. La fluorescence ainsi générée est mesurée directement par le module optique du thermocycleur.

Un ADN synthétique appelé « Contrôle interne » est ajouté à chaque réaction. Il est amplifié en même temps que les séquences cibles de *Zygosaccharomyces bailii*, mais détecté par une sonde marquée avec un deuxième fluorophore. Il permet de mettre en évidence un éventuel phénomène d'inhibition de la réaction.

Le logiciel associé à l'appareil calcule automatiquement la relation entre l'intensité de la fluorescence et le cycle d'amplification. Cette relation indique la présence ou l'absence de *Zygosaccharomyces bailii* dans l'échantillon.

Les résultats obtenus pour l'amplification de ces ADN sont analysés par le logiciel CFX Manager™ IDE software programmés pour réaliser une analyse qualitative automatique. Une interprétation « présence/absence » concernant le risque lié à la présence de *Zygosaccharomyces bailii* est alors proposée à l'utilisateur.

Ce test permet la détection de *Zygosaccharomyces bailii* dans les ADN extraits à partir de boissons fermentées issues de raisin.



3 - COMPOSITION DU KIT

Bouchons	Désignation	Réactif	Volume
Rose	Fluorescent probes	Sondes fluorescentes	1 tube (0,55 mL)
Blanc	Amplification mix	Solution d'amplification	2 tubes (2 x 2,2 mL)
Vert	Negative PCR control	Contrôle négatif PCR	1 tube (0,5 mL)
Rouge	Positive PCR control	Contrôle positif PCR	1 tube (0,5 mL)

Ce kit contient la quantité de réactif nécessaire pour 96 réactions.

4 - VALIDITE ET CONSERVATION

Dès réception, le kit doit être conservé entre +2°C et +8°C. Chaque réactif conservé entre +2°C et +8°C peut être utilisé jusqu'à la date de péremption indiquée sur le tube.

NB : Ne pas congeler les réactifs.

5 - EQUIPEMENT ET MATERIEL NECESSAIRES NON FOURNIS

Equipements :

- Industrial Diagnostic CFX96™ Deepwell Touch pour la PCR en temps réel, bloc réactionnel de 96 puits, réf. Bio-Rad: 359-4990
- Industrial Diagnostic CFX96™ pour la PCR en temps réel, bloc réactionnel de 96 puits, réf. Bio-Rad: 359-3990
- CFX Manager™ Software, Industrial Diagnostic Edition, réf. Bio-Rad : 359-3893
- Système MiniOpticon™ pour la PCR en temps réel, bloc réactionnel de 48 puits, réf. Bio-Rad: 359-3995
- Vortex
- En option: centrifugeuse avec rotor pour plaque ou barrette (max. 2000 x G)
- 20 µL, 200 µL and 1000 µL micropipettes
- Multi-distributeur, tel que combitip pipettes

Remarque : Nous recommandons l'utilisation d'un onduleur électrique avec le thermocycleur.

Consommables :

- Pour les plaques, tubes PCR et capuchons :
 - Plaques blanches de 96 puits "Low-profile", réf. Bio-Rad: MLL-9651
 - Plaques blanches de 48 puits "Low-profile", réf. Bio-Rad: MLL-4851
 - Barrettes de 8 tubes de 200 µL "Low-profile", réf. Bio-Rad: TLS-0851
 - Barrettes de 8 capuchons optiques plats, pour tubes ou plaques de puits de 0,2 mL, 120 barrettes Réf. Bio-Rad : TCS-0803

- Cônes pour Combitip ou multi-distributeur, stériles à emballage individuel
- Cônes à filtre stériles, adaptables sur les micropipettes de 10 µL, 20 µL, 100 µL, 200 µL et 1000 µL
- Tubes stériles de 2 mL et de 5 mL
- Gants non-poudrés latex ou nitrile
- Eau distillée stérile
- Eau de javel 5%
- Agent décontaminant tel que DNA AWAY® ou RNase AWAY®

