

1. DESCRIPCIÓN DEL PRODUCTO

Los kits de detección en bebidas proporcionan un procedimiento simple, fiable y rápido para detectar la presencia de un patógeno específico. El ensayo se basa en reacciones PCR en tiempo real con nucleasa 5' para amplificar una secuencia genómica única en el microorganismo diana.

2. DESCRIPCIÓN DE LA TECNOLOGÍA

La PCR es un método utilizado para amplificar una secuencia específica de ADN en una reacción que contiene, entre otros componentes, una ADN polimerasa termoestable, nucleótidos y cebadores complementarios a la secuencia diana. Cuando esta solución se calienta, la molécula de ADN se desnatura, por lo que se divide en dos cadenas. A medida que la solución se enfría, los cebadores se unen a la secuencia diana en las cadenas de ADN divididas y la ADN polimerasa sintetiza una nueva cadena extendiendo los cebadores con nucleótidos, por lo que crea una copia de la secuencia de ADN (amplicones). Cuando se repite, este ciclo de desnaturalización, fusión y extensión aumenta exponencialmente el número de amplicones diana. En la PCR en tiempo real, la señal se mide en cada ciclo utilizando, en la mayoría de los casos, sondas fluorescentes específicas. La fluorescencia se mide con un detector, y el software correspondiente dibuja la intensidad de la fluorescencia en función del número de ciclos, por lo que permite determinar la presencia o la ausencia del organismo diana.

3. DESCRIPCIÓN DEL PATÓGENO

La levadura *Brettanomyces bruxellensis* (teleomorph *Dekkera bruxellensis*) es una levadura que se encuentra en el vino y en diversas bebidas alcohólicas y se puede encontrar en las bayas de uva, en los equipos de bodega y en las barricas. Se ha descrito que la *B. bruxellensis* es el principal agente responsable de la formación de fenoles volátiles, a saber, el 4-etilfenol y el 4-etilguayacol, lo que genera las características manchas "Brett" asociadas al vino tinto, desarrolladas durante la crianza y el embotellado del vino. En esta etapa, los vinos están mal protegidos por el uso adecuado de fungicidas y debido a la resistencia de *B. bruxellensis* al control del dióxido de azufre de estas levaduras se hace difícil. Por otra parte, la viabilidad de *B. bruxellensis* en la bebidas parece incrementarse por su capacidad de utilizar fuentes alternativas de carbono, por lo que es capaz de sobrevivir en las bebidas mucho después de la fermentación. La detección de *B. bruxellensis* en bebidas se realiza generalmente utilizando técnicas microbiológicas tradicionales, basadas en el cultivo del organismo en medios apropiados e incubación durante 1 a 2 semanas, lo que puede tener importantes consecuencias económicas para la industria del vino y las bebidas alcohólicas. Por lo tanto, la amplificación in vitro del ADN mediante reacción

en cadena de la polimerasa (PCR), en particular mediante PCR en tiempo real y sondas fluorescentes específicas, es una alternativa potente y fiable para la detección de *B. bruxellensis*, proporcionando resultados en tiempos mucho más cortos y permitiendo procedimientos de control más eficientes.

4. CONTROL INTERNO (IC)

Los kits de detección en bebidas incluyen un control interno (IC) en la Master Mix. Este control se amplifica al mismo tiempo que la secuencia de ADN diana, aunque utilizando un conjunto diferente de cebadores y una sonda marcada con un fluoróforo diferente. La inclusión del IC en cada reacción permite evaluar los inhibidores de la PCR en los resultados negativos.

5. APLICACIÓN

Condagene[®] *Brettanomyces/Dekkera* está destinado a la detección rápida de *B. bruxellensis* en vino y otras bebidas, tras extraer el ADN. También se puede utilizar con otras muestras del entorno. El kit se validó en los instrumentos ABI PRISM[®] 7500 Fast y ThermoScientific[®] PikoReal. El kit es compatible con todos los termocicladores que trabajan en los canales **FAM** y **ROX**. El kit de detección no debe utilizarse en los procedimientos de diagnóstico. Para uso exclusivo en investigación. El procedimiento incluye los siguientes pasos principales:



6. CONTENIDO Y CONSERVACIÓN

El kit contiene reactivos para 100 ensayos.

