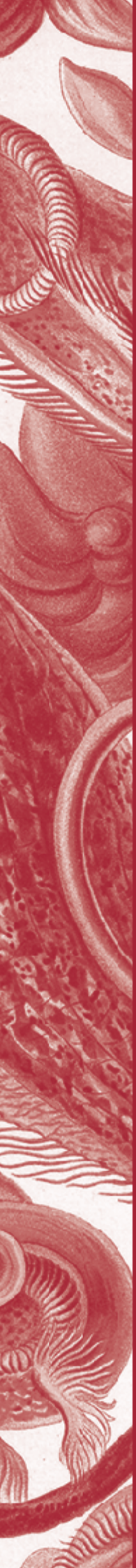

PROTOCOLOS DE DIAGNÓSTICO NORMAS INTERNACIONALES PARA MEDIDAS FITOSANITARIAS 27

Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura

Convención Internacional de Protección Fitosanitaria
Proteger de las plagas los recursos vegetales del mundo

NIMF 27
ANEXO 13

ESP

PD 13:
Erwinia amylovora

Esta página se ha dejado en blanco intencionalmente

Este protocolo de diagnóstico fue adoptado por el Comité de Normas, en nombre de la Comisión de Medidas Fitosanitarias, en agosto de 2016.
Este anexo es una parte prescriptiva de la NIMF 27.

NIMF 27

Protocolos de diagnóstico para plagas reglamentadas

PD 13: *Erwinia amylovora*

Adoptado en 2016; publicado en 2018

ÍNDICE

1. Información sobre la plaga 3
2. Información taxonómica 4
3. Detección 4
3.1 Detección en plantas con síntomas 4
3.1.1 Síntomas 4
3.1.2 Muestreo y preparación de las muestras 6
3.1.3 Aislamiento 6
3.1.3.1 Aislamiento a partir de muestras sintomáticas 6
3.1.3.2 Enriquecimiento-aislamiento 8
3.1.4 Detección serológica 9
3.1.4.1 DASI-ELISA con enriquecimiento 9
3.1.4.2 Inmunoimpresión directa-ELISA 10
3.1.4.3 Inmunofluorescencia 10
3.1.4.4 Inmunoensayo de flujo lateral 11
3.1.5 Detección molecular 11
3.1.5.1 Controles para las pruebas moleculares 11
3.1.5.2 Extracción de ADN 13
3.1.5.3 Amplificación de ADN mediante PCR 13
3.1.5.4 Consideraciones generales relativas a la PCR 16
3.1.5.5 PCR en tiempo real 17
3.1.5.6 Interpretación de los resultados de la PCR 18
3.1.5.7 Amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP) 19
3.2 Detección en plantas asintomáticas 21
3.2.1 Muestreo y preparación de las muestras 21
3.2.2 Pruebas de detección 22
4. Identificación 22
4.1 Identificación nutricional y enzimática 23
4.1.1 Caracterización bioquímica 24

4.1.1.1 Perfil nutricional y enzimático 24
4.1.1.2 Identificación automatizada 25
4.1.1.3 Perfil de ácidos grasos 25
4.2 Identificación serológica 25
4.2.1 Aglutinación 25
4.2.2 Inmunofluorescencia 25
4.2.3 ELISA 25
4.2.4 Inmunoensayo de flujo lateral 26
4.3 Identificación molecular 26
4.3.1 PCR 26
4.3.2 Macrorrestricción y electroforesis en gel de campo pulsante 27
4.4 Técnicas de patogenicidad 27
5. Registros 28
6. Puntos de contacto para información adicional 28
7. Agradecimientos 29
8. Referencias 29
9. Figuras 34

1. Información sobre la plaga

Erwinia amylovora es el agente causal del fuego bacteriano, una enfermedad que afecta a la mayoría de las especies de la subfamilia *Maloideae* de la familia *Rosaceae (Spiraeoideae)*. Fue la primera bacteria en ser descrita como agente causal de una enfermedad de plantas (Burrill, 1883). Se considera que *E. amylovora* es nativa de América del Norte y fue detectada por primera vez fuera de esta región en Nueva Zelanda, en 1920. Se informó de la presencia de fuego bacteriano en Inglaterra en 1957 y, desde entonces, se ha detectado la bacteria en la mayoría de las áreas de Europa en las que se cultivan hospedantes susceptibles. Actualmente *E. amylovora* está presente en más de 40 países. No se ha registrado su presencia en América del Sur ni en la mayoría de los países de África y Asia (excepto en los de la costa del mar Mediterráneo); en Australia, tras un informe que indicaba su presencia (van der Zwet, 2004), ha sido erradicada. Esta bacteria es una amenaza para el sector de los frutales de pepita (frutas pomáceas) de todos estos países (Bonn y van der Zwet, 2000). Puede encontrarse información detallada sobre su distribución geográfica en el sistema de recuperación de datos sobre cuarentena vegetal (EPPO, s. f.) de la Organización Europea y Mediterránea de Protección de las Plantas (OEPP, EPPO por sus siglas en inglés).

Las plantas hospedantes más importantes desde los puntos de vista económico y epidemiológico pertenecen a los géneros *Chaenomeles*, *Cotoneaster*, *Crataegus*, *Cydonia*, *Eriobotrya*, *Malus*, *Mespilus*, *Pyracantha*, *Pyrus*, *Sorbus* y *Stranvaesia* (Bradbury, 1986). Las cepas de *E. amylovora* aisladas de *Rubus* sp. en los Estados Unidos son distintas de aquellas que están presentes en otros hospedantes (Starr *et al.*, 1951; Powney *et al.*, 2011b).

El fuego bacteriano es probablemente la más grave de las enfermedades bacterianas que afectan a cultivares de *Pyrus communis* (peral) y *Malus domestica* (manzano) en muchos países. Las epidemias son esporádicas y dependen de varios factores, como la existencia de condiciones ambientales favorables, un nivel de inóculo suficiente en la parcela y la susceptibilidad del hospedante. La enfermedad se dispersa fácilmente por los pájaros, los insectos, la lluvia o el viento (Thomson, 2000). El desarrollo de los síntomas del fuego bacteriano acompaña al desarrollo estacional de la planta hospedante. La enfermedad comienza en primavera con la producción del inóculo primario por las bacterias que hibernan en los chancros o cancros (Thomson, 2000), inóculo que infecta las flores; continúa en el verano con la infección de los brotes y los frutos, y termina en invierno con el desarrollo de chancros durante todo el periodo de reposo del hospedante (van der Zwet y Beer, 1995; Thomson, 2000).

2. Información taxonómica

Nombre: *Erwinia amylovora* (Burrill, 1883) Winslow *et al.*, 1920

Sinónimos: *Micrococcus amylovorus* Burrill, 1883, *Bacillus amylovorus* (Burrill, 1883) Trevisan, 1889, "*Bacterium amylovorus*" [sic] (Burrill, 1883) Chester, 1897, *Erwinia amylovora* f. sp. *rubi* (Starr *et al.*, 1951)

Posición taxonómica: *Proteobacteria, Gammaproteobacteria, Enterobacteriales, Enterobacteriaceae*

Nombre común: Fuego bacteriano, tizón violento, fogón, tizón de fuego

3. Detección

El fuego bacteriano se puede diagnosticar mediante aislamiento y pruebas serológicas y moleculares. Se recomiendan los análisis indicados a continuación, tras haber sido evaluados en al menos una de las siguientes pruebas interlaboratorios: un proyecto de protocolos de diagnóstico europeos de organismos nocivos para las plantas (DIAGPRO), en el que participaron 10 laboratorios, en 2003 (López *et al.*, 2006); un proyecto de coordinación de la investigación fitosanitaria europea (EUPHRESCO), en el que participaron cinco laboratorios, en 2009 (Dreo *et al*., 2009), y una prueba realizada en 2010 por 14 laboratorios de todo el mundo (López *et al*., 2010). Las pruebas indicadas en las figuras 1 y 2 son los requisitos mínimos para el diagnóstico, pero la organización nacional de protección fitosanitaria (ONPF) podrá exigir otras adicionales, especialmente para el primer informe en un país. Por ejemplo, las pruebas serológicas podrán facilitar un diagnóstico presuntivo de material vegetal sintomático basado en la detección de una proteína específica; sin embargo, debería realizarse otra prueba más, basada en un principio biológico diferente. Todas las pruebas deberán incluir controles positivos y negativos.

En este protocolo de diagnóstico, los métodos (incluidas las referencias a nombres comerciales) se describen según se publicaron, ya que en la publicación se definió el nivel inicial de sensibilidad, especificidad y/o reproducibilidad alcanzado. El uso de nombres de reactivos, productos químicos o equipo en estos protocolos de diagnóstico no implica su aprobación ni la exclusión de otros que también podrán ser adecuados. Los procedimientos de laboratorio presentados en los protocolos podrán ajustarse a las normas de los laboratorios individuales, siempre que estén adecuadamente validadas.

3.1 Detección en plantas con síntomas

Las pruebas de detección recomendadas se indican en el diagrama de flujo de la Figura 1.

3.1.1 Síntomas

Los síntomas del fuego bacteriano en los hospedantes más frecuentes, como *P. communis* (peral), *M. domestica* (manzano), *Cydonia* spp. (membrillero), *Eriobotrya japonica* (níspero del Japón),

Cotoneaster spp. (cotoneaster), *Pyracantha* spp. (espino de fuego) y *Crataegus* spp. (espino albar o blanco, majuelo), son similares y fáciles de reconocer. El nombre de la enfermedad hace referencia a su principal característica: el aspecto parduzco y necrótico de ramillas, flores y hojas, como si hubieran sido quemadas con fuego. Los síntomas típicos son el color entre pardo (marrón) y negro de las hojas de las ramas afectadas, la producción de exudado y el característico curvado en "cayado de pastor" de los brotes terminales. Según la parte de la planta afectada, la enfermedad produce necrosis de las flores, los brotes o las ramillas, las hojas, los frutos, las ramas o el tronco, o el cuello de la raíz o del patrón (van der Zwet y Keil, 1979; van der Zwet y Beer, 1995).

En manzanos y perales, los primeros síntomas suelen aparecer al principio de la primavera cuando la temperatura media supera los 15 °C en condiciones húmedas. Las flores infectadas presentan un aspecto húmedo; posteriormente se marchitan, se secan y adquieren un color naranja o entre pardo y negro. Los pedúnculos también podrán tener un aspecto húmedo y adquirir un color verde oscuro y, en último término, pardo o negro, y a veces rezuman pequeñas gotas de un exudado bacteriano pegajoso. Las hojas infectadas se marchitan y se secan, y los brotes enteros adquieren un color pardo en manzanos, y entre pardo oscuro y negro en perales, pero permanecen unidos al árbol durante un tiempo. Tras la infección, los frutos inmaduros se vuelven pardos, pero también permanecen unidos al árbol. Las lesiones de los frutos inmaduros presentan un aspecto aceitoso o húmedo, adquieren un color pardo o negro y a menudo rezuman pequeñas gotas de exudado bacteriano. Con frecuencia se observan unas características manchas de color pardo-rojizo en los tejidos subcorticales cuando se levanta la corteza de ramas o ramillas infectadas (van der Zwet y Keil, 1979; Thomson, 2000). En la corteza de las ramillas, las ramas o el tronco se forman chancros ligeramente deprimidos de color pardo a negro. Más adelante, estos chancros quedan definidos por grietas localizadas cerca del borde que separa el tejido enfermo y el sano (Thomson, 2000).

Los síntomas del fuego bacteriano se podrán confundir con síntomas similares al tizón o de tipo necrótico, sobre todo en flores y yemas, causados por otras bacterias y hongos patógenos, por el daño de insectos o por desórdenes fisiológicos. Otras bacterias que causan síntomas semejantes a los del fuego bacteriano son *Erwinia pyrifoliae*, el agente causal de la necrosis bacteriana de los brotes de *Pyrus pyrifolia* (peral japonés, asiático o nashi) (Kim *et al.*, 1999); *Erwinia piriflorinigrans*, aislada de flores necróticas de peral en España (López *et al.*, 2011); *Erwinia uzenensis*, descrita recientemente en Japón (Matsuura *et al*., 2012); otras *Erwinia* spp. que, según se ha informado, causan necrosis bacteriana de los brotes en Japón (Tanii *et al.*, 1981; Kim *et al*., 2001a, 2001b; Palacio-Bielsa *et al*., 2012), y *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, agente causal de la necrosis bacteriana de frutales de pepita. Siempre debería obtenerse un diagnóstico definitivo del fuego bacteriano mediante análisis de laboratorio.

3.1.2 Muestreo y preparación de las muestras

El material vegetal debería analizarse lo antes posible después de su obtención, pero podrá almacenarse a una temperatura de 4–8 ºC durante una semana como máximo hasta su procesamiento. Deberían adoptarse precauciones para evitar la contaminación cruzada al tomar las muestras, durante su trasporte y procesamiento, y especialmente durante el aislamiento de la bacteria o la extracción del ADN.