6 - PRECAUTIONS ET RECOMMANDATIONS

- Cet essai doit être réalisé par des personnes ayant reçu une formation adéquate.
- La qualité des résultats dépend du respect scrupuleux des Bonnes Pratiques de Laboratoire, en particulier en matière de PCR :
 - Le matériel (pipettes, tubes etc...) ne doit pas circuler d'un poste de travail à l'autre.
 - Il est indispensable d'utiliser un contrôle positif et un contrôle négatif pour chaque série de réactions d'amplification.
 - Ne pas utiliser les réactifs au-delà de leur date de péremption.
 - Vortexer les réactifs du kit avant leur utilisation pour travailler avec des solutions homogènes.
 - Vérifier l'exactitude et la précision des pipettes ainsi que le bon fonctionnement des instruments.
 - Changer de gants régulièrement et dès que vous soupçonnez qu'ils peuvent être contaminés.
 - Nettoyer les surfaces de travail régulièrement avec de l'eau de javel 5% et autre agent tel que DNA AWAY® ou RNase AWAY®.
 - Porter des gants non-poudrés pour ne pas laisser des traces de doigts sur le film optique utilisé pour sceller les microplaques. Ne pas écrire sur les bouchons des tubes PCR. Dans les deux cas, l'enregistrement des données par l'appareil peut être perturbé.

Nous vous recommandons vivement de lire l'ensemble du protocole avant de commencer l'essai.

Respecter scrupuleusement le protocole proposé.

7 - PRELEVEMENT ET TRANSPORT DES ECHANTILLONS

Les échantillons de vins sont collectés, en conditions aseptiques, dans des récipients stériles en verre, en polyéthylène ou en matériel similaire.

Les échantillons doivent être remis au laboratoire le plus rapidement possible, de préférence dans les 24 heures et pas plus de 48 heures après le prélèvement. Si les échantillons sont transportés et analysés dans les 24 heures, le transport et le stockage ont lieu à température ambiante (+18°C à +30°C). Si les échantillons sont transportés et analysés dans les 48 heures, le transport et le stockage ont lieu entre +2°C et +8°C.

8 - EXTRACTION DE L'ADN

L'extraction de l'ADN doit être réalisée en utilisant le kit développé par Bio-Rad pour l'extraction d'ADN à partir d'échantillons de vin VINEO™ Extract DNA Kit (réf. Bio-Rad 354-8100).

9 - PCR EN TEMPS REEL

1. Mise en marche appareil PCR

Allumer dans l'ordre le thermocycleur, l'ordinateur puis ouvrir le logiciel Opticon Monitor. Pour plus d'informations et pour la définition des paramètres du logiciel consulter le manuel utilisateur du thermocycleur Bio-Rad pour le kit VINEO™ ZYGO *baillii* Test.

2. Préparation des réactions PCR

2.1 Préparer le mélange réactionnel VINEO™ ZYGO *baillii* Test en mélangeant (40 µL/échantillon) de la **solution d'amplification** (tube à bouchon blanc) et (5 µL/échantillon) des **sondes fluorescentes** (tube à bouchon rose). Réaliser le mélange réactionnel en fonction du nombre d'échantillons et des contrôles à analyser (au minimum 1 duplicat (2) du contrôle positif PCR et un contrôle négatif doivent être utilisés par plaque). Le tableau de préparation du mélange réactionnel d'amplification PCR présent en **Annexe A** indique les quantités nécessaires de chaque réactif à mélanger en fonction du nombre d'échantillons à analyser. Ne pas oublier de comptabiliser les 2 points de contrôles.

Note : ne pas mélanger les lots de réactifs.

2.2 Après préparation, le mélange réactionnel (solutions d'amplification et de sondes) doit être utilisé immédiatement, ou il peut être conservé pendant **2 heures de +2°C à +8 °C**.

2.3 Répartir **45 µL** de ce mélange réactionnel par puits, selon le plan de plaque défini. Les **Annexes B et C** proposent des plans de plaque à utiliser respectivement sur les thermocycleurs CFX96™ et MiniOpticon™.

