
METODO ANALITICO PARA DIAGNOSTICO FITOSANITARIO

Erwinia amylovora (Burrill) Winslow et al

Contenido

[Nombres Comunes](#)

[Hospederos principales y secundarios](#)

[Introducción](#)

[Inspección directa](#)

[Características taxonómicas](#)

[Técnicas Analíticas](#)

[Evaluación de la técnica de detección y diagnóstico](#)

[Referencias](#)

[Anexos](#)

Nombres comunes (2,8,10):

Fuego bacteriano
Tizón de fuego
Fire blight
Requeima

Hospederos principales y secundarios (2,8,10):

Pyrus spp.
Malus spp.
Cydonia spp.
Cotoneaster spp.
Crataegus spp.
Pyracantha spp.
Amelanchier spp.
Sorbus spp.
Chaenomeles spp.
Stranvaesia spp.

Introducción:

El agente causal del fuego bacteriano es un organismo considerado A1 en los listados de plagas y enfermedades cuarentenarias para la región del COSAVE. Afecta a casi todos los cultivares de *Pyrus* spp. y algunos de *Malus* spp., siendo los primeros altamente susceptibles (2). Se encuentra distribuido en: Región Mediterránea Europea (Bélgica, Dinamarca, Inglaterra, Francia, Alemania, Holanda, Polonia y Turquía), Oceanía (Nueva Zelanda), América del Norte (Estados Unidos, Canadá y México) (2).

La forma de diseminación de la enfermedad a corta y mediana distancia es por la lluvia, riego por aspersión, viento e insectos. En tanto que a larga distancia puede ser por material vegetativo, hombre, útiles y herramientas de cultivo, aves migratorias (3). La fase epífita de *Erwinia amylovora* puede ser muy peligrosa en los países en que se corre el riesgo de introducir la bacteria con material vegetal importado sin síntomas, dado que se ha demostrado que la bacteria puede estar

presente en yemas, brotes, flores y frutos, e incluso en el xilema y médula de plantas huéspedes asintomáticas. Los mecanismos que permiten a esta bacteria sobrevivir de forma latente en los tejidos susceptibles del huésped no se conocen, aunque se ha sugerido factores fisiológicos del huésped, ambientales o antagonismo con otras bacterias. Por este motivo las medidas cuarentenarias tienden a evitar la entrada de la enfermedad controlando las vías de penetración.

La biología de la enfermedad comienza a partir del inóculo primario procedente de la multiplicación de la bacteria en los márgenes de los canchros y tejidos adyacentes de la corteza. Posteriormente se disemina por insectos, lluvia o viento a flores o brotes en crecimiento, penetrando a éstos a través de aberturas naturales o heridas. En condiciones climáticas favorables la enfermedad avanza afectando las flores, pedúnculos florales, hojas, brotes, ramas y troncos, produciéndose en éstos un exudado bacteriano que actúa como fuente de inóculo secundario durante el período vegetativo. En primavera y verano pueden haber numerosos ciclos secundarios de infección dependiendo de la temperatura y humedad. Al final del período vegetativo, en ramas y troncos, los canchros sirven para que la bacteria se conserve durante el invierno. Además, la bacteria también puede invernar en brotes necrosados, hojas, frutos momificados, etc., e incluso puede conservarse en el suelo y en restos vegetales infectados (3).

Inspección directa:

El fuego bacteriano es la enfermedad que presenta síntomas más espectaculares entre las que atacan al peral. La sintomatología final confiere a los árboles atacados el aspecto de haber sido destruidos por el fuego.

Los primeros síntomas se observan en floración, produciéndose un ennegrecimiento de la flor o de todo el corimbo, que se inicia en los nectarios de las flores. Luego pasa al pedúnculo, que se oscurece y marchita, tomando un aspecto húmedo y finalmente un color marrón oscuro o negro. Si las condiciones atmosféricas son favorables afecta a las hojas de la base, luego a los brotes y la rama que los soporta, en donde puede formarse un cancro. Los frutos recién formados toman un aspecto húmedo y se ennegrecen, permaneciendo tanto éstos como las flores marchitas unidos al árbol. Con alta humedad y temperaturas adecuadas se pueden observar gotas de un exudado blanco amarillento, que se oxida más tarde, constituido por millones de bacterias virulentas envueltas en cápsulas mucosas (3).

