# RÉSOLUTION OIV-OENO 414-2011

# NUMERATION DES LEVURES DE L'ESPECE BRETTANOMYCES BRUXELLENSIS PAR qPCR

L'ASSEMBLÉE GÉNÉRALE

VU l'article 2 paragraphe 2 iv de l'accord du 3 avril 2001 portant création de l'Organisation Internationale de la Vigne et du Vin,

CONSIDERANT les travaux du groupe d'experts « Microbiologie » et de la Sous-Commission des Méthodes d'Analyse,

SUR PROPOSITION du groupe d'experts Microbiologie et de la Sous-Commission des Méthodes d'Analyse,

DÉCIDE sur proposition de la Commission II "Oenologie" d'introduire la méthode de type IV suivante dans la section 4 du « *Recueil des méthodes internationales d'analyse des vins et des moûts* »:

## Numération des Levures de l'espèce *Brettanomyces bruxellensis* par qPCR

**Méthode de type IV**

**Avertissement aux utilisateurs :**

Phénol : Toutes les étapes de manipulation où le phénol est présent doivent être réalisées sous la hotte avec des gants. Les résidus contaminés au phénol sont récupérés dans les containers appropriés.

SYBR Green : il présente une mutagenicité non nulle mais cependant très inférieure au Bromure d'éthydium. Les précautions d'usage doivent être néanmoins conservées.

## 1. Domaine d'application

Ce protocole décrit une méthode de dénombrement des levures de l'espèce *Brettanomyces bruxellensis* dans les vins en cuve ou embouteillés, par PCR (Polymérase chain reaction) quantitative en temps réel (qPCR). L'analyse des vins en cours de FA (Fermentation alcoolique) et des moûts n'est pas validée à ce jour.



Exemplaire certifié conforme Porto, 24 juin 2011
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2011

## 2. Définition

Les microorganismes dénombrés par cette méthode sont les levures *Brettanomyces bruxellensis* qui disposent d'une copie du gène cible.

## 3. Principe

Le principe consiste à amplifier, par une réaction enzymatique répétée, une région d'ADN (Acide désoxyribonucléique) cible balisée par deux amorces. Le procédé nécessite la succession de nombreux cycles avec trois étapes :

- La dénaturation de l'ADN par chauffage
- L'hybridation des amorces
- La polymérisation réalisée par la *Taq (Thermophilus aquaticus)* polymérase

Cependant, contrairement à la PCR classique, la qPCR permet de quantifier l'ADN amplifié au cours de l'amplification grâce à l'utilisation d'un fluorophore.

Jusqu'ici deux régions se révélant spécifiques de l'espèce ont été utilisées comme cibles. Il s'agit du gène codant pour l'ARN (Acide ribonucléique) ribosomal 26S et du gène *RAD4* [2, 3]. Comme pour la méthode FISH, il s'agit donc d'une technique spécifique de *Brettanomyces bruxellensis* mais qui présente l'avantage d'être moins coûteuse.

La particularité de la qPCR réside dans la lecture, à chaque cycle d'amplification, de la fluorescence qui augmente de façon exponentielle au fur et à mesure que l'ADN est amplifié. De nombreuses technologies de fluorescence ont été développées pour cette application. Dans le cas présent, il s'agira d'utiliser le fluorophore SYBR® Green.

- Fluorophore SYBR® Green

Cet agent fluoresce fortement en s'intercalant de façon non spécifique entre les nucléotides au niveau de l'ADN double brin. En revanche à l'état libre il ne présente qu'une faible fluorescence. Grâce à cette technologie, une courbe de fusion peut être générée à la fin de l'amplification afin de s'assurer de la spécificité de la réaction .

- Contrôle interne



Exemplaire certifié conforme Porto, 24 juin 2011
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2011

Afin de valider les étapes d'extraction et d'amplification de l'ADN, un contrôle interne a été intégré à la méthode ((Lip4) *Yarrowia lipolytica*).

