

PLAGA DEL CANGREJO DE RÍO (*APHANOMYCES ASTACI*)

1. Ámbito de aplicación

A efectos de este capítulo, la plaga del cangrejo de río se considerará una infección del cangrejo de río por *Aphanomyces astaci* Schikora.

2. Información sobre la enfermedad

2.1. Factores del agente

2.1.1. Agentes patógenos, cepas del agente

El agente patógeno de la plaga del cangrejo de río es *Aphanomyces astaci*. *Aphanomyces astaci* forma parte del grupo de microorganismos que a menudo se denominan hongos acuáticos. Aunque se han considerado hongos durante mucho tiempo, este grupo, los Oomicetos, ahora se consideran protistas y se clasifican, junto con las diatomeas y las algas marrones, dentro del grupo llamado Estramenópilos o Cromistas

Se han descrito cuatro grupos (A-D) de *A. astaci* en base a una polimórfico mediante una reacción en cadena de la polimerasa de amplificación aleatoria de polimorfismo del ADN (RAPD-PCR) (Huang *et al.*, 1994; Dieguez-Urbeondo *et al.* 2005): el grupo A (las denominadas cepas *Astacus*) está formado por varias cepas que se aislaron de *Astacus astacus* y de *Astacus leptodactylus*; estas cepas se considera que han estado en Europa durante mucho tiempo. El Grupo B (cepas *Pacifastacus* I) está formado por cepas tanto de *A. astacus* de Suecia como por cepas de *Pacifastacus leniusculus* del lago Tahoe, EE.UU. Es probable que *P. leniusculus* importados hayan introducido *A. astaci* e infectado a *A. astacus* nativos de Europa. El Grupo C (cepas *Pacifastacus* II) está formado por una cepa de *P. leniusculus* aislada del lago Pitt, Canadá. Otra cepa (Pc), aislada de *Procambarus clarkii*, en España, se halla en el grupo D (cepa *Procambarus*). Esta cepa presenta curvas de temperatura/crecimiento con temperaturas óptimas más altas que las de las cepas del norte de Europa (Dieguez Urbeondo *et al.*, 1995). Los *Aphanomyces astaci* que han existido en Europa durante muchos años (cepas del grupo A) parecen ser menos patógenos que cepas introducidas más recientemente con cangrejos de Norteamérica desde los años 60.

2.1.2. Supervivencia fuera del hospedador

Aunque *A. astaci* no es un parásito en sentido estricto y crece bien en medios artificiales en el laboratorio (Alderman y Polglase, 1986; Cerenius *et al.*, 1988), no es fácil que sobreviva mucho tiempo en un entorno natural, en ausencia de un hospedador adecuado.

Las zoosporas de *Aphanomyces astaci* siguen siendo móviles durante incluso 3 días y los quistes sobreviven durante 2 semanas en agua destilada (Svensson y Unestam, 1975; Unestam, 1966). Dado que *A. astaci* puede crecer a lo largo de tres ciclos de eclosión de las zoosporas, la esperanza máxima de vida fuera de un hospedador podría ser de varias semanas. Las esporas siguen siendo viables en una suspensión de esporas mantenida a 2°C durante meses (Unestam, 1966).

2.1.3. Estabilidad del agente (métodos eficaces de inactivación)

Aphanomyces astaci, tanto si se halla en un cultivo como en cangrejos infectados, muere tras una corta exposición a temperaturas de 60°C o de -20°C (o inferiores) durante 48 horas (o más) (Alderman, 2000; Oidtmann *et al.*, 2002). El hipoclorito de sodio y los iodóforos son eficaces para desinfectar el equipo contaminado, aunque este debe lavarse antes de la desinfección, puesto que se ha observado que la presencia de materia orgánica disminuye la eficacia de los iodóforos (Alderman y Polglase, 1985). También es eficaz un secado minucioso del equipo (>24 horas), puesto que *A. astaci* no es resistente a la desecación.