Las muestras se deberían procesar siguiendo un procedimiento general válido para el aislamiento, las pruebas serológicas y el análisis mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés). Para un enriquecimiento con buenos resultados, debe utilizarse una solución tampón de maceración antioxidante recién preparada (20 g de polivinilpirrolidona [PVP]-10, 10 g de manitol, 1,76 g de ácido ascórbico, 3 g de glutatión reducido y 1 litro de solución salina con tampón fosfato [PBS, por sus siglas en inglés] 10 mM, pH 7,2 esterilizada por filtración), según se indica en Gorris *et al*. (1996). Las muestras también se pueden procesar en agua destilada estéril o en PBS a pH 7,2 (8 g de NaCl, 0,2 g de KCl, 2,9 g de $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$, 0,2 g de KH_2PO_4 y 1 litro de agua destilada) excepto las destinadas a aislamiento directo, inmunofluorescencia o PCR.

Se seleccionan cuidadosamente partes de la planta (flores, brotes, ramillas, hojas o frutos) que presenten los síntomas más típicos y que tengan exudado bacteriano si es posible. El material para procesar se selecciona del frente de avance de las lesiones de la enfermedad. El tejido vegetal se corta en trozos de aproximadamente 0,1–1,0 g, se tritura ligeramente en el tampón de maceración antioxidante, PBS o agua destilada estéril (según se describe en el párrafo anterior) en una proporción 1:50 (p/v), se deja reposar durante al menos 5 min y a continuación se pone en hielo durante unos minutos. Se transfieren tres muestras (de 1 ml cada una) de cada macerado a sendos tubos de microcentrífuga estériles: uno de los tubos se almacena a –20 ºC para su posterior análisis mediante PCR; en otro se añade glicerol hasta una concentración final de 30 % y se almacena a –80 ºC para usarlo en una prueba de confirmación en caso necesario. El tercer tubo se conserva en hielo para llevar a cabo el enriquecimiento antes del ensayo de inmunoadsorción enzimática (ELISA) o de la PCR, y el aislamiento en medios selectivos (Figura 1). Si se va a realizar un análisis mediante inmunofluorescencia (optativo), los portaobjetos se preparan y se fijan el mismo día en que se maceran las muestras. El análisis mediante PCR debería realizarse tan pronto como sea oportuno, con la muestra macerada almacenada a –20 ºC.

3.1.3 Aislamiento

3.1.3.1 Aislamiento a partir de muestras sintomáticas

En general, se recomienda sembrar en tres medios de cultivo para que la probabilidad de recuperación de *E. amylovora* sea máxima, especialmente cuando las muestras no estén en buenas condiciones. La

mayor o menor eficiencia de los distintos medios de cultivo dependerá de la cantidad y la composición de la microbiota de la muestra. De los tres medios validados en dos pruebas interlaboratorios (CCT, B de King y levano), el levano es el que tiene mayor eficiencia de recuperación.

Cuando los síntomas están muy avanzados o las condiciones ambientales tras la infección no son favorables para la multiplicación de las bacterias, el número de células de *E. amylovora* cultivables puede ser muy bajo. En estas condiciones, el aislamiento puede dar lugar a placas con pocas células del patógeno y que pueden estar superpobladas con bacterias saprófitas y antagonistas. Si se sospecha esta circunstancia, debería repetirse la prueba con la muestra o llevarse a cabo un enriquecimiento antes del aislamiento. Ordax *et al*. (2009) han descripto la inducción del estado viable pero no cultivable (VNC), con carácter reversible, en *E. amylovora in vitro* mediante tratamientos de frutos con cobre. Este estado puede ser la causa de falsos negativos en el aislamiento. A continuación se describe la preparación de los medios recomendados:

- El medio CCT se prepara en dos partes. La parte 1 consiste en una mezcla de 100 g de sacarosa, 10 g de sorbitol, 1,2 ml de Niaproof 4, 2 ml de cristal violeta (con etanol al 0,1 % como disolvente), 23 g de agar nutritivo y 1 litro de agua destilada, pH 7,0–7,2. El medio se esteriliza en autoclave a 115 ºC durante 10 min y se enfría hasta aproximadamente 45 ºC. La parte 2 se prepara mezclando 2 ml de nitrato de talio (solución acuosa al 1 % p/v) y 0,05 g de cicloheximida, y se esteriliza por filtración. La parte 2 se añade a 1 litro de la parte 1 estéril (Ishimaru y Klos, 1984).
- El medio B de King se prepara mezclando 20 g de proteosa peptona n. 3, 10 ml de glicerol, 1,5 g de K_2HPO_4, 1,5 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 15 g de agar y 1 litro de agua destilada, pH 7,0–7,2; se esteriliza en autoclave a 120 ºC durante 20 min (King *et al*., 1954).
- El medio de levano se prepara con 2 g de extracto de levadura, 5 g de bacto-peptona, 5 g de NaCl, 50 g de sacarosa, 20 g de agar y 1 litro de agua destilada, pH 7,0–7,2; se esteriliza en autoclave a 120 ºC durante 20 min.

Cuando se prevé la presencia de hongos en el aislamiento, se añaden 0,05 g/litro de cicloheximida a los medios B de King y levano. Se preparan diluciones a 1:10 y 1:100 de cada macerado en PBS (8 g de NaCl, 0,2 g de KCl, 2,9 g de $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$, 0,2 g de KH_2PO_4 y 1 litro de agua destilada).

Preferentemente se siembran 100 µl de los macerados y sus diluciones en estrías, por triplicado, en placas de 130 mm, o se siembran 50 µl en placas de Petri estándar de 90 mm. Las placas se incuban a 25 ºC durante un máximo de 4 días. La lectura final se suele hacer a las 72 h. En el medio CCT las colonias de *E. amylovora* son de color violeta pálido, circulares, entre marcadamente convexas y abombadas, de superficie lisa y aspecto mucoide, y crecen más lentamente que en el medio B de King o en el de levano. En el medio B de King las colonias son de color blanco crema, circulares y no

fluorescentes bajo luz ultravioleta (UV) de 366 nm. En el medio de levano las colonias son blancas, circulares, abombadas y presentan superficie lisa y aspecto mucoide. Se ha informado de la existencia de cepas de *E. amylovora* que no producen colonias en levano (Bereswill *et al*., 1997).

A partir de las colonias individuales sospechosas de cada muestra se obtienen cultivos puros mediante dilución y siembra en estrías en medio B de King. La identificación de presuntas colonias de *E. amylovora* se hace preferentemente mediante ensayo indirecto de inmunoadsorción enzimática en fase doble de anticuerpos (DASI-ELISA), PCR u otras pruebas adecuadas (p. ej., pruebas bioquímicas, de inmunofluorescencia, de perfil de ácidos grasos), o inoculando órganos susceptibles de cualquier hospedante de *E. amylovora* disponible para probar su patogenicidad, como se indica en la Sección 4.

Cuando se analizan muestras sintomáticas, es de esperar que haya una buena correlación entre el aislamiento, la inmunofluorescencia, el enriquecimiento-DASI-ELISA (Sección 3.1.4.1) y la PCR.

La precisión del aislamiento determinada en las pruebas interlaboratorios de 2003 y 2010 fue, respectivamente, de 0,88 y 0,81 para el medio B de King; 0,92 y 0,89 para el de levano, y 0,92 y 0,95 para el CCT (López *et al.*, 2006; M. M. López, comunicación personal, 2012). En la prueba interlaboratorios de 2009, se determinó una precisión del aislamiento en medio CCT de 0,96 (Dreo *et al*., 2009).

3.1.3.2 Enriquecimiento-aislamiento

El enriquecimiento se usa para multiplicar la población inicial de *E. amylovora* cultivable de una muestra, así como para realizar las pruebas de enriquecimiento-DASI-ELISA o enriquecimiento-PCR. Debería realizarse antes del aislamiento (incluso en muestras sintomáticas), cuando se prevea la presencia de un escaso número de células cultivables de *E. amylovora* (p. ej., en muestras tratadas con cobre, muestras con síntomas antiguos o muestras tomadas en condiciones meteorológicas desfavorables para el fuego bacteriano, como las propias del invierno). La fase de enriquecimiento aumenta en gran medida la sensibilidad del ensayo DASI-ELISA. Se recomienda el uso de dos medios líquidos validados para esta: uno no selectivo (B de King) y uno semiselectivo (CCT), puesto que se desconoce tanto la composición de la microbiota como su tamaño poblacional.

La muestra de tejido se macera como se describe en la Sección 3.1.2 y se dispensan inmediatamente dos dosis de 0,9 ml en sendos tubos estériles de 10–15 ml (para garantizar que haya suficiente aireación) que contengan 0,9 ml de cada medio de enriquecimiento líquido (B de King sin agar y CCT preparado con caldo nutritivo en lugar de agar nutritivo). Los tubos se incuban a 25 ºC durante 48–72 h sin agitación. Cuando se procesen muestras tomadas en invierno, se recomienda incubarlas durante más tiempo. Tanto los caldos de enriquecimiento como las diluciones (1:10 y 1:100) preparadas en PBS se siembran en estrías sobre placas de CCT, por triplicado, para obtener colonias aisladas. Las placas se incuban a 25 ºC durante 72–96 h. La lectura final de las placas de CCT se hace a las 72 h y, a continuación, se deberán purificar e identificar las colonias.

Para la siembra en placas y para la dilución se recomienda usar un medio semiselectivo ya que la fase de enriquecimiento permitirá el crecimiento del patógeno, pero también la proliferación de otras bacterias. En la prueba interlaboratorios de 2010 se determinó una precisión del aislamiento con enriquecimiento en B de King y CCT de 0,97.

3.1.4 Detección serológica

3.1.4.1 DASI-ELISA con enriquecimiento

Se ha validado en dos pruebas interlaboratorios un kit para enriquecimiento DASI-ELISA comercializado por Plant Print Diagnòstics SL[1]. Se basa en la mezcla de dos anticuerpos monoclonales específicos descritos en Gorris *et al*. (1996) y requiere el enriquecimiento previo de las muestras según el procedimiento antes descrito. Para obtener la máxima precisión, debe seguirse rigurosamente el siguiente protocolo. Antes del ELISA, se incuba en un baño María a 100 ºC durante 10 min la cantidad requerida de los controles y de los extractos enriquecidos. Este tratamiento es necesario para obtener una especificidad óptima. Las muestras hervidas se procesan (a temperatura ambiente) mediante ELISA el mismo día o se almacenan a –20 ºC para su análisis posterior, siguiendo las instrucciones suministradas por el fabricante del kit comercial.

El ELISA es negativo si la lectura media de la densidad óptica (DO) de los pocillos de la muestra analizada por duplicado es <2× la DO de los pocillos del control negativo de extracción de la muestra (siempre que la DO de los pocillos del control positivo sea superior a 1,0 tras 90 min de incubación y mayor que el doble de la DO obtenida para los extractos negativos de las muestras). El ELISA es positivo si la lectura media de la DO de los pocillos de la muestra analizada por duplicado es >2× la DO de los pocillos del control negativo de extracción de la muestra (siempre que la DO de todos los pocillos del control negativo sea menor de 2× la lectura media de la DO de los pocillos del control positivo).

Las lecturas negativas del ELISA para los pocillos de los controles positivos indican que la prueba no se ha realizado correctamente o que la preparación de los reactivos no ha sido correcta, o ambas cosas. Las lecturas positivas del ELISA para los pocillos de los controles negativos indican que se ha producido contaminación cruzada o una fijación inespecífica de los anticuerpos. En ambos casos, la prueba debería repetirse o debería realizarse una segunda prueba basada en un principio biológico diferente, como la PCR.

En las pruebas interlaboratorios de 2003 y 2010 se determinaron valores de la precisión del DASI-ELISA de 0,79 y 0,82, respectivamente, para el enriquecimiento en medio B de King (B de

[1] En este protocolo de diagnóstico, los métodos (incluidas las referencias a nombres comerciales) se describen según se publicaron, ya que en la publicación se definió el nivel inicial de sensibilidad, especificidad y/o reproducibilidad alcanzado. El uso de nombres de reactivos, productos químicos o equipo en estos protocolos de diagnóstico no implica su aprobación ni la exclusión de otros que también podrán ser adecuados. Los procedimientos de laboratorio presentados en los protocolos podrán ajustarse a las normas de los laboratorios individuales, siempre que estén adecuadamente validadas.

King-DASI-ELISA), y de 0,83 y 0,77, respectivamente, para el enriquecimiento en medio CCT (CCT-DASI-ELISA) (López *et al.*, 2006, 2010).

3.1.4.2 Inmunoimpresión directa-ELISA

Para hacer impresiones de tejidos, se presionan con cuidado secciones de la planta recién cortadas contra una membrana de nitrocelulosa. Se preparan impresiones para los controles positivo y negativo. Las membranas con las impresiones se pueden conservar durante varios meses en un lugar seco a temperatura ambiente. Se debería usar una fuente validada de anticuerpos de *E. amylovora* como el kit de Plant Print Diagnòstics SL[1] . Para revelar las impresiones se deberían seguir las instrucciones del fabricante. Las impresiones se examinan con una lupa de baja potencia (×10 o ×20). La prueba es positiva cuando aparecen precipitados de color violeta-púrpura en las secciones de tejido vegetal impresas sobre la membrana y no en la impresión de tejido vegetal del control negativo. Si se imprimen exudados o colonias, deberían presentar color violeta si son positivas. La prueba es negativa cuando no aparecen precipitados de color violeta-púrpura, como en el control negativo.