# 4. Réactifs et produits

Tous les consommables plastiques doivent être autoclavés au préalable afin de détruire les DNAses (désoxyribonucléases), ainsi que les solutions de tampon Tris-HCl, TE (Tris EDTA, acide éthylène diamine tétra acétique), l'acétate d'ammonium et l'eau ultrapure (18 M□). Toutes les solutions aqueuses sont préparées dans l'eau ultrapure (18 M□). Certaines solutions sont stérilisées à l'autoclave (indiqué par "autoclavé"). Pour les solutions qui ne sont pas autoclavées, on utilise si possible de l'eau ultrapure (18 M□) stérile pour leur préparation. Il n'est pas nécessaire ensuite de travailler en conditions de stérilité.

- **PVPP** (par exemple : ISP Polyclar Super R ou Sigma P6755-100G),
- **Solutions à température ambiante** : tampon Tris-HCl 10mM pH8, solution I (Tris-HCl 10 mM pH8, EDTA 1 mM, NaCl 100mM, SDS 1% (Sodium dodécyl sulfate), Triton X-100 2%), TE (Tris-HCl 10 mM pH8, EDTA 1 mM) autoclavé, acétate d'ammonium 4M, éthanol absolu,
- Prévoir **un flacon d'eau ultrapure (18 M□) stérilisée** (20mL) autoclavé à chaque plaque qPCR,
- **Solutions à 4°C** : phénol saturé pH8:chloroforme :IAA (alcool isoamylique : 24 :25 :1) et RNase (Ribonucléase) 1µg/µL
- **Suspension à** –20°C : contrôle interne, SYBR Green (par exemple mix iQ SYBR Green supermix, Bio-Rad 170-8884), amorces 4µM Brett rad3, Brett rad4, YAL-F et YAL-R chacune.
- **Bain-sec à 37°C**.

**Toutes les étapes de manipulation où le phénol est présent doivent être réalisées sous la hotte avec des gants. Les résidus contaminés au phénol sont récupérés dans les containers appropriés.**

| Produits Chimiques PCR | Spécifications | Numéro CAS |
|---|---|---|
| 4.1. acétate d'ammonium | ≥ 98% | 631-61-8 |



Exemplaire certifié conforme Porto, 24 juin 2011
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2011

| | | |
|---|---|---|
| 4.2. phénol:chloroforme:IAA 24:25:1 | Ultra | 136112-00-0 |
| 4.3. protéinase K | 1215U/mg protéines (16,6 ng/mL) | 39450-01-6 |
| 4.4. SDS | ≥ 99% Ultra | 151-21-3 |
| 4.5. Tris base | ≥ 99,8% Ultra | 77-86-1 |
| 4.6. BSA | Molecular biology grade | 9048-46-8 |
| 4.7. phénol saturé pH 8 | | 108-95-2 |
| 4.8. PVPP 360kDa | | 9003-39-8 |
| 4.9. RNase A | 70U/mg en solution | 9001-99-4 |
| 4.10. TE pH8 | Ultra | Tris : 77-86-1<br>EDTA : 60-00-4 |
| 4.11. amorces 25nmol | | - |

# 5. Appareillage

- **Consommables plastiques** : microtubes à vis 2mL, microtubes 1,5 et 1,7mL, embouts de pipettes blancs (10 µL), jaunes (200 µL) et bleus (1000 µL) pour micropipettes P20, P200, P1000, P5000, microplaques PCR 96 puits et film optique, gants non poudrés
- **Billes de verre** (Ø 500µm),
- **Flacon** (20mL) autoclavé (pour eau **ultrapure [18 M]** stérilisée à chaque plaque qPCR),
- **Tubes à centrifuger** 15 et 50 mL.
- **Matériel** :
    - Pipettes automatiques (P20, P200, P1000, P5000)
    - Centrifugeuse à microtubes
    - Agitateur automatique pour casser les cellules (par exemple GénieDisruptor)



Exemplaire certifié conforme Porto, 24 juin 2011
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2011

- Thermocycleur couplé à un spectrofluorimètre (système optique de détection de la fluorescence générée lors des réactions de PCR en temps réel)
- Agitateur magnétique
- Chronomètre
- bain-sec à 37°C
- autoclave
- Fioles jaugées 100 mL
- Fioles jaugées 50 mL
- Fioles jaugées 10 mL
- Béchers 100 mL
- Béchers 50 mL
- Béchers 10 mL
- Barreaux aimantés

# 6. Echantillonnage (Préparation de l'échantillon)

## 6.1. Dénombrement échantillons :

Les échantillons sont prélevés soit directement dans les bouteilles à analyser, soit dans des flacons de prélèvements au préalable stérilisés

Aucune interférence de la méthode n'a été observée avec les levures testées (dont K1 et L2056) lorsque les populations de levures sont inférieures ou égales à $5.10^6$UFC/mL (Unités formant colonies). Pas de données au delà, donc éviter les mesures sur vins en cours de FA.