2.1.4. Ciclo de vida

El ciclo de vida de *A. astaci* es sencillo: las hifas vegetativas invaden y se ramifican a través de los tejidos del hospedador, y terminan produciendo esporangios extramatriciales que liberan esporas primarias ameboideas. Estas esporas inicialmente se enquistan, pero después liberan una zoospora biflagelada (zoospora secundaria). Las zoosporas biflageladas nadan en la columna de agua y, al encontrarse con un hospedador susceptible, se unen a él y germinan produciendo hifas vegetativas invasivas. Las zoosporas que nadan libremente parecen resultar atraídas quimiotácticamente por la cutícula del cangrejo de río (Cerenius y Söderhäll, 1984a) y a menudo se depositan sobre la cutícula cerca de una herida (Nyhlen y Unestam, 1980). Las zoosporas son capaces de enquistarse y resurgir en repetidas ocasiones alargando el periodo durante el cual pueden ser infectivas (Cerenius y Söderhäll, 1984b). La capacidad de crecimiento y de esporulación depende de la cepa y de la temperatura (Dieguez Uribeondo *et al.*, 1995).

2.2. Factores del hospedador

2.2.1. Especies hospedadoras susceptibles

Hasta ahora, todas las especies de cangrejo de agua dulce se han considerado susceptibles a la infección por *A. astaci*. La evolución de cada infección depende de la especie. Todos los estadios de las especies europeas de cangrejo, incluidos el cangrejo de río de patas rojas (*Astacus astacus*) del noreste de Europa, el cangrejo de patas blancas (*Austropotamobius pallipes*) del sureste y este de Europa, el cangrejo de los torrentes (*Austropotamobius torrentium*) del suroeste de Europa, y el cangrejo de patas delgadas (*Astacus leptodactylus*) de Europa del este y de Asia Menor, son muy susceptibles (Alderman, 1996; Alderman *et al.*, 1984; Rahe y Soylu, 1989; Unestam, 1969b; 1976; Unestam y Weiss, 1970). Las inoculaciones de desafío llevadas a cabo en el laboratorio han puesto de manifiesto que las especies australianas de cangrejos también son muy susceptibles (Unestam, 1976). Los cangrejos de Norteamérica, tales como el cangrejo del Pacífico (*Pacifastacus leniusculus*), el cangrejo de las marismas (*Procambarus clarkii*) y *Orconectes* spp. resultan infectados por *A. astaci*, pero en condiciones normales esta infección no causa enfermedad clínica ni la muerte. Todas las especies de cangrejos de Norteamérica estudiadas hasta ahora se ha observado que son susceptibles a la infección, según ha demostrado la presencia del agente patógeno en la cutícula del hospedador (Oidtmann *et al.*, 2006; Unestam, 1969b; Unestam y Weiss, 1970) y por tanto actualmente se asume que ocurre lo mismo en cualquier otra especie de cangrejo de Norteamérica.

El único otro crustáceo que se sabe que es susceptible a la infección por *A. astaci* es el cangrejo chino (*Eriocheir sinensis*), pero dicha susceptibilidad solo se ha observado en condiciones de laboratorio (Benisch, 1940).

2.2.2. Fases susceptibles de la vida del hospedador

Todos los estadios de vida deben considerarse susceptibles a la infección

2.2.3. Especies o subpoblaciones predilectas (probabilidad de detección)

Especies muy susceptibles: en los brotes naturales de la plaga del cangrejo de río, pueden encontrarse cangrejos moribundos y muertos de gran variedad de tamaños (y por tanto, de edades).

Especies de cangrejo de Norteamérica: la prevalencia de la infección tiende a disminuir en los animales que han mudado recientemente (B. Oidtmann, datos no publicados). Sin embargo, no se han llevado a cabo estudios sistematizados a gran escala que se comprometieran a corroborar estas observaciones. Los juveniles de cangrejo de río pasan por varias mudas al año, y los adultos suelen mudar al menos una vez al año en los climas templados. Por tanto, los animales que llevan un tiempo sin mudar pueden presentar una mayor prevalencia que los que han mudado recientemente.

2.2.4. Órganos diana y tejidos infectados

El primer tejido en infectarse es la cutícula del exoesqueleto. La cutícula blanda, dado que se encuentra en la parte ventral del abdomen y en las articulaciones que lo rodean, es la primera en resultar afectada. En las especies europeas de cangrejo, que son muy susceptibles, el agente patógeno a menudo consigue penetrar hasta la lámina basal situada bajo la capa celular de la epidermis. Desde ahí, *A. astaci* se disemina por todo el organismo invadiendo principalmente el tejido conjuntivo y senos hemáticos; sin embargo, pueden resultar afectados todos los tejidos.