3.1.4.3 Inmunofluorescencia

La inmunofluorescencia se recomienda como método serológico alternativo y el protocolo estándar es fácil de seguir (Anónimo, 1998). Debería usarse una fuente validada de anticuerpos de *E. amylovora*. En una prueba interlaboratorios se han validado dos anticuerpos comerciales: un anticuerpo monoclonal comercializado por Plant Print Diagnòstics SL[1] y un anticuerpo policlonal comercializado por Loewe Biochemicals[1].

El procedimiento debería llevarse a cabo con extractos de muestras frescas fijados en portaobjetos de inmunofluorescencia. En los pocillos de los portaobjetos se depositan gotas de macerados sin diluir y con diluciones 1:10 y 1:100 en PBS, respectivamente. El anticuerpo monoclonal o policlonal se diluye en PBS a la concentración adecuada. También se diluye en PBS el conjugado de isotiocianato de fluoresceína (FITC, por sus siglas en inglés) adecuado: con anticuerpos caprinos antimurinos (GAM-FITC) en el caso de los anticuerpos monoclonales, y con anticuerpos caprinos anticonejo (GAR-FITC) o anticaprinos en el caso de los anticuerpos policlonales.

La prueba de una muestra es negativa si se observan células fluorescentes verdes con la morfología típica de *E. amylovora* en los controles positivos, pero no en los pocillos de la muestra. La prueba de una muestra es positiva si se observan células fluorescentes verdes con la morfología típica en los controles positivos y en los pocillos de la muestra, pero no en los controles negativos. Puesto que se considera que el límite de detección fidedigna mediante inmunofluorescencia es una población de 10^3 células/ml, en las muestras con $>10^3$ células/ml, la prueba de inmunofluorescencia se considera positiva. En el caso de las muestras con $<10^3$ células/ml o con células débilmente fluorescentes, el resultado de la prueba de inmunofluorescencia puede considerarse incierto.

En la prueba interlaboratorios de 2003 se determinó una precisión de la inmunofluorescencia de 0,70 para el anticuerpo monoclonal de Plant Print Diagnòstics SL[1] y de 0,72 para los anticuerpos policlonales de Loewe Biochemicals[1], lo cual confirma que la sensibilidad de la técnica es de aproximadamente 10^3 unidades formadoras de colonias (ufc)/ml.

3.1.4.4 Inmunoensayo de flujo lateral

Se comercializan dos dispositivos de flujo lateral para el análisis rápido de material vegetal: Ea AgriStrip (Bioreba[1]) y Pocket Diagnostics (Forsite Diagnostics[1]). En las pruebas interlaboratorios de 2009 y de 2010, realizadas siguiendo las instrucciones de los fabricantes, se determinaron precisiones de 0,66 y 0,55, respectivamente, para Ea AgriStrip[1] y de 0,64 y 0,56, respectivamente, para Pocket Diagnostics[1]. Estos fueron los resultados obtenidos para la detección de *E. amylovora* en muestras de 1 a 10^6 ufc/g, pero la precisión fue de aproximadamente 1,0 cuando se analizaron muestras con 10^5 a 10^6 ufc/g, número mínimo esperado en muestras sintomáticas (López *et al.*, 2010). Se recomienda usar estos kits solo con muestras sintomáticas.

3.1.5 Detección molecular

Varios laboratorios evaluaron minuciosamente, en una prueba interlaboratorios, distintos métodos de PCR y un protocolo de amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP, del inglés *loop-mediated isothermal amplification*)[2], disponibles para la detección de *E. amylovora* (López *et al.*, 2010; M. M. López, comunicación personal, 2012). Powney *et al*. (2011a) han evaluado la especificidad de algunos de estos métodos. Los métodos de PCR convencional pueden ser más costosos y consumir mucho tiempo, y suelen requerir más formación que los métodos serológicos. Por estas razones, y por el riesgo de contaminación, no siempre son adecuados para la realización de pruebas a gran escala. Sin embargo, la PCR en tiempo real, así como algunos protocolos de PCR convencional y de PCR anidada en un único tubo, han dado resultados de gran precisión y, por lo tanto, son métodos moleculares recomendados. Todos los ensayos de PCR deberían realizarse con ADN extraído de las muestras, debido a la gran cantidad de inhibidores de *E. amylovora* en los hospedantes, o a partir de muestras enriquecidas, en las que la detección es más fiable.

3.1.5.1 Controles para las pruebas moleculares

Para considerar fidedigno el resultado de las pruebas, en cada serie de aislamiento de ácido nucleico y de amplificación del ácido nucleico diana se deberían tener en cuenta los controles adecuados, que dependerán del tipo de prueba utilizada y del grado de certidumbre requerido. Para la PCR, deberían

[2] Cuando se usa de forma regular la amplificación de tipo LAMP en un área que cuenta con un sistema de patentes como el Japón (patentes 3 313 358, 3 974 441 y 4 139 424), los Estados Unidos (US6 410 278, US6 974 670 y US7 494 790), la Unión Europea (1 020 534, 1 873 260, 2 045 337 y 2 287 338), China (ZL008818262), la República de Corea (10-0612551), Australia (779160) y la Federación de Rusia (2 252 964), los usuarios deben obtener una licencia de Eiken Chemical Co., Ltd antes de usar el método, para proteger el derecho de propiedad intelectual.

utilizarse, como mínimo, un control positivo de ácido nucleico, un control interno y un control negativo de amplificación (control sin molde).

Control positivo de ácido nucleico

Este control se utiliza para monitorear la eficiencia del método de prueba (aparte de la extracción) y, específicamente, de la amplificación. Se podrá utilizar ácido nucleico previamente preparado (almacenado), el ADN genómico completo amplificado o un control sintético (p. ej., un producto de PCR clonado).

Control interno

Para las PCR convencional y en tiempo real, deberían incorporarse al protocolo controles internos de la planta, p. ej. un gen de mantenimiento, como el COX (Weller *et al.*, 2000) o ADNr (ribosómico) 16S (Weisberg *et al.*, 1991). Esto permite descartar la posibilidad de falsos negativos debidos a deficiencias en la extracción del ácido nucleico o a su degradación, o a la presencia de inhibidores de la PCR.

Control negativo de amplificación (control sin molde)

Este control es necesario para las PCR convencional y en tiempo real a fin de descartar falsos positivos por contaminación durante la preparación de la mezcla de reacción. En la fase de amplificación se añade el agua de calidad apta para PCR que se utilizó para preparar la mezcla de reacción.

Control positivo de extracción

Este control se utiliza para asegurar que el ácido nucleico diana se haya extraído en una cantidad y con una calidad suficientes, y que se detecte. El ácido nucleico se extrae de tejido infectado del hospedante o de tejido vegetal sano que ha sido inoculado con el ADN diana.

El control positivo debería ser aproximadamente una décima parte de la cantidad de tejido foliar utilizada por planta para la extracción de ADN.

Para la PCR, deben adoptarse precauciones para evitar la contaminación cruzada por aerosoles procedentes del control positivo o de las muestras positivas. De ser necesario, el control positivo empleado en el laboratorio debería secuenciarse a fin de que esta secuencia se pueda comparar fácilmente con la secuencia obtenida de los amplicones del tamaño correcto. Otra opción es elaborar controles positivos sintéticos que contengan una secuencia conocida que se pueda comparar con los amplicones del tamaño correcto.

Control negativo de extracción

Este control se utiliza para monitorear la contaminación durante la extracción del ácido nucleico o la reacción cruzada con el tejido hospedante. Consiste en ácido nucleico extraído de tejido no infectado del hospedante y posteriormente amplificado. Cuando se analicen muchas muestras positivas, se recomienda utilizar varios controles.

3.1.5.2 Extracción de ADN

En la prueba interlaboratorios de 2009 (Dreo *et al*., 2009) se evaluaron tres métodos de extracción de ADN -Llop *et al.* (1999), Taylor *et al.* (2001) y REDExtract-N-Amp Plant PCR Kit (Sigma-Aldrich[1])- con cuatro protocolos de PCR con precisiones de entre 0,67 y 0,76. En la prueba interlaboratorios de 2010 (López *et al.*, 2010), los diferentes métodos de PCR mostraron resultados comparables en cuanto a las precisiones obtenidas, como se indica a continuación. Sus eficiencias no mejoraron tras diluir los extractos en una proporción 1:10, lo que sugiere que la presencia de inhibidores era escasa o nula. A partir de estos resultados, se recomienda el método de extracción de Llop *et al.* (1999), ya que se ha sometido a pruebas minuciosas en varios países y es barato y fácil de aplicar en el laboratorio.

Extracción de ADN según Llop et al. (1999)

Se centrifuga, a 10 000 *g* durante 5 min a temperatura ambiente, 1 ml de una muestra macerada preparada según lo indicado en la Sección 3.1.2 y/o 1 ml de macerado enriquecido. El sobrenadante se desecha, y el sedimento se resuspende en 500 µl de tampón de extracción (24,2 g de tris-HCl, pH 7,5; 14,6 g de NaCl; 9,3 g de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA); 5 g de dodecilsulfato sódico (SDS); 20 g de polivinilpirrolidona (PVP-10) y 1 litro de agua destilada; esterilizado por filtración) y se incuba durante 1 h a temperatura ambiente antes de centrifugarlo a 4.000 *g* durante 5 min. Se mezclan aproximadamente 450 µl de sobrenadante con un volumen igual de isopropanol, se pone en posición invertida y se deja a temperatura ambiente entre 30 min y 1 h. El ácido nucleico precipitado se centrifuga a 10.000 *g* durante 5 min, el sobrenadante se desecha y el sedimento se seca con aire. Si aún queda un precipitado coloreado (pardo o verde) en el fondo del tubo, se retira con cuidado al tiempo que se desecha el sobrenadante, y se obtiene así un sedimento de ADN más limpio. El sedimento se resuspende en 200 µl de agua. Debería usarse para la PCR inmediatamente o almacenarse a –20 ºC.

3.1.5.3 Amplificación de ADN mediante PCR

Hay muchos protocolos y cebadores de PCR descritos para la detección de *E. amylovora* y algunos han dado problemas de especificidad (Roselló *et al.*, 2006; Powney *et al.*, 2011a). Los cebadores y protocolos validados en pruebas interlaboratorios fueron los de Bereswill *et al.* (1992) y Llop *et al.* (2000), con o sin enriquecimiento previo, en 2003, y los de Taylor *et al.* (2001), Stöger *et al.* (2006) y Obradovic *et al.* (2007) en 2009 y 2010. El descubrimiento de cepas de *E. amylovora* totalmente

virulentas sin el plásmido pEA29 (Llop *et al.*, 2006) y las experiencias de distintos países (Powney *et al.*, 2011a) indican que deberían usarse dos protocolos de PCR: uno con cebadores basados en secuencias de pEA29, y otro con cebadores que actúen sobre secuencias cromosómicas únicas. Si el resultado de la PCR es negativo con el protocolo basado en los cebadores de pEA29 y positivo con el basado en cebadores cromosómicos, puede considerarse que la prueba dio resultado positivo para *E. amylovora*. La PCR puede llevarse a cabo usando los cebadores y condiciones validados en las pruebas interlaboratorios, aunque las condiciones de amplificación deberían optimizarse para diferentes termocicladores.

PCR según Bereswill et al. (1992)

Los cebadores son:

A (directo): 5′-CGG TTT TTA ACG CTG GG-3′

B (inverso): 5′-GGG CAA ATA CTC GGA TT-3′

Las secuencias diana están en el plásmido pEA29. La mezcla de la PCR está compuesta por 17,4 µl de agua ultrapura, 2,5 µl de tampón 10×, 1,5 µl de $MgCl_2$ 50 mM, 0,5 µl de desoxinucleótidos trifosfato (dNTP) 10 mM, 0,25 µl del cebador A 10 pmol/µl, 0,25 µl del cebador B 10 pmol/µl y 0,1 µl de ADN polimerasa de Taq 5 U/µl. El volumen de muestra de ADN extraído es de 2,5 µl, y debería añadirse a 22,5 µl de la mezcla de la PCR. Los parámetros de ciclado son los siguientes: una fase de desnaturalización de 5 min a 93 ºC seguida de 40 ciclos de 30 s a 93 ºC, 30 s a 52 ºC y 1 min 15 s a 72 ºC, con una fase de extensión final de 10 min a 72 ºC. El tamaño del amplicón es de 900 pares de bases (pb), según Bereswill *et al*. (1992), aunque el tamaño puede variar entre 900 y 1 100 pb dependiendo del número de repeticiones de 8 pb en el fragmento amplificado (Jones y Geider, 2001).