NB : Lorsque le dénombrement des levures est réalisé par des méthodes d'analyse relevant de la microbiologie classique (croissance sur milieu gélosé nutritif, densité optique), les résultats sont exprimés en UFC/mL (unité formant colonie). *A contrario*, le dénombrement résultant de l'analyse par qPCR est exprimé en UG/mL (unité génétique)



Exemplaire certifié conforme Porto, 24 juin 2011
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2011

## 6.2. Préparation du contrôle interne :

Culture *Yarrowia* en YPD (Yeast peptone dextrose) liquide à 28 °C jusqu'à une $DO_{600}$ (Densité optique à 600 nm) de 1 (environ 48h).

Après estimation de la $DO_{600nm}$ faire une dilution à $1,0.10^6$ UFC/mL dans de l'eau physiologique (1DO = $1,0.10^7$ UFC/mL).

Prélever 110µL de la culture à $1,0.10^6$ UFC/mL dans un microtube de 1,7mL et ajouter 110µL de glycérol à 40% pour obtenir une population à $5,0.10^5$UFC/mL. Mélanger et conserver à -80°C. Un tube permet de traiter 5 échantillons de vin.
Réaliser une numération en parallèle afin de vérifier le titre de la suspension.

## 6.3. Préparation des solutions :

**100mL de Tris-HCl pH8 10mM** : peser 0,121 g de tris base (par exemple_: Trizma base et dissoudre dans 80mL d'eau ultrapure (18 M□). Ajuster le pH avec de l'HCl. Ajuster le volume à 100mL. Autoclaver.

**100mL TE** : peser 0,121 g de tris base et dissoudre dans 80mL d'eau. Ajuster le pH avec de l'HCl. Ajouter 37,2 mg d'EDTA. Ajuster le pH à 8 (favorise la dissolution de l'EDTA) puis le volume à 100mL. Autoclaver.

**100mL solution I** : préparer 50mL de TE 2x et ajouter 10mL de NACl 1M, 10mL de SDS 10% (à dissoudre en chauffant légèrement) et 2g de Triton X100, puis ajuster le volume.

**Acétate d'ammonium 4M** : dissoudre 15,4 g d'acétate d'ammonium qsp (quantité suffisante pour) 50mL eau ultrapure (18 M□).

**100mL phénol :chloroforme :IAA (25 :24 :1)** : à partir de 50mL de phénol saturé avec du tampon TE pH8, ajouter 48mL de chloroforme et 2mL d'alcool isoamylique.Conserver à 4°C.

**RNAse A 1µg/µL** : diluer la RNase A 70U/mg en solution (par exemple :Sigma, R4642-50MG, stockée à −20°C) avec de l'eau ultrapure (18 M□). La concentration de la RNase stock est indiquée sur le tube et la feuille de spécifications du lot. La solution diluée est à conserver à 4°C maximum 3 semaines.

**Amorces Brett 4µM** : à partir des solutions stocks d'amorces (tubes fournisseurs) à 100µM, faire un mélange 4µM Brett rad3 (GTTCACACAATCCCCTCGATCAAC) et 4µM Brett rad4 (TGCCAACTGCCGAATGTTCTC) qsp 1mL avec de l'eau ultrapure [18 M□]. Conservation 1 an à −20°C.



Exemplaire certifié conforme Porto, 24 juin 2011
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2011

**Amorces YAL 4µM** : à partir des solutions stocks d'amorces (tubes fournisseurs) à 100µM, faire un mélange 4µM YAL-F (ACGCATCTGATCCCTACCAAGG) et 4µM YAL-R (CATCCTGTCGCTCTTCCAGGTT) qsp 1mL avec de l' eau ultrapure [18 Mα]). Conservation 1 an à –20°C.