En las especies de cangrejo de Norteamérica, la infección no suele pasar de la cutícula.

2.2.5. Infección persistente con portadores de por vida

Se ha estudiado la susceptibilidad a la infección por *A. astaci* y el desarrollo de la enfermedad en varias especies de cangrejo de Norteamérica (Oidtmann *et al.*, 2006; Unestam, 1969a; Unestam y Söderhäll, 1977). Hasta ahora, la infección se ha demostrado sin excepción en todas las especies de cangrejo de Norteamérica analizadas hasta la fecha. Los animales estudiados solían estar clínicamente sanos.

Esta hipótesis está respaldada por un reciente estudio en el que se ha observado que la probabilidad de detectar un cangrejo positivo para *A. astaci* aumenta significativamente al aumentar la longitud del cangrejo. Además, las hembras de cangrejos grandes expresaban niveles significativamente más altos de *A. astaci* que los machos grandes (Vrålstad *et al.*, 2011). Es probable que los resultados reflejen la que la frecuencia de muda de los animales adultos más grandes es menor a la de los inmaduros, más pequeños (Reynolds, 2002), y que las hembras adultas tiendan a mudar incluso con menor frecuencia que los machos adultos (Skurdal y Qvenild, 1986).

De acuerdo con las observaciones realizadas en especies de cangrejo de Norteamérica, parece razonable suponer que todas las especies de cangrejo originarias de Norteamérica pueden resultar infectadas por *A. astaci* sin desarrollar enfermedad clínica y que, por tanto, pueden actuar como portadores del agente patógeno de por vida.

2.2.6. Vectores

Existen indicios de campo y experimentales fiables de que los desplazamientos de peces desde zonas donde la plaga del cangrejo de río está activa pueden transmitir la infección de una cuenca a otra (Alderman *et al.*, 1987; Oidtmann *et al.*, 2006).

Fomites: *A. astaci* también puede transmitirse a través de equipo contaminado (redes, botas, ropa, etc.).

2.2.7. Animales acuáticos salvajes portadores o sospechosos de serlo

Muchos estudios han puesto de manifiesto que las especies de cangrejo originarias de Norteamérica pueden actuar como portadoras de *A. astaci* (como el cangrejo señal, el cangrejo de los canales o el cangrejo de las marismas (Alderman *et al.*, 1990; Oidtmann *et al.*, 2006). Dado que todas las especies de Norteamérica analizadas hasta ahora han resultado ser posibles portadoras de la enfermedad, también se considera que las especies de Norteamérica no analizadas hasta ahora probablemente actuarán como posibles portadoras de *A. astaci*. Se han extendido especies de Norteamérica por varias regiones de Europa. Un informe reciente de Finlandia también sugiere que las poblaciones de cangrejo de patas rojas de baja densidad en medios de agua fría podrían estar afectadas a bajos niveles por una infección crónica (Viljamaa-Dirks *et al.*, 2011).

2.3. Patrón de la enfermedad

2.3.1. Mecanismos de transmisión

Las principales vías de transmisión del agente patógeno son 1) el desplazamiento de cangrejos infectados, 2) el desplazamiento de esporas con agua o equipo contaminados, como puede ocurrir durante los desplazamientos de los peces, o 3) la colonización de hábitats por parte de especies de cangrejo de Norteamérica.

La transmisión entre cangrejos tiene lugar, en pocas palabras, mediante la liberación de zoosporas de un animal infectado y la inserción de dichas zoosporas a un cangrejo no inmune. Las zoosporas de *A. astaci* nadan activamente en la columna de agua y se ha observado que presentan una quimiotaxis positiva hacia el cangrejo (Cerenius y Söderhäll, 1984a).

La principal vía de transmisión de la plaga del cangrejo de río en Europa entre los años 60 y el año 2000 ha sido la población activa de cangrejos de Norteamérica en explotaciones de cangrejo salvaje, o bien fugas desde dichas explotaciones (Alderman, 1996; Dehus *et al.*, 1999). Hoy en día, la transmisión tiene lugar principalmente debido a la expansión de las poblaciones de cangrejo de Norteamérica, al co-transporte accidental de ejemplares y a la liberación de cangrejo de Norteamérica a la naturaleza por parte de particulares (Edsman, 2004; Oidtmann *et al.*, 2005).

