

## SÍNDROME ULCERANTE EPIZOÓTICO

---

### 1. **Ámbito de aplicación**

El síndrome ulcerante epizootico (SUE) se considera una infección por el oomiceto denominado *Aphanomyces invadans* (sinónimo de *A. piscicida*) y se caracteriza histológicamente por hifas penetrantes envueltas por inflamación granulomatosa. Es un trastorno epizootico de peces de agua dulce y de estuarios tanto salvajes como de piscifactorías.

### 2. **Información sobre la enfermedad**

#### 2.1. **Factores del agente**

##### 2.1.1. **El agente patógeno, cepas del agente**

El SUE es un trastorno epizootico estacional de gran importancia en peces de agua dulce y de estuarios tanto salvajes como de piscifactorías. Tiene una compleja etiología infecciosa y clínicamente se caracteriza por la presencia de una infección invasiva por *A. invadans* y lesiones ulcerantes necrotizantes, que suelen conllevar una respuesta granulomatosa. El SUE también se denomina enfermedad de las manchas rojas (EMR), granulomatosis micótica (GM) y micosis ulcerante (MU). En 2005, unos científicos propusieron que el SUE se denominara afanomicosis granulomatosa epizootica o AGE (Baldock *et al.*, 2005). No obstante, la mayoría de científicos han seguido utilizando el término SUE. El oomiceto que causa el SUE se denomina *Aphanomyces invadans*. El SUE que se ha propagado mucho desde el primer brote, que tuvo lugar en 1971 en Japón, y hasta ahora solo se ha documentado un genotipo. También se han asociado parásitos y rhabdovirus a brotes concretos, y las lesiones causadas por el SUE siempre presentan infección secundaria por bacterias gramnegativas.

El género *Aphanomyces* forma parte de un grupo de organismos comúnmente conocidos como hongos acuáticos. Aunque durante mucho tiempo se ha visto como un hongo debido a su característico crecimiento filamentosos, este grupo, el de los Oomicetida, no forma parte de los Eumycota, sino que se clasifican con las diatomeas y las algas marrones en un grupo denominado Stramenopiles o Chromista.

##### 2.1.2. **Supervivencia fuera del hospedador**

Todavía no está claro cómo *A. invadans* sobrevive fuera del hospedador. Si la zoospora móvil no puede hallar sustratos adecuados, se enquistada. No existe ningún método adecuado para recuperar ni aislar la zoospora enquistada en estanques de peces infectados por el SUE. Todavía no se sabe cuánto tiempo puede sobrevivir la espora enquistada en agua o en un sustrato distinto de los peces. En una prueba *in-vitro*, la zoospora enquistada sobrevivió al menos 19 días (Lilley *et al.*, 2001).

##### 2.1.3. **Estabilidad del agente patógeno (métodos eficaces de inactivación)**

*Aphanomyces invadans* crece mejor a 20-30°C; no crece *in-vitro* a 37°C. Una salinidad del agua superior a las 2 partes por mil (ppmil) puede detener la transmisión del agente. La preparación de estanques de peces mediante el secado al sol y la aplicación de cal constituyen métodos eficaces de desinfección frente al SUE. Como ocurre con otros oomicetos u hongos acuáticos, las sustancias químicas habitualmente utilizadas para la desinfección destruyen eficazmente todo *A. invadans* que pudiera contaminar piscifactorías, estanques o equipo de pesca.

##### 2.1.4. **Ciclo de vida**

*Aphanomyces invadans* (Saprolegniales, Oomicetos) tiene una estructura micelial tipo hongo no septado. Este oomiceto tiene dos formas de zoospora típicas. La zoospora primaria consiste en células redondas que se desarrollan dentro del esporangio. La zoospora primaria se libera a la punta del esporangio, donde forma una agrupación de esporas. Rápidamente se transforma en la zoospora secundaria, que es reniforme con células biflageladas lateralmente y puede nadar libremente en el agua. La zoospora secundaria permanece móvil durante un periodo que depende de las condiciones ambientales y la presencia del pez hospedador o sustrato. Lo habitual es que la zoospora se enquiste y germine

produciendo nuevas hifas, aunque los quistes pueden liberar generaciones terciarias de zoosporas (poliplanetismo) (Lilley *et al.*, 1998).

## 2.2. Factores del hospedador

### 2.2.1. Especies hospedadoras susceptibles

El SUE causa enfermedad y mortalidad en peces salvajes y de piscifactoría de todo el mundo. En unas 94 especies de peces se ha confirmado mediante diagnóstico histológico que están afectadas de forma natural por el SUE, como se muestra en la Tabla 2.1. Los casos sospechosos de infección natural por *A. invadans* en especies distintas de las de la lista deben notificarse de inmediato al Laboratorio de Referencia pertinente de la OIE, tanto si los signos clínicos se asocian a los hallazgos como si no. Algunos peces, como la carpa común (*Cyprinus carpio*), la tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*) y el sabalote (*Chanos chanos*), se han considerado resistentes naturales al SUE (Lilley *et al.*, 1998).

**Tabla 2.1.** Especies de peces susceptibles al SUE

Nombre científico	Nombre común	Nombre científico	Nombre común
<i>Acanthopagrus australis</i>	-	<i>Macquariaambigua</i>	perca dorada
<i>Acanthopagrus berda</i>	chopa	<i>Macquarianovemaculeata</i>	-
<i>Alosa sapidissima</i>	sábalo americano	<i>Marcusenius macrolepidotus</i>	-
<i>Ambassis agassiz</i>	-	<i>Melanotaenia splendida</i>	-
<i>Ameiurus melas</i>	bagre negro	<i>Micralestes acutidens</i>	-
<i>Ameiurus nebulosus</i>	bagre pardo	<i>Micropterus salmoides</i>	perca atruchada/perca americana
<i>Amniataba percoides</i>	-	<i>Mugil cephalus</i>	múgil
<i>Anabas testudineus</i>	-	<i>Mugil curema</i>	lisa criolla
<i>Archosargus probatocephalus</i>	sargo chopá	<i>Mugilidae</i> ( <i>Mugil</i> spp.; <i>Liza</i> spp.)	lisas
<i>Arius</i> sp.	-	<i>Myxus petard</i>	-
<i>Aseraggodes macleayanus</i>	-	<i>Nematalosa erebi</i>	-
<i>Bairdiellachrysa</i>	-	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	trucha arco iris
<i>Barbus peludinosus</i>	-	<i>Oreochromis andersoni</i>	-
<i>Barbus poechei</i>	-	<i>Oreochromis machrochir</i>	-
<i>Barbus thalakanensis</i>	-	<i>Osphronemus goramy</i>	gurami gigante
<i>Barbus unitaeniatus</i>	-	<i>Oxyeleotris lineolatus</i>	-
<i>Bidyanus bidyanus</i>	perca plateada	<i>Oxyeleotris marmoratus</i>	-
<i>Brevoortia tyrannus</i>	lacha tirana	<i>Petrocephalus catostoma</i>	-
<i>Brycinus lateralis</i>	-	<i>Platycephalus fuscus</i>	-
<i>Carassius auratus auratus</i>	pez rojo	<i>Plecoglossus altivelis</i>	ayu
<i>Catla catla</i>	-	<i>Pogonias cromis</i>	cortinón negro
<i>Channa marulius</i>	-	<i>Psettodes</i> sp.	lenguados
<i>Channa striatus</i>	-	<i>Puntius gonionotus</i>	barbo plateado de Tailandia
<i>Cirrhinus mrigala</i>	-	<i>Puntius sophore</i>	-
<i>Clarias gariepinus</i>	pez gato africano	<i>Rohteesp.</i>	-
<i>Clarias ngamensis</i>	-	<i>Sargochromis carlottae</i>	-
<i>Clarius batrachus</i>	-	<i>Sargochromis codringtonii</i>	-
<i>Colisa lalia</i>	-	<i>Sargochromis giardi</i>	-
<i>Esomus</i> sp.	-	<i>Scatophagus argus</i>	-
<i>Fluta alba</i>	anguila blanca	<i>Schilbe intermedius</i>	-
<i>Glossamia aprion</i>	-	<i>Schilbe mystus</i>	-
<i>Glossogobius giuris</i>	-	<i>Scleropages jardini</i>	saratoga
<i>Glossogobius</i> sp.	gobios	<i>Scortum barcoo</i>	-