# 7. Mode opératoire

Échantillon à analyser : agiter le flacon ou la bouteille de façon à homogénéiser son contenu.

Cas d'une bouteille bouchée : désinfecter le col de la bouteille à l'alcool à 70% et déboucher à la flamme, au moyen d'un tire-bouchon désinfecté à l'alcool à 70%.

Transvaser un échantillon de vin de 15-20mL dans un flacon stérile en matière plastique à usage unique de 30 mL.

**Les étapes auxquelles le protocole peut être interrompu sont signalées par * (durée d'interruption max, T°).**

## 7.1. Séparation des cellules

Cette étape doit être réalisée en double, **et les manipulations doivent être réalisées sous une hotte dédiée et confinée prévue à cet effet.**

- Prélever 1mL de vin dans un microtube à vis 2mL
- Ajouter 20µL du contrôle interne à 5,0.105 UFC/mL
- Centrifuger 30s (secondes) à 9300 g
- Éliminer le surnageant par retournement délicat
- Reprendre le culot dans 1mL de Tris-HCl 10mM pH8
- Centrifuger 30s à 9300 g et éliminer le surnageant.
- Agiter au vortex brièvement afin de suspendre le culot dans le liquide résiduel * (3 mois, -20°C).

**Un tube est utilisé pour l'extraction de l'ADN et l'autre conservé à –20°C jusqu'à obtention de résultats validés.**

## 7.2. Extraction de l'ADN

**A partir d'un culot frais ou congelé. Au maximum traiter 24 échantillons en parallèle.**



Exemplaire certifié conforme Porto, 24 juin 2011
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2011

- Ajouter PVPP (1% final m/v)
- Ajouter 0,3g de billes de verre 200-500µm
- Ajouter 200µL de solution I
- Ajouter 200µL de phénol :chloroforme :IAA (24 :25 :1)
- Casser les cellules à l'agitateur automatique (par exemple GénieDisruptor) 4x80s avec passage au froid (bloc réfrigéré -20°C) 80s environ entre chaque casse
- Additionner 200µL de TE
- Centrifuger 5min (minutes) à 15700 g.
- Récupérer délicatement 400µL de la phase aqueuse supérieure dans un microtube 1,7mL. En cas de mélange des deux phases, réitérer l'étape de centrifugation.
- Ajouter 1mL éthanol absolu et mélanger le tube par inversion 4-5 fois * (qqs heures, T° ambiante)
- Centrifuger 5min à 15700 g et éliminer le surnageant par retournement
- Reprendre le culot dans 400µL TE et 30µL de Rnase à 1µg/µL
- Incuber la solution à 37°C pendant 5min (modifier ensuite le réglage à 48°C)
- Ajouter 10µL acétate d'ammonium 4M + 1mL éthanol absolu ; mélanger par inversion
- Centrifuger 5min à 15700 g
- Eliminer le surnageant par retournement, les dernières gouttes sont absorbées sur du papier filtre
- Sécher le culot (tube ouvert dans le bain-sec à 48°C, 1 heure environ)
- Ajouter au culot 25µL TE, agiter au vortex et mettre à 4°C entre 1 et 18h (favorise la solubilisation de l'ADN). Homogénéiser à l'agitateur automatique * (qqs semaines, -20°C)

## 7.3. qPCR

Pour chaque échantillon de vin, prévoir 2 puits avec les amorces Brett rad3/4 et 2 puits de contrôle interne avec les amorces YAL. Pour chaque plaque, prévoir un



Exemplaire certifié conforme Porto, 24 juin 2011
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2011

contrôle négatif avec du TE pour chaque couple d'amorces à réaliser en dernier. Faire aussi un contrôle positif avec l'ADN de *Brettanomyces bruxellensis* disponible à -20°C. Pour préparer le contrôle positif, ajouter 5 µL de solution mère (4,5 UG/mL) dans un volume de réaction final de 25 µL.