La sintomatología en brotes herbáceos en pleno crecimiento es un oscurecimiento de la hoja terminal y una pérdida de rigidez del brote, que se curva en forma de cayado de pastor, tomando un aspecto húmedo y negrusco una vez ya marchito. El resto de las hojas son afectadas a partir del brote o por penetración directa, quedando adherido el brote a la rama durante el otoño. A partir de los brotes atacados la infección puede progresar muy rápido afectando primero a las ramas secundarias, luego las principales y finalmente el tronco, causando frecuentemente la muerte del árbol en un solo período vegetativo (3).

En los frutos se observan manchas translúcidas de color verde oscuro, con posibilidad de exudados. Posteriormente el fruto se arruga y momifica, oscureciéndose las manchas. Estos frutos quedan colgando del árbol (2). El daño en cuello y raíces es poco común, pero son considerados de los más destructivos, causando frecuentemente la rápida muerte del árbol (3).

En manzano y membrillero la evolución del ataque y la sintomatología es muy similar al peral, la diferencia está en que las flores y brotes jóvenes dañados presentan un color tabaco o rojizo que nunca llega a ser marrón oscuro o negro como en el peral. En cambio, en las Rosáceas silvestres y ornamentales los síntomas no suelen ser tan espectaculares, y la mayor importancia de su reconocimiento es que pueden servir de vehículos de introducción de la enfermedad ó como importantes reservorios de inóculo (3).

Características taxonómicas:

Erwinia amylovora es una bacteria de forma bacilar, de tamaño 1,1-1,6 µm de largo y 0,6-0,9 µm de ancho, Gram negativa, móvil por varios flagelos peritricos, con cápsula mucosa no proteica, y que utiliza diversos azúcares, entre ellos la glucosa, en aero y anaerobiosis. Sus condiciones óptimas de crecimiento "in vitro" son una temperatura entre 21 y 28°C, con una mínima de 3-12°C y una máxima de 35-37°C, y un pH de 6-7,5, con un mínimo de 4-5,9 y un máximo de 7,6-8,8 (3). El patrón característico en API 20 E y API 20 NE se describe en anexo 3.

1-. Test positivos:

Levano, catalasa, β-galactosidasa, arbutina hidrolasa y producción de acetoina. Crecimiento a partir de las fuentes de carbono fructosa, galactosa, glucosa, malato, sacarosa, trehalosa, glicerol, fumarato y succinato (3).

2-. Test negativos:

Oxidasa, fluorescencia en King B, reducción de nitratos, producción de indol-ureasa, producción de SH₂ a partir de peptona, protopectinasa, arginina dihidrolasa, lisina y ornitina decarboxilasa, y desoxirribonucleasa. Crecimiento a partir de d-xilosa, ramnosa, d-manosa, celobiosa, maltosa, arabinosa, d-tartrato, l-tartrato, eritritol, adonitol, dulcitol, salicina, esculina, acetato, oxalato y lactato (3).

Técnicas Analíticas:

Previamente, antes de describir los métodos analíticos para diagnosticar *Erwinia amylovora*, se indica la metodología de muestreo y proceso de la muestra cuando las partidas de ingreso consideran altos volúmenes de plantas (10):

- Si la partida va a estar constituida por plantas del mismo género, la muestra se forma con 100 brotes de unos 10 cm de longitud. Si hay dos géneros se toman 50 brotes de cada uno, y si existen tres géneros la muestra se forma con 30 brotes de cada género, número mínimo considerado adecuado para incluir en una muestra.
- En el laboratorio se procede a analizar una submuestra constituida por 30 brotes y el resto se guarda a 5°C como contramuestra.