Contenido	Unidades	Composición
Master Mix (tapón azul)	● 2 tubos (2 x 840 µl)	Tampón, dNTPs, ADN polimerasa
Assay Mix (tapón marrón)	● 1 tubo (1 x 210 µl)	Cebadores y sondas
Control negativo (tapón transparente)	○ 1 tubo (1 x 70 µl)	Agua sin nucleasa
Control positivo (tapón rojo)	● 1 tubo (1 x 70 µl)	ADN diana

Conserve todo el contenido a -20° C y protéjalo de la luz, ya que la exposición excesiva a la luz puede afectar a las sondas fluorescentes. Minimice los ciclos de congelación-descongelación. Los reactivos conservados siguiendo las recomendaciones se pueden utilizar hasta la fecha de caducidad indicada en el tubo.

7. MATERIAL NECESARIO Y NO SUMINISTRADO

- Microcentrífuga
- Cabinas de flujo de aire laminar / cabinas de PCR
- Guantes de nitrilo
- Micropipetas y puntas de filtro sin nucleasa
- Termociclador Real Time
- Tubos/tiras/placas de múltiples pocillos y accesorios específicos de cada instrumento
- Tampón de lisis / kit de extracción de ADN (ejemplo: 6500/6504/6505/6506/6507)

8. PRECAUCIONES Y RECOMENDACIONES

Los procedimientos de biología molecular, como las extracciones de ADN y la amplificación mediante PCR, requieren que intervenga personal cualificado que evite el riesgo de que

se generen resultados erróneos, especialmente a causa de la contaminación de las muestras o la degradación de los ácidos nucleicos presentes en ellas. Es muy aconsejable contar con áreas, materiales y equipos específicos para la extracción de ADN, la preparación de la PCR y los procedimientos posteriores a la PCR. En el laboratorio, el flujo de trabajo debe avanzar de manera unidireccional, comenzando en el área de Extracción y pasando al área de Amplificación y Detección.

El usuario siempre debe prestar atención a lo siguiente:

- Antes de ejecutar el ensayo, lea todas las instrucciones proporcionadas.
- No mezcle los reactivos de diferentes lotes.
- Use el equipo de protección personal adecuado, que incluya guantes desechables y batas de laboratorio.
- Conserve y extraiga el material positivo sin que este esté en contacto con el resto de reactivos.

9. CONTROL DE CALIDAD

De acuerdo con la norma ISO 9001, cada lote del kit se analiza conforme a especificaciones predeterminadas, para garantizar que la calidad del producto sea uniforme.

10. PROCEDIMIENTO

10.1. Extracción de ADN

Las muestras de bebidas se concentrarán por centrifugado o filtrado

10.2. Extracción de ADN

Utilice un kit o un protocolo adecuado para extraer el ADN. Como Condagene® Complex Extraction Kit (6500), Condagene® Extraction Rapid (6504-6505) o Condagene® Extraction Column (6506-6507).

10.3. Preparación de la PCR

A: Mezcla para PCR

Siempre use guantes en todos los procedimientos de PCR.

1. Descongele las soluciones del kit. Mezcle bien y centrifugue brevemente.
2. Prepare las reacciones como se describe a continuación:

Contenido	N.º de muestras	
Reacción qPCR	1	10 (10 + 1)
Master Mix	● 16 µl	176 µl
Assay Mix	● 2 µl	22 µl
Volumen total	18 µl	198 µl

Nota: Prepare la reacción PCR para cada muestra, o bien, prepare una Master Mix que cubra el total de reacciones más un 10 % adicional para compensar las pérdidas generadas al pipetear (por ejemplo, si son 10 muestras, prepare un volumen para 11). En este caso, prepare la mezcla en un tubo de 1,5 ml estéril y sin nucleasa. Incluye 2 reacciones PCR para los controles positivos y negativos.

3. Mezcle la mix preparada invirtiendo el tubo y centrifugando brevemente.
4. Vierta alícuotas de 18 µl de la mix preparada en los pocillos de las placas o el tubo de PCR.
5. Para el control negativo, pipetee 2 µl del tubo de Control Negativo (tapón transparente); pipetee 2 µl de la muestra de ADN por cada pocillo; y para el control positivo, pipetee 2 µl del tubo de Control Positivo (tapón rojo). Cada tubo de PCR/pocillo debe tener un volumen de PCR final de 20 µl.
6. Centrifugue brevemente los pocillos de las placas o los tubos de PCR.
7. Coloque las reacciones en el instrumento de PCR en tiempo real.