**Programme d'amplification PCR :**

| **Nombre de cycle** | **Temps (sec)** | **Température (°C)** |
|---|---|---|
| **1** | **180** | **95** |
| **40** | **30** | **95** |
| | **10** | **64,6** |
| **La courbe de fusion est déterminée à partir de 90°C en diminuant de 0,5°C toutes les 10 secondes** | | |

*nb puits Brett = nb puits YAL = 2 x nb échantillons + 2*

**La table ci-dessous indique selon le nombre d'échantillons, le nombre de puits et la quantité de chaque composant du mélange.**

| nombre d' échantillons | nombre de puits | eau à 18 Mα (µL) | iQ SYBR Green supermix (µL) | mélange amorces 4µM (µL) |
|---|---|---|---|---|
| 1 | 4 | 26,3 | 65,6 | 13,1 |
| 2 | 6 | 36,8 | 91,9 | 18,4 |
| 3 | 8 | 47,3 | 118,1 | 23,6 |
| 4 | 10 | 57,8 | 144,4 | 28,9 |
| 5 | 12 | 68,3 | 170,6 | 34,1 |
| 6 | 14 | 78,8 | 196,9 | 39,4 |
| 7 | 16 | 89,3 | 223,1 | 44,6 |
| 8 | 18 | 99,8 | 249,4 | 49,9 |



Exemplaire certifié conforme Porto, 24 juin 2011
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2011

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| 9 | 20 | 110,3 | 275,6 | 55,1 |
| 10 | 22 | 120,8 | 301,9 | 60,4 |
| 11 | 24 | 131,3 | 328,1 | 65,6 |
| 12 | 26 | 141,8 | 354,4 | 70,9 |
| 13 | 28 | 152,3 | 380,6 | 76,1 |
| 14 | 30 | 162,8 | 406,9 | 81,4 |
| 15 | 32 | 173,3 | 433,1 | 86,6 |
| 16 | 34 | 183,8 | 459,4 | 91,9 |
| 17 | 36 | 194,3 | 485,6 | 97,1 |
| 18 | 38 | 204,8 | 511,9 | 102,4 |
| 19 | 40 | 215,3 | 538,1 | 107,6 |
| 20 | 42 | 225,8 | 564,4 | 112,9 |
| 21 | 44 | 236,3 | 590,6 | 118,1 |
| 22 | 46 | 246,8 | 616,9 | 123,4 |
| 23 | 48 | 257,3 | 643,1 | 128,6 |

- Sortir les amorces Brett 4µM et les amorces YAL 4µM du congélateur
- Sortir le SYBR Green (4°C si tube en cours, sinon –20°C)
- Préparer un mélange Brett et un mélange YAL avec la table ci-dessous selon le nombre d'échantillons.
- Déposer au fond de chaque puits 20µL de mélange
- Ajouter 5µL de solution d'ADN homogénéisée à l'agitateur automatique ou 5 µLd'eau pour les contrôles négatifs
- Ajuster le film optique et charger la plaque



Exemplaire certifié conforme Porto, 24 juin 2011
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2011

## 7.4. Lecture des résultats

- Sortir la plaque et la mettre directement dans le sac pour destruction **(ne pas l'ouvrir)**
- **F**ixer la ligne de base à 100.
- Analyser dans l'ordre :
    - Les témoins négatifs qui ne doivent pas donner de signal. Si un Ct est observé avec une valeur inférieure à 37, recommencer la manipulation en changeant toutes les solutions
    - Le contrôle positif Brett: son Ct doit être voisin de 25 avec une température de fusion de 82,5°C (± 0,5°C),
    - Les contrôles internes YAL : si un Ct est obtenu, vérifier la température de fusion du produit (84°C ± 0,5°C). Dans les cas non conformes, l'absence de signal Brett ne peut être interprétée.,
    - Les échantillons : vérifier le Tm du produit Brettanomyces bruxellensis (82°C ± 0,5°C). Si et seulement si le Tm est acceptable, vérifier l'allure exponentielle de l'amplification. Relever alors les valeurs de Ct pour les reporter sur la droite d'étalonnage.

NB : le Ct représente le temps nécessaire pour que la fluorescence de la séquence cible atteigne une valeur seuil. Il s'agit par conséquent le nombre de cycle PCR minimum pour que le signal fluorescent sorte du bruit de fond.

# 8. Calculs (Résultats)

Cinq souches *Brettanomyces bruxellensis* ont été inoculées à différentes concentrations allant de $3{,}1.10^5$ à 3 UFC/mL sur 14 vins (3 vins blancs, 2 vins rosés, 9 vins rouges dont les teneurs en composés phénoliques s'étendent sur une large gamme). L'ADN a ensuite été extrait en présence de PVPP 1%.