Obtención del extracto bacteriano:

- cortar de cada uno de los 30 brotes 4 piezas de 1 cm.
- colocar los 120 fragmentos de 1 cm en un matraz.
- añadir 30 ml de tampón fosfato 0,01 M (anexo 2).
- agitar 1,5 hrs a temperatura ambiente.
- filtrar el sobrenadante.
- centrifugar 20 min a 10.000 g.
- resuspender el precipitado en 1 ml del tampón anterior, sin Tween.
- separar 0,4 ml de la suspensión para realizar los distintos métodos analíticos de diagnóstico.
- añadir una gota de glicerol a los 0,6 ml restantes y guardarlos a -20 C.

1-. Aislamiento directo:

Se puede aislar la bacteria sin dificultad a partir de flores, brotes enfermos y canchales en actividad. A partir de canchales es preferible trabajar con aquellos que presentan un margen no definido (persistentes). Se toman pequeños trozos de tejidos enfermos, o del límite entre la zona sana y enferma, y se maceran en agua estéril. Esperar diez minutos y extender una gota en una placa Petri con el medio de cultivo apropiado (3).

Un medio utilizado es el agar nutriente enriquecido con sacarosa, el cual diferencia morfológicamente las colonias de las de *P. syringae*, éstas son muy mucosas, de 3-4 mm de diámetro a las 48 hrs, de color blanco crema, en cambio *P. syringae* es mucho menos mucosa. Otro medio es el King B, en donde las colonias son lisas, blanquecinas, convexas, opacas, no fluorescentes y con un reflejo anacarado (3,11). En medio LPGA (anexo 1) a 25°C, se observan a los tres días colonias blancas, lisas, algo convexas, redondeadas, de unos 2-5 mm de diámetro y variables en su opacidad (3).

Medios de cultivo semiselectivos pueden servir como pruebas complementarias y como orientativos en los primeros aislamientos. Entre éstos los más utilizados son CCT, MS y Hig Sucrose Medium (anexo 1.1, 1.2 y 1.3). La utilidad de éstos es relativa dada la facilidad de aislamiento de la bacteria en medios de cultivo comunes (3,11,12).

2-. Hipersensibilidad en tabaco:

La verificación del poder patógeno de la bacteria puede ser realizado, entre otras pruebas, mediante infiltración de una suspensión bacteriana de concentración aproximada 10⁹ ufc/ml en el mesófilo de la hoja de tabaco. A las 10-12 hrs la zona infiltrada comienza a adquirir un aspecto cristalino, pasando a una necrosis blanquecina a las 24 hrs (3,10).

3-. Pruebas sobre peras inmaduras:

La inoculación de peritas (o de rodajas de peritas) inmaduras se emplea como bioensayo para el aislamiento indirecto e identificación de *E. amylovora*. Las peritas verdes (5- 7 cm de longitud) se colocan en un desecador provisto de agua en el fondo. Se inyecta con jeringuilla una gota de suspensión bacteriana, o bien depositarla sobre la superficie y pinchar a su través. Cerrar herméticamente el recipiente e incubar a 25 C. A los 3-5 días aparece una zona acuosa alrededor del punto de inoculación con gotitas de exudado bacteriano de color oscuro (10).

En el caso de rodajas de peritas verdes, éstas recién cortadas se colocan en cámara húmeda y se deposita sobre el corte una gota de suspensión bacteriana. Cerrar herméticamente e incubar a 25 C. A los 3-5 días aparece una podredumbre acompañada por típicas gotas de exudado bacteriano crema (10).

4-. Inoculación sobre plantas jóvenes:

Plantas jóvenes de peral en crecimiento activo son inoculadas en hojas, pecíolo o brote terminal, y se incuban con humedad a 25 C. Después de 4-5 días se produce un marchitamiento de las plantas.

Con los otros huéspedes del fuego bacteriano, la inoculación de plantas en crecimiento activo es también positiva en pocos días, por lo que se pueden utilizar si se dispone de los mismos (10).