La colonización por parte de especies de cangrejo de Norteamérica portadoras de *A. astaci* de hábitats inicialmente ocupados por especies muy susceptibles probablemente dará lugar a una epidemia en los animales que sean muy susceptibles. La velocidad de transmisión depende, entre otros factores, de la prevalencia de la infección en la población de cangrejos de Norteamérica.

El transporte de pescado podría facilitar la transmisión de *A. astaci* de varias formas, como por ejemplo mediante la presencia de esporas en el agua de transporte, la presencia de *A. astaci* que haya sobrevivido en la piel del pescado, el co-transporte de ejemplares de cangrejos infectados, o una combinación de los tres factores (Alderman *et al.*, 1987; Oidtmann *et al.*, 2002). También existen indicios circunstanciales de la transmisión por equipo contaminado (redes, botas, ropa, etc.).

2.3.2. Prevalencia

En las especies europeas de cangrejo muy susceptibles, la exposición a esporas de *A. astaci* se considera que conlleva la infección y finalmente la muerte. La dosis mínima infecciosa todavía no se ha establecido, pero podría ser tan baja como de una sola spora por animal (B. Oidtmann, datos no publicados). La prevalencia de la infección dentro de una población en el estadio inicial de un brote podría ser baja (podrían estar afectados solo uno o unos pocos animales de la población de un río). Sin embargo, el agente patógeno se amplifica en los animales afectados, y a continuación se libera al agua, lo cual suele conllevar un 100% de mortalidad en una población contigua. La velocidad de transmisión desde los animales afectados inicialmente depende de varios factores, uno de los cuales es la temperatura del agua (Oidtmann *et al.*, 2005). Por tanto, el tiempo que transcurre entre la introducción inicial del agente patógeno en una población y la observación de mortalidades detectables en los cangrejos puede variar mucho y puede oscilar entre unas pocas semanas y unos meses. La prevalencia de la infección aumentará progresivamente a lo largo de este periodo y normalmente alcanzará el 100%. Los datos de una población de cangrejo de patas rojas de Finlandia que sufrió un brote de plaga del cangrejo de río en 2001, de la que se llevó a cabo un seguimiento durante los años posteriores, sugiere que en poblaciones de cangrejo de patas rojas de baja densidad, la propagación por la población hospedadora podría prolongarse a lo largo de un periodo de tiempo de varios años.

Los niveles de prevalencia en el cangrejo de Norteamérica parecen variar mucho. Unos pocos estudios sugieren que es posible observar niveles de prevalencia en cualquier punto situado entre el 0 y el 100% (Oidtmann *et al.*, 2006).

2.3.3. Distribución geográfica

Las primeras observaciones de grandes mortalidades en cangrejos se remontan a 1860 en Italia (Ninni, 1865; Seligo, 1895). A partir de entonces hubo otras, en las que no estaba afectada ninguna otra especie acuática, localizadas en la zona de la frontera franco-alemana en el tercer cuarto del siglo XIX. Desde ahí se produjo una propagación constante de la infección, principalmente en dos direcciones: hacia el sur por el Danubio hasta adentrarse en los Balcanes, y hacia el Mar Negro, y por la llanura del norte de Alemania en dirección a Rusia, y desde ahí hacia el sur hasta llegar al Mar Negro y hacia el noroeste hasta Finlandia, alcanzando Suecia en 1907. En los años 60 se describieron los primeros brotes en España, y en los años 80 se produjeron otras propagaciones de la infección a las islas británicas, Turquía, Grecia y Noruega (Alderman, 1996). El reservorio de las infecciones iniciales del siglo XIX nunca se determinó; no se supo que se había introducido *Orconectes* spp. hasta los años 1890, pero las propagaciones posteriores de los años 1960 están muy vinculadas a los desplazamientos de cangrejos de Norteamérica introducidos más recientemente con fines de explotación comercial (Alderman, 1996). Fue casi imposible evitar fugas de estas nuevas especies, y hoy en día *Pacifastacus leniusculus* y *Procambarus clarkii* están ampliamente aclimatadas en muchas partes de Europa.