Une droite étalon a été établie à partir des résultats obtenus sur les différentes combinaisons de vins et de souches.

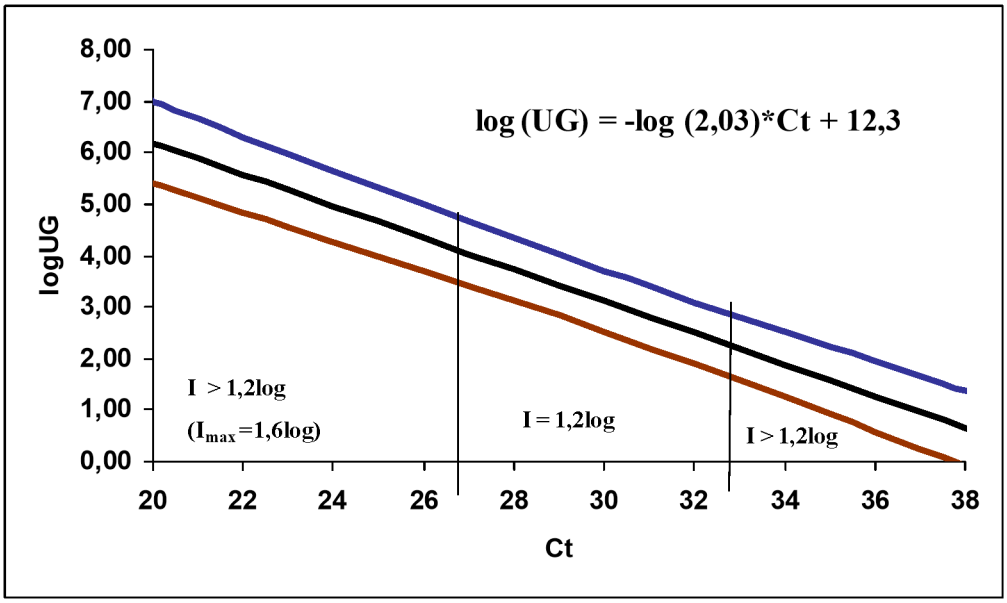
Les résultats sont obtenus en UG/mL (unité génétique/mL) à partir de la droite d'étalonnage



Exemplaire certifié conforme Porto, 24 juin 2011
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2011

logUG = – log(2,03)×Ct + 12,34




# 9. Caractéristiques de la méthode : paramètres de validation intralaboratoires

## 9.1. Linéarité, répétabilité et reproductibilité [4]

La courbe d'étalonnage en six points a été réalisée sur l'intervalle 0 à $2x10^5$ UFC/mL de la souche L0211 dans un vin, avec quatre réplicats. Cet intervalle de populations a été choisi d'après les niveaux habituels de *Brettanomyces bruxellensis* dans le vin. Le rapport log UG mesuré / log UG théorique a été établi à l'aide d'une analyse de régression simple. Les paramètres de régression, la pente et l'ordonnée à l'origine ont été déterminés comme indiqué dans le Tableau ci-dessous. Le modèle de régression a été accepté avec un risque □= 1 % et le domaine de linéarité choisi a été validé, aucune erreur de modèle n'ayant été constatée.

La fidélité de la méthode a été comparée à celle de la méthode de culture classique. Trois opérateurs ont préparé de l'ADN extrait d'un vin inoculé par la souche L0211 à deux niveaux de population : $1,9x10^4$ (élevé) ou $1,9x10^2$ (faible) UFC/mL. Quatre mesures par PCR ont été réalisées pour chaque ADN extrait. Les écarts-types pour la



Exemplaire certifié conforme Porto, 24 juin 2011
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2011

répétabilité et la reproductibilité, respectivement Sr et SR, ont été calculés d'après les valeurs de log UG pour les deux niveaux (tableau ci-dessous). Pour la méthode qPCR, Sr et SR étaient similaires pour le niveau bas, mais SR était supérieur à Sr pour les niveaux de population élevés. Les deux écarts-types ont été deux fois supérieurs à ceux obtenus avec la méthode microbiologique classique. Cet effet a été attribué à l'augmentation du nombre d'étapes pour la méthode qPCR.