En la prueba interlaboratorios de 2003 la precisión fue de 0,51 pero aumentó hasta 0,74 y 0,78 tras el enriquecimiento de las muestras en los medios B de King y CCT, respectivamente (López *et al.*, 2006).

PCR según Taylor et al. (2001)

Los cebadores son:

G1-F: 5′-CCT GCA TAA ATC ACC GCT GAC AGC TCA ATG-3′

G2-R: 5′-GCT ACC ACT GAT CGC TCG AAT CAA ATC GGC-3′

Las secuencias diana son cromosómicas. La mezcla de la PCR está compuesta por 14,3 µl de agua ultrapura, 2,5 µl de tampón 10×, 0,75 µl de $MgCl_2$ 50 mM, 0,25 µl de dNTP 10 mM, 1 µl de G1-F 10 pmol/µl, 1 µl de G2-R 10 pmol/µl y 0,2 µl de ADN polimerasa de Taq 5 U/µl. Se añade una muestra de 5 µl del ADN extraído a 45 µl de la mezcla de la PCR. Los parámetros de ciclado son los siguientes: 3 min a 95 ºC seguidos de 40 ciclos de 30 s a 94 ºC, 30 s a 60 ºC y 1 min a 72 ºC, con una

fase de extensión final de 5 min a 72 ºC y enfriamiento a 15 ºC. El tamaño esperado del amplicón es de 187 pb.

En la prueba interlaboratorios de 2010, con el procedimiento de extracción de ADN de Llop *et al.* (1999) la precisión fue de 0,77.

PCR según Stöger et al. (2006)

Los cebadores (de Llop *et al*., 2000) son:

PEANT1-F: 5′-TAT CCC TAA AAA CCT CAG TGC-3′

PEANT2-R: 5′-GCA ACC TTG TGC CCT TTA-3′

Las secuencias diana están en el plásmido pEA29. Stöger *et al.* (2006) recomendaron usar este método con ADN extraído con el REDExtract-N-Amp Plant PCR Kit (Sigma-Aldrich[1]). La mezcla de la PCR está compuesta por 5 µl de agua ultrapura, 10 µl de REDExtract-N-Amp PCR ReadyMix (Sigma-Aldrich[1]), 0,5 µl de PEANT1-F 10 pmol/µl, 0,5 µl de PEANT2-R 10 pmol/µl y 4 µl del ADN extraído. Los parámetros de ciclado son los siguientes: 5 min a 95 °C seguidos de 35 ciclos de 15 s a 95 °C, 30 s a 58 °C y 45 s a 72 °C, con una fase de extensión final de 5 min a 72 °C y enfriamiento a 15 °C. El tamaño esperado del amplicón es de 391 pb.

La precisión fue de 0,76 en la prueba interlaboratorios del 2009 y de 0,72 en la de 2010 con el kit de extracción de ADN recomendado.

PCR según Gottsberger (2010), adaptado de Obradovic et al. (2007)

Los cebadores son:

FER1-F: 5′-AGC AGC AAT TAA TGG CAA GTA TAG TCA-3′

rgER2-R: 5′-AAA AGA GAC ATC TGG ATT CAG ACA AT-3′

Las secuencias diana son cromosómicas. La mezcla de la PCR está compuesta por 14,3 µl de agua ultrapura, 2,5 µl de tampón 10×, 0,75 µl de $MgCl_2$ 50 mM, 0,25 µl de dNTP 10 mM, 1 µl de FER1-F 10 pmol/µl, 1 µl de rgER2-R 10 pmol/µl, 0,2 µl de ADN polimerasa de Taq 5 U/µl y 5 µl del ADN extraído. Los parámetros de ciclado son los siguientes: 3 min a 94 ºC seguidos de 41 ciclos de 10 s a 94 ºC, 10 s a 60 ºC y 30 s a 72 ºC, con una fase de extensión final de 5 min a 72 ºC y enfriamiento a 15 ºC. El tamaño esperado del amplicón es de 458 pb.

La precisión fue de 0,76 en la prueba interlaboratorios de 2009 y de 0,68 en la prueba interlaboratorios de 2010 con el método de extracción de ADN descrito por Llop *et al.* (1999).

PCR anidada según Llop et al. (2000)

En la PCR anidada de Llop *et al*. (2000) se usan dos pares de cebadores, que se combinan en un solo tubo de reacción. Como las temperaturas de hibridación de los cebadores son diferentes, las dos PCR se realizan consecutivamente. Los cebadores externos son los diseñados por McManus y Jones (1995) y se basan en secuencias del plásmido pEA29. Los cebadores internos son los descritos por Llop *et al*. (2000).

Los cebadores externos son:

AJ75-F: 5′-CGT ATT CAC GGC TTC GCA GAT-3′

AJ76-R: 5′-ACC CGC CAG GAT AGT CGC ATA-3′

Los cebadores internos son:

PEANT1-F: 5′-TAT CCC TAA AAA CCT CAG TGC-3′

PEANT2-R: 5′-GCA ACC TTG TGC CCT TTA-3′

La mezcla de la PCR está compuesta por 36,25 µl de agua ultrapura, 5 µl de tampón 10×, 3 µl de $MgCl_2$ 50 mM, 0,5 µl de dNTP 10 mM, 0,32 µl de AJ75-F 0,1 pmol/µl, 0,32 µl de AJ76-R 0,1 pmol/µl, 1 µl de PEANT1-F 10 pmol/µl, 1 µl de PEANT2-R 10 pmol/µl y 0,6 µl de ADN polimerasa de Taq 5 U/µl. Deberían añadirse 2 µl de la muestra de ADN a 48 µl de la mezcla de la PCR. Los parámetros de ciclado son los siguientes: una fase de desnaturalización de 4 min a 94 ºC seguida de 25 ciclos de 60 s a 94 ºC y 90 s a 72 ºC. Tras esta primera ronda de PCR, se realiza, en el mismo termociclador, una segunda fase de desnaturalización de 4 min a 94 ºC y 40 ciclos de 60 s a 94 ºC, 60 s a 56 ºC y 60 s a 72 ºC con una fase de extensión final de 10 min a 72 ºC. El tamaño esperado del amplicón es de 391 pb, aunque pueden darse variaciones en el tamaño.

En las pruebas interlaboratorios, la precisión fue de 0,69 y 0,72 en 2003 y 2010, respectivamente, pero aumentó, tras el enriquecimiento, a 0,84 en medio B de King y a 0,86 en medio CCT en la prueba de 2003, y a 0,79 (B de King) y 0,88 (CCT) en la de 2010.

3.1.5.4 Consideraciones generales relativas a la PCR

Podrá ser necesario modificar (optimizar) los protocolos de PCR cuando se usen reactivos o termocicladores diferentes.

Tras la amplificación mediante PCR la presencia de *E. amylovora* puede confirmarse secuenciando los productos de la PCR o mediante el análisis del polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP, por sus siglas en inglés). El patrón de restricción observado en los amplicones obtenidos con los cebadores de Bereswill *et al.* (1992) o con la PCR anidada de Llop *et al.* (2000) puede usarse para confirmar la especificidad del análisis mediante PCR comparándolo con el patrón

de restricción de una cepa de control conocida. La digestión de restricción debería realizarse con las endonucleasas DraI y SmaI.

El resultado de la prueba realizada con una muestra es negativo si no se detecta el amplicón específico de *E. amylovora* del tamaño esperado (ni el patrón tras tratamiento con la enzima de restricción o la secuencia del amplicón, cuando proceda) en la muestra en cuestión, pero sí en todos los controles positivos. El resultado de la prueba realizada con una muestra es positivo si se detecta el amplicón específico de *E. amylovora* del tamaño esperado, siempre que no haya amplificación en ninguno de los controles negativos y el patrón tras tratamiento con la enzima de restricción o la secuencia del amplicón (cuando proceda) sean indicativos de *E. amylovora*.

3.1.5.5 PCR en tiempo real

A partir de una evaluación de protocolos de PCR en tiempo real realizada en pruebas interlaboratorios en 2009 y 2010 (Dreo *et al.*, 2009; López *et al.*, 2010), se recomendó el protocolo descrito por Pirc *et al.* (2009), en el que se amplifican secuencias cromosómicas. También se dispone de una PCR en tiempo real dúplex basada en secuencias cromosómicas, pero no se ha analizado en pruebas interlaboratorios (Lehman *et al.*, 2008).

PCR en tiempo real según Pirc* et al. *(2009)

Se usan los siguientes oligonucleótidos:

Cebador Ams116F: 5′-TCC CAC ATA CTG TGA ATC ATC CA-3′

Cebador Ams189R: 5′-GGG TAT TTG CGC TAA TTT TAT TCG-3′

Sonda Ams141T: FAM-CCA GAA TCT GGC CCG CGT ATA CCG-TAMRA

La reacción se produce en un volumen final de 25 µl. La mezcla de la PCR está compuesta por 2,5 µl de agua ultrapura, 12,5 µl de TaqMan Fast Universal PCR Master Mix 2× (Applied Biosystems[1]), 2,25 µl de Ams116F 10 pmol/µl, 2,25 µl de Ams189R de 10 pmol/µl y 0,5 µl de Ams141T marcado con FAM de 10 pmol/µl. A estos 20 µl de mezcla de la PCR se añaden 5 µl de extracto de ADN. Los parámetros de ciclado son los siguientes: 2 min a 50 ºC, 10 min a 95 ºC y 40 ciclos de 15 s a 95 ºC y 1 min a 60 ºC. En modo estándar, las rampas de incremento y decremento de la temperatura de los analizadores 7900HT y 7900HT Fast (Applied Biosystems[1]) son 1,6 ºC/s (ascendente) y 1,6 ºC/s (descendente). Las reacciones pueden realizarse con rampas de variación de la temperatura menores, pero con rampas más altas (de aproximadamente 3,5 ºC/s, en ascenso y descenso) los resultados no fueron aceptables. El tamaño esperado del amplicón es de 74 pb.

Para el análisis de los resultados de la PCR en tiempo real, suele haber distintas opciones, automáticas o manuales, para configurar los límites de señal y de ruido. Deberían seguirse las instrucciones del programa informático pertinente. La línea de referencia debería fijarse automáticamente y el umbral

debería fijarse manualmente de manera que intercepte la fase exponencial de las curvas de amplificación de los controles.

En la prueba interlaboratorios de 2010, la precisión fue de 0,80, 0,85 y 0,76 con el método de extracción de ADN descrito por Llop *et al.* (1999), el kit REDExtract-N-Amp Plant PCR (Sigma-Aldrich[1]) y el método de Taylor *et al.* (2001), respectivamente.

PCR en tiempo real según Gottsberger (2010)

Se usan los siguientes oligonucleótidos para la amplificación del cromosoma de *E. amylovora*:

Cebador hpEaF: 5′-CCG TGG AGA CCG ATC TTT TA-3′

Cebador hpEaR: 5′-AAG TTT CTC CGC CCT ACG AT-3′

Sonda hpEaP: FAM-TCG TCG AAT GCT GCC TCT CT-MGB

La reacción se produce en un volumen final de 20 µl. La mezcla de la PCR está compuesta por 6 µl de agua ultrapura, 10 µl de TaqMan Fast Universal PCR Master Mix 2× (Applied Biosystems[1]), 1 µl de hpEaF 10 pmol/µl, 1 µl de hpEaR 10 pmol/µl y 1 µl de hpEaP 1 pmol/µl. A estos 19 µl de mezcla de la PCR se añade 1 µl de extracto de ADN. Los parámetros de ciclado son los siguientes: 2 min a 50 °C, 10 min a 95 °C y 50 ciclos de 15 s a 95 °C y 1 min a 60°C. El tamaño esperado del amplicón es de 138 pb.

Para el análisis de los resultados de la PCR en tiempo real, suele haber distintas opciones, automáticas o manuales, para configurar los límites de señal y de ruido. Deberían seguirse las instrucciones del programa informático pertinente. La línea de referencia debería fijarse automáticamente y el umbral debería fijarse manualmente de manera que intercepte la fase exponencial de las curvas de amplificación de los controles.

En la prueba interlaboratorios de 2010 no se pudo analizar la precisión de esta PCR en tiempo real; sin embargo, en un laboratorio se realizó en paralelo a la PCR en tiempo real de Pirc *et al.* (2009) y se obtuvieron los mismos resultados cualitativos que con la extracción de ADN de Llop *et al.* (1999).

3.1.5.6 Interpretación de los resultados de la PCR

PCR convencional

La PCR específica del patógeno solo se considerará válida si:

1) el control positivo produce un amplicón del tamaño correcto para la bacteria
2) no se producen amplicones del tamaño correcto para la bacteria en el control negativo de extracción ni en el control negativo de amplificación.