5-. Aglutinación en portaobjetos:

Esta metodología tan sólo se utiliza con cultivos puros de bacterias. Una de sus múltiples aplicaciones la constituye su utilidad en la identificación de *E. amylovora*, cuyos aislados, al menos por el momento, son antigénicamente homogéneos y muy diferentes de otras bacterias asociadas normalmente en infecciones mixtas con ella (10). El proceso de ejecución de la prueba es como sigue (10):

- extraer con un asa una parte del cultivo y suspenderla uniformemente en agua fisiológica (0,85 % NaCl) o en tampón fosfato salino 0,05 M (anexo 2), o en casos de necesidad simplemente en agua destilada estéril.
- colocar en portaobjetos una gota de la suspensión, procurando que sea densa.
- depositar próxima a la gota anterior, otra de volumen similar de antisuero a la dilución adecuada (normalmente entre 1/10 y 1/50) en agua fisiológica.
- poner cuidadosamente en contacto ambas gotas para que vayan mezclándose. Para ello se toma el portaobjetos entre los dedos, balanceándolo muy suavemente hasta producir el contacto entre ambas gotas.
- a los 3-5 min se observa una reacción de aglutinación.
- la prueba debe plantearse con la cepa problema con el antisuero, la cepa problema y el suero fisiológico, un testigo positivo homólogo del antisuero.

6-. Inmunofluorescencia:

E. amylovora puede ser detectada por inmunofluorescencia directa o indirecta. El método de inmunofluorescencia directa necesita de antisueros marcados específicos para la bacteria. Su metodología es como sigue (5,10) :

- depositar una gota de antígeno en un portaobjetos.
- aplicar igual cantidad de conjugado.
- dejar reposar durante 30 min en cámara húmeda a 37°C.
- lavar el portaobjetos cuidadosamente con PBS (anexo 2) procurando que el chorro no le incida directamente.
- colocar un cubreobjetos y depositar una gota de tampón fosfato glicerina 0,1 M (anexo 2).
- examinar por epifluorescencia, los complejos antígeno-anticuerpo fluorescentes.

7-. DAS-ELISA:

La metodología utilizada para DAS-ELISA es la siguiente (10):

- depositar 200 µl de solución de gamma-globulinas en tampón carbonato (anexo 2) en cada pocillo de la placa, tapar e incubar durante 5 hrs a 37 °C.
- lavar los pocillos de la placa con PBS-Tween (anexo 2) dejándola reposar 3 min. Repetir el lavado tres veces.
- depositar en cada pocillo 200 µl de las muestras y testigos en tampón PBS (anexo 2). Tapar e incubar toda la noche (16 hrs aprox.) a 28°C.
- proceder al lavado como en el punto anterior.
- depositar por pocillo 200 µl del conjugado gammaglobulina-enzima en tampón PBS + 0,4 % albúmina de huevo. Tapar herméticamente e encubar 4 hrs a 37 °C.
- lavado de pocillos.
- depositar 200 µl de sustrato, preparado en el mismo momento de su uso, en cada pocillo de la placa. Tapar e incubar a temperatura ambiente por una hora. El sustrato empleado para la fosfatasa alcalina es el p-nitrofenil fosfato, que se utiliza en la proporción de 0,8 mg/ml de solución dietanolamina tamponada (anexo 2).
- parar la reacción con 50 µl por pocillo de NaOH 3 M.

8-. PCR (Polymerase chain reaction) (1,6,7):

En el caso de cultivos puros, se toma un asa con bacterias, se lleva a agua estéril y se centrifuga a 10.000 rpm por 10 min. Luego, el precipitado se resuspende en 1 ml de agua estéril. En cambio, con material vegetal se debe dilacerar en agua estéril o en tampón PBS 0,01 M pH 7,2 con PVP 2%. Posteriormente el dilacerado se centrifuga a 13.000 rpm por 5 minutos. Se resuspende el precipitado en tampón de extracción (200 mM tris HCl pH 7,5; 250 mM EDTA; 0,5% SDS; 2% PVP) y dejar en agitación suave.