Ajouter **5 µL** d'échantillon ou de contrôle négatif ou de contrôle positif PCR et sceller de façon hermétique les puits de la plaque ou des barrettes. Il est important d'insister sur la fermeture des puits et des barrettes pour éviter tout phénomène d'évaporation au cours de la réaction de PCR.

Il est important d'éviter la présence de bulles au fond des puits en pipétant précautionneusement. Pour éliminer des bulles, après avoir scellé la plaque ou avoir fermé les barrettes PCR, il est possible de centrifuger brièvement la plaque ou les barrettes PCR. La plaque peut être conservée pendant **2 heures de +2°C à +8 °C**.

- 2.4 Placer la plaque ou les barrettes PCR dans le thermocycleur. S'assurer de leur bonne orientation (puits A1 en haut à gauche).
Fermer le module réactionnel.

3. Lancement de la réaction d'amplification

Pour le lancement de la PCR, consulter le manuel utilisateur du thermocycleur Bio-Rad pour le kit VINEO™ ZYGO *baillii* Test.

10 - ANALYSE DES DONNEES

L'analyse des données peut être réalisée directement à la fin de la réaction d'amplification ou ultérieurement en ré-ouvrant le fichier de données. Pour ouvrir des fichiers de données et analyser les résultats de la PCR, consulter le manuel utilisateur du thermocycleur Bio-Rad pour le kit VINEO™ ZYGO *baillii* Test.

11 - INTERPRETATION DES RESULTATS

Pour obtenir les résultats de l'analyse, il suffit de lire les valeurs de C_q (Cycle quantification) : valeur du cycle d'amplification à partir duquel la fluorescence s'élève significativement au-dessus du bruit de fond.

Il est nécessaire d'utiliser les logiciels Opticon Monitor™ (version 3.3 et plus) ou CFX Manager™ Industrial Diagnostic Edition pour une interprétation automatisée. Un rapport complet pourra être imprimé (Cf. notice d'utilisation des logiciels).

1. Contrôles

Dans le cadre d'une analyse manuelle, avant l'interprétation finale des résultats il est nécessaire de vérifier les résultats des contrôles négatif et positif.

Pour que le test soit valide, les résultats des contrôles négatif et positif doivent être les suivants :

	Détection de <i>Zygosacchaomyces bailii</i> (FAM)	Control HEX
Contrôle négatif	$Cq = N/A^*$	$25 \leq Cq \leq 40$
Contrôle positif PCR	$27 \leq Cq \leq 37$	Non significatif

* N/A signifie « Non Applicable ». Le logiciel indique N/A pour le Cq d'un échantillon quand la courbe de fluorescence ne croise pas le seuil.

Si les résultats des contrôles positif PCR et négatif sont différents de ceux décrits dans le tableau ci-dessus, il est nécessaire de recommencer la PCR.

2. Echantillons

Un échantillon est considéré **positif** pour *Zygosacchaomyces bailii* si une valeur de $10 \leq Cq \leq 40$ est obtenue pour le fluorophore FAM.

Si aucune valeur n'est obtenue pour le Cq_{FAM} ($Cq_{FAM} = N/A$), l'interprétation du résultat dépend de la valeur du contrôle interne :

- Un échantillon est considéré **négatif** pour *Zygosacchaomyces bailii* si aucune valeur de Cq n'est obtenue pour le fluorophore FAM ($Cq_{FAM}=N/A$) et si le Cq du contrôle interne est supérieur ou égal à 25. ($Cq_{HEX} \geq 25$).
- Une valeur N/A pour le Cq_{HEX} du contrôle interne indique, lorsque le Cq_{FAM} de la cible est également N/A, qu'un phénomène d'inhibition de la réaction de PCR a probablement eu lieu. Dans ce cas, l'échantillon d'ADN doit être dilué (au 1/10^e par exemple) en eau distillée stérile, puis soumis à une nouvelle PCR.
- Si le Cq_{HEX} du contrôle interne est inférieur à 25 il n'est pas possible d'interpréter le résultat. Vérifier que le seuil a été correctement placé ou que la courbe brute montre un aspect caractéristique d'amplification exponentielle. Si la courbe observée n'est pas correcte il sera nécessaire de répéter le test PCR pour cet échantillon.