**Tabla 2.1. cont.** Especies de peces susceptibles al SUE

Nombre científico	Nombre común	Nombre científico	Nombre común
<i>Helostomatemmincki</i>	gurami besador	<i>Selenotoca multifasciata</i>	striped scat
<i>Hepsetus odoe</i>	African pike	<i>Serranochromis angusticeps</i>	thinface largemouth
<i>Hydrocynus vittatus</i>	-	<i>Serranochromis robustus</i>	-
<i>Ictalurus punctatus</i>	bagre del canal	<i>Sillago ciliata</i>	-
<i>Kurtus gulliveri</i>	-	<i>Siluridae (genus)</i>	-
<i>Labeo cylindricus</i>	-	<i>Strongylura krefftii</i>	-
<i>Labeo lunatus</i>	-	<i>Therapon sp.</i>	-
<i>Labeo rohita</i>	-	<i>Tilapia rendalli</i>	-
<i>Lates calcarifer</i>	perca gigante	<i>Tilapia sparrmanii</i>	-
<i>Leiopotherapon unicolor</i>	-	<i>Toxotes chatareus</i>	-
<i>Lepomis macrochirus</i>	-	<i>Toxotes lorentzi</i>	-
<i>Lutjanus argentimaculatus</i>	-	<i>Trichogaster pectoralis</i>	-
<i>Macchullochellapeelii</i>	bacalao de Murray	<i>Trichogaster trichopterus</i>	-
<i>Maccullochelaikei</i>	-	<i>Tridentiger obscures obscures</i>	-

### 2.2.2. Fases susceptibles de la vida del hospedador

Los estadios susceptibles de la vida de los peces en general son el juvenil y el adulto joven. No se ha notificado SUE ni en alevines ni en larvas.

Una inyección experimental de *A. invadans* en ejemplares de un año de carpas mayores de la India, *Catla catla*, rohus y mrigales, presentaron resistencia al SUE (Pradhan *et al.*, 2007), aunque son especies susceptibles por naturaleza. En infecciones experimentales se ha observado que el pez rojo es susceptible (Hatai *et al.*, 1977; 1994), pero que la carpa (Wada *et al.*, 1996), la tilapia (Khan *et al.*, 1998) y la anguila, *Anguilla anguilla* (Oidtmann *et al.*, 2008) son resistentes.

### 2.2.3. Especies o subpoblaciones predilectas (probabilidad de detección)

El SUE puede detectarse con facilidad en ejemplares de peces enfermos obtenidos de zonas infectadas por el SUE utilizando técnicas histológicas. Sin embargo, *Aphanomyces* se puede aislar solo de peces con signos clínicos leves o moderados de SUE, que presenten puntos rojos o pequeñas úlceras. Los peces con signos clínicos graves o grandes úlceras no son adecuados para el aislamiento.

### 2.2.4. Órganos diana y tejidos infectados

La zoospora móvil desempeña un importante papel en la transmisión de la enfermedad. Una vez la esporo móvil se adhiere a la piel del pez, germina en condiciones estables y sus hifas invaden la piel del pez y el tejido muscular, hasta llegar a los órganos internos. El músculo esquelético es el órgano diana y presenta signos clínicos de SUE con granulomas micóticos.

### 2.2.5. Infección persistente con portadores de por vida

No se dispone de información que indique que los peces pueden ser portadores de por vida de *A. invadans*. En general, la mayoría de peces infectados mueren durante los brotes. Aunque algunos peces infectados por SUE de forma leve o moderada puede recuperarse, es improbable que sean portadores de por vida.

### 2.2.6. Vectores

No se dispone de datos.

### 2.2.7. Animales acuáticos salvajes portadores o sospechosos de serlo

No se dispone de datos.

## 2.3. Patrón de la enfermedad

### 2.3.1. Mecanismos de transmisión

El SUE se transmite horizontalmente. Las zoosporas de *Aphanomyces* se pueden transmitir horizontalmente entre peces por el suministro de agua. Se considera que solo las zoosporas secundarias o las zoosporas en fase de natación libre son capaces de adherirse a la piel dañada de los peces y germinar formando hifas. Si las zoosporas secundarias no hallan la especie susceptible o se encuentran con condiciones desfavorables, pueden enquistarse en el ambiente del estanque. Los quistes pueden esperar las condiciones que favorezcan su transformación en generaciones terciarias de zoosporas que también están en la fase de natación libre. La propiedad del agente patógeno *Aphanomyces* de enquistarse puede desempeñar un importante papel en el ciclo de brotes en zonas endémicas.

### 2.3.2. Prevalencia

La prevalencia del SUE en la naturaleza y en las piscifactorías puede ser alta en las zonas endémicas cuando se observan altos niveles de mortalidad, pero puede variar considerablemente. Se dispone de muy pocos datos sobre la prevalencia de la enfermedad o la infección en otros momentos. El intercambio de agua no controlado entre piscifactorías de zonas endémicas dará lugar a brotes de SUE en la mayoría de las piscifactorías que crían especies de peces susceptibles.

### 2.3.3. Distribución geográfica

El SUE se notificó por primera vez en ayu (*Plecoglossus altivelis*) de piscifactoría en la Prefectura de Oita, isla de Kyushu, Japón en 1971 (Egusa y Masuda, 1971). Más adelante se notificó en peces de estuario, en concreto en mágiles (*Mugil cephalus*) en el este de Australia en 1972 (Fraser *et al.*, 1992; McKenzie y Hall, 1976). El SUE se ha extendido mucho por Nueva Guinea de Papua hacia el sureste y el sur de Asia, y hacia el oeste de Asia, donde ha llegado a Pakistán (Lilley *et al.*, 1998; Tonguthai, 1985). Los brotes de la enfermedad ulcerante en lacha tirana (*Brevoortia tyrannus*) en EE.UU. estuvieron causados por el mismo agente etiológico que el SUE de Asia (Blazer *et al.*, 1999; Lilley *et al.*, 1997a; Vandersea *et al.*, 2006). Los primeros brotes confirmados en África tuvieron lugar en 2007 en Botswana, Namibia y Zambia, y estaban conectados al sistema fluvial Zambezi-Chobe (FAO, 2009). Recientemente, en 2010 y en 2011, el SUE ha aparecido en peces de agua dulce salvajes de la Provincia del Cabo Oeste, en Sudáfrica y en bagres pardos salvajes en el Lago de Ontario, en Canadá. El SUE se ha notificado en más de 20 países de cuatro continentes: Norteamérica, el sur de África, Asia y Australia.