Se eliminan los residuos del extracto centrifugando a 5.000 r.p.m. 5 minutos y luego se recoge la suspensión para mezclarla con isopropanol a temperatura ambiente. Se deja en reposo una hora y se centrifuga a 13.000 r.p.m. por 10 in, se elimina el sobrenadante y se secan los tubos al vacío. Se resuspende en 100 µl de agua estéril, empleándose 5 µl para amplificar.

El PCR se corre sobre un volumen final de 50 µl, conteniendo 50 pmol de cada primer, 1 U de Taq polimerasa, 0,2 mM de cada dNTPs, 3 mM de MgCl₂, 5 µl de tampón 10X, 30,3 µl de agua y 10 µl de muestra. Los primers son los diseñados por Bereswill et al y son las siguientes secuencias 5'- CGGTTTTTAACGCTGGG- 3' y 5'- GGGCAAATACTGGGATT- 3'. La temperatura de inicio de la amplificación fue de 93°C por 5 in, seguida por 40 ciclos de 93°C por 30 segundos, 52°C por 45 seg., 72 °C por 90 seg. Finalizando con 72°C por 10 min.

Finalmente, el producto de la amplificación pasa por un proceso de electroforesis en un gel de agarosa al 1% en tampón TAE (0,04 M tris acetato, pH 8,0 y 0,002 M EDTA) y por un revelado con bromuro de etidio por 10 a 15 min. La observación del gel se realiza bajo luz U.V. (254 nm).

Evaluación de las técnicas de detección y diagnóstico:

El primer paso para la detección del agente productor del fuego bacteriano es el examen visual de síntomas, aunque su ausencia no implica que no exista el patógeno. Los análisis sobre muestras con síntomas sospechosos deben realizarse siempre; los casos asintomáticos convendrá analizarlos cuando exista posibilidad de infección latente, como por ejemplo importaciones desde países con fuego bacteriano (10).

En el caso de plantas con síntomas, desde el punto de vista práctico, se aconseja dilacerar los tejidos sospechosos en agua estéril, dejar en maceración 15-30 min, sembrar en los medios de cultivo King B y SNA (5 %), inocular peritas verdes y realizar la prueba de aglutinación. A los 3-4 días se analizan los resultados. *E. amylovora* no presenta fluorescencia en King B, el levano es positivo y las peritas muestran en las proximidades del punto inoculado un exudado blanco crema (10).

En el caso de plantas asintomáticas puede existir infección latente o encontrarse la bacteria en forma epífita. Para estos análisis la OEPP sugiere emplear la técnica de Inmunofluorescencia para los extractos obtenidos a partir de brotes, esto con el fin de eliminar las muestras negativas, y proceder, en los restantes casos, al aislamiento e identificación microbiana, y cuando es preciso, confirmar mediante pruebas bioquímicas y de patogenicidad.

La Inmunofluorescencia puede ser reemplazada por DAS-ELISA, metodología que permite trabajar con volúmenes altos de muestras, que no requiere mayor experiencia para realizar la evaluación, y que prácticamente posee una sensibilidad similar (9). Además, la metodología se puede mejorar si aumentamos la especificidad, con anticuerpos monoclonales, y la sensibilidad, al utilizar en serie las técnicas de Inmunofluorescencia y DAS-ELISA (4). En caso de muestras puntuales, en donde se requiera mayor especificidad y sensibilidad, utilizar como test complementario PCR, en donde las muestras, tanto de cultivos puros como de bacterias en extracto vegetal, presentan bandas características, al ser comparadas con el patrón 100 bp DNA ladder, alrededor de los 0.95 Kb (1,6,7).

