

SMART LINK #15

PCR DIGITAL, LA TECNOLOGÍA AL SERVICIO DE LA SENSIBILIDAD

Laboratorios Excell Ibérica, S.L. – C/ Planillo, 12; 26006 Logroño (La Rioja)
www.excelliberica.com - Tel.: 941 445 106

El problema de *Brettanomyces* en enología ha estado durante años en el centro de investigaciones y estudios para cubrir las necesidades de su desarrollo analítico. Para impulsar este desarrollo, Laboratorios Excell está invirtiendo tanto en la investigación fundamental (Tesis Doctoral Filmbrett) como a nivel de sus equipos y métodos.

Desde hace casi un año, una nueva herramienta se suma a la batería de análisis de *Brettanomyces* disponibles en Laboratorios Excell Ibérica. Esta herramienta es la PCR digital. Esta técnica innovadora surgió en el momento de la pandemia de COVID porque aseguró la sensibilidad para controlar el seguimiento epidemiológico del virus en aguas residuales. Muy rápidamente, los microbiólogos del laboratorio se centraron en aplicar el tecnología analítica al objetivo más buscado en microbiología del vino: ¡*Brettanomyces*!

PERFECCIONAR UN MÉTODO ROBUSTO PERO LIMITADO

Los métodos de PCR han progresado significativamente desde los primeros usos. Una primera generación de PCR, llamada PCR de punto final, consistió en multiplicar el ADN objetivo antes de resaltar su presencia o ausencia. Este análisis cualitativo permitió, por ejemplo, certificar la presencia de *Brettanomyces*, de esta manera, podrías conocer la población precisa y, por lo tanto, el riesgo inherente.

Posteriormente, se desarrolló la PCR cuantitativa (o PCR "a tiempo real"). La multiplicación del ADN objetivo mediante fluorescencia (cada hebra neosintetizada estuvo acompañada por un aumento de fluorescencia, este último seguido a tiempo real, se correlaciona con la cantidad de ADN y, por lo tanto, de células inicialmente presentes en la muestra). El número

de multiplicaciones necesarias para alcanzar un umbral de fluorescencia corresponde entonces a una concentración de células en la muestra. Se trata de una cuantificación dinámica. Este método permite cuantificar muchos microorganismos incluyendo *Brettanomyces* en vinos y así resaltar poblaciones más o menos importantes para evaluar los riesgos. Cuantificar específicamente la población de *Brettanomyces* en tiempo real fue un gran avance en la prevención de la contaminación.

En los últimos años, gracias a la mejora del conocimiento genético de cepas de *Brettanomyces*, la adición de una caracterización de las curvas de fusión de las cadenas de ADN recién sintetizadas durante la reacción de polimerización por PCR ha permitido agregar la identificación de ciertos grupos de cepas específicas para la cuantificación de población total. Esta técnica se llama el TYP\Brett. Proporciona la población total de *Brettanomyces* pero también el porcentaje de cepas triploides resistentes al SO₂ y el porcentaje de cepas triploides aptas para fenómenos de adhesión (Tesis FilmBrett).

Hasta la fecha, TYP\Brett es el único análisis que reúne la precisión del análisis genético y la caracterización de rasgos fisiológicos particularmente útiles para los profesionales. En caso de un alto nivel de población de *Brettanomyces*, la acción enológica será diferente si las cepas son resistentes al SO₂ o no.

Aunque es muy ventajoso, la PCR tiene tres debilidades relativas. A continuación, se mencionan por orden de importancia:

La primera, a menudo mencionada injustamente, se refiere al riesgo de detectar ADN en células muertas. Sobre este punto es importante recordar la importancia de elegir la secuencia objetivo a amplificar. Cuanto más corta sea la secuencia (lo que facilita la especificidad), más puede plantearse la cuestión. En Laboratorios Excell Ibérica hemos determinado una secuencia suficientemente larga para reducir este riesgo.

La segunda surge del hecho de que la amplificación del ADN es una reacción enzimática (acción de Taq polimerasa) y que muchos inhibidores presentes en los vinos, especialmente los taninos, pueden alterar. Por tanto, es necesario purificar primero el ADN extraído, lo que potencialmente puede provocar una pérdida de sensibilidad. Estas purificaciones deben imaginarse como microvínculos: se añade un producto (a menudo PVPP) que atrapa los taninos y se produce una reacción de separación durante la cual es posible perder una pequeña parte del ADN. En laboratorios Excell, un gran trabajo e inversión desde hace 3 años ha permitido automatizar estos pasos y garantizar un umbral de detección de PCR

relativamente bajo: 10 células por mililitro (mientras que la mayoría de las otras técnicas de PCR propuestas garantizan una media de 100 células por mililitro). Sin embargo, en ciertos casos como el control en el embotellado (donde 10 células por mililitro todavía corresponden a 7.500 células por botella) o controles de higiene o la búsqueda de *Brettanomyces* en uvas en el viñedo, nos pareció relevante intentar trabajar para mejorar este umbral.