Dado que el cangrejo de Norteamérica sirve de reservorio de *A. astaci*, todas las zonas en las que se encuentra cangrejo de Norteamérica se consideran zonas donde también hay *A. astaci* (a no ser que se demuestre lo contrario).

Australia y Nueva Zelanda nunca han experimentado ningún brote de plaga del cangrejo de río hasta la fecha, y actualmente se consideran libres de la enfermedad (interfaz WAHID de la web de la OIE, consultada en junio de 2011).

2.3.4. Mortalidad y morbilidad

Cuando la infección alcanza en primer lugar una población no inmune de cangrejos susceptibles, se suele producir una mortalidad rápida de manera que en las zonas con altas densidades de cangrejo el fondo de los lagos, de los ríos y de los arroyos queda cubierto de cangrejos muertos y moribundos. Se extenderá rápidamente una franja de mortalidad río abajo desde el lugar del brote inicial, mientras que río arriba la propagación será más lenta. En los lugares en los que las poblaciones de cangrejos susceptibles son escasas, se producirán menos zoosporas, la propagación de la enfermedad será más lenta y la evidencia de mortalidad menos drástica. La temperatura del agua tiene algún efecto en la velocidad de propagación y esto es más evidente en las poblaciones de cangrejos de baja densidad, donde la transmisión de un animal a otro tarda más tiempo y la intensidad de la exposición será más baja. Las bajas temperaturas del agua y el número reducido de zoosporas se asocian a mortalidades más bajas y con una mayor variedad de signos clínicos en los animales infectados (Alderman *et al.*,

1987). Las observaciones de Finlandia sugieren que a bajas temperaturas del agua, el cangrejo de patas rojas puede resultar infectado durante varios meses sin desarrollar mortalidades perceptibles (S. Viljamaa-Dirks, datos no publicados).

En ocasiones muy infrecuentes, se han encontrado ejemplares aislados de especies muy susceptibles después de que haya tenido lugar un brote de plaga del cangrejo de río en un río o lago. Lo más probable es que esto se deba a que estos animales no han resultado expuestos durante el brote (pueden haberse quedado en un afluente de un río o lago, o bien en una parte del río o lago afectados a la que no han llegado esporas; estos ejemplares también pueden haber estado enterrados durante la ola de la plaga del cangrejo). Sin embargo, se ha descrito que existen cepas poco virulentas de la plaga del cangrejo que persisten en un curso de agua, y que se mantienen vivas mediante una infección débil en la población residual (Viljamaa-Dirks *et al.*, 2011). Aunque en muchas cuencas europeas quedan poblaciones residuales de especies de cangrejo susceptibles, las densas poblaciones que existieron hace 150 años son ahora mucho menores (Alderman, 1996; Souty-Grosset *et al.*, 2006). Las poblaciones de cangrejo susceptibles podrían reestablecerse, pero una vez la densidad de la población y la distribución geográfica sea suficiente como para que animales susceptibles entren en contacto con la infección, tendrán lugar nuevos brotes de plaga del cangrejo en forma de mortalidades a gran escala.

2.3.5. Factores medioambientales

En condiciones de laboratorio, el intervalo de temperaturas preferido para el crecimiento de los micelios de *A. astaci* varía ligeramente en función de la cepa. En un estudio, en el que se compararon varias cepas de *A. astaci* que habían sido aisladas de distintas especies de cangrejo, se observó crecimiento miceliar a temperaturas de entre 4 y 29,5°C, y la cepa aislada de *Procambarus clarkii* creció mejor a temperaturas más altas que las óptimas para otras cepas. La eficiencia de la esporulación también fue alta en todas las cepas estudiadas a temperaturas de entre 4 y 20°C, pero fue claramente inferior en las cepas no de *P. clarkii* a 25°C y ausente a 27°C. Por el contrario, a 27°C seguía habiendo esporulación de la cepa *P. clarkii*. La proporción de zoosporas móviles (de entre todas las zoosporas observadas en una suspensión de zoosporas) fue de casi el 100% a temperaturas de entre 4 y 18°C, disminuyó a aproximadamente el 60% a 20°C y a alrededor del 20% a 25°C, pero a 27°C no se encontró ninguna espora móvil (Dieguez Uribeondo *et al.*, 1995).

