RISOLUZIONE OIV-OENO 713B-2025

CONTEGGIO DELLE CELLULE DI LIEVITO MEDIANTE CITOMETRIA A FLUSSO NELLE COLTURE DI LIEVITI

L'ASSEMBLEA GENERALE

CONSIDERATO che i produttori di colture microbiche starter per enologia e le aziende vitivinicole necessitano di informazioni tempestive e accurate riguardanti la qualità delle colture di lieviti per enologia,

CONSIDERATO che attualmente la maggior parte delle metodiche OIV riguardanti l'analisi microbiologica è basata sulla conta su piastra Petri, tecnica robusta ed efficace, ma che richiede lunghi tempi di incubazione, a volte incompatibili con la rapidità dei processi fermentativi,

CONSIDERATO che la citometria a flusso oggi è una tecnica analitica ampiamente diffusa in diversi settori dell'industria biotecnologica e agroalimentare, la sua robustezza e affidabilità sono ampiamente dimostrate e sul mercato vi è disponibilità di numerose soluzioni tecnologiche adatte a differenti contesti produttivi,

DECIDE di adottare il seguente metodo di analisi microbiologica per le colture di lieviti e di inserirlo nella parte 2 del *Codex enologico internazionale*,

CONTEGGIO DELLE CELLULE DI LIEVITO MEDIANTE CITOMETRIA A FLUSSO NELLE COLTURE DI LIEVITI

1. Conteggio delle cellule di lievito mediante citometria a flusso nelle colture di lieviti

2. Campo di applicazione

Il metodo è volto alla quantificazione delle cellule di lieviti vitali, in stato di stress (membrane permeabili) e morte nelle colture di lieviti per enologia, così come definite dall'OIV.

Questo metodo, che utilizza la doppia marcatura, non consente di quantificare le cellule vitali metabolicamente inattive (membrane impermeabili).

Il metodo può essere applicato per l'analisi di preparazioni di lieviti selezionati (LSA e altri formulati previsti dall'OIV).

Esemplare certificato conforme Chișinău, 20th June 2025
Il Direttore Generale dell'OIV
Segretario dell'Assemblea Generale
John BARKER

© OIV 2025

I limiti di quantificazione dipendono dalle prestazioni dell'attrezzatura utilizzata e dal metodo di preparazione del campione.

3. Definizioni

CITOMETRIA A FLUSSO: Si tratta di una tecnologia che fornisce un'analisi rapida e multiparametrica di singole cellule in soluzione. Il citometro a flusso utilizza solitamente un laser come sorgente luminosa per ottenre segnali luminosi dati dai fenomeni di rifrazione e fluorescenza. Tali segnali sono letti da rilevatori come fotodiodi o tubi fotomoltiplicatori e convertiti in impulsi elettronici che vengono analizzati da un computer. La popolazione cellulare può essere differenziata e/o caratterizzata in base alle caratteristiche di fluorescenza, mediante specifiche marcature, o di interazione fisica (Rifrazione) con la luce.

RIFRAZIONE FRONTALE (*FORWARD SCATTER*, FSC): Segnale generato dalla dispersione della luce da parte della particella (cellula). Per convenzione, viene registrato a 180° rispetto alla sorgente luminosa e può essere direttamente correlato alle dimensioni della particella.

RIFRAZIONE LATERALE (*SIDE SCATTER*, SSC): Segnale generato dalla dispersione della luce da parte della particella (cellula). Per convenzione viene registrato a 90° rispetto alla sorgente luminosa e può essere direttamente correlato alla complessità strutturale della particella.

SEGNALI DI FLUORESCENZA (FLx): Segnali generati dall'emissione di fluorescenza dovuta ai fluorocromi coniugati alle particelle che emettono opportuni colori. Le diverse lunghezze d'onda di emissione sono separate da filtri ottici e, per convenzione, numerate progressivamente (FL1, FL2, ecc.).

COMPENSAZIONE: Processo di correzione della sovrapposizione (spillover) della fluorescenza, che prevede la rimozione del segnale di un determinato fluorocromo da tutti i rivelatori tranne quello dedicato alla misurazione di quel colore. In genere, viene applicata ai canali FL2 o FL3, per eliminare il contributo del fluorocromo che presenta il picco massimo di emissione nel canale FL1.