Si también se usan los cebadores ADNr 16S de control interno, el control negativo (tejido vegetal sano), si se utiliza, el control positivo y todas las muestras de la prueba deben producir un amplicón de 1,6 kilobases (kb) (ADNr 16S). Téngase en cuenta que si se utilizan controles positivos sintéticos o plásmidos no se producirá un amplicón de 1,6 kb. La falta de amplificación de las muestras con los cebadores de control interno puede indicar, por ejemplo, que la extracción del ADN ha sido deficiente, que no se ha incluido el ácido nucleico en la mezcla de la reacción, que el extracto de ADN contiene compuestos inhibidores de la PCR o que el ADN se ha degradado.

La prueba de una muestra se considerará positiva si se produce un amplicón del tamaño correcto.

PCR en tiempo real

La PCR en tiempo real solo se considerará válida si:

1) el control positivo produce una curva de amplificación con los cebadores específicos del patógeno
2) no se produce ninguna curva de amplificación (esto es, el valor de ciclo umbral [Ct] es 40) en el control negativo de extracción ni en el control negativo de amplificación.

Si también se usan cebadores COX de control interno, el control negativo, si se utiliza, el control positivo y todas las muestras de la prueba deben producir una curva de amplificación. Si las muestras no producen una curva de amplificación con los cebadores de control interno, la causa puede ser, por ejemplo, que la extracción de ADN ha sido deficiente, que no se ha incluido el ácido nucleico en la mezcla de la reacción, que hay presencia de compuestos inhibidores de la PCR en el extracto de ADN o que el ADN se ha degradado.

La prueba de una muestra se considerará positiva si produce una curva de amplificación típica, de tipo exponencial. Cada laboratorio tiene que comprobar el valor de ciclo umbral (Ct) cuando realice la prueba por primera vez.

3.1.5.7 Amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP)

El protocolo de la técnica LAMP fue desarrollado y descrito por Temple *et al.* (2008) y Temple y Johnson (2011). Se evaluó en la prueba interlaboratorios de 2010 porque se consideró adecuado para laboratorios no equipados para la PCR y porque es fácil de aplicar. En la prueba interlaboratorios se determinó que el protocolo de la técnica LAMP con cebadores para detectar el gen cromosómico *amsL* de *E. amylovora* no ofrecía una sensibilidad suficiente para el análisis de muestras con una población reducida de bacterias. Por lo tanto, el protocolo de LAMP descrito a continuación para detectar *amsL* cromosómico solo se recomienda para el análisis de muestras sintomáticas con más de 10^5–10^6 ufc/ml. El protocolo de Temple y Johnson (2011) con cebadores para detectar pEA29 no se evaluó en la prueba interlaboratorios.

Los cebadores de LAMP para detectar *amsL* B son:

ALB Fip: 5′-CTG CCT GAG TAC GCA GCT GAT TGC ACG TTT TAC AGC TCG CT-3′

ALB Bip: 5′-TCG TCG GTA AAG TGA TGG GTG CCC AGC TTA AGG GGC TGA AG-3′

ALB F: 5′-GCC CAC ATT CGA ATT TGA CC-3′

ALB B: 5′-CGG TTA ATC ACC GGT GTC A-3′

Los cebadores Fip y Bip se utilizaron a concentraciones finales de 2,4 µM, y los cebadores F y B, a concentración final de 0,2 µM. Las temperaturas de fusión de los cebadores estuvieron entre 58 y 60 °C. Los componentes de la mezcla de reacción de la LAMP son los siguientes: 5 µl de tampón ThermoPol 10× (New England Biolabs[1]), 5 µl de dNTP 10 mM, 2 µl de $MgSO_4$ 100 mM, 2 µl de albúmina de suero bovino (BSA, por sus siglas en inglés) de 10 mg/ml, 1,2 µl de ALB Fip 100 µM, 1,2 µl de ALB Bip 100 µM, 1 µl de ALB F 10 µM, 1 µl de ALB B 10 µM, 2 µl de ADN polimerasa de *Bst* de 8 U/µl, 5 µl de ADN molde y 24,6 µl de agua ultrapura. Téngase en cuenta que la ADN polimerasa de *Bst*, el ADN molde y el agua ultrapura no se añaden a la mezcla maestra, sino que se agregan por separado tras distribuirse esta en partes alícuotas. Antes de iniciar la reacción de la LAMP, se prepara un baño María a 65 °C o se fija esta temperatura en un termociclador. Se prepara la mezcla y se transfieren con una pipeta 18,4 µl a cada uno de los tubos de PCR de 0,2 ml. A continuación, se transfieren con una pipeta, por separado, a cada uno de los tubos que contienen mezcla maestra, la ADN polimerasa de *Bst*, el ADN molde y el agua ultrapura. Los tubos se centrifugan a 1 000 r.p.m. durante 30 s en una centrífuga de placas y se ponen en el baño María (a 65 ºC), en una gradilla, de manera que el fondo de los tubos de reacción se mantenga sumergido, o en el termociclador (a 65 °C) durante 55 min. Los tubos se retiran y se dejan enfriar durante 10 s.

La prueba realizada con una muestra es positiva si se observa un precipitado blanco de pirofosfato de magnesio, ya sea disperso en todo el tubo, confiriéndole turbidez, o como precipitado sólido en el fondo (al igual que en el control positivo). Si la solución es trasparente, el resultado de la prueba es negativo (la misma apariencia debería observarse en el control negativo).

En la prueba interlaboratorios de 2010, la precisión fue de 0,64, pero de 0,80 para muestras con 10^5–10^6 ufc/ml. Por esta razón, la técnica LAMP solo se recomienda para el análisis de muestras sintomáticas.

3.2 Detección en plantas asintomáticas

Las pruebas de detección recomendadas se indican en el diagrama de flujo de la Figura 2.

3.2.1 Muestreo y preparación de las muestras

Las muestras asintomáticas se pueden procesar de manera individual (preferentemente) o en grupos de hasta 100 (EPPO, 2013). Deberían adoptarse precauciones a fin de evitar la contaminación cruzada al tomarse las muestras y durante el proceso de extracción. El muestreo y la preparación de las muestras se pueden llevar a cabo aplicando uno de los siguientes protocolos:

- Se toman flores, brotes, frutos pequeños o segmentos de tallo en bolsas o recipientes estériles en verano o a principios del otoño, después de que se hayan dado condiciones favorables para la multiplicación de *E. amylovora* y cuando las temperaturas medias asciendan por encima de unos 15 ºC (Van der Zwet y Beer, 1995). Se cortan de la planta sospechosa brotes jóvenes de unos 20 cm de longitud, o flores, si las hay. Si fuera necesario hacer los análisis en invierno, se toman entre cinco y diez yemas por planta. En el laboratorio, se cortan de las plantas seleccionadas las flores, si las hay, el pedúnculo y la base del limbo de varias hojas de la porción basal de los brotes, o bien segmentos de los tallos. Se pesan aproximadamente 0,1–1,0 g de material vegetal y se maceran en tampón antioxidante aplicando el protocolo descrito en la Sección 3.1.2.
- Un procedimiento de muestreo para el análisis de ramillas de material leñoso asintomático de viveros, del que se ha informado pero que no ha sido validado, es el siguiente. Una muestra está formada por 100 ramillas, de unos 10 cm de longitud cada una, tomadas de 100 plantas. Si el lote contiene plantas de diferentes géneros, deberían estar representados por igual en la muestra (con un máximo de tres géneros por muestra). Se toman de cada muestra 30 ramillas al azar y cada una se corta en cuatro trozos (de modo que se obtienen 120 trozos de tallo). Las muestras se cubren con PBS estéril con un 0,1 % de Tween 20 en matraces Erlenmeyer, y estos se agitan bien durante 1,5 h a temperatura ambiente en un agitador giratorio. El extracto se filtra con papel de filtro colocado en un filtro de cristal sinterizado con una bomba de vacío y se colecta el filtrado. Este se usa directamente para el análisis o se centrifuga a 10.000 *g* durante 20 min. El sedimento se suspende en 4,5 ml de PBS estéril. Se aplican las técnicas de detección indicadas a continuación. Puede aplicarse un protocolo similar para las hojas, los brotes, las flores y las yemas.

La recuperación esperada de *E. amylovora* dependerá del momento del muestreo; es máxima en verano (siempre que las condiciones meteorológicas sean favorables para *E. amylovora*) y menor en invierno. Las muestras deberían procesarse de inmediato realizando un enriquecimiento y aplicando a continuación las técnicas de DASI-ELISA, PCR y aislamiento conforme a los respectivos protocolos descritos para las muestras sintomáticas en López *et al.* (2006). La técnica de inmunofluorescencia es optativa; en caso de aplicarse, debe hacerse directamente sobre los extractos, antes del enriquecimiento.

3.2.2 Pruebas de detección

El análisis directo de muestras asintomáticas normalmente es negativo para *E. amylovora* debido a la baja población bacteriana. Por lo tanto, cuando se analice material asintomático es absolutamente necesario realizar un enriquecimiento a partir de las muestras preparadas en el tampón antioxidante (Sección 3.2.1) (Gorris *et al.*, 1996) durante 72 h a aproximadamente 25 ºC. Se recomienda llevar a cabo al menos dos de las siguientes pruebas de detección basadas en principios biológicos diferentes:

- Enriquecimiento-aislamiento. Aplíquese el procedimiento descrito para las muestras sintomáticas (Sección 3.1.3.2).
- Enriquecimiento-DASI-ELISA. Aplíquese el procedimiento descrito para las muestras sintomáticas (Sección 3.1.4.1).
- Enriquecimiento-PCR o enriquecimiento-PCR en tiempo real. Tómense 500–1000 µl de las muestras enriquecidas en medio B de King y/o CCT para la extracción de ADN y aplíquese el procedimiento de amplificación descrito por Taylor *et al.* (2001) o Llop *et al.* (2000) (Sección 3.1.5.3) o los protocolos de PCR en tiempo real (Sección 3.1.5.5).

Si alguna de las pruebas de detección da resultado positivo, pero el aislamiento es negativo, se debería intentar aislar el patógeno a partir del extracto almacenado con glicerol a –80 ºC o a partir de las muestras enriquecidas. Cuando tres o más pruebas dan resultado positivo y el aislamiento es negativo, es razonable tener sospechas firmes de la presencia de *E. amylovora* en la muestra, pero para la identificación y confirmación es necesario aislar el patógeno a partir de muestras nuevas e identificar la bacteria.

4. Identificación

La identificación debería basarse en los resultados obtenidos con varias técnicas porque otras especies de *Erwinia*, como *E. piriflorinigrans* (López et al., 2011), *E. pyrifoliae* (Kim *et al.*, 1999; Rhim *et al.*, 1999), *E. uzenensis* (Matsuura *et al.*, 2012) y otras *Erwinia* spp. (Kim *et al.*, 2001a, 2001b; Palacio-Bielsa *et al.*, 2012) presentan características morfológicas, serológicas y moleculares similares a las de *E. amylovora*. *E. amylovora* se puede diferenciar de estas especies de *Erwinia* muy cercanas (que pueden estar presentes en tejidos con síntomas similares en algunos hospedantes) mediante una combinación de tres técnicas basadas en principios biológicos diferentes:

- PCR basada en ADN cromosómico (Secciones 3.1.5.2 y 4.3.1)
- DASI-ELISA con anticuerpos monoclonales específicos según se ha descrito para la detección (Sección 3.1.4.1, excluida la fase de enriquecimiento)
- inoculación en hospedantes de fuego bacteriano para cumplir los postulados de Koch, incluido el reaislamiento del patógeno inoculado (Sección 4.4).

Para la identificación de colonias, se recomienda el uso de al menos dos de estas tres técnicas. Según la experiencia del laboratorio, también se pueden usar otras pruebas, que se describen a continuación. Cuando sea necesario, la confirmación final de la identificación de un cultivo debería incluir una prueba de patogenicidad.

Se recomienda usar como controles positivos las cepas NCPPB 683 y CFBP 1430 de *E. amylovora*. Se pueden obtener diferentes cepas de referencia de *E. amylovora* de las siguientes colecciones, entre otras: National Collection of Plant Pathogenic Bacteria (NCPPB), Fera, York (Reino Unido); Collection Française de Bactéries Phytopathogènes (CFBP), Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), Station Phytobactériologie, Angers (Francia); Belgian Co-ordinated Collection of Micro-organisms BCCM/LMG Bacteria Collection, Ghent (Bélgica); International Collection of Microorganisms from Plants (ICMP), Manaaki Whenua Landcare Research, Auckland (Nueva Zelandia) y American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA (Estados Unidos). Solo se puede garantizar la autenticidad de las cepas si se han obtenido directamente de las colecciones de cultivos.

4.1 Identificación nutricional y enzimática

Ciertas pruebas fenotípicas clave son útiles y siguen usándose para la identificación, pero se aconseja combinarlas con análisis de patogenicidad y una prueba serológica o molecular. Los miembros del género *Erwinia* se definen como gramnegativos, anaerobios facultativos, con movilidad mediante flagelos perítricos, baciliformes y capaces de producir ácido a partir de glucosa, fructosa, galactosa y sacarosa. Las propiedades fenotípicas clave (Paulin, 2000) que son comunes a la mayoría de las cepas de *E. amylovora*, según los métodos de Jones y Geider (2001) son los siguientes: prueba de oxidasa (–), prueba de metabolismo oxidativo/fermentativo (O/F) (+/+), producción de pigmento fluorescente en medio B de King bajo luz UV (–), producción de levano (+), reducción de nitratos (–), utilización de citratos (+), licuefacción de la gelatina (+), producción de ureasa e indol (–) y morfología de la colonia en medio CCT.