Los datos de campo indican que se producen brotes de plaga del cangrejo a muy variadas temperaturas, y al menos en el intervalo de temperaturas que va de los 4 a los 20°C. La velocidad de transmisión dentro de una población depende de varios factores, como la temperatura del agua. En un intervalo de temperatura de entre 4 y 16°C, la velocidad de propagación de una epidemia se potencia a mayores temperaturas del agua. A temperaturas del agua más bajas, la curva de la epidemia puede aumentar muy lentamente y el periodo durante el cual se observan mortalidades puede ser de varios meses (B. Oidtmann, datos no publicados).

En agua tamponada bidestilada, se produce esporulación a pH de entre 5 y 8, siendo el intervalo óptimo el comprendido entre un pH de 5 y de 7. El intervalo de pH óptimo para la natación de las zoosporas parece ser el situado entre 6 y 7,5, y el intervalo máximo es el que va de 4,5 a 9,0 (Unestam, 1966).

La salida de las esporas está influida por la presencia de ciertas sales en el agua. El CaCl₂ estimula la salida de las zoosporas de los quistes primarios, mientras que el MgCl₂ tiene un efecto inhibitor. En general, la salida de las zoosporas se desencadena por la transferencia del micelio vegetativo a un medio en que no hay nutrientes o bien se encuentran en una baja concentración (Cerenius y Söderhäll, 1984b).

2.4. Control y prevención

Una vez *A. astaci* se ha introducido en la naturaleza en una población de especies de cangrejo muy susceptibles, la transmisión dentro de la población afectada no se puede controlar. Por tanto, es crucial la prevención de la introducción. Para evitar las principales vías de introducción, es necesario aplicar las siguientes medidas:

1. Deben evitarse los desplazamientos de cangrejos infectados vivos o muertos, de agua, equipo o cualquier otro objeto potencialmente contaminado que pudiera vehicular el agente patógeno de un lugar infectado a otro no infectado donde vivan especies susceptibles.
2. Al planificar transferencias de peces, debe tenerse en cuenta si el agua original puede contener cangrejos infectados (incluidos cangrejos de Norteamérica portadores).
3. Todo desplazamiento de peces procedentes de un lugar donde esté teniendo lugar una plaga del cangrejo conlleva un alto riesgo de propagación y en general debe evitarse.
4. Al planificar desplazamientos de peces procedentes de unas aguas que contengan cangrejo de Norteamérica, los métodos de extracción de peces empleados en el lugar de origen deben garantizar

que: a) no se co-transporten accidentalmente cangrejos; b) el agua de transporte no contenga esporas de *A. astaci*, c) se desinfecte el equipo entre un uso y el siguiente; d) el envío no se contamine durante el transporte.

5. Debe evitarse la liberación de cangrejo de Norteamérica a la naturaleza en zonas donde habite cualquiera de las especies que son muy susceptibles. Una vez liberados, los cangrejos de Norteamérica tiende a propagarse, a veces a grandes distancias. Por tanto, antes de planificar cualquier liberación, hay que tener muy en cuenta las posibles consecuencias de dicha liberación a largo plazo, puesto que pueden terminar afectadas poblaciones de cangrejos muy susceptibles que se encuentren incluso a grandes distancias del punto en el que se ha llevado a cabo la liberación.
6. Las instalaciones de acuicultura para la explotación de cangrejo casi nunca son adecuadas para prevenir la fuga de cangrejos. Por tanto, debe estudiarse con mucho detalle si estas instalaciones son realmente necesarias.

Ciertas vías de introducción, como la liberación de cangrejo de Norteamérica por parte de particulares, son difíciles de controlar.

2.4.1. Vacunación

Actualmente no existe ningún indicio de que las vacunas ofrezcan una protección a largo plazo a los crustáceos, pero incluso en el caso de que sí la ofrecieran, la vacunación de poblaciones naturales de cangrejo es imposible.

2.4.2. Tratamiento con sustancias químicas

Actualmente no se conoce ningún tratamiento que permite tratar con éxito las especies de cangrejo muy susceptibles, una vez infectadas.

2.4.3. Inmunoestimulación

Actualmente no se conoce ningún inmunoestimulante que permita proteger con éxito las especies de cangrejo muy susceptibles contra la infección y la consecuente enfermedad causadas por *A. astaci*.