CONTEGGIO VOLUMETRICO: Numero di eventi (cellule) in un determinato volume di campione, solitamente misurati da due elettrodi posti a livelli diversi nella cuvetta del campione. Sono accettabili alcune soluzioni alternative, ad esempio l'uso di una pompa volumetrica.

EVENTO: Si definisce evento la rilevazione di una singola particella che attraversa il fascio laser dello strumento. Ogni evento corrisponde a un insieme di misurazioni di diverse proprietà ottiche e fisiche di questa particella. Spetta agli operatori dimostrare

Esemplare certificato conforme Chișinău, 20th June 2025
Il Direttore Generale dell'OIV
Segretario dell'Assemblea Generale
John BARKER

© OIV 2025

che un evento può essere associato a una singola cellula, in particolare verificando l'assenza di agglomerati cellulari (doppiette, triplette, ecc.).

4. Principio del metodo

Una sospensione cellulare, ottenuta da appropriata diluizione decimale del campione, è analizzata in citometria a flusso in modalità volumetrica, previa marcatura con coloranti fluorescenti in grado di differenziare tra cellule con attività enzimatica (vive) e cellule aventi membrana citoplasmatica compromessa (morte). Inoltre, in alcuni casi è possibile identificare una terza sottopopolazione di cellule con attività metabolica ma alterata permeabilità della membrana cellulare; questa sottopopolazione è generalmente costituita da cellule in stato di stress ma vitali.

Il metodo qui proposto è un metodo generico che utilizza un singolo laser blu e 2 fluorocromi. È possibile utilizzare metodi più sofisticati, che prevedono l'impiego di citometri multi-laser e marcature multiple.

In questo metodo si utilizzano 2 tipi di fluorocromi:

- Ioduro di propidio (PI): è un agente intercalante per gli acidi nucleici (DNA o RNA). Penetra solo nelle cellule con membrane plasmatiche permeabili. Si considera che queste siano principalmente cellule morte o cellule che mostrano stress di membrana (ad esempio, a causa dell'effetto dell'etanolo). Il suo picco di eccitazione si trova tra i 520 e i 550 nm, mentre la massima fluorescenza emessa si colloca tra 610 e 630 nm. Le cellule marcate come PI(−) sono considerate quindi vitali, mentre le cellule PI(+) sono classificate come morte o presentano membrane plasmatiche permeabili.
- 5-(e 6)-carbossifluoresceina diacetato (cFDA): si tratta di un substrato esterasico in grado di permeare le cellule che agisce come indicatore dell'attività metabolica (esterasica). Durante l'idrolisi da parte delle esterasi intracellulari, questo estere acetossimetilico produce carbossifluoresceina, il cui picco di eccitazione è rilevabile a 498 nm con massima fluorescenza emessa rilevabile a 516 nm. Il suo spettro di emissione si estende fino a 650 nm, il che può richiedere una compensazione su altri canali (FL2). Le cellule marcate cFDA(+) sono quindi considerate metabolicamente attive (esterasi) mentre quelle marcate cFDA(−) metabolicamente inattive.

Tabella 1: sintesi delle interpretazioni in base alle risposte fluorocromatiche

Esemplare certificato conforme Chișinău, 20th June 2025
Il Direttore Generale dell'OIV
Segretario dell'Assemblea Generale
John BARKER

© OIV 2025

Quadrante	**PI(−)**	**PI(+)**
cFDA(−)	Non interpretabile con questo metodo	Morte
cFDA(+)	Vitali e attive	Cellule attive con membrana plasmatica alterata permeabile al PI (cellule in stato di stress)

Nota 1: Una popolazione di cellule PI(−) è definita come indicativa dell'integrità della membrana, mentre cFDA(−) denota un'attività metabolica non rilevabile.

Nota 2: In questo metodo, le cellule non sono distinte da eventuali rumori di fondo. Il quadrante IP(−) cFDA(−) non è quindi interpretabile.

5. Reagenti e materiali

Vetreria da laboratorio, cuvette per citometria a flusso e fluido di trascinamento, laddove richiesti dallo strumento.

Provette (16x160 mm o simili) contenenti 9 mL di tampone fosfato salino (PBS) filtrato con filtro avente porosità di 0,2 µm (pH 7,4).

5-(e 6)-carbossifluoresceina diacetato (polvere) (cFDA; N. CAS 124387-19-5).