### 2.3.4. Mortalidad y morbilidad

Cuando el SUE se transmite a un estanque de piscifactoría, como un estanque de ofiocéfalos, pueden observarse una alta morbilidad (>50%) y mortalidad (>50%) en los años de largas estaciones frías, con temperaturas de entre 18 y 22°C. No obstante, la mortalidad y la morbilidad pueden variar en gran medida en función de las especies de peces. Algunos peces infectados se pueden recuperar cuando termina la estación fría.

### 2.3.5. Factores ambientales

El SUE tiene lugar principalmente a temperaturas del agua de entre los 18°C y los 22°C y tras periodos intensamente lluviosos (Bondad-Reantaso *et al.*, 1992). Estas condiciones favorecen la esporulación de *A. invadans* (Lumanlan-Mayo *et al.*, 1997), y se ha observado que las temperaturas de 17-19°C retrasan la respuesta inflamatoria de los peces ante la infección por oomicetos (Catap y Munday, 1998; Chinabut *et al.*, 1995). En algunos países, aparecen brotes en peces salvajes en primer lugar y a continuación se transmiten a estanques de piscifactorías. Normalmente, una infección por baño de *A. invadans* en especies de peces susceptibles no da lugar a signos clínicos de la enfermedad. El oomiceto *Aphanomyces* necesita factores predisponentes que conllevan lesiones cutáneas, como infecciones parasitarias, bacterianas o víricas o agua ácida, para iniciar los signos clínicos del SUE (Lilley *et al.*, 1998).

El SUE se ha notificado en más de 20 países de cuatro continentes. Los desplazamientos de peces ornamentales vivos procedentes de países infectados por el SUE podrían extender la enfermedad, como ocurrió con el brote de Sri Lanka (Balasuriya, 1994). Las inundaciones también causaron la diseminación del SUE en Bangladesh y en Pakistán (Lilley *et al.*, 1998). Una vez aparece un brote en ríos/canales, la enfermedad se puede extender tanto río abajo como río arriba a donde haya especies de peces susceptibles. Garantizar que el agua de ríos infectados no entre en contacto con los estanques de las piscifactorías podría prevenir la transmisión del SUE.

## 2.4. Control y prevención

### 2.4.1. Vacunación

No se dispone de ninguna vacuna protectora. Sin embargo, los ofiocéfalos que han sido inmunizados con un extracto crudo de *A. invadans* desarrollan una respuesta inmunitaria humoral, según se ha detectado mediante SDS-PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico) y análisis mediante inmunoelectrotransferencia (Thompson *et al.*, 1997).

### 2.4.2. Tratamiento con sustancias químicas

No existe ningún tratamiento eficaz para los peces infectados por el SUE en la naturaleza o en estanques de piscifactoría. Para minimizar las pérdidas de peces en estanques de peces infectados, debe detenerse el intercambio de agua y aplicarse un tratamiento con cal o cal deshidratada y/o sal (Lilley *et al.*, 1998). Los intentos de utilizar agua verde, cenizas, cal y semillas o ramas de margosa (*Azadirachta indica*) para los tratamientos profilácticos de peces infectados por SUE en estanques de piscifactorías han dado varios resultados (Inland Aquatic Animal Health Research Institute [AAHRI], Tailandia, informe interno, 2001).

### 2.4.3. Inmunoestimulación

En pruebas preliminares se ha observado que la inyección intraperitoneal del inmunoestimulante, Salar-bec (que contiene 300 g kg<sup>-1</sup> de vitamina C, 150 g kg<sup>-1</sup> de vitamina B y cantidades muy pequeñas de las vitaminas B1, B2, B6 y B12), en peces ofiocéfalos puede aumentar la inhibición sérica tanto de la germinación como del crecimiento de la zoospora *in vitro*. Peces ofiocéfalos alimentados con un alimento granulado normal y alimento suplementado con Salar-bec siguieron presentando signos clínicos de SUE tras exponerlos a *A. invadans*. Sin embargo, los peces ofiocéfalos que recibieron el inmunoestimulante, Salar-bec, presentaron un porcentaje de supervivencia de un 59,2% más alto que el del grupo control, alimentado con alimento normal (Miles *et al.*, 2001).

### 2.4.4. Selección genética a favor de la resistencia

No se dispone de datos.

### 2.4.5. Repoblación con especies resistentes

Se ha observado que algunas especies de piscifactoría importantes, como la tilapia del Nilo, el sabalote y la carpa china son resistentes al SUE y podrían criarse en zonas endémicas. Se recomienda la introducción de especies de peces autóctonas resistentes.

### 2.4.6. Agentes bloqueantes

No se dispone de datos.

### 2.4.7. Desinfección de huevos y larvas

La desinfección sistemática de huevos y larvas de peces como medida contra los hongos acuáticos es igual de eficaz contra *A. invadans*. Hay que tener en cuenta que no existe ningún informe de la presencia de *A. invadans* en huevos ni larvas de peces.

### 2.4.8. Prácticas generales de manejo

El control del SUE en aguas naturales es probablemente imposible. En brotes que tienen lugar en masas de agua pequeñas y cerradas o en estanques de piscifactorías, la aplicación de cal agrícola al aguay la mejora de la calidad del agua, junto con la retirada de los peces infectados, a menudo es eficaz para reducir las mortalidades y controlar la enfermedad. Garantizar que no se produzcan fugas de agua de zonas infectadas con el SUE hacia estanques de piscifactorías es una práctica normal que previene fácilmente la transmisión del SUE a las piscifactorías. El cloruro de sodio o sal, y la cal agrícola son sustancias químicas seguras y eficaces para tratar o prevenir la transmisión del SUE.

## 3. Obtención de muestras

### 3.1. Elección de ejemplares

La red de copo, el esparavel o el aparejo de cerca son las mejores opciones para la captura de peces infectados por el SUE en aguas naturales o estanques de piscifactorías. A efectos de investigación de los brotes, deben obtenerse peces enfermos con lesiones ulcerantes o puntos rojos en el cuerpo.

### 3.2. Conservación de las muestras para su envío

Los peces obtenidos deben transportarse al laboratorio vivo o en cajas enfriadas con hielo, con vistas a ser analizados. Los peces obtenidos de zonas alejadas deben anestesiarse y pueden fijarse en formalina normal al 10% o en formalina tamponada con fosfato al 10% durante al menos 1-2 días. Los ejemplares fijados se transfieren a continuación a bolsas de plástico de doble capa con papel de cocina humedecido con formalina. Las bolsas se sellan y se envían al laboratorio en condiciones de semi-sequedad.

### 3.3. Combinación de varias muestras

Se obtienen diez peces enfermos del lugar infectado por el SUE. El diagnóstico se lleva a cabo mediante la técnica histológica y el aislamiento del oomiceto en un solo pez o en un grupo de unos pocos peces.