Tableau : Paramètres de validation de la méthode qPCR pour la numération des *Brettanomyces* dans les vins

| Paramètre | Valeurs |
|---|---|
| Equation de régression | |
| Intervalle (UFC/mL) | 0-2x$10^5$ |
| Pente (±ÉT) | 0,957 (0,044) |
| Ordonnée à l'origine (±ÉT) | -0,049 (0,142) |
| Modèle de régression | $F_{obs}$>F(1,18) : modèle linéaire accepté |
| Erreur de modèle | $F_{obs}$<F(4,18) : aucune erreur de modèle |
| | |
| Fidélité | |
| $S_r$ qPCR (bas/élevé) | 0,26/0,25 |
| $S_r$ microbio (bas/élevé) | 0,17/0,04 |
| $S_R$ qPCR (bas/élevé) | 0,29/0,41 |
| $S_R$ microbio (bas/élevé) | 0,17/0,04 |
| | |
| Justesse | |
| Moyenne 43 échantillons (D) | 2,39 (qPCR)/2,25 (microbio) |



Exemplaire certifié conforme Porto, 24 juin 2011
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2011

| | |
|---|---|
| $S_R$ D | 1,18 |
| Test d'égalité W=D/$S_R$ D | 0,11<3 justesse acceptable |

## 9.2. Limite de détection (LD) et limite de quantification (LQ) [4]

LD et LQ indiquent la sensibilité de la méthode. LD est la plus basse population détectée par la méthode ; LQ est la population minimale qui peut être quantifiée avec précision. Dans l'analyse des produits alimentaires, ces paramètres sont calculés d'après les résultats antérieurs. Or, pour la qPCR, il n'existe pas de tels résultats. Nous avons donc utilisé les autres méthodes pour évaluer LD et LQ. La première méthode utilise la pente, l'ordonnée à l'origine et l'erreur type sur l'ordonnée à l'origine obtenues lors des essais de validation de la linéarité. Avec cette méthode, des valeurs de LD et LQ de 3 et 31 UG/mL respectivement ont été obtenues. Avec la deuxième méthode, la LD a été obtenue d'après le niveau de population donnant un résultat négatif pour 10 mesures indépendantes. L'analyse de nos données obtenues sur 14 vins inoculés par cinq souches a montré que 96 % des échantillons (48/50) contenant 101 à 250 UFC/mL conduisaient à des signaux positifs, tandis que 83 % (49/59) étaient positifs s'ils contenaient 26 à 100 UFC/mL et 65 % (44/68) pour un niveau de population de 5 à 25 UFC/mL. Par conséquent, la limite de détection évaluée avec cette méthode serait comprise dans l'intervalle 26-100 UFC/mL. Par répétition systématique du test PCR, une LD de 5 UFC/mL a été certifiée à l'aide de calculs de probabilités $(1-p)^2$. En effet, pour 5 UFC/mL, 88 % des échantillons ont été positifs. Ce pourcentage a atteint 97 % pour 25 UFC/mL.

# 10. Bibliographie


1. Phister T.G., Mills D.A., 2003. Real-time PCR assay for detection and enumeration of Dekkera bruxellensis in wine. Applied and Environmental Microbiology, 69: 7430-7434.
2. Cocolin L., Rantsiou K., Iacumin L., Zironi R., Comi G., 2003. Molecular detection and identification of Brettanomyces/Dekkera bruxellensis Brettanomyces/Dekkera anomalus in spoiled wines. Applied and Environmental Microbiology, 70: 1347-1355.
3. Ibeas J.I., Lozano I., Perdigones F., Jimenez J., 1996. Detection of Dekkera-Brettanomyces strains in sherry by a nested PCR method. Applied and




Exemplaire certifié conforme Porto, 24 juin 2011
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2011

Environmental Microbiology, 62: 998-1003.

4. Tessonnière H., Vidal S., Barnavon L., Alexandre H., Remize F., 2009. Design and performance testing of a real-time PCR assay for sensitive and reliable direct quantification of Brettanomyces in wine. International Journal of Food Microbiology, 129: 237-243.



Exemplaire certifié conforme Porto, 24 juin 2011
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2011