Ioduro di propidio, (polvere) 95% (PI ; N. CAS 25535-16-4).

Dimetilsulfossido in forma liquida pura (DMSO; N. CAS 67-68-5).

Coltura pura di *S. cerevisiae* (ad es. ceppo ATCC 9763) con concentrazione nominale di 10^5 cell/mL.

Soluzione di NaCl a 8,5 g/L in acqua, sterilizzata per filtrazione o in autoclave.

Soluzione di cFDA in DMSO o acetone (0,1 mg/mL).

Soluzione di PI in DMSO o soluzione acquosa, 1 mg/mL.

Nota 1: La diluizione dei fluorocromi viene effettuata in DMSO, seppur sia possibile farla utilizzando anche acetone. Tuttavia, sembra che la miscela acetone/DMSO produca più rumore di fondo sul citometro; si raccomanda pertanto di usare solo DMSO.

6. Attrezzatura

Citometro a flusso equipaggiato con laser emittente a 488 nm (50 mW) e parametri

Esemplare certificato conforme Chișinău, 20th June 2025
Il Direttore Generale dell'OIV
Segretario dell'Assemblea Generale
John BARKER

© OIV 2025

ottici FSC, SSC, FL1 (530 nm), FL2 (630 nm) e FL3 (670 nm).

Agitatore tipo Vortex.

Vetreria da laboratorio.

Filtro da laboratorio sterilizzante da 0,2 µm (preferibilmente realizzato in acetato di cellulosa, che riduce il rumore di fondo).

Piastra multi-pozzetto.

Micro pipette con puntali sterili da 1 mL e 0,2 mL.

Bilancia analitica con precisione di ± 0,01 g.

Centrifuga da laboratorio.

Nota: sebbene la sterilità non sia strettamente necessaria, è comunque consigliato mantenere un elevato grado di igiene e utilizzare attrezzature e reagenti sterili.

7. Preparazione del campione

Il campione di coltura di lieviti da analizzare deve essere prelevato e trasportato al laboratorio in modo corretto e deve essere rappresentativo della massa originale.

Per l'analisi, è sufficiente disporre di 50 g di campione con le caratteristiche descritte nella monografia COEI-1-SACCHA "Lieviti selezionati *Saccharomyces* spp.", conservato secondo le modalità previste dal fabbricante.

8. Procedimento

L'analisi in citometria a flusso è immediata, vi sono scarsi rischi di contaminazione dovuti alla manipolazione del campione al di fuori della cappa a flusso laminare o durante la lettura citometrica. Tuttavia, è necessario mantenere un elevato grado di igiene e utilizzare attrezzature e reagenti sterili.

Questo procedimento è fornito a titolo esemplificativo. Il laboratorio può introdurre eventuali variazioni. La tecnica della citometria a flusso richiede in particolare di adattare costantemente le diluizioni in base all'attrezzatura utilizzata e alla carica microbiologica dei prodotti analizzati.

MESSA A PUNTO DEL CITOMETRO A FLUSSO

Accendere il citometro a flusso e provvedere al lavaggio dell'apparecchio per evitare interferenze con l'analisi. Settare i canali di acquisizione FSC, SSC, FL1 (acquisizione a 530 nm), FL2 (acquisizione a 630 nm) e FL3 (acquisizione a 670 nm) su scala logaritmica.

Si può ritenere il citometro a flusso pronto per l'analisi quando non si evidenzia,

Esemplare certificato conforme Chișinău, 20th June 2025
Il Direttore Generale dell'OIV
Segretario dell'Assemblea Generale
John BARKER

© OIV 2025

durante la lettura di un campione contenente solo fluido di trascinamento, la presenza di eventi in grado interferire con l'acquisizione nel canale FSC.

Eseguire la lettura di una coltura pura di *S. cerevisiae* avendo cura di regolare, se necessario, i voltaggi dei canali FSC e SSC affinché il picco del segnale nei due canali FSC/SSC sia ben distinguibile dal rumore di fondo. Se il citometro a flusso lo permette, è possibile eliminare il contributo del rumore di fondo agendo sulla soglia del parametro FSC. Comporre un dot plot integrando i segnali FSC e SSC, e individuare la regione contenente la popolazione di cellule di lievito, identificandola con uno specifico gate (figura 1).