### 3.4. Órganos y tejidos de elección

Lo recomendable es escoger peces con signos clínicos menores, y el tejido muscular adyacente o situado bajo la úlcera es el mejor para el aislamiento del oomiceto. El mejor tejido para el examen histopatológico es el tejido muscular situado en el borde de las úlceras.

### 3.5. Muestras/tejidos que no son adecuados

Los peces gravemente enfermos o muertos no son adecuados para el aislamiento de oomicetos.

## 4. Métodos de diagnóstico

El diagnóstico del SUE en peces clínicamente afectados puede lograrse mediante histopatología, mediante el aislamiento de oomicetos o mediante amplificación por reacción en cadena de la polimerasa.

### 4.1. Métodos de diagnóstico de campo

Los brotes de SUE se han asociado a mortalidad masiva de distintas especies de peces de agua dulce en la naturaleza (incluidos campos de arroz, estuarios, lagos y ríos) y de piscifactoría durante periodos de bajas temperaturas y tras periodos de intensas lluvias.

#### 4.1.1. Signos clínicos

Los peces suelen desarrollar puntos rojos o lesiones ulcerantes pequeñas a grandes en el cuerpo.

#### 4.1.2. Alteraciones del comportamiento

Los primeros signos de la enfermedad son una pérdida del apetito y un color oscuro que adquieren los peces. Los peces infectados pueden flotar cerca de la superficie del agua, y volverse hiperactivos con un patrón de movimiento muy entrecortado.

### 4.2. Métodos clínicos

#### 4.2.1. Anatomopatología macroscópica

Pueden observarse puntos rojos en la superficie corporal, la cabeza, el opérculo o el pedúnculo caudal. Se observan úlceras grandes y poco profundas de color rojo o gris, a menudo con una necrosis marrón, en las fases más tardías. Aparecen lesiones superficiales grandes en el flanco o el dorso. La mayoría de especies distintas de *Channa striata* o lisas mueren en esta fase. En especies muy susceptibles, como los oficéfalos, las lesiones son más extensas y pueden conllevar una erosión completa de la parte posterior del cuerpo, o la necrosis de tejidos tanto blandos como duros del cráneo, de modo que el encéfalo está expuesto en el animal vivo.

#### 4.2.2. Bioquímica clínica

No se dispone de información.

#### 4.2.3. Anatomopatología microscópica

Las primeras lesiones por SUE están causadas por una dermatitis eritematosa sin intervención evidente de oomicetos. Se observan hifas de *Aphanomyces invadans* creciendo en el músculo esquelético a

medida que la lesión avanza pasando de ser una dermatitis activa crónica leve a una dermatitis granulomatosa necrotizante grave localmente extensa con grave degeneración flocular del músculo. El oomiceto desencadena una fuerte respuesta inflamatoria y se forman granulomas alrededor de las hifas penetrantes. Los raspados de lesiones del cuerpo del pez o de las úlceras en general ponen de manifiesto infección fúngicas, bacterianas y/o parasitarias secundarias.

#### 4.2.4. Preparaciones húmedas

No son adecuadas para el diagnóstico del SUE.

#### 4.2.5. Frotis

No son adecuados para el diagnóstico del SUE.

#### 4.2.6. Microscopía electrónica/citopatología

No son adecuadas para el diagnóstico del SUE.

### 4.3. Métodos de detección e identificación del agente

#### 4.3.1. Métodos directos de detección

##### 4.3.1.1. Métodos microscópicos

La preparación de aplastamiento puede llevarse a cabo del siguiente modo:

- i) Se retira la superficie de la úlcera mediante una hoja de bisturí.
- ii) Se corta el tejido muscular del borde de la úlcera.
- iii) Se colocan los trozos de tejido sobre una tabla de cortar y a continuación se realizan cortes mediante una hoja de bisturí.
- iv) Se colocan los finos cortes de tejido entre dos portas y se presionan suavemente con los dedos.
- v) Se retira uno de los portas y se cubre el tejido con un cubreobjetos. Se observa al microscopio óptico para hallar las hifas no septadas de *A. invadans* (de 12-25 µm de diámetro).

##### 4.3.1.1.1. Preparaciones húmedas

No son adecuadas para el diagnóstico del SUE.

##### 4.3.1.1.2. Frotis

No son adecuados para el diagnóstico del SUE.

##### 4.3.1.1.3. Cortes fijados

Procedimiento de la toma de muestras

- i) Se escogen solo ejemplares vivos o moribundos de peces con lesiones clínicas.
- ii) Se toman muestras de piel/músculo (<1 cm<sup>3</sup>), incluido el borde de la lesión más cercano a la misma y el tejido circundante.
- iii) Se fijan los tejidos de inmediato en formalina al 10%. La cantidad de formalina debe ser 10 veces el volumen del tejido a fijar.

##### Procedimiento histológico

El procesado del tejido fijado consiste en la deshidratación mediante disoluciones ascendentes de alcohol, lavado en un agente miscible en cera e impregnación con cera. Se realizan cortes de los bloques de tejido de pez de unos 5 µm de espesor y se montan sobre un porta de vidrio. Antes de teñirlo, el corte debe estar completamente desprovisto de cera, y a continuación se tiñe con hematoxilina y eosina (H/E) (Chinabut y Roberts, 1999). La tinción H/E y las tinciones fúngicas generales (como la de Grocott) ponen de manifiesto los típicos granulomas e hifas invasivas.

#### 4.3.1.2. Aislamiento e identificación del agente

##### 4.3.1.2.1 Aislamiento de *Aphanomyces invadans* de tejidos internos

A continuación se describen dos métodos de aislamiento de *A. invadans* o *A. piscicida* adaptados de Lilley *et al.*, 1998 y Willoughby y Roberts, 1994.

**Método 1:** Las lesiones dérmicas moderadas, de color claro y con relieve son las más adecuadas para los intentos de aislamiento de oomicetos. Se retiran las escamas de la periferia de la lesión y se quema la piel subyacente con una espátula al rojo vivo como si se quisiera esterilizar la superficie. Mediante una hoja de bisturí y unas pinzas de punta fina estériles, se corta la capa subyacente a la zona quemada y, cortando horizontalmente y apartando los tejidos superficiales, se expone el músculo subyacente. Es necesario asegurarse de que los instrumentos no entren en contacto con la superficie externa contaminada, para evitar que se contamine el músculo subyacente. Mediante técnicas asépticas, se toman cuidadosamente trozos de músculo afectado, de unos 2 mm<sup>3</sup>, y se depositan en una placa de Petri que contenga agar de glucosa/pectosa (GP) (véase la Tabla 4.1) con penicilina (100 unidades ml<sup>-1</sup>) y estreptomycin (100 µg ml<sup>-1</sup>). Se sellan las placas, se incuban a temperatura ambiente o a 25°C y se examinan a diario. Se repite la transferencia de puntas de hifas emergentes a placas limpias de agar GP con antibióticos hasta que los cultivos estén libres de contaminación.