2.4.4. Selección genética a favor de la resistencia

A lo largo de los 125 años que han pasado desde que tuvo lugar el primer brote de plaga del cangrejo de Europa, se han hallado pocos indicios de poblaciones resistentes de cangrejo europeo. Sin embargo, el hecho de que el cangrejo de Norteamérica no sea muy susceptible al desarrollo de la enfermedad clínica sugiere que la selección a favor de la resistencia podría ser posible y que podrían tener éxito los estudios de laboratorio en los que se utilizan cepas de *A. astaci* de patogenicidad atenuada. No obstante, actualmente no existe ningún dato publicado relativo a este tipo de estudios.

2.4.5. Repoblación con especies resistentes

Se han utilizado cangrejos de Norteamérica en distintos países europeos para repoblar las reservas perdidas de cangrejo nativo. Sin embargo, dado que el cangrejo de Norteamérica es un posible hospedador de *A. astaci*, la repoblación con cangrejo de Norteamérica potenciaría la propagación de *A. astaci*. Dadas las altas tasas de reproducción y la tendencia de varias especies de cangrejos de Norteamérica a colonizar nuevos hábitats, la repoblación con especies de cangrejos de Norteamérica prevendría en gran medida el reestablecimiento de las especies de cangrejo nativas.

2.4.6. Agentes bloqueantes

No existen datos.

2.4.7. Desinfección de huevos y larvas

Existe poca información sobre la susceptibilidad de los huevos de cangrejo a la infección por *A. astaci*. Unestam y Söderhäll mencionan que ellos expusieron experimentalmente huevos de *Astacus astacus* y de *P. leniusculus* a suspensiones de zoosporas y no consiguieron inducir infección (Unestam y Söderhäll, 1977). No obstante, no se han publicado los detalles de estos estudios.

Aunque no se dispone de datos publicados, es improbable que la desinfección de larvas, una vez infectadas, funcione, puesto que *A. astaci* quedaría protegido de la desinfección por la cutícula del cangrejo, donde seguiría estando presente.

2.4.8. Prácticas generales de manejo

Al planificar la apertura de una piscifactoría de cangrejos de una especie muy susceptible, debe estudiarse muy detenidamente si en las proximidades de la zona escogida hay especies de cangrejo de Norteamérica o si podría haber poblaciones de cangrejos de Norteamérica río arriba (en el caso de aguas que procedan de los mismos cauces y en los casos en que se extraiga agua de dichos cauces), por mucho que se encuentren a una gran distancia. Si hay cangrejos de Norteamérica, será muy probable que la especie susceptible de la piscifactoría termine infectada.

En los lugares donde se cultive la especie muy susceptible deben seguirse las siguientes recomendaciones para evitar una introducción de *A. astaci* en el lugar:

1. Deben evitarse los desplazamientos de cangrejos infectados vivos o muertos, de agua, equipo o cualquier otro objeto potencialmente contaminado que pudiera vehicular el agente patógeno de un lugar infectado a otro no infectado donde vivan especies susceptibles.
2. Al planificar transferencias de peces, estas no pueden proceder de cauces u otras aguas que contengan cangrejos potencialmente infectados (ni poblaciones de cangrejo susceptible que actualmente estén pasando por un brote de plaga del cangrejo, ni cangrejos de Norteamérica portadores).
3. No deben traerse cangrejos de Norteamérica al lugar.
4. Los peces procedentes de fuentes de agua dulce desconocidas o de aguas en las que pueda haber cangrejos de Norteamérica o en las que pueda estar produciéndose un brote de plaga del cangrejo no deben utilizarse como cebo ni alimento para los cangrejos, a no ser que se hayan sometido a un tratamiento térmico que mate *A. astaci* (véase el apartado 2.1.3).
5. Todo equipo que llegue al lugar debe ser desinfectado.
6. Deben aplicarse medidas generales de bioseguridad (como controlar el acceso a las instalaciones, desinfectar las botas cuando se entra en el lugar, investigar las mortalidades si las hay o introducir animales vivos (cangrejos, peces) solo procedentes de lugares en los que se sepa que no hay plaga del cangrejo).

3. Obtención de muestras

3.1. Elección de ejemplares

En el caso de que se sospeche de un brote de plaga del cangrejo en una población de una especie de cangrejo muy susceptible, lo ideal es que el lote de cangrejos escogidos para estudiar la presencia de *A. astaci* esté formado por: a) cangrejos vivos que presenten signos de enfermedad, b) cangrejos vivos que parezcan estar todavía sanos y, c) cangrejos muertos que también pudieran ser adecuados, aunque esto dependerá de su estado.