COLORAZIONE DEL CAMPIONE

Nel caso di colture selezionate di lievito procedere alla reidratazione e alla diluizione come previsto dalla risoluzione OIV-OENO 632-2021.

Diluire il campione di lievito reidratato tra 1/10 e 1/100, a seconda delle prestazioni dell'attrezzatura utilizzata, in una soluzione di NaCl.

Effettuare la marcatura con, ad esempio, 10 µL di soluzione di cFDA (4.8) e 10 µL di soluzione di PI (4.9), in 980 µL di vino diluito.

Incubare per circa 10 minuti a temperatura ambiente, al buio.

Al termine dell'incubazione, omogeneizzare e procedere alla lettura del campione, previa impostazione del citometro a flusso su modalità di lettura volumetrica.

Nota 1: La concentrazione finale di cFDA nel campione marcato è di circa 2-5 mg/L. La concentrazione finale di IP nel campione marcato è dell'ordine di 3-10 mg/L.

Nota 2: L'ordine di aggiunta dei fluorocromi non ha importanza. Possono essere aggiunti contemporaneamente a una soluzione che li contiene entrambi.

Nota 3: La marcatura è generalmente stabile per 1 ora o più.

ANALISI CITOFLUORIMETRICA

Leggere il campione avendo cura di regolare i settaggi dello strumento per far ricadere la popolazione di lieviti all'interno del gate precedentemente individuato con la coltura pura di *S. cerevisiae*.

Regolare i voltaggi dei canali FL1 e FL2 al fine di separare al meglio il picco di emissione del campione dal rumore di fondo (auto fluorescenza). Per evitare aberrazioni dovute allo spettro di emissione dell'FDA, che potrebbe intercettare anche il canale FL2, agire opportunamente sulla compensazione dello strumento al fine di sottrarre da FL2 il contributo di FL1. Se opportuno, è possibile utilizzare il canale FL3 al posto del canale FL2 per consentire una migliore discriminazione dei segnali di fluorescenza relativi alle cellule vive (FL1) e morte (FL2 o FL3). Eseguire la conta volumetrica delle cellule presenti nel campione. Integrare in un dot plot i canali FL1 e

Esemplare certificato conforme Chișinău, 20th June 2025
Il Direttore Generale dell'OIV
Segretario dell'Assemblea Generale
John BARKER

© OIV 2025

FL2 (o FL3) per meglio visualizzare la separazione delle popolazioni cellulari (figura 2). Considerare come cellule vive gli eventi raccolti nel canale FL1 e provenienti dal gate contenente la popolazione di lieviti, individuata nel dot plot dei parametri fisici FSC e SSC. Considerare come cellule morte gli eventi raccolti nel canale FL2 (o FL3) e provenienti dal gate contenente la popolazione di lieviti, individuata nel dot plot dei parametri fisici FSC e SSC. Considerare come cellule in stato di stress ma vitali la popolazione di eventi che risulta positiva in entrambi i canali (FL1 e FL2 o FL3) previa compensazione appropriata dei segnali.

9. Calcoli

Terminato il conteggio volumetrico, riportare il numero di cellule vive, morte e danneggiate conteggiate all'unità di volume o di peso, in funzione del volume campionato dal citometro a flusso, considerando le diluzioni decimali eseguite. Trattandosi di una conta cellulare diretta, è possibile esprimere i dati come "cellule/g", previa verifica dell'assenza di doppiette o triplette.

Dati sulla prestazione del metodo

Bibliografia

1. Longin, C., Petitgonnet, C., Guilloux-Benatier, M., Rousseaux, S., Alexandre, H., Application of flow cytometry to wine microorganisms, *Food Microbiology*, 2017, vol. 62, pagg. 221-231. DOI: 10.1016/j.fm.2016.10.023.
2. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), CLSI H62: Validation of Assays Performed by Flow Cytometry, 1ª edizione, .2022. ISBN: 978-1-68440-129-1.
3. ISO 7218:2007 amd1:2013 – Microbiologia degli alimenti e del mangime per animali – Regole generali degli esami microbiologici.
4. Kwolek-Mirek, M., Zadrag-Tecza, R., Comparison of methods used for assessing the viability and vitality of yeast cells, *FEMS Yeast Research*, 2014, vol. 14, pagg. 1068-1079. DOI: 10.1111-1567-1364.12202.
5. Guzzon, R., Larcher, R., The application of flow cytometry in microbiological monitoring during winemaking: two case studies, *Annals of Microbiology*, 2015, vol. 65 pagg. 1865-1878. DOI: 10.1007/s13213-014-1025-6.