**Método 2:** Las lesiones situadas en el flanco o la cola del pez <20 cm de longitud se pueden muestrear cortando el pez en dos con un bisturí, y realizando un corte transversal del pez a la altura del borde de la lesión. Se aplica llama al bisturí hasta que esté al rojo vivo y se utiliza para esterilizar la superficie de músculo expuesta. Se utiliza una hoja de bisturí pequeña estéril para cortar un bloque circular de músculo (de 2–4 mm<sup>3</sup>) desde debajo de la lesión y se coloca en una placa de Petri con medio GP (véase la Tabla 4.1) con 100 unidades ml<sup>-1</sup> de penicilina G y 100 µg ml<sup>-1</sup> de estreptomycin. Los instrumentos no pueden contactar con la superficie externa contaminada del pez. Se incuban los medios inoculados a unos 25°C y se examinan al microscopio (preferiblemente un microscopio invertido) en un plazo de 12 horas. Se repite la transferencia de puntas de hifas emergentes a placas de medio GP con 12 g/litro de agar técnico, 100 unidades/ml de penicilina G y 100 µg/ml de estreptomycin hasta que se obtengan cultivos axénicos. La cepa de oomiceto también se puede mantener a 25°C en agar GY (véase la Tabla 4.1) y transferirse a un tubo nuevo de agar GY una vez cada 1-2 semanas (Hatai y Egusa, 1979).

#### 4.3.1.2.2. Identificación de *Aphanomyces invadans*

*Aphanomyces invadans* no produce estructuras sexuales y, por tanto, no debe diagnosticarse por meros criterios morfológicos. Sin embargo, los oomicetos se pueden identificar hasta nivel de género induciendo esporogénesis y poniendo de manifiesto las características asexuales típicas de *Aphanomyces*, como describen Lilley *et al.*, 1998. *A. invadans* tiene un crecimiento característicamente lento en cultivo y no crece a 37°C en agar GPY (Tabla 4.1). Los datos sobre los perfiles de temperatura-crecimiento son los indicados por Lilley y Roberts, 1997. Para confirmar *A. invadans* existen dos posibles procedimientos, el bioanálisis y la amplificación del ADN de *A. invadans* mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

#### 4.3.1.2.3. Inducción de la esporulación en cultivos de *Aphanomyces invadans*

La inducción de estructuras reproductivas asexuales es necesaria para identificar cultivos con oomicetos como miembros del género *Aphanomyces*. Para inducir esporulación, se coloca un tapón de agar (de 3-4 mm de diámetro) de micelio en crecimiento activo en una placa de Petri que contenga caldo GPY y se incuba 4 días a unos 20°C. Se lava para retirar el agar de la alfombra resultante mediante una transferencia secuencial por cinco placas de Petri que contengan agua de estanque esterilizada en autoclave (Tabla 4.1), y se deja toda la noche a 20°C en agua de estanque esterilizada en autoclave. Tras unas 12 horas, al microscopio debería observarse la formación de agrupaciones acioideas de quistes primarios y la liberación de zoosporas secundarias móviles.

#### 4.3.1.2.4. Bioanálisis

Los peces se pueden infectar experimentalmente mediante la inyección intramuscular de una suspensión de 0,1 ml de zoosporas móviles 100+ en peces susceptibles al SUE (preferiblemente *Channa striata* u otras especies de peces susceptibles) a 20°C, y revelando el crecimiento histológico de hifas no septadas, de 12-25 µm de diámetro en el músculo de peces obtenidos 7 días después, y de granulomas micóticos típicos en el músculo de peces obtenidos 10-14 días después.

#### 4.3.1.2.5. Métodos de detección de antígeno basados en anticuerpos

Los anticuerpos policlonales contra *A. invadans* o *Aphanomyces* saprófitos presentaron reactividad cruzada entre ellos al utilizar electroforesis en gel de proteína y análisis mediante inmunoelectrotransferencia e inmunohistoquímica (Lilley *et al.*, 1997b). Sin embargo, los anticuerpos monoclonales específicos contra *A. invadans* desarrollados más tarde se observó que tenían una alta especificidad y sensibilidad frente a *Aphanomyces* del SUE al utilizar inmunofluorescencia. Este anticuerpo monoclonal permitía detectar las hifas de *Aphanomyces* en el primer estadio de la infección por el SUE (Miles *et al.*, 2003).



## 4.3.1.2.6. Técnicas moleculares

4.3.1.2.6.1. Amplificación del ADN de *A. invadans* mediante la reacción en cadena de la polimerasa*Preparación del ADN de la cepa de A. invadans*

Se extrae ADN de una colonia en crecimiento activo de un cultivo de *A. invadans* en caldo GY aproximadamente a los 4 días o cuando los micelios jóvenes alcancen los 0,5-1,0 cm de diámetro. Los micelios se transfieren a placas de Petri estériles de unos 100 mm, se lavan dos veces con PBS y a continuación se colocan sobre papel de cocina para retirar el líquido. Las puntas de las hifas (~50–250 mg) se parten con una hoja de bisturí y se transfieren a un tubo de microcentrifuga de 1,5 ml para la extracción del ADN. Se han utilizado kits comerciales de extracción de ADN con éxito (Phadee *et al.*, 2004b; Vandersea *et al.*, 2006).

*Preparación de ADN a partir de tejido infectado por el SUE*

Trozos pequeños de tejido infectado por el SUE de 25-50 mg son adecuados para las extracciones de ADN (Phadee *et al.*, 2004a).

*Técnica de diagnóstico mediante PCR*

Dos técnicas recientemente publicadas son más específicas para *A. invadans*. En la reacción PCR se recomienda utilizar agua ultrapura para todas las diluciones químicas.

*Método 1:* El cebador directo específico de especie está situado cerca del extremo 3' del gen de la SSU (subunidad pequeña) y un cebador inverso específico de especie está situado en la región ITS1 para Ainvad-2F (5'-TCA-TTG-TGA-GTG-AAA-CGG-TG-3') e Ainvad-ITSR1 (5'-GGC-TAA-GGT-TTC-AGT-ATG-TAG-3'). La mezcla para la PCR contenía cada cebador a una concentración 25 pM, cada desoxinucleósido trifosfato a una concentración 2,5 mM, 0,5 U de ADN polimerasa *Taq* Platinum y 20 ng de ADN genómico (de una cepa de *Aphanomyces* o de tejido infectado) hasta un volumen total de 50 µl. El ADN se amplifica que un termociclador en las siguientes condiciones de ciclado: 2 minutos a 95°C; 35 ciclos, cada uno de 30 segundos a 95°C, 45 segundos a 56°C, 2,5 minutos a 72°C, y una extensión final de 5 minutos a 72°C. El producto de la PCR se analiza mediante electroforesis en gel de agarosa y el producto diana es de 234 pb (Vandersea *et al.*, 2006).

*Método 2:* Los lugares de los cebadores específicos de especie se sitúan en las regiones ITS1 e ITS2. El cebador directo es ITS11 (5'-GCC-GAA-GTT-TCG-CAA-GAA-AC-3') y el inverso es ITS23 (5'-CGT-ATA-GAC-ACA-AGC-ACA-CCA-3'). La mezcla para PCR contiene cada cebador a una concentración 0,5 µM, cada desoxinucleósido trifosfato a una concentración 0,2 mM, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, 0,6 U de ADN polimerasa *Taq* y 20 ng de ADN genómico (de la cepa de *Aphanomyces*) para un volumen total de 25 µl. El ADN se amplifica en las siguientes condiciones de ciclado: 5 minutos a 94°C; 25 ciclos, cada uno de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 65°C, 1 minuto a 72°C; y una extensión final de 5 minutos a 72°C. El producto de la PCR se analiza mediante electroforesis en gel de agarosa y el producto diana es de 550 pb. La amplificación mediante PCR utilizando ADN molde del tejido infectado es similar al protocolo anterior excepto por el hecho de que se utiliza 5 ng de ADN molde para 35 ciclos (Phadee *et al.*, 2004b).