Las siguientes pruebas diferencian *E. amylovora* de *E. pyrifoliae* y de *E. piriflorinigrans*, aunque algunas cepas podrán presentar otras características fisiológicas y bioquímicas (Cuadro 1).

Cuadro 1. Diferencias entre *Erwinia amylovora*, *Erwinia pyrifoliae* y *Erwinia piriflorinigrans*

Prueba microbiológica	*Erwinia amylovora*	*Erwinia pyrifoliae*	*Erwinia piriflorinigrans*
Hidrólisis de gelatina	+	–	–
Inositol†	–	N. D.	+
Sorbitol†	+	+	–
Esculina†	V	–	+
Melibiosa†	–	–	+
D-rafinosa†	–	–	+
β-genciobiosa†	+	–	+
Amplificación con‡ EP16A/EPI62C CPS1/CPS2C	–	+	N. D.

† De Roselló *et al.* (2006) y López *et al.* (2011). Oxidación de sustratos en tiras API 50 CH (bioMérieux) usando el método descrito por López *et al.* (2011). Más del 90 % de las cepas dan los resultados indicados.

‡ Según Kim *et al.* (2001b).

N. D.: no determinado; V: variable.

4.1.1 Caracterización bioquímica

4.1.1.1 Perfil nutricional y enzimático

La identificación de *E. amylovora* se puede lograr bioquímicamente mediante la obtención del perfil en las tiras 20 E y 50 CH del sistema API (bioMérieux[1]).

API 20 E[1]. Para preparar la suspensión e inocular la tira se deberían seguir las instrucciones del fabricante. La tira se incuba a 25–26 ºC. Transcurridas 48 h, la lectura de un cultivo típico de *E. amylovora* debería ser la siguiente: negativo en las pruebas de lisina descarboxilasa (LDC), ornitina descarboxilasa (ODC), utilización de citratos (CIT), producción de H_2S (SH_2), ureasa (URE), triptófano desaminasa (TDA), producción de indol (IND) y oxidación de ramnosa (RHA), y positivo en la oxidación de sacarosa (SAC). Otras pruebas pueden variar en función de la cepa, según Donat *et al.* (2007).

API 50 CH[1]. Se prepara una suspensión en PBS de DO 1,0 (a una longitud de onda de 600 nm). Se añade un mililitro de la suspensión a 20 ml de medio Ayers (1 g de $NH_4H_2PO_4$, 0,2 g de KCl, 0,2 g de $MgSO_4$, 75 ml de azul de bromotimol 0,2 % y 1 litro de agua destilada, pH 7; esterilizado a 120 ºC durante 20 min) (Ayers *et al.*, 1919). Para inocular la tira se deberían seguir las instrucciones del fabricante. La tira se incuba a 25–26 ºC en condiciones aeróbicas. La utilización de los diferentes

hidratos de carbono se observa por el desarrollo de color amarillo en el pocillo. Transcurridas 72 h, la lectura de un cultivo típico de *E. amylovora* debería ser la siguiente: positiva para L-arabinosa, ribosa, D-glucosa, D-fructosa, manitol, sorbitol, N-acetilglucosamina, sacarosa, trehalosa y β-genciobiosa. *E. amylovora* no utiliza el resto de los azúcares en estas condiciones, pero algunas cepas pueden utilizar el glicerol y la D-fucosa, según Donat *et al.* (2007).

4.1.1.2 Identificación automatizada

Está disponible comercialmente un sistema de identificación automatizada basado en los resultados diferenciales de 94 pruebas fenotípicas en una placa de microvaloración junto con un programa informático de análisis (OmniLog[1], Biolog[1]). Para la identificación de presuntos aislamientos de *E. amylovora*, se deberían seguir las instrucciones del fabricante.

4.1.1.3 Perfil de ácidos grasos

Para determinar el perfil de ácidos grasos (FAP, por sus siglas en inglés), se cultivan colonias positivas para levano y no fluorescentes en agar soja con triptona —disponible comercialmente— a 28 ºC durante 48 h (Sasser, 1990). Se aplica un procedimiento adecuado de extracción de ácidos grasos y el extracto se analiza con el Sherlock Microbial Identification System (MIS) (MIDI[1]) —disponible comercialmente— u otro programa informático apropiado para la identificación presuntiva de *E. amylovora*, según Wells *et al.* (1994).

4.2 Identificación serológica

4.2.1 Aglutinación

Las colonias sospechosas de *E. amylovora* se pueden identificar presuntivamente mediante aglutinación en portaobjetos. Se mezcla una suspensión densa de células con una gota de PBS y una gota de antisuero específico contra *E. amylovora* (sin diluir o en una dilución de solo 1:5 a 1:10) sobre un portaobjetos. Se pueden usar anticuerpos monoclonales siempre que aglutinen las cepas de referencia. La especificidad de los anticuerpos debe establecerse previamente.

4.2.2 Inmunofluorescencia

Se prepara una suspensión de aproximadamente 10^6 células/ml en PBS con colonias positivas en levano y no fluorescentes, y se sigue el procedimiento de inmunofluorescencia descrito en la Sección 3.1.4.3. La especificidad de los anticuerpos debe establecerse previamente.

4.2.3 ELISA

La identificación de aislamientos se puede realizar mediante inmunoimpresión directa-ELISA (Sección 3.1.4.2), DASI-ELISA (Sección 3.1.4.1) y ELISA indirecto (descrito a continuación) con anticuerpos monoclonales específicos, como se describió para la detección. Se ha validado en dos

pruebas interlaboratorios una mezcla de anticuerpos monoclonales para el DASI-ELISA. Se prepara, a partir de colonias sospechosas, una suspensión en PBS de aproximadamente 10^8 células/ml. Puede usarse el procedimiento del DASI-ELISA descrito en la Sección 3.1.4.1, pero sin la fase de enriquecimiento.

ELISA indirecto

Los cultivos puros de los aislamientos sospechosos se calientan a 100 ºC durante 10 min, al baño María o en un termobloque, para reducir las reacciones inespecíficas con los anticuerpos monoclonales comerciales. Se mezclan alícuotas de 200 µl de cultivo con volúmenes iguales de tampón de carbonato (1,59 g de Na_2CO_3, 2,93 g de $NaHCO_3$ y 1 litro de agua destilada, pH 9,6) y esta solución se deposita en al menos dos pocillos de una placa de microvaloración. La placa se incuba a 37 ºC durante 1 h o a 4 ºC durante la noche. Los extractos se retiran de los pocillos y la placa se lava tres veces con tampón de lavado (véase el protocolo del DASI-ELISA). Se preparan los anticuerpos comerciales específicos contra *E. amylovora* de Plant Print Diagnòstics SL[1] a las diluciones recomendadas. En cada pocillo se añaden 200 µl de la solución diluida de anticuerpos contra *E. amylovora* y la placa se incuba a 37 ºC durante 1 h. La solución de anticuerpos se retira de los pocillos y estos se lavan de la forma indicada más arriba. Se prepara la dilución apropiada del conjugado de anticuerpo secundario-fosfatasa alcalina (GAM-AP, por sus siglas en inglés) en PBS con un 0,5 % de BSA. Se añaden a cada pocillo 200 µl del anticuerpo conjugado diluido y la placa se incuba a 37 ºC durante 1 h. El anticuerpo conjugado se retira de los pocillos y estos se vuelven a lavar como antes. Se prepara un sustrato de 1 mg/ml de fosfatasa alcalina (p-nitrofenil-fosfato) en tampón de sustrato (97 ml de dietanolamina y 800 ml de agua destilada; el pH se ajusta a 9,8 con HCl concentrado y después se ajusta el volumen a 1000 ml con agua destilada). Se añaden a cada pocillo 200 µl de solución de sustrato de fosfatasa alcalina. La placa se incuba en la oscuridad a temperatura ambiente y se lee a 405 nm a intervalos regulares en un plazo de 90 min. La prueba es positiva si el sustrato adquiere color amarillo.

4.2.4 Inmunoensayo de flujo lateral

Se prepara una suspensión de 10^7 ufc/ml del cultivo puro para la identificación presuntiva. Se usan los tampones y los procedimientos suministrados por los fabricantes de los kits, como se describe en la Sección 3.1.4.4.

4.3 Identificación molecular

4.3.1 PCR

Se prepara una suspensión de aproximadamente 10^6 células/ml en agua de grado molecular estéril a partir de colonias purificadas positivas en levano y no fluorescentes, y se calienta a 100 ºC durante

10 min. Se aplican los procedimientos apropiados de PCR o el protocolo de LAMP tal y como se describe en las Secciones 3.1.5.2 a 3.1.5.4 (directamente, sin extracción de ADN). Cuando se utilice PCR para identificar colonias aisladas, se debería utilizar 1 U de ADN polimerasa de Taq (en vez de 2 U como en el caso del material vegetal).

4.3.2 Macrorrestricción y electroforesis en gel de campo pulsante

El análisis mediante electroforesis en gel de campo pulsante (PFGE, por sus siglas en inglés) del ADN genómico tras la digestión con *Xba*I, según Jock *et al.* (2002) muestra seis patrones para las cepas europeas de *E. amylovora*. El método puede aportar información útil para la diferenciación de cepas y se ha aplicado para entender la dispersión del fuego bacteriano en Europa (Jock *et al.*, 2002; Donat *et al.*, 2007).

4.4 Técnicas de patogenicidad

Las colonias presuntamente pertenecientes a *E. amylovora* deberían volverse a inocular en plantas hospedantes para cumplir los postulados de Koch y verificar su patogenicidad. Para la inoculación en plantas, se usan cultivares susceptibles de peral (p. ej., Conference, Doyenne du Comice, Williams, Passa Crassane), manzano (p. ej., Fuji, Gala, Idared, Jonathan), níspero del Japón (p. ej., Algerie, Tanaka), *Crataegus* spp., *Cotoneaster* spp. o *Pyracantha* spp. La inoculación se realiza en brotes jóvenes cortando una hoja joven desde el borde hasta alcanzar la nervadura central con tijeras sumergidas en una suspensión de 10^9 ufc/ml de cada aislamiento preparada en PBS. Las plantas se mantienen a 20–25 ºC con una humedad relativa de aproximadamente el 80 % durante una o dos semanas. También pueden inocularse de la misma forma, previa esterilización superficial, brotes jóvenes extraídos de plantas cultivadas en invernadero, y conservarse en tubos con agar estéril al 1 %. Para la esterilización superficial se debe sumergir los brotes en etanol al 70 % durante 30 s y, a continuación, lavar tres veces con agua destilada estéril. Los tubos con el material inoculado deberían mantenerse a 20–25 ºC con 16 h diarias de luz.

También se pueden inocular frutos inmaduros desprendidos de cultivares susceptibles de peral, manzano y níspero del Japón, colocando 10 µl de suspensiones de 10^9 ufc/ml de los aislamientos en PBS sobre una herida recién practicada en la superficie de los frutos desinfectados (tratados con lejía comercial al 70 % durante 30 min y después lavados tres veces con agua destilada estéril). Los frutos deberían incubarse en una cámara húmeda a 25 ºC durante tres a cinco días.

Las colonias similares a *E. amylovora* se vuelven a aislar a partir de órganos inoculados que muestren los síntomas típicos del fuego bacteriano, y se caracterizan. El resultado de una prueba es positivo cuando al cabo de dos a siete días se observa un exudado y los alrededores del lugar de la inoculación se oscurecen, como se constata en el control positivo de *E. amylovora*, siempre que en el control negativo no haya lesiones o solo se observe una pequeña lesión necrótica en el lugar de la herida.

Pueden usarse otras técnicas de inoculación. La aparición de reacciones de hipersensibilidad en hojas de tabaco podrá indicar la expresión de los genes de reacción de hipersensibilidad y patogenicidad (*hrp*, por su sigla en inglés) de *E. amylovora*, pero esta prueba puede ser positiva para muchas otras bacterias fitopatógenas. Se deberían usar plantas de tabaco de los cultivares Xanthi o Samsun con más de cinco o seis hojas. Se preparan suspensiones bacterianas de 10^9 ufc/ml (DO a 600 nm: 1,0) y se inyectan con una aguja y una jeringuilla en el espacio intracelular de hojas maduras. Se considera resultado positivo el colapso completo del tejido infiltrado transcurridas 24–48 h a temperatura ambiente, tal como se observa en el control positivo de *E. amylovora*.

5. Registros

Los registros y las evidencias deberían conservarse según lo descrito en la Sección 2.5 de la NIMF 27 (Protocolos de diagnóstico para las plagas reglamentadas).