Figura 1. Dot plot FSC/SSC con evidenziato il gate della popolazione di eventi

Esemplare certificato conforme Chișinău, 20th June 2025
Il Direttore Generale dell'OIV
Segretario dell'Assemblea Generale
John BARKER

© OIV 2025

corrispondenti alle cellule di S. cerevisiae (YEAST) presenti in un campione di vino con concentrazione pari a 10^5 *cell/mL.*

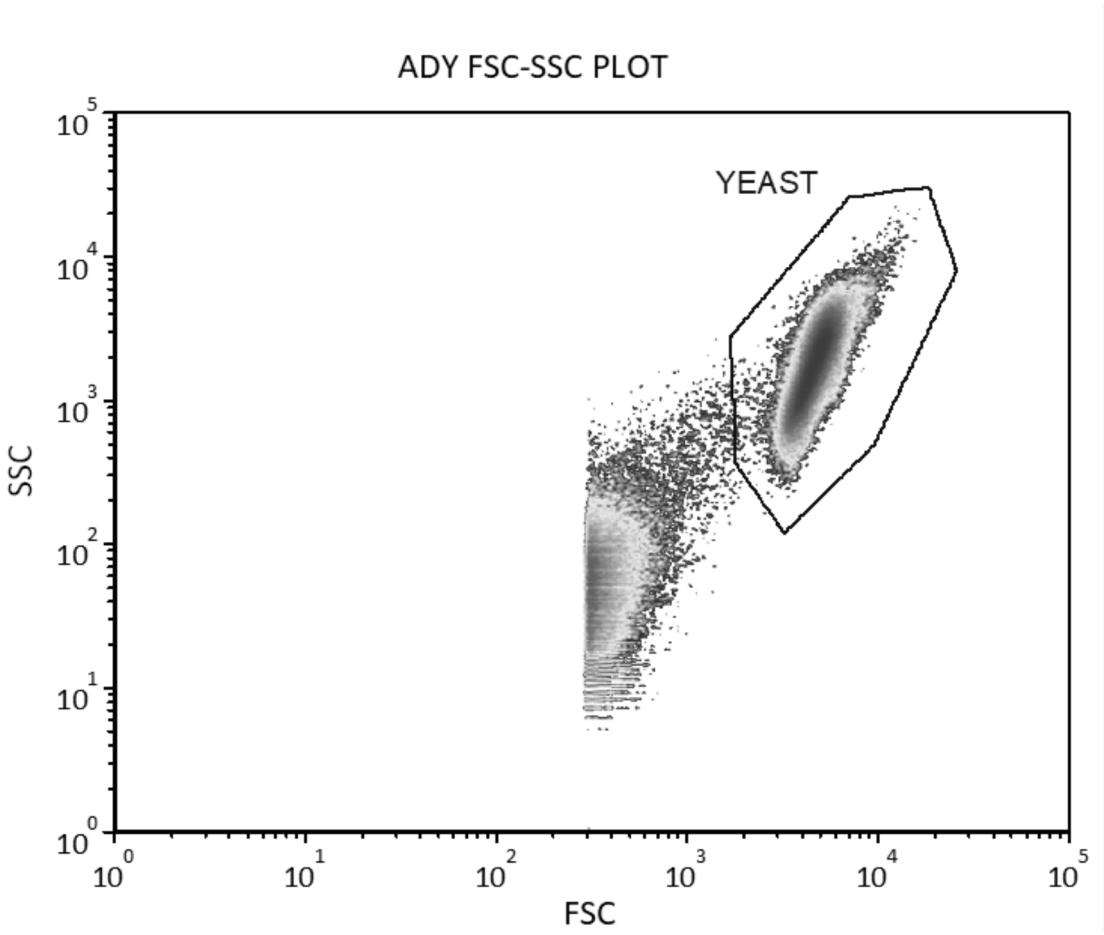
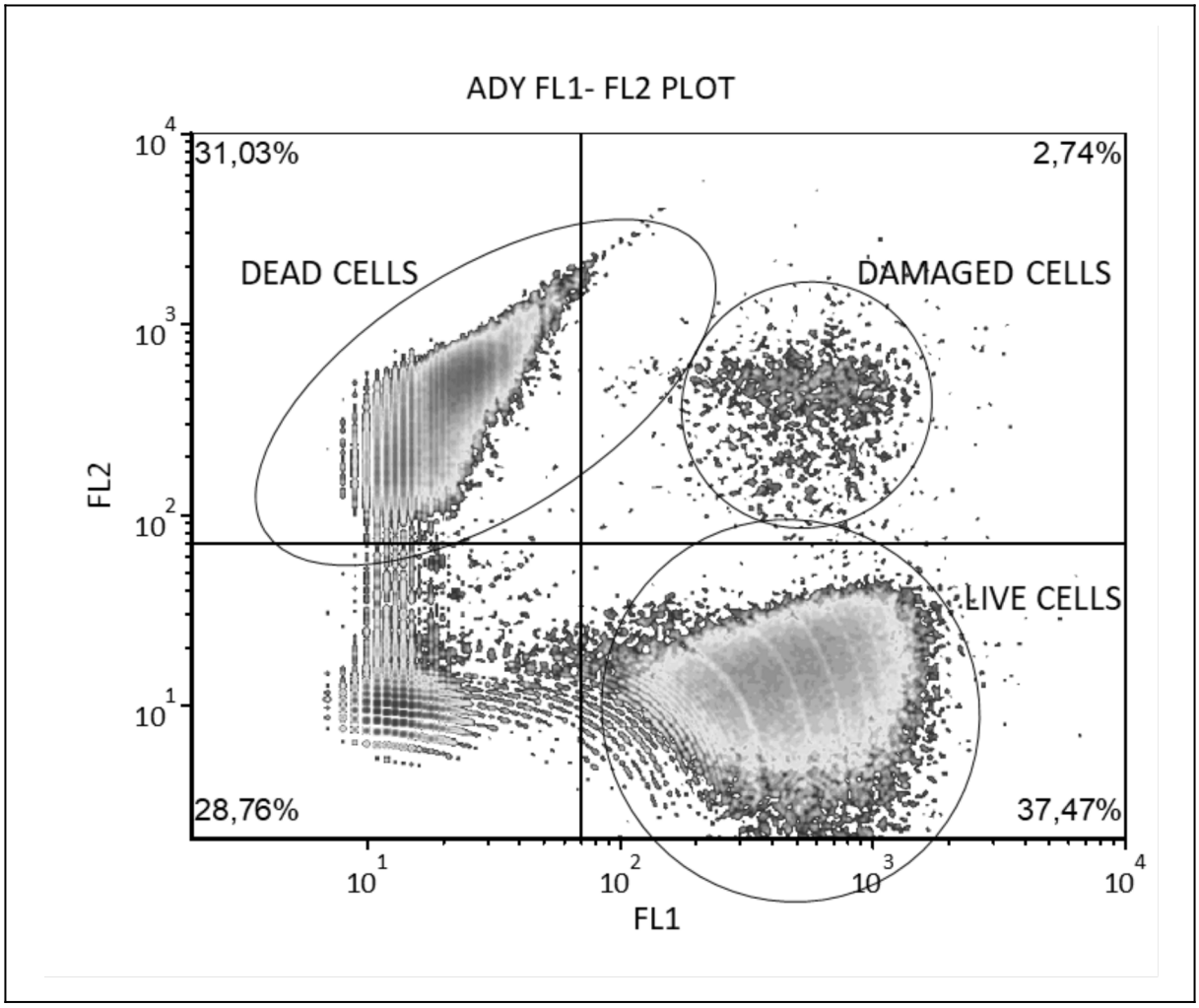


Figura 2. Dot plot FL1 (530 nm)/FL2 (630 nm) con evidenziati i gate contenenti la popolazione di eventi corrispondenti alle cellule di S. cerevisiae vive (LIVE), morte (DEAD) e in stato di stress ma vitali (DAMAGED).

Esemplare certificato conforme Chișinău, 20th June 2025
Il Direttore Generale dell'OIV
Segretario dell'Assemblea Generale
John BARKER

© OIV 2025



Esemplare certificato conforme Chișinău, 20th June 2025
Il Direttore Generale dell'OIV
Segretario dell'Assemblea Generale
John BARKER

© OIV 2025