*Método 3:* Los cebadores específicos de especie están situados en las regiones ITS1 e ITS2. El cebador directo es BO73 (5'-CTT-GTG-CTG-AGC-TCA-CAC-TC-3') and the reverse is BO639 (5'-ACA-CCA-GAT-TAC-ACT-ATC-TC-3'). La mezcla para PCR contiene 0,6 µM de cada cebador, desoxinucleósido trifosfato 0,2 mM, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, 0,625 unidades de ADN polimerasa *Taq* y unos 5 ng de ADN genómico (o 2,5 µl de ADN molde extraído de 25 mg de tejido infectado y suspendido en 100 µl de tampón) en un volumen de reacción de 50 µl (Oidtmann *et al.*, 2008). El ADN se amplifica en las siguientes condiciones de ciclado: 96°C durante 5 minutos; 35 ciclos de 1 minuto a 96°C, 1 minuto a 58°C y 1 minuto a 72°C; seguido de una extensión final a 72°C durante 5 minutos (Oidtmann, comunicación personal). El producto de la PCR se analiza mediante electroforesis en gel de agarosa y el producto diana es de 564 pb.

Todas las cepas de *A. invadans* halladas hasta ahora corresponden a un solo genotipo, y esto facilita la identificación. Como alternativa, puede llevarse a cabo la secuenciación de los productos de la PCR y los resultados se pueden comparar con la secuencia depositada en los bancos públicos de datos de genes. Ambos oomicetos patógenos se pueden diferenciar mediante técnicas moleculares (Diéguez-Urbeondo *et al.*, 2009; Lilley *et al.*, 2003; Phadee *et al.*, 2004b; Vandersea *et al.*, 2006).

4.3.1.2.6.2. Hibridación *in-situ* fluorescente de péptido de ácido nucleico (FISH)

Una técnica de hibridación fluorescente *in-situ* de péptido de ácido nucleico (FISH) ha demostrado una alta especificidad por *A. invadans*. La técnica permite detectar directamente la estructura tipo miceliar de los oomicetos en cortes finos de tejidos de órganos afectados de peces susceptibles. La sonda de fluoresceína (FLU) diseñada para hibridar la subunidad pequeña del ARNr de *A. invadans* (pb del 621 al 635; código de acceso al GenBank AF396684) es 5'-FLU-GTA-CTG-ACA-TTT-CGT-3' o Ainv-FLU3.

El tejido afectado por SUE se fija e hibrida cuanto antes una vez obtenidos los peces, con el fin de minimizar la degradación del ARN. El tejido (de unos 20 mg) se disecciona desde la periferia de las lesiones con hojas de bisturí estériles y se coloca en pocillos individuales de una placa de microtitulación de 24 pocillos. Se añade 1 ml de fijador salino con etanol (44 ml de etanol al 95%, 10 ml de H<sub>2</sub>O, y 6 ml de tampón SET 25x [NaCl 3,75 M, EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) 25 mM, Tris/HCl 0,5 M, pH 7,8]) que contiene Monolaurato de sorbitán polioxi-etileno (Tween 20) al 3% para potenciar la permeabilización del tejido. La placa de microtitulación se agita suavemente a temperatura ambiente en un agitador de placas (a 30 rpm) durante 1 hora y media. Los tejidos fijados se lavan (dos veces 15 minutos cada vez) con 0,5 ml de tampón de hibridación (SET 5x, Igepal-CA630 al 0,1% [v/v] y poly[A] a razón de 25 µg ml<sup>-1</sup>) que contenga Tween 20 al 3%. El tampón de hibridación se retira, y los tejidos se vuelven a suspender en 0,5 ml de tampón de hibridación que contenga Tween 20 al 3% y sonda Ainv-FLU3 100 nM. Se incuban muestras control "sin sonda" con 0,5 ml de tampón de hibridación/Tween 20 al 3%. Todos los tejidos se incuban a 60°C 1 hora en oscuridad. Tras la incubación, los tejidos se lavan dos veces con 1 ml de tampón SET 5x precalentado (a 60°C) que contenga un 3% de Tween 20 para eliminar la sonda residual. Las muestras de tejido se montan sobre portas de microscopio recubiertos de poli-L-lisina. Se instila una gota de la solución Antifade para microscopía óptica sobre las muestras, que a continuación se cubren con un cubreobjetos. Los análisis se llevan a cabo mediante microscopía óptica y de epifluorescencia. Los ajustes de la cámara y del microscopio se mantienen constantes para que puedan realizarse análisis comparativos de la intensidad de la fluorescencia entre muestras con sonda y muestras sin sonda. Las hifas de los oomicetos fluorescentes emiten una fluorescencia verde sobre el fondo de tejido oscuro. Los protocolos explicados son los publicados por Vandersea *et al.* (2006). Utilizando la técnica de FISH, *A. invadans* se visualiza mucho mejor en cortes finos de tejido que en los aplastamientos recientes de tejido.

**Tabla 4.1.** Medios para el aislamiento, crecimiento y esporulación en cultivos de *Aphanomyces invadans*

Medio de GP (glucosa/peptona)	Caldo GPY (glucosa/peptona/ levadura)	Agar GPY	Agar GY	Agua de estanque esterilizada en autoclave
glucosa 3 g litro <sup>-1</sup> peptona 1 g litro <sup>-1</sup> MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O 0,128 g litro <sup>-1</sup> KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,014 g litro <sup>-1</sup> CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O 0,029 g litro <sup>-1</sup> FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O 2,4 mg litro <sup>-1</sup> MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O 1,8 mg litro <sup>-1</sup> CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O 3,9 mg litro <sup>-1</sup> ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O 0,4 mg litro <sup>-1</sup>	Caldo GP + extracto de levadura 0,5 g litro <sup>-1</sup>	Caldo GPY + agar técnico 12 g litro <sup>-1</sup>	Glucosa 1%, extracto de levadura 0,25%, agar 1,5%	Muestra de agua de estanque o lago que se sepa que es adecuada para el crecimiento de oomicetos. Se filtra por un papel de filtro Whatman 541. Se mezcla una parte de agua de estanque con dos partes de agua destilada y se esteriliza en autoclave. pH a 6–7.

4.3.1.2.7. Purificación del agente

Es necesario mantener *A. invadans* en el cultivo axénico. Dado que se caracteriza por un crecimiento lento, resulta fácilmente contaminado por otros microorganismos, como bacterias y otros oomicetos de crecimiento rápido y hongos. Los intentos de purificar o aislar *A. invadans* de cultivos contaminados suelen fracasar.

#### 4.3.2. Métodos serológicos

Los métodos serológicos para la detección e identificación de *A. invadans* en muestras de SUE no son prácticos. Si es necesario se puede recurrir a los anticuerpos monoclonales, que ofrecen una mejor especificidad y sensibilidad que los policlonales para la detección serológica o identificación de *A. invadans* en muestras de ejemplares enfermos o en cepas patógenas.