La tercera es que monitorear la aparición de fluorescencia en tiempo real requiere un hardware riguroso y también un rango para calibrar el número de ciclos (multiplicaciones de ADN) correspondientes a una determinada concentración. En el laboratorio, para cada serie de análisis Q-PCR, se utiliza una gama de calibración que se repite sistemáticamente (+ controles positivos, controles negativos de los pasos de extracción y amplificación). Estos elementos esenciales para producir un resultado satisfactorio desde el punto de vista de la calidad aumentan el costo del análisis.

Para superar estas limitaciones, parecía relevante el uso del nuevo método, la PCR digital. La tecnología PCR digital del laboratorio, llamada D-PCR, se basa en la primera generación de PCR, haciéndola al mismo tiempo cuantitativa. Los avances técnicos en microfluidos han permitido la dispersión de una muestra en miles de particiones. Esto significa que no se realiza un PCR de punto final por muestra si no casi 30.000.

¿CÓMO FUNCIONA?

La preparación de una D-PCR es similar a la de una Q-PCR, sin embargo, antes de iniciar los ciclos de multiplicación, las muestras se dispersan en 30.000 reacciones. Esto tiene el efecto de dividir el ADN, pero también inhibidores. Si una reacción es bloqueada por la presencia de un inhibidor, se observará un solo falso negativo entre varios miles. Posteriormente, la cuantificación se basa en un estudio estadístico de las reacciones positivas y reacciones negativas. Por lo tanto, ya no existe ningún control en tiempo real de la fluorescencia, sino un recuento de reacciones fluorescentes al final del análisis (Figura 1). De esta manera, el análisis está protegido de un posible fallo durante el monitoreo en tiempo real. Por lo tanto, se basa en una cantidad llamada "absoluta".

Finalmente, el uso de cálculos estadísticos permite eximirse del uso de rangos de calibración, limitando así los requisitos para cada análisis.

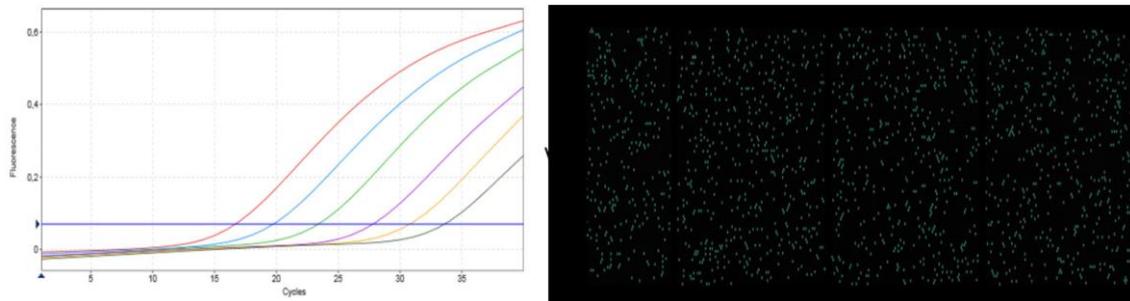


Figura 1. Resultados brutos de una Q-PCR (a la izquierda, el ejemplo de un rango realizado: se produce la señal en rojo de una población mayor que la de la señal en azul, a su vez vinculada a una población mayor al de la señal en verde...) y una D-PCR (a la derecha, los puntos de fluorescencia verde son las mezclas reacciones positivas, las negras son negativas).

El número de reacciones llevadas a cabo proporciona una mayor sensibilidad del análisis. Cuando Q-PCR permite la detección a partir de 10 células por mililitro, la D-PCR permite la detección de una célula en 10 mililitros de muestra. Por tanto, la sensibilidad es 100 veces mayor en la D-PCR.

Este umbral puede resultar importante para identificar el inicio de la contaminación, comprender la distribución de células en el viñedo o más precisamente objetivar la ausencia de población tras el embotellado.

COPIAS DE ADN

En el caso de D-PCR, dado que el análisis se realiza a escala de la molécula de ADN, la cuantificación es el número de copias de ADN en la muestra. Para simplificar la lectura de sus resultados, un gran número de muestras se analizaron en el laboratorio y se desarrolló una correlación entre Q-PCR y D-PCR. Por lo tanto, los resultados de una D-PCR se indican en copias de ADN, pero también con un equivalente en células por mililitro con el fin de facilitar la interpretación y el manejo inducido por estos análisis.

NUEVAS PISTAS DE SEGUIMIENTO EN LOS ITINERARIOS ENOLÓGICOS

Durante estas cosechas se utilizó la tecnología D-PCR, la cual permitió resaltar pequeñas poblaciones de *Brettanomyces* en uvas que no habrían podido detectarse mediante Q-PCR simple. Hasta entonces, las poblaciones de uvas se consideraban débiles y raras. Durante los análisis realizados en 2023, se pudo demostrar que la presencia de *Brettanomyces* no fue tan baja como se pensaba (casi el 20% de las muestras de uva dieron positivo). El seguimiento de las fermentaciones y de los vinos resultantes nos permitirá comparar estos inventarios con el riesgo de desviación en los fenoles volátil (vinculado a los niveles de precursores).