Referencias:

1. BERESWILL, S.; PAHL, A.; BELLEMANN, P.; ZELLER, W.; GEIDER, K. 1992 Sensitive and species-specific detection of *Erwinia amylovora* by polymerase chain reaction analysis. *Applied and Environmental Microbiology* 58 (11) :3522-3526.
2. COSAVE 1991. *Erwinia amylovora* (Burril 1882) Winslow et al 1920. Ficha Cuarentenaria N°9. In: Plagas Cuarentenarias. 11 p.
3. LAROCHE, M. 1987. Specific identification of *E. amylovora* through their metabolites. Technical communication of International Society for Horticultural Science fourth international workshop on fire blight. *Acta Horticulturae* 217: 43-51.
4. LIN, C. ; ZWET, T. VAN DER 1987. In vitro and in situ detection of *E. amylovora* with monoclonal antibodies. Technical communication of International Society for Horticultural Science fourth international workshop on fire blight. *Acta Horticulturae* 217: 77-80.
5. _____; ZWET, T. VAN DER 1987. Direct counts of *Erwinia amylovora* by immunofluorescent staining with monoclonal antibodies. Technical communication of International Society for Horticultural Science fourth international workshop on fire blight. *Acta Horticulturae* 217: 81-85.
6. LLACER, G.; LÓPEZ, M. M.; TRAPERO, A.; BELLO, A. 1996 *Patología Vegetal*, tomo I. Sociedad Española de Fitopatología, M. V. Phytoma-España. España, 695 p.
7. LLOP, P. ; LÓPEZ, M. M. Protocolo de preparación de muestras de *E. amylovora* para PCR. Depto. Protección Vegetal y Biotecnología. Laboratorio de Bacteriología. IVIA, Moncada, Valencia, España.
8. LOPEZ, M. ; NOVAL, C. ; PALAZON, I. ; SAMPAYO, M. 1987. El fuego bacteriano, *Erwinia amylovora*. Madrid, España, Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. 86 p.
9. McLAUGHLIN, R.; CHEN, T.; WELLS, J. 1989. Monoclonal anti-bodies against *Erwinia amylovora* : characterization and evaluation of a mixture for detection by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Phytopathology* 79 (5): 610-613.
10. ESPAÑA. MINISTERIO AGRICULTURA, PESCA Y ALIMENTACION 1991. Manual de Laboratorio: diagnóstico de hongos, bacterias y nemátodos fitopatógenos. Madrid, España, Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. 485 p.
11. OEPP/EPPO 1992. Quarantine procedure. *Erwinia amylovora* sampling and test methods. Bulletin OEPP/EPPO 22:225-231.
12. SCHAAD, N. 1988. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria, 2nd edition. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota. 164 p.

ANEXOS

Anexo 1:

1-. Medios de aislamiento:

MS-Medium (12)

Agar	15,0 g
Manitol	10,0 g
Ac. nicotínico	0,5 g
L-asparagina (anhidro)	3,0 g
K ₂ HPO ₄	2,0 g
MgSO ₄ x 7H ₂ O	0,2 g
Taurocholato de sodio	2,5 g

Previo a agregar los reactivos, precalentar el agar en 800 ml de agua destilada. Agregar posteriormente:

Tergitol 7	0,10 ml
Ac. triacético nitrilo	10,00 ml (sol. al 2 %)
Azul de bromotimol	9,00 ml (0,5 % sol. acuosa)
Rojo neutro	2,50 ml (0,5 % sol. acuosa)
NaOH	5,00 ml (sol. 1 N)
Nitrato de talio	1,75 ml (sol. acuosa al 1 %)
CoCl ₂	50,00 ml (sol. acuosa 14 mM)
Cicloheximida	5,00 ml (sol. acuosa al 1 %)

Completar volumen a 1 l con agua destilada. Llevar a pH 7,3.

High sucrose medium (12)

Sacarosa	160,0 g
Agar nutriente (BBL)	12,0 g
Cristal violeta	0,8 ml (0,1 % en alcohol)
Cicloheximida (0,1 %)	20,0 ml
Agua destilada	380,0 ml

El medio se autoclava, se coloca en discos Petri y se deja incubando a 30°C por 2 hrs antes de usar.

Medio CCT (12)

Sacarosa	100 g
Sorbitol	10 g
Tergitol aniónico (1 %)	30 ml (al 1 % en agua)
Cristal violeta	2 ml (al 0,1 % en etanol)
Agar nutriente	23 g
Agua destilada	970 ml

Autoclavar 10 min a 115 C y agregar 2 ml de nitrato de talio al 1 % en agua y 0,05 g de cicloheximida.