### 5. Idoneidad de las pruebas para cada uso previsto

Los métodos actualmente disponibles para la vigilancia dirigida, la detección y el diagnóstico del SUE se detallan en la Tabla 5.1. Las denominaciones utilizadas en la Tabla indican: a = el método es el recomendado por razones de disponibilidad, utilidad y especificidad y sensibilidad de diagnóstico; b= el método es estándar con buena sensibilidad y especificidad de diagnóstico; c= el método tiene aplicación en algunas situaciones, pero el coste, la precisión u otros factores limitan seriamente su aplicación; y d= el método no se recomienda actualmente para este fin. Esta clasificación es de alguna forma subjetiva ya que la idoneidad implica cuestiones de fiabilidad, sensibilidad, especificidad y utilidad. Aunque no todas las pruebas incluidas en las categorías a o b se han sometido a estandarización y validación formales, su naturaleza sistemática y el hecho de que se hayan usado generalmente sin resultados dudosos las hace aceptables.

**Tabla 5.1. Métodos de vigilancia dirigida y diagnóstico**

Método	Vigilancia dirigida			Diagnóstico provisional	Diagnóstico confirmativo
	Alevinos	Juveniles	Adultos		
Signos macroscópicos	c	c	c	b	c
MO directa; observación de las hifas de los oomicetos en aplastamientos de tejidos frescos	d	d	d	b	b
FISH; observación de las hifas de los oomicetos en tejidos	d	d	d	a	a
Histopatología	c	c	c	a	a
Aislamiento de <i>A. invadans</i> e identificación confirmativa mediante bioanálisis o PCR	d	d	d	a	a
PCR de extractos de tejido	d	d	d	a	a
Análisis de la secuencia	d	d	d	d	a
Observación de tejidos mediante ME de transmisión	d	d	d	d	d

MO = microscopía óptica; FISH = hibridación fluorescente *in-situ* de péptido de ácido nucleico; PCR = reacción en cadena de la polimerasa; ME = microscopía electrónica.

### 6. Prueba(s) recomendada(s) para la vigilancia dirigida destinada a declarar la ausencia del síndrome ulcerante epizoótico

La prueba de vigilancia dirigida destinada a declarar la ausencia del SUE es el examen de los signos macroscópicos. La vigilancia dirigida se lleva a cabo dos veces al año para cubrir determinadas variaciones estacionales, al menos una vez durante la estación que favorece la aparición del SUE, o cuando las temperaturas del agua son de entre 18 y 25°C. Deben implementarse medidas de bioseguridad para mantener un estatus libre de enfermedad en instalaciones o compartimientos de acuicultura controlados.

Mediante la observación de los signos macroscópicos como método de vigilancia dirigida, debe examinarse un gran número de peces sin matarlos. Deben tomarse muestras de peces de piscifactorías, de compartimientos o de masas naturales de agua cuidadosamente con equipo de pesca o redes adecuadas. Los tamaños de muestra apropiados se basarán en los datos descritos en la *Guía de la OIE para la Vigilancia Sanitaria de los Animales Acuáticos* (2009).

Una vez los peces presentan signos macroscópicos similares a los del SUE, deben clasificarse como peces sospechosos de SUE, y el lugar/piscifactoría/compartimiento/zona deberá considerarse sospechoso. Las muestras sospechosas deben analizarse en mayor detalle mediante los métodos mencionados en el apartado sobre diagnóstico provisional, y a continuación el diagnóstico se confirmará como se describe en la Tabla 5.1.

## 7. Criterios de diagnóstico confirmativo

### 7.1. Definición de caso sospechoso

Un caso sospechoso de SUE se define como la presencia de signos clínicos característicos, uno o varios puntos rojos o úlceras en el cuerpo, en una población de peces susceptibles a temperaturas del agua de entre 18 y 25 °C O BIEN como la presencia de granulomas micóticos O BIEN como la presencia de hifas no septadas de oomicetos ramificándose en una preparación de aplastamiento de músculo O BIEN como el aislamiento de *Aphanomyces* de crecimiento lento sin otra identificación del agente.

### 7.2. Definición de caso confirmado

Un caso confirmado de SUE se define como un caso sospechoso en el que se han producido granulomas micóticos característicos en tejidos u órganos afectados, O BIEN que se ha identificado como positivo mediante las técnicas de detección PCR o FISH, O BIEN en el que se ha aislado *Aphanomyces* y confirmado mediante bioanálisis, PCR o análisis de la secuencia.

## 8. Bibliografía

BALDOCK F.C., BLAZER V., CALLINAN R., HATAI K., KARUNASAGAR I., MOHAN C.V. & BONDAD-REANTASO M.G. (2005). Outcomes of a short expert consultation on epizootic ulcerative syndrome (EUS): Re-examination of causal factors, case definition and nomenclature. *In: Diseases in Asian Aquaculture V*, Walker P., Laster R. & Bondad-Reantaso M.G., eds. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, Philippines, 555–585.

BALASURIYA L.K.S.W. (1994). Epizootic ulcerative syndrome in fish in Sri Lanka, country status report. *In: Proceeding of the ODA Regional Seminar on Epizootic Ulcerative*, Robert R.J., Campbell B. & MacRae I.H., eds. Aquatic Animal Health Research Institute, Bangkok, Thailand, pp 39–47.

BLAZER V.S., VOGELBEIN W.K., DENSMORE C.L., MAY E.B., LILLEY J.H. & ZWERNER D.E. (1999). *Aphanomyces* as a cause of ulcerative skin lesions of menhaden from Chesapeake Bay tributaries. *J. Aquat. Anim. Health*, **11**, 340–349.

BONDAD-REANTASO M.G., LUMANLAN S.C., NATIVIDAD J.M. & PHILLIPS M.J. (1992). Environmental monitoring of the epizootic ulcerative syndrome (EUS) in fish from Munoz, Nueva Ecija in the Philippines. *In: Diseases in Asian Aquaculture 1*, Shariff M., Subasinghe R.P. & Arthur J.R., eds. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, The Philippines, 475–490.

CATAP E.S. & MUNDAY B.L. (1998). Effects of variations of water temperature and dietary lipids on the expression of experimental epizootic ulcerative syndrome (EUS) in sand whiting, *Sillago ciliata*. *Fish Pathol.*, **33**, 327–335.

CHINABUT S. & ROBERTS R.J. (1999). Pathology and Histopathology of Epizootic Ulcerative Syndrome (EUS). Aquatic Animal Health Research Institute, Department of Fisheries, Royal Thai Government, Bangkok, Thailand, 33 pp. ISBN 974-7604-55-8.

CHINABUT S., ROBERTS R.J., WILLOUGHBY G.R. & PEARSON M.D. (1995) Histopathology of snakehead, *Channa striatus* (Bloch), experimentally infected with the specific *Aphanomyces* fungus associated with epizootic ulcerative syndrome (EUS) at different temperatures. *J. Fish Dis.*, **18**, 41–47.

DIÉGUEZ-URIBEONDO J., GARCIA M.A., CERENIUS L., KOZUBÍKOVÁ E., BALLESTEROS I., WINDELS C., WEILAND J., KATOR H., SÖDERHÄLL K. & MARTÍN M.P. (2009). Phylogenetic relationships among plant and animal parasites, and saprotrophs in *Aphanomyces* (Oomycetes). *Fungal Genetics and Biology*, **46**, 365–376.