B: Configuración del programa

Prepare el instrumento de PCR en tiempo real conforme al siguiente programa de temperatura/tiempo:

Fase	Paso	Temperatura	Tiempo
Etapa de retención	Paso 1	50°	2 min
	Paso 2	95°	5 min
Amplificación: 45 ciclos	Paso 1	95°	30 s
	Paso 2	56°	30 s
	Paso 3	72°	30 s

Diana	Canales
Detección de <i>B. bruxellensis</i>	FAM
Detección del control interno (IC)	ROX

11. ANÁLISIS DE DATOS

Para analizar los resultados de la PCR, seleccione las opciones de visualización de la fluorescencia. Las muestras que arrojan valores positivos del umbral de ciclos (Ct) se consideran positivas.

Importante: También compruebe las curvas de amplificación, no solo los valores de Ct. Las muestras deben inspeccionarse tanto a escala logarítmica como a escala lineal y compararse con el control negativo. Si es necesario, ajuste el umbral. La evaluación de los resultados de la muestra debe realizarse después de que los controles positivos y negativos hayan sido examinados y se haya determinado que son válidos. Si los resultados de los controles no son válidos, los resultados de la muestra no se podrán interpretar. Interpretación de los datos de la PCR:

Interpretación de los datos de la PCR:

a) Controles

Para validar el ensayo, los controles deben tener los siguientes resultados:

	Detección de <i>B. bruxellensis</i> con FAM	Detección de IC con ROX
Control negativo	Negativo	Positivo
Control positivo	Positivo	Positivo

Tenga en cuenta que, si los controles no coinciden con estos resultados, el experimento deberá repetirse.

b) Muestras

La interpretación de los resultados de las muestras se resume en la siguiente tabla:

Detección de <i>B. bruxellensis</i>	Detección de IC con ROX	Interpretación
FAM	Positivo/negativo**	Se detectó ADN, muestra positiva en el serogrupo <i>B. bruxellensis</i>
Negativo	Positivo	No se detectó ADN, muestra negativa en el serogrupo <i>B. bruxellensis</i>
Negativo	Negativo	El resultado no es válido*

*Si la detección de *B. bruxellensis* y del IC son negativas, esto indica la presencia de inhibidores de PCR en la muestra. Realice una dilución de la muestra de ADN (dilución 1/10) o lleve a cabo otra extracción de ADN y repita la qPCR.

**La alta concentración de ADN diana en la muestra puede provocar una señal de fluorescencia reducida o inexistente del IC.

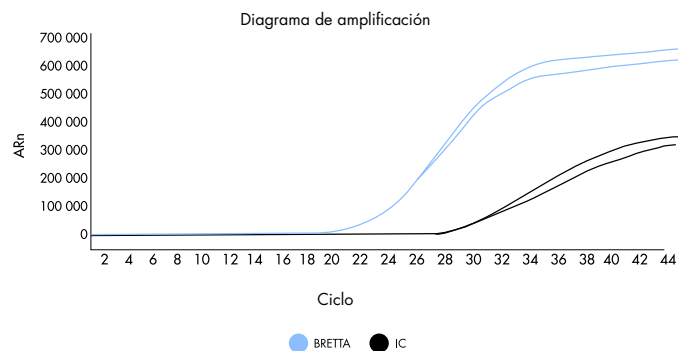
12. ESPECIFICIDAD/INCLUSIVIDAD

- a) 100 % de exclusividad, determinada utilizando 34 cepas de organismos estrechamente relacionados o que se encuentren en el mismo hábitat.
- b) 100 % de inclusividad, determinada en 3 cepas de *Brettanomyces*/*Dekkera bruxellensis*.

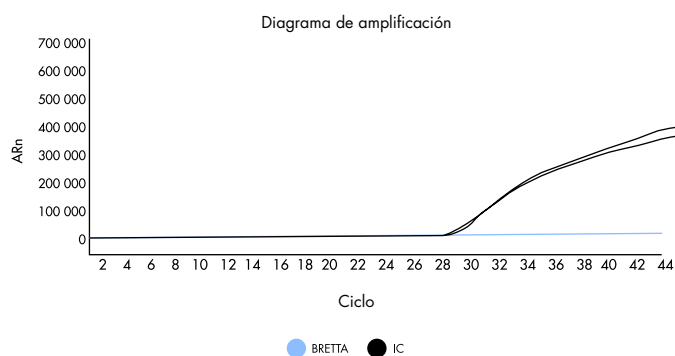
13. SENSIBILIDAD

Condagene® *Brettanomyces*/*Dekkera* detecta 102-103 ufc/45 ml después de la concentración de la muestra. Este kit tiene una sensibilidad de reacción de 20 fg de ADN diana.

Control positivo



Control negativo



Laboratorios Conda S.A.
C/ Forja, 9. Torrejón de Ardoz
28850 Madrid, España
T. +34 91 761 02 00