Interprétation des résultats obtenus sur les échantillons :

Détection de <i>Zygosacchaomyces bailii</i> (FAM)	Détection du contrôle interne	Interprétation
Cq $\geq 10^{***}$	Non significatif	Positif
Cq = N/A	Cq _{HEX} ≥ 25	Négatif
Cq = N/A	Cq = N/A	Inhibition**

** : En cas de valeur nulle pour un échantillon et son contrôle interne (Cq = N/A), l'analyse doit être renouvelée avec l'échantillon d'ADN dilué (au 1/5^e ou au 1/10^e par exemple).

*** : Il peut arriver qu'une valeur inférieure à 10 soit obtenue, vérifier que la courbe en tant que donnée brute montre un aspect caractéristique d'amplification exponentielle (ligne de base plate, puis augmentation régulière de la fluorescence, suivi par un plateau). Si la courbe observée est correcte, on peut considérer l'échantillon positif pour la présence de *Zygosacchaomyces bailii*. Dans le cas contraire, l'interprétation du résultat dépend de la valeur du contrôle interne, comme il est expliqué dans les paragraphes ci-dessus.

12 - PROTOCOLE DE CONFIRMATION A PARTIR DE COLONIES ISOLÉES

Il est possible d'utiliser le test VINEO™ *Zygosacchaomyces bailii* Test pour la confirmation de colonies isolées sur gélose.

1. Piquer une colonie isolée, à partir d'un milieu sélectif ou non, à l'aide d'un cure-dent ou d'une aëse de 1 μ L, ou autre consommable adapté (cône pipette par exemple).
2. Resuspendre la colonie dans 100 μ L de R2 dans un tube de type Eppendorf (il est possible de resuspendre la colonie dans de l'eau physiologique stérile, l'efficacité PCR peut alors être affectée). Bien homogénéiser la suspension à l'aide d'un vortex.
3. Déposer 5 μ L de la suspension dans 45 μ L du mélange réactionnel PCR (Cf. partie 9.2 PCR en temps réel) et suivre le reste de la méthode VINEO™ *Zygosacchaomyces bailii* Test pour l'obtention et l'interprétation des résultats. **Note : une analyse qualitative est réalisée à partir de la PCR effectuée sur cette suspension. Le signal obtenu en PCR est souvent très élevé car la quantité de cellules prélevées et analysées par PCR avec cette méthode est très importante.**

13 - PERFORMANCES DU TEST ET VALIDATIONS

Le test VINEO™ ZYGO *bailii* Test est spécifique pour la détection de *Zygosaccharomyces bailii*. Il est possible de détecter la levure à partir de :

- 27 CFU/mL de vin avec le protocole d'extraction d'ADN décrit dans le VINEO™ Extract DNA Kit : sur 1,8 mL
- 1 CFU/mL de vin selon le protocole partant de 45 mL pour un vin dont l'analyse nécessite un niveau de sensibilité analytique élevé.

ANNEXE A - TABLEAU DE PREPARATION DU MELANGE REACTIONNEL D'AMPLIFICATION PCR

Utiliser ce tableau pour déterminer les quantités nécessaires de sondes fluorescentes et solution d'amplification pour préparer le mélange réactionnel de PCR. **Le calcul du nombre d'échantillons doit inclure le contrôle positif PCR et le contrôle négatif.**