EGUSA S. & MASUDA N. (1971). A new fungal disease of *Plecoglossus altivelis*. *Fish Pathol.*, **6**, 41–46.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO) (2009). Report of the international emergency disease investigation task force on a serious fish disease in Southern Africa, 18-26 May 2007, FAO, Rome, Italy, 70 pp.

- FRASER G.C., CALLINAN R.B. & CALDER L.M. (1992). *Aphanomyces* species associated with red spot disease: an ulcerative disease of estuarine fish from eastern Australia. *J. Fish Dis.*, **15**, 173–181.
- HATAI K. & EGUSA S. (1979). Studies on pathogenic fungus of mycotic granulomatosis III. Development of the medium for MG-fungus. *Fish Pathol.*, **13**, 147–152.
- HATAI K., EGUSA S., TAKAHASHI S. & OOE K. (1977). Study on the pathogenic fungus of mycotic granulomatosis – I. Isolation and pathogenicity of the fungus from cultured-ayu infected with the disease. *Fish Pathol.*, **12**, 129–133.
- HATAI K., NAKAMURA K., AN RHA S., YUASA K. & WADA S. (1994). *Aphanomyces* infection in dwarf gourami (*Colisa lalia*). *Fish Pathol.*, **29**, 95–99.
- KHAN M.H., MARSHALL L., THOMPSON K.D., CAMPBELL R.E. & LILLEY J.H. (1998). Susceptibility of five fish species (Nile tilapia, rosy barb, rainbow trout, stickleback and roach) to intramuscular injection with the *Oomycete* fish pathogen, *Aphanomyces invadans*. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.*, **18**, 192–197.
- LILLEY J.H., CALLINAN R.B., CHINABUT S., KANCHANAKHAN S., MACRAE I.H. & PHILLIPS M.J. (1998). Epizootic ulcerative syndrome (EUS) technical handbook. Aquatic Animal Health Research Institute, Bangkok, Thailand.
- LILLEY J.H., HART D., PANYAWACHIRA V., KANCHANAKHAN S., CHINABUT S., SÖDERHÄLL K. & CERENIUS L. (2003). Molecular characterization of the fish-pathogenic fungus *Aphanomyces invadans*. *J. Fish Dis.*, **26**, 263–275.
- LILLEY J.H., HART D., RICHARDS R.H., ROBERTS R.J., CERENIUS L. & SODERHALL K. (1997a). Pan-Asian spread of single fungal clone results in large scale fish kills. *Vet. Rec.*, **140**, 653–654.
- LILLEY J.H., PETCHINDA T. & PANYAWACHIRA V. (2001). *Aphanomyces invadans* zoospore physiology: 4. *In vitro* viability of cysts. *The AAHRI Newsletter*, **10**, 1–4.
- LILLEY J.H. & ROBERTS R.J. (1997). Pathogenicity and culture studies comparing the *Aphanomyces* involved in epizootic ulcerative syndrome (EUS) with other similar fungi. *J. Fish Dis.*, **20**, 135–144.
- LILLEY J.H., THOMPSON K.D. & ADAMS A. (1997b). Characterization of *Aphanomyces invadans* by electrophoretic and Western blot analysis. *Dis. Aquat. Org.*, **30**, 187–197.
- LUMANLAN-MAYO S.C., CALLINAN R.B., PACLIBARE J.O., CATAP E.S. & FRASER G.C. (1997). Epizootic ulcerative syndrome (EUS) in rice-fish culture systems: an overview of field experiments 1993-1995. *In: Diseases in Asian Aquaculture III*, Flegel T.W. & MacRae I.H., eds. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, The Philippines, 129–138.
- MCKENZIE R.A. & HALL W.T.K. (1976). Dermal ulceration of mullet (*Mugil cephalus*). *Aust. Vet. J.*, **52**, 230–231.
- MILES D.J.V., POLCHANA J., LILLEY J.H., KANCHANAKHAN S., THOMPSON K.D. & ADAMS A. (2001). Immunostimulation of striped snakehead *Channa striata* against epizootic ulcerative syndrome. *Aquaculture*, **195**, 1–15.
- MILES D.J.C., THOMPSON K.D., LILLEY J.H. & ADAMS A. (2003). Immunofluorescence of the epizootic ulcerative syndrome pathogen, *Aphanomyces invadans*, using a monoclonal antibody. *Dis. Aquat. Org.*, **55**, 77–84.
- OIDTMANN B., STEINBAUER GEIGER S. & HOFFMANN R.W. (2008). Experimental infection and detection of *Aphanomyces invadans* in European catfish, rainbow trout and European eel. *Dis. Aquat. Org.*, **82**, 185–207.
- PHADEE P., KURATA O. & HATAI K. (2004a). A PCR method for the detection of *Aphanomyces piscicida*. *Fish Pathol.*, **39**, 25–31.
- PHADEE, P., KURATA, O., HATAI K., HIRONO I. & AOKI T. (2004b). Detection and identification of fish-pathogenic *Aphanomyces piscicida* using polymerase chain reaction (PCR) with species-specific primers. *J. Aquat. Anim. Health*, **16**, 220–230.
- PRADHAN P.K., MOHAN C.V., SHANKAR K.M., KUMAR B.M. & DEVARAJA G. (2007). Yearlings of Indian major carps resist infection against the epizootic ulcerative syndrome pathogen, *Aphanomyces invadans*. *Current Science*, **92**, 1430–1434.
- THOMPSON K.D., LILLEY J.H., CHINABUT S. & ADAMS A. (1997). The antibody response of snakehead, *Channa striata* Bloch, to *Aphanomyces invadans*. *Fish & Shellfish Immunology*, **7**, 349-353.

TONGUTHAI K. (1985). A preliminary account of ulcerative fish diseases in the Indo-Pacific region (a comprehensive study based on Thai experiences). National Inland Fisheries Institute, Bangkok, Thailand, 39 pp.

VANDERSEA M.W., LITAKER R.W., YONNISH B., SOSA E., LANDSBERG J.H., PULLINGER C., MOON-BUTZIN P., GREEN J., MORRIS J.A., KATOR H., NOGA E.J. & TESTER P.A. (2006). Molecular assays for detecting *Aphanomyces invadans* in ulcerative mycotic fish lesions. *Appl. Environ. Microbiol.*, **72**, 1551–1557.

WADA S., AN RHA S., KONDOH T., SUDA H., HATAI K. & ISHII H. (1996). Histopathological comparison between ayu and carp artificially infected with *Aphanomyces piscicida*. *Fish Pathol.*, **31**, 71–80.

WILLOUGHBY L.G. & ROBERTS R.J. (1994). Improved methodology for isolation of the *Aphanomyces* fungal pathogen of epizootic ulcerative syndrome (EUS) in Asian fish. *J. Fish Dis.*, **17**, 541–543.

\*  
\* \*

NB: Existe un Laboratorio de Referencia de la OIE para el Síndrome ulcerante epizoótico (puede consultarse en la Tabla del final de este *Manual Acuático* o en la página web de la OIE: [www.oie.int](http://www.oie.int)).