En los casos en que los resultados del diagnóstico puedan afectar a otras partes contratantes, en particular en casos de incumplimiento (NIMF 13, Directrices para la notificación del incumplimiento y acción de emergencia) y en áreas en las que se detecte la plaga por primera vez, los siguientes registros, evidencias y material adicional deberían conservarse por lo menos durante un año de un modo que garantice su plena rastreabilidad: la muestra original, los cultivos de la plaga, los especímenes preservados o montados en portaobjetos, o los materiales de las pruebas (p. ej., fotografías de los geles, copias impresas de los resultados de los ELISA y amplicones de la PCR).

6. Puntos de contacto para información adicional

Puede obtenerse información adicional sobre este protocolo en las siguientes fuentes:

Centro de Protección Vegetal, Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), Carretera Moncada-Náquera km 4,5, 46113 Moncada, Valencia (España) (María M. López; e-mail: mlopez@ivia.es; tel.: +34 963424000; fax +34 963424001).

Plant Health and Environment Laboratory, Investigation and Diagnostic Centres, Ministry for Primary Industries, 231 Morrin Road, St Johns, Auckland 1140 (Nueva Zelandia) (Robert Taylor; e-mail: Robert.Taylor@mpi.govt.nz; tel.: +64 99093548; fax: +64 99095739).

Podrán presentar una solicitud de revisión de un protocolo de diagnóstico las organizaciones nacionales de protección fitosanitaria (ONPF), las organizaciones regionales de protección fitosanitaria (ORPF) o los órganos auxiliares de la Comisión de Medidas Fitosanitarias (CMF) por conducto de la Secretaría de la Convención Internacional de Protección Fitosanitaria (ippc@fao.org), que a su vez remitirá la solicitud al Grupo técnico sobre protocolos de diagnóstico (GTPD).

7. Agradecimientos

El primer proyecto de este protocolo fue redactado por M. M. López (Centro de Protección Vegetal, IVIA, España [véase la sección anterior]) y revisado por R. Taylor (Plant Health and Environment Laboratory, Investigation and Diagnostic Centres, Ministry for Primary Industries, Nueva Zelandia [véase la sección anterior]) y R. Roberts (Tree Fruit Research Laboratory, USDA-ARS, Estados Unidos de América).

La mayoría de las técnicas descritas se sometieron pruebas interlaboratorios en un proyecto de DIAGPRO financiado por la Unión Europea en 2003, en un proyecto de la EUPHRESCO en 2009 y en un proyecto español en 2010.

8. Referencias

En el presente anexo se hace referencia a las normas internacionales para medidas fitosanitarias (NIMF). Las NIMF están disponibles en el Portal fitosanitario internacional (PFI): https://www.ippc.int/core-activities/standards-setting/ispms.

Anónimo. 1998. Directiva 98/57/CE del Consejo de 20 de julio de 1998 sobre el control de *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi *et al. Diario Oficial de la Unión Europea*, L235: 1–39.

Ayers, S. H., Rupp, P. y Johnson, W. T. 1919. A study of alkali-forming bacteria in milk. *US Department of Agriculture Bulletin*, 782.

Bereswill, S., Jock, S., Aldridge, P., Janse, J. D. y Geider, K. 1997. Molecular characterization of natural *Erwinia amylovora* strains deficient in levan synthesis. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 51: 215–225.

Bereswill, S., Pahl, A., Bellemann, P., Zeller, W. y Geider, K. 1992. Sensitive and species-specific detection of *Erwinia amylovora* by polymerase chain reaction analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 58: 3522–3526.

Bonn, W. G. y van der Zwet, T. 2000. Distribution and economic importance of fire blight. *En* J. Vanneste, ed. *Fire blight: The disease and its causative agent*, Erwinia amylovora, págs. 37-54. Wallingford (Reino Unido), CABI. 370 págs.

Bradbury, J. F. 1986. *Guide to plant pathogenic bacteria.* Kew, Surrey (Reino Unido), CAB International Mycological Institute. 332 págs.

Burrill, T. J. 1883. New species of *Micrococcus* (bacteria). *The American Naturalist*, 17: 319.

Donat, V., Biosca, E. G., Peñalver, J. y López, M. M. 2007. Exploring diversity among Spanish strains of *Erwinia amylovora* and possible infection sources. *Journal of Applied Microbiology*, 103: 1639–1649.

Dreo, T., Duffy, B., López, M., Paulin, J. P., Poliakoff, F. y Reisenzein, H. 2009. *Development and validation of innovative diagnostic tools for the detection of fire blight* (Erwinia amylovora). York (Reino Unido), EUPHRESCO. Disponible en: http://www.euphresco.org/downloadFile.cfm?id=662 (último acceso: septiembre de 2012).

EPPO (Organización Europea y Mediterránea de Protección de las Plantas, OEPP). 2013. PM 7/20 (2) *Erwinia amylovora*. *EPPO Bulletin,* doi:10.1111/epp.12019.

EPPO (Organización Europea y Mediterránea de Protección de las Plantas, OEPP). s. f. EPPO Plant Quarantine Data Retrieval System. París, EPPO. Disponible en: http//www.eppo.int/DATABASES/pqr/pqr.htm.

Gorris, M. T., Cambra, M., Llop, P., López, M. M., Lecomte, P., Chartier, R. y Paulin, J. P. 1996. A sensitive and specific detection of *Erwinia amylovora* based on the ELISA-DASI enrichment method with monoclonal antibodies. *Acta Horticulturae,* 411: 41–45.

Gottsberger, R. A. 2010. Development and evaluation of a real-time PCR assay targeting chromosomal DNA of *Erwinia amylovora*. *Letters in Applied Microbiology,* 51: 285–292.

Ishimaru, E. S. y Klos, E. J. 1984. New medium for detection of *Erwinia amylovora* and its use in epidemiological studies. *Phytopathology,* 74: 1342–1345.

Jock, S., Donat, V., López, M. M., Bazzi, C. y Geider, K. 2002. Following spread of fire blight in Western, Central and Southern Europe by molecular differentiation of *Erwinia amylovora* strains with PFGE analysis. *Environmental Microbiology,* 4: 106–114.

Jones, A. y Geider, K. 2001. II Gram negative bacteria. B. *Erwinia* and *Pantoea*. *En* N.W. Schaad, J.B. Jones y W. Chum, eds. *Guide for identification of plant pathogenic bacteria,* segunda edición. Saint Paul, MN, APS Press.

Kim, W. S., Gardan, L., Rhim, S. L. y Geider, K. 1999. *Erwinia pyrifoliae* sp., a novel pathogen that affects Asian pear trees (*Pyrus pyrifolia* Nakai) *International Journal of Systemic Bacteriology,* 49: 899–906.

Kim, W. S., Hildebrand, M., Jock, S. y Geider, K. 2001a. Molecular comparison of pathogenic bacteria from pear trees in Japan and the fire blight pathogen *Erwinia amylovora*. *Microbiology,* 147: 2951–2959.

Kim, W. S., Jock, S., Rhim, S-L. y Geider, K. 2001b. Molecular detection and differentiation of *Erwinia pyrifoliae* and host range analysis of the Asian pear pathogen. *Plant Disease,* 85: 1183–1188.

King, E. O., Ward, M. y Raney, D. E. 1954. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine,* 44: 301–307.

Lehman, S. M., Kim, W. K., Castle, A. J. y Svircev, S. M. 2008. Dualplex real-time polymerase chain reaction reveals competition between *Erwinia amylovora* and *E. pyrifoliae* on pear blossoms. *Phytopathology,* 98: 673–679.

Llop, P., Bonaterra, A., Peñalver, J. y López, M. M. 2000. Development of a highly sensitive nested-PCR procedure using a single closed tube for detection of *Erwinia amylovora* in asymptomatic plant material. *Applied and Environmental Microbiology,* 66: 2071–2078.

Llop, P., Caruso, P., Cubero, J., Morente, C. y López, M. M. 1999. A simple extraction procedure for efficient routine detection of pathogenic bacteria in plant material by polymerase chain reaction. *Journal of Microbiological Methods,* 37: 23–31.

Llop, P., Donat, V., Rodríguez, M., Cabrefiga, J., Ruz, L., Palomo, J. L., Montesinos, E. y López, M. M. 2006. An indigenous virulent strain of *Erwinia amylovora* lacking the ubiquitous plasmid pEA29. *Phytopathology,* 96: 900–907.

López, M. M., Llop, P., Gorris, M. T., Keck, M., Peñalver, J., Donat, V. y Cambra, M. 2006. European protocol for diagnosis of *Erwinia amylovora*. *Acta Horticulturae,* 704: 99–103.

López, M. M., Peñalver, J., Arilla, A., Morente, C., Dreo, T., Pirc, M., Poliakoff, F., Dousset, C., Visage, M., Achbani, E., Bersgma-Vlami, M., Drenova, N., Duffy, B., Marín, M., Meekes, E., Moumni, M., Obradovic, A., Palomo, J., Taylor, R., Stockwell, V. y Reisenzein, H. 2010. Ring test evaluation of techniques for *Erwinia amylovora* diagnosis and detections. ISHS 12th International Workshop on Fire Blight. Varsovia (Polonia), 16–20 de agosto de 2010, resumen 18.

López, M. M., Roselló, M. M., Llop, P., Ferrer, S., Christen, R. y Gardan, L. 2011. *Erwinia piriflorinigrans* sp. nov., a novel pathogen that causes necrosis of pear blossoms. *International Journal of Systemic and Evolutionary Microbiology,* 61: 561–567.

McManus, P. S. y Jones, A. L. 1995. Detection of *Erwinia amylovora* by nested-PCR and PCR-dot-blot and reverse blot hybridisations. *Phytopathology,* 85: 618–623.

Matsuura, T., Mizuno, A., Tsukamoto, T., Shimizu, Y., Saito, N., Sato, S., Kikuchi, S., Uzuki, T., Azegami, K. y Sawada, H. 2012. *Erwinia* uzenensis sp. nov., a novel pathogen that affects European pear trees (*Pyrus communis* L.). *International Journal of Systemic and Evolutionary Microbiology,* doi:10.1099/ijs.0.032011-0.

Obradovic, D., Balaz, J. y Kevresan, S. 2007. Detection of *Erwinia amylovora* by novel chromosomal polymerase chain reaction primers. *Mikrobiologiia,* 76: 844–852.

Ordax, M., Biosca, E. G., Wimalajeewa, S. C., López, M. M. y Marco-Noales, E. 2009. Survival of *Erwinia amylovora* in mature apple fruit calyces through the viable but nonculturable (VBNC) state. *Journal of Applied Microbiology,* 107: 106–116.

Palacio-Bielsa, A., Roselló, M., Llop, P. y López, M. M. 2012. *Erwinia* spp. from pome fruit trees: Similarities and differences among pathogenic and nonpathogenic species. *Trees,* 26: 13–29.

Paulin, J. P. 2000. *Erwinia amylovora*: General characteristics, biochemistry and serology. *En* J. Vanneste, ed. *Fire blight: The disease and its causative agent,* Erwinia amylovora, págs. 87–116. Wallingford (Reino Unido), CABI. 370 págs.

Pirc, M., Ravnikar, M., Tomlinson, J. y Dreo, J. 2009. Improved fireblight diagnostics using quantitative real-time PCR detection of *Erwinia amylovora* chromosomal DNA. *Plant Pathology,* 58: 872–881.

Powney, R., Beer, S., Plummer, K., Luck, J. y Rodoni, B. 2011a. The specificity of PCR-based protocols for detection of *Erwinia amylovora*. *Australian Plant Pathology,* 40: 87–97.

Powney, R., Smits, T. H., Sawbridge, T., Frey, B., Blom, J., Frey, J. E., Plummer, K. M., Beer, S. V., Luck, J., Duffy, B. y Rodoni, B. 2011b. Genome sequence of an *Erwinia amylovora* strain with pathogenicity restricted to *Rubus* plants. *Journal of Bacteriology,* 193: 785–786.

Rhim, S-L., Völksch, B., Gardan, L., Paulin, J-P., Langlotz, C., Kim, S-L. y Geider, K. 1999. *Erwinia pyrifoliae,* an *Erwinia* species different from *Erwinia amylovora*, causes a necrotic disease of Asian pear trees. *Plant Pathology,* 48: 514–520.

Roselló, M., Peñalver, J., Llop, P., Gorris, M. T., Charter, R., Cambra, M. y López, M. M. 2006. Identification of an *Erwinia* sp. different from *Erwinia amylovora* and responsible for necrosis on pear blossoms. *Canadian Journal of Plant Pathology,* 28: 1–12.

Sasser, M. 1990. Identification of bacteria through fatty acid analysis. *En* F. Klement, K. Rudolf y D.C. Sands, eds. *Methods in phytobacteriology*, págs. 199–204. Budapest, Akademiai Kiadó.

Starr, M. P., Cardona, C. y Folsom, D. 1951. Bacterial fire blight of raspberry. *Phytopathology,* 41: 9515–9559.