Los cangrejos vivos deben transportarse en recipientes de poliestireno provistos de pequeños agujeros que permitan la aireación, o un recipiente equivalente. La temperatura del interior del recipiente no puede superar los 16°C.

El recipiente debe proporcionar un aislamiento contra las grandes diferencias de temperatura respecto al exterior. En épocas de calor, deben utilizarse bloques de congelador para evitar que se alcancen temperaturas nocivas para los animales. Estos bloques se pueden pegar al fondo del recipiente de transporte por la cara interna. Sin embargo, el cangrejo debe estar protegido del contacto directo con estos bloques, lo cual puede conseguirse utilizando, por ejemplo, cartón o varias capas de papel de periódico.

Los cangrejos deben transportarse en una atmósfera húmeda, por ejemplo usando virutas de madera/serrín, papel de periódico o hierba/heno, todo ello humedecido. A no ser que el agua de transporte esté suficientemente oxigenada, los cangrejos vivos no deben transportarse en agua, puesto que podrían ahogarse debido a la falta de oxígeno.

El periodo de tiempo transcurrido entre la toma de ejemplares vivos y la entrega al laboratorio no debe ser superior a las 24 horas.

En el caso de que en el lugar donde se sospeche de un brote solo se encuentren animales muertos, tal vez también sean adecuados para el diagnóstico. En función del estado en el que se encuentren, pueden: a) transportarse refrigerados (si parecen haber muerto muy recientemente), o b) sumergirse en etanol no metilado (concentración mínima del 70%; véase el apartado 3.2).

Los animales que presenten un estado avanzado de descomposición probablemente no darán resultados fiables, pero si no hay otros, incluso así podrían ser analizados.

3.2. Conservación de las muestras para su envío

La utilización de cangrejos frescos es lo ideal, como se ha descrito anteriormente. Pero si por motivos prácticos no puede prepararse rápidamente el transporte de cangrejos recién muertos o moribundos, los ejemplares pueden fijarse en etanol (a un mínimo del 70%). No obstante, la fijación puede reducir la sensibilidad de la prueba. Lo ideal es que la proporción cangrejos:etanol sea de 1:10 (1 parte de cangrejos, 10 partes de etanol).

3.3. Combinación de varias muestras

No se recomienda.

3.4. Órganos y tejidos de elección

En especies muy susceptibles, se recomienda tomar una muestra de la cutícula abdominal blanda, que puede hallarse en la cara ventral del abdomen.

En las especies de cangrejo de Norteamérica, se recomienda tomar muestra de la cutícula abdominal blanda, de los urópodos y del telson.

3.5. Muestras/tejidos que no son adecuados

El material autolítico no es adecuado para el análisis.

4. Métodos de diagnóstico

La aparición de grandes cantidades de cangrejos muertos pertenecientes a especies muy susceptibles, quedando el resto de la fauna acuática inalterada, suscita la sospecha de que la población podría estar afectada por la plaga del cangrejo. Los signos clínicos de la plaga del cangrejo consisten en cambios en el comportamiento y una gran variedad de lesiones externas visibles. Los principales métodos de diagnóstico de los que se dispone son la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y el aislamiento del agente patógeno en medios de cultivo seguido de la identificación. El aislamiento puede ser difícil y requiere que las muestras se encuentren en buenas condiciones cuando lleguen al laboratorio (Oidtmann *et al.*, 1999). Hoy en día se dispone de métodos moleculares que dependen menos de la rapidez de la entrega y pueden aplicarse a una mayor variedad de muestras que los métodos basados en el aislamiento del agente causal (Oidtmann *et al.*, 2006; Vrålstad *et al.*, 2009).

4.1. Métodos de diagnóstico de campo

4.1.1. Signos clínicos

Especies muy susceptibles

Los síntomas clínicos evidentes son extremadamente variables y dependen de la intensidad de la exposición y de las temperaturas del agua. El primer signo de mortalidad de la plaga del cangrejo suele ser la presencia de cangrejos en libertad durante el día (los cangrejos son normalmente nocturnos), algunos de