Para concluir esta presentación de PCR digital, vamos a presentar el seguimiento de un embotellado de un cliente del laboratorio que hasta ahora realizaba el seguimiento de su embotellado en Q-PCR. El seguimiento en D-PCR mostró detecciones en el 22% de las botellas analizadas tras el embotellado. La población promedio fue de 1 célula/mL (es decir, 750 células por botella) con variaciones significativas entre las botellas. Todas estas poblaciones no se habrían detectado por Q-PCR clásica (ni por otras técnicas de análisis de *Brettanomyces*, véase la conclusión general). Estas poblaciones pueden estar en el origen de los desarrollos a veces observado durante el almacenamiento en botellas. Al afinar el umbral de detección, la D-PCR destaca como el análisis de elección para el control calidad de los embotellados.

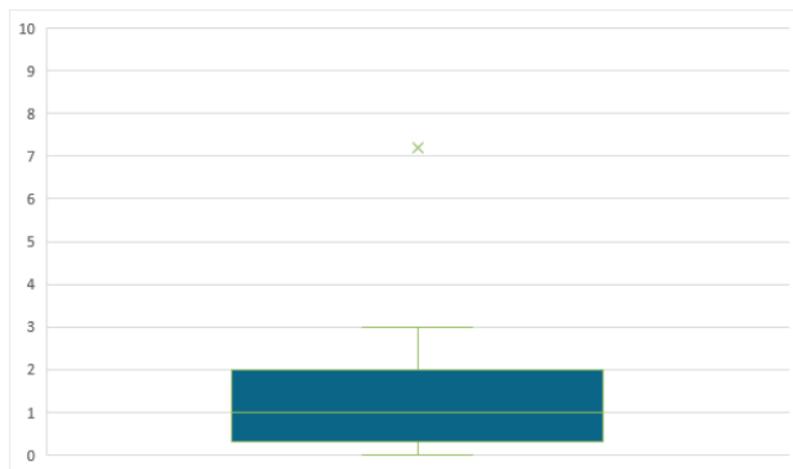


Figura 2. Ilustración de los resultados de búsqueda de *Brettanomyces* mediante PCR digital en muestras de botellas tomadas después del embotellado.

CONCLUSIÓN GENERAL

El laboratorio Excell es el único laboratorio con todas las técnicas de análisis microbiológicos para el seguimiento del problema de *Brettanomyces*. Esto permite beneficiarse de ventajas de cada técnica (y sus limitaciones) en función de los objetivos del análisis. La siguiente tabla resume estas posiciones e indica las ventajas obvias de la D-PCR en términos de sensibilidad y costo (frente a Q-PCR).

	Criterios de selección				Periodo de aplicación del análisis microbiológico
	Rapidez	Especificidad	Sensibilidad	Coste	
Observación microscópica con epifluorescencia	+++	+	+	€€	- Fin de FA lenta - Antes de iniciar la FML (búsqueda de <i>Oenococcus</i>) y observación de las flores de levadura competitivas - Cuando se sospecha una contaminación (1ª etapa de observación global de poblaciones)
Medio de cultivo	-	++	+++	€	- Análisis preliminar para controles de implantación - Seguimiento analítico previsto (plazo de entrega) - Placas de contacto (control de higiene de superficies) - Control rápido, especialmente durante la vinificación (cuando la diversidad microbiana es relativamente alta)
PCR cuantitativa	+++	++	+++	€€€	- Posibilidad de buscar específicamente otras especies de levaduras y bacterias - Para el control previo y posterior al embotellado - Para prevenir la aparición de contaminación (umbral de detección)
D-PCR	+++	+++	++++	€€	- Adecuado para el análisis de uva, mosto y vino - Útil para auditorías de higiene (sobre el agua de enjuague de los equipos, agua estancada...) - Seguimiento específico de <i>Brettanomyces</i>
TYP/Brett	++	++++	+++	€€€	- Herramienta de ayuda a la toma de decisiones para elegir el tratamiento más adecuado en caso de contaminación - Distinción entre cepas triploides resistentes al SO ₂ - Control del final de la fermentación: estimación del riesgo de ralentización en la actividad fermentativa
Citometría de flujo específica (sonda ARNr)	+++	+++	++	€€	- Seguimiento tras una acción de estabilización de la microflora (adición de quitosano, de SO ₂ ...) o estrés para los microorganismos - Caracterización de la viabilidad de la levadura (cremas de levadura, desarrollo de espuma...)

Figura 3. Tabla comparativa de los diferentes análisis realizados en el Laboratorio Excell sobre el problema de *Brettanomyces*.