Stöger, A., Schaffer, J. y Ruppitsch, W. 2006. A rapid and sensitive method for direct detection of *Erwinia amylovora* in symptomatic and asymptomatic plant tissues by polymerase chain reaction. *Journal of Phytopathology,* 154: 469–473.

Tanii A., Tamura, O. y Ozaki, M. 1981. The causal agent of a fire blight-like disease. *Annals of the Phytopathological Society of Japan,* 47: 102.

Taylor, R. K., Guilford, P. J., Clark, R. G., Hale, C. N. y Forster, R. L. S. 2001. Detection of *Erwinia amylovora* in plant material using novel polymerase chain reaction (PCR) primers. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science,* 29: 35–43.

Temple, T. N. y Johnson, K. B. 2011. Evaluation of loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of *Erwinia amylovora* on pear and apple fruit flowers. *Plant Disease,* 95: 423–430.

Temple, T. N., Stockwell, V. O. y Johnson, K. 2008. Development of a rapid detection method for *Erwinia amylovora* by loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *Acta Horticulturae,* 793: 497–504.

Thomson, S. V. 2000. Epidemiology of fire blight. *En* J. Vanneste, ed. *Fire blight: The disease and its causative agent,* Erwinia amylovora, págs. 9–36. Wallingford (Reino Unido), CABI. 370 págs.

Van der Zwet, T. 2004. Present worldwide distribution of fire blight and closely related diseases. *Acta Horticulturae,* 704: 35.

Van der Zwet, T. y Beer, S. 1995. Fire blight: Its nature, prevention and control. A practical guide to integrated disease management. *USDA Agricultural Information Bulletin,* núm. 631.

Van der Zwet, T. y Keil, H. L. 1979. *Fire blight: A bacterial disease of rosaceous plants.* United States Department of Agriculture (USDA) Handbook 510. Washington, DC (Estados Unidos), USDA.

Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A. y Lane, D. J. 1991. 16S Ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology,* 173(2): 697–703.

Weller, S. A., Elphinstone, J. G., Smith, N. C., Boonham, N., y Stead, D. E. 2000. Detection of *Ralstonia solanacearum* strains with a quantitative multiplex, real-time, fluorogenic PCR (TaqMan) assay. *Applied and Environmental Microbiology,* 66: 2853–2858

Wells, J. M., van der Zwet, T. y Hale, C. N. 1994. Differentiation of *Erwinia* species in the "*amylovora"* group by class analysis of cellular fatty acids. *Journal of Phytopathology,* 140: 31–38.

9. Figuras

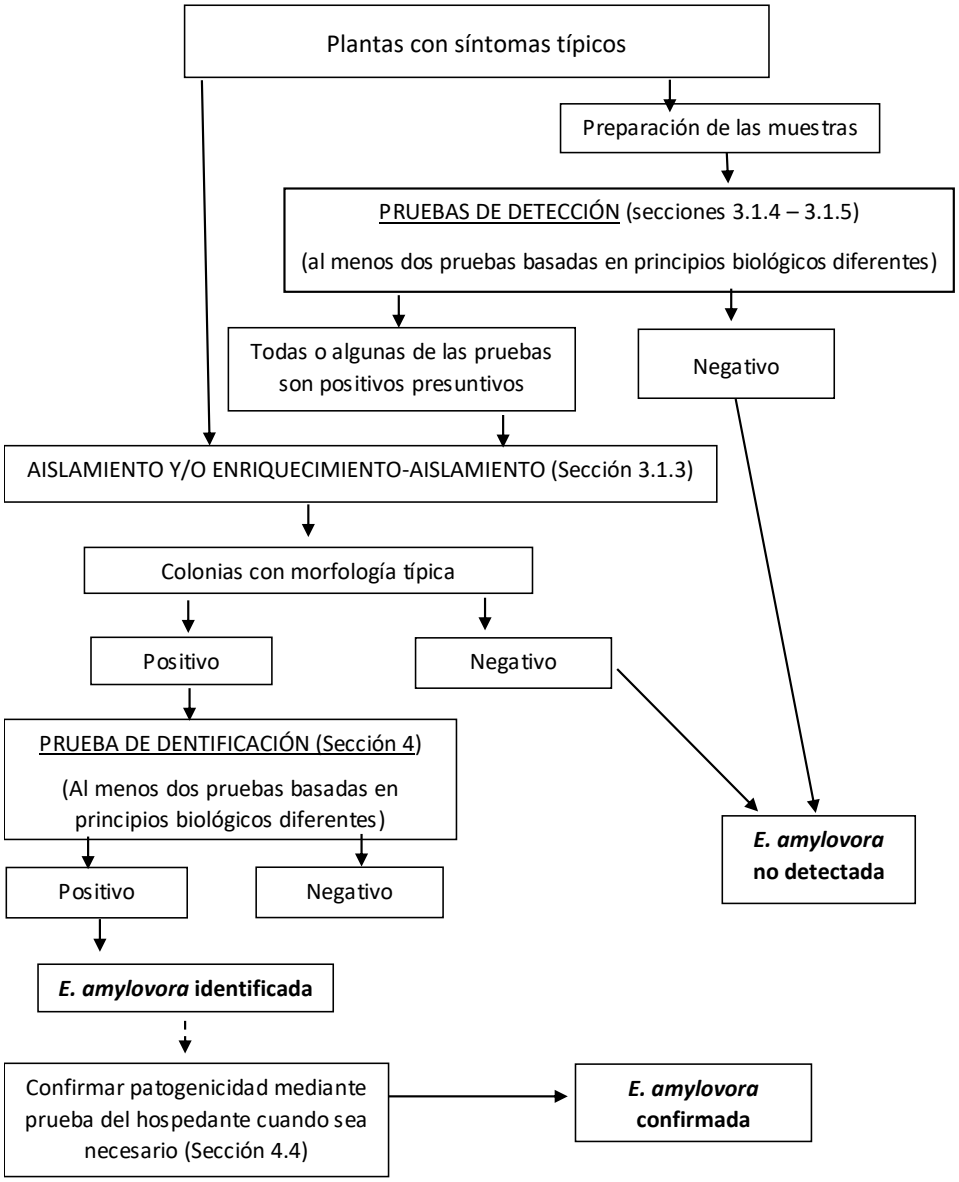

Figura 1. Diagrama de flujo para la identificación de *Erwinia amylovora* en muestras con síntomas de fuego bacteriano.

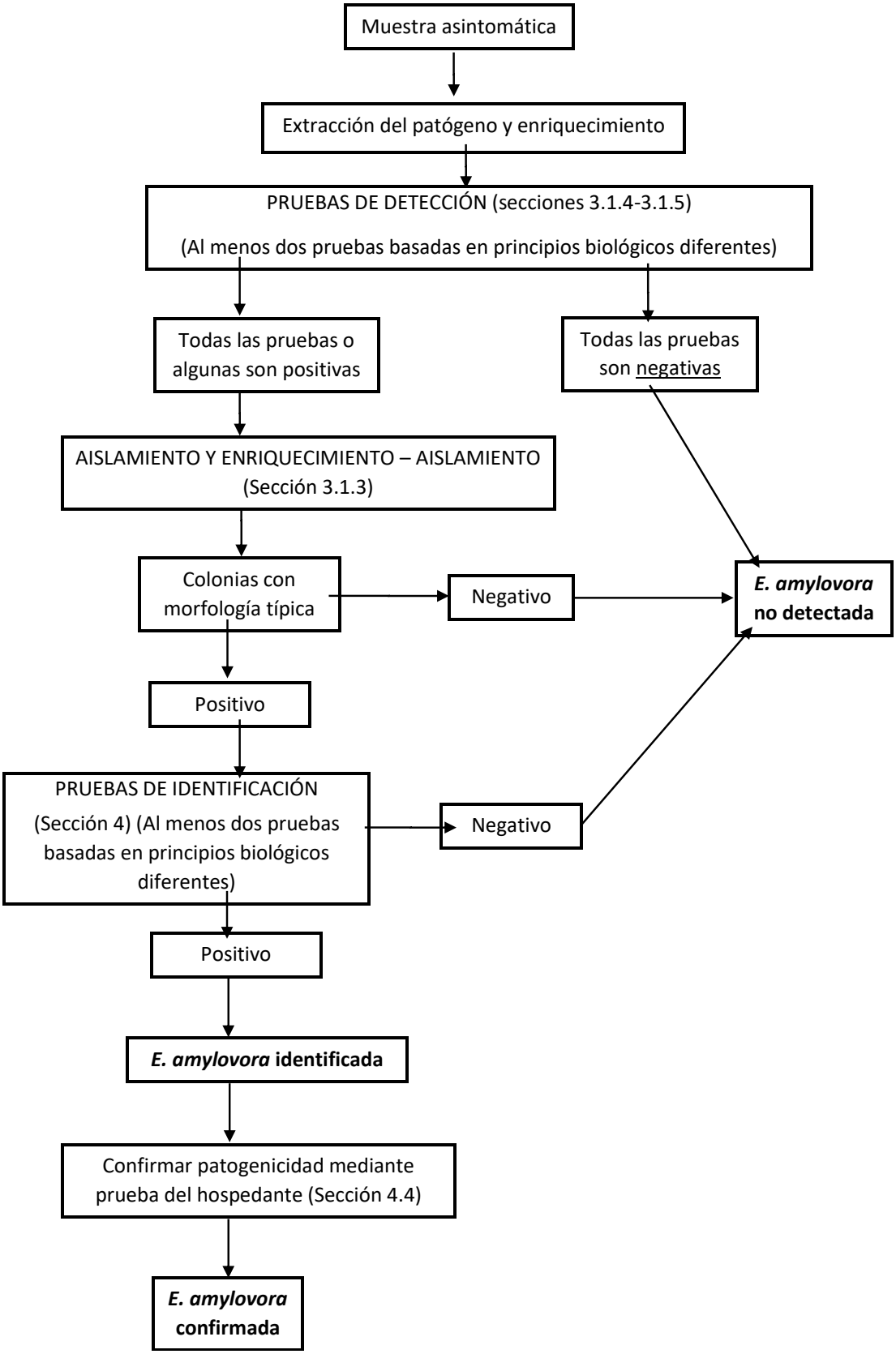

Figura 2. Diagrama de flujo para la identificación de *Erwinia amylovora* en muestras asintomáticas.

* Es razonable tener serias sospechas de la presencia de *E. amylovora* en la muestra, pero para su identificación es preciso aislar el patógeno a partir de nuevas muestras y proceder a la subsiguiente identificación de la bacteria.

Historia de la publicación

Esta no es una parte oficial de la norma.

2004-11: El CN presentó la cuestión original: *Erwinia amylovora* (2004-009).

2006-04: La CMF-1 añadió esta cuestión al tema del programa de trabajo: Bacterias.

2012-11: Primer proyecto presentado en la reunión del GTPD.

2013-06: Proyecto presentado en la reunión del GTPD.

2014-05: El CN aprobó presentar el texto para consulta a los miembros (2014_eSC_May_08).

2014-07: Consulta a los miembros.

2015-12: El grupo de redacción del PD examina el proyecto de DP y las respuestas a las observaciones de los miembros.

2016-03: Decisión del GTPD por vía electrónica de que aprobar la adopción del PD (2016_eTPDP_Mar_01).

2016-05: El CN decidió por medios electrónicos someter la aprobación del PD al período de notificación de 45 días (2016_eSC_May_12).

2016-07: Período de notificación del PD.

2016-08: El CN adoptó el PD en nombre de la CMF (no se recibieron objeciones).

NIMF 27. Anexo 13. *Erwinia amylovora* (2016). Roma, CIPF, FAO.

2018-01: El GRE para el español y el Servicio de Traducción de la FAO revisaron este PD y la Secretaría de la CIPF incorporó las modificaciones conformemente.

2018-04: La CMF-13 (2018) ha tomado nota que el Grupo de Revisión de Idiomas para el español ha revisado este Anexo.

Última actualización de la historia de publicación: 2018-11.

Esta página se ha dejado en blanco intencionalmente

CIPF

La Convención Internacional de Protección Fitosanitaria (CIPF) es un acuerdo internacional de sanidad vegetal que tiene como objetivo proteger las plantas cultivadas y silvestres previniendo la introducción y propagación de plagas. Los viajes y el comercio internacional hoy son más abundantes que nunca antes. En el desplazamiento de personas y mercancías por todo el mundo, los acompañan organismos que representan riesgos para las plantas.

La organización

- Hay más de 180 partes contratantes de la CIPF
- Cada parte contratante tiene una organización nacional de protección fitosanitaria (ONPF) y un contacto oficial de la CIPF
- Nueve organizaciones regionales de protección fitosanitaria (ORPF) obran para facilitar la aplicación de la CIPF en los países
- La CIPF se enlaza con las organizaciones internacionales pertinentes a fin de contribuir a la creación de capacidad regional y nacional
- La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) proporciona la Secretaría de la CIPF

Convención Internacional de Protección Fitosanitaria (CIPF)

Viale delle Terme di Caracalla, 00153 Roma, Italia
Tel. +39 06 5705 4812
Correo electrónico: ippc@fao.org | Web: www.ippc.int