Nombre d'échantillons	Sondes fluorescentes (µL) (Bouchon rose)	Solution d'amplification (µL) (Bouchon blanc)	Nombre d'échantillons	Sondes fluorescentes (µL) (Bouchon rose)	Solution d'amplification (µL) (Bouchon blanc)
1	5	40	49	265	2117
2	11	86	50	270	2160
3	16	130	51	275	2203
4	22	173	52	281	2246
5	27	216	53	286	2290
6	32	259	54	292	2333
7	38	302	55	297	2376
8	43	346	56	302	2419
9	49	389	57	308	2462
10	54	432	58	313	2506
11	59	475	59	319	2549
12	65	518	60	324	2592
13	70	562	61	329	2635
14	76	605	62	335	2678
15	81	648	63	340	2722
16	86	691	64	346	2765
17	92	734	65	351	2808
18	97	778	66	356	2851
19	103	821	67	362	2894
20	108	864	68	367	2938
21	113	907	69	373	2981
22	119	950	70	378	3024
23	124	994	71	383	3067
24	130	1037	72	389	3110
25	135	1080	73	394	3154
26	140	1123	74	400	3197
27	146	1166	75	405	3240
28	151	1210	76	410	3283
29	157	1253	77	416	3326
30	162	1296	78	421	3370
31	167	1339	79	427	3413
32	173	1382	80	432	3456
33	178	1426	81	437	3499
34	184	1469	82	443	3542
35	189	1512	83	448	3586
36	194	1555	84	454	3629
37	200	1598	85	459	3672
38	205	1642	86	464	3715
39	211	1685	87	470	3758
40	216	1728	88	475	3802
41	221	1771	89	481	3845
42	227	1814	90	486	3888
43	232	1858	91	491	3931
44	238	1901	92	497	3974
45	243	1944	93	502	4018
46	248	1987	94	508	4061
47	254	2030	95	513	4104
48	259	2074	96	518	4147

ANNEXE B

PLAN DE PLAQUE A UTILISER SUR LE THERMOCYCLEUR CFX96™

Les 2 premiers puits de la colonne 1 peuvent être utilisés pour analyser les 2 points de contrôles. Les autres puits de la plaque seront utilisés pour déposer les échantillons à analyser.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	C+											
B	NC											
C	Echantillon											
D	Echantillon											
E	Echantillon											
F	...											
G												
H												

NC : Contrôle négatif PCR

C+ : Contrôle positif PCR

ANNEXE C

PLAN DE PLAQUE A UTILISER SUR LE THERMOCYCLEUR MiniOpticon™

Les 2 premiers puits de la colonne 1 peuvent être utilisés pour analyser les 2 points de contrôles. Les autres puits de la plaque seront utilisés pour déposer les échantillons à analyser.

	1	2	3	4	5	6
A	C+					
B	NC					
C	Echantillon					
D	Echantillon					
E	Echantillon					
F	...					
G						
H						

NC : Contrôle négatif PCR

C+ : Contrôle positif PCR

AVIS CONCERNANT L'ACHETEUR : LICENCE LIMITEE

L'utilisation de ce produit est couverte par un ou plusieurs des brevets US suivants et les revendications de brevet correspondantes hors Etats-Unis : 5 079 352, 5 789 224, 5 618 711, 6 127 155, 5 677 152 (revendications 1 à 23 seulement) et 5 773 258 (revendications 1 et 6 seulement) et par les revendications hors Etats-Unis correspondant au brevet US n° 4 889 818. L'achat de ce produit comprend une immunité de poursuite restreinte et non transférable selon les revendications de brevet précédentes lorsque cette quantité de produit est uniquement utilisée à des fins d'analyse alimentaire, d'analyse environnementale et en microbiologie industrielle, y compris la publication des résultats des activités de l'acheteur moyennant paiement ou toute autre contrepartie commerciale, et lorsqu'elle est également utilisée aux fins des propres recherches de l'acheteur. Aucun droit selon une quelconque revendication de brevet (comme les revendications de la méthode 5'-nucléase dans les brevets US n° 5 210 015 et 5 487 972) n'est expressément cédé, que ce soit par implication ou par préclusion. De plus amples informations concernant l'achat de licences peuvent être obtenues en contactant le Directeur des Licences, Applied Biosystems, 850 Lincoln Centre Drive, Foster City, Californie, 94404, Etats-Unis.

Purchaser's information: VINEO is a trademark of Bio-Rad
Information à l'acheteur : VINEO is a trademark of Bio-Rad

Bio-Rad
3, bd Raymond Poincaré
92430 Marnes-la-Coquette - France
Tel.: +33 1 47 95 60 00
Fax.: +33 1 47 41 91 33
www.bio-rad.com