LPGA (2)

Extracto de levadura	5 g
Peptona	5 g

Glucosa	10 g
Agua destilada	1 lt

Ajustar a pH 7 y autoclavar.

Anexo 2:

1.-Tampones (10):

Tampón fosfato 0,01 M pH 7,2*

Na ₂ HPO ₄ x 12 H ₂ O	2,7 g
NaH ₂ PO ₄	0,4 g
NaCl	8,0 g
Tween 20	1,0 ml

Tampón fosfato salino 0,05 M pH 7,0*

Na ₂ HPO ₄ x 12 H ₂ O	4,26 g
KH ₂ PO ₄	2,72 g
NaCl	8,00 g

Tampón PBS pH 7,4*

NaCl	3,0 g
KH ₂ PO ₄	0,2 g
NaH ₂ PO ₄	2,9 g
KCl	0,2 g
Na ₂ S	0,2 g (optativo)

Tampón fosfato glicerina 0,1 M pH 7,6*

Na ₂ HPO ₄ x 12 H ₂ O	3,20 g
NaH ₂ PO ₄ x 2 H ₂ O	0,15 g
Glicerol	50,00 ml

Tampón carbonato pH 9,6*

Na ₂ CO ₃	1,59 g
NaHCO ₃	2,93 g
Na ₂ S	0,20 g (optativo)

Llevar a Ph 9,6 con HCl 1 N o NaOH 1N. Conservar a 4 C.

* H₂O (c.s.p.) 1,00 l

Tampón PBS-Tween

Tween 20	0,5 ml
----------	--------

Tampón PBS 999,5 ml

Solución dietanolamina tamponada

Dietanolamina 9,7 ml
H₂O 700,0 ml
NaN₃ 0,2 g

Llevar a pH 9,8 con HCl 1 N. Añadir agua destilada hasta completar el litro.

Anexo 3:

1-. Reacciones de *E. amylovora* a las pruebas API 20 E :

PRUEBA	SUBSTRATOS	REACCIÓN (48 HRS) ¹ (7)
ONPG	Ortonitrofenol-galactosido	Variable
ADH	Arginina	Débil +
LDC	Lisina	-
ODC	Ornitina	-
CIT	Citrato sódico	-
H ₂ S	Tiosulfato sódico	-
URE	Urea	-
TDA	Triptófano	-
IND	Triptófano (producción indol)	-
VP	Piruvato sódico	+ (variable)
GEL	Gelatina	Variable
GLU	Glucosa	+
MAN	Manitol	Variable
INO	Inositol	Variable
SOR	Sorbitol	Variable
RHA	Rammosa	-
SAC	Sacarosa	+
MEL	Melibiosa	Débil + o -
AMY	Amigdalina	-
ARA	Arabinosa	+ (algunas -)

¹ Reacciones comunes al 70-90% de las cepas de *E. amylovora*. Puede haber variaciones en una o más pruebas.

2-. Reacciones de *E. amylovora* a las pruebas API 20 NE :

PRUEBA	SUBSTRATOS	REACCIÓN (48 HRS) ¹ (7)
NO ₂	Nitrato de potasio	-

TRP	Triptófano	-
GLU	Glucosa	+
ADH	Arginina	-
URE	Urea	Débil +
ESC	Esculina	-
GEL	Gelatina	Variable
PNG	p-nitro-fenil,-βD galactopiranosido	+
GLU	Glucosa	+
ARA	Arabinosa	Variable
MNE	Manosa	-
MAN	Manitol	+
NAG	N-acetil-glucosamina	+
MAL	Maltosa	-
GNT	Gluconato	Variable
CAP	Caprato	-
ADI	Adipato	-
MLT		+
CIT	Citrato	-
PAC	Fenil-acetato	-

1 Reacciones comunes al 70-90% de las cepas de *E. amylovora*. Puede haber variaciones en una o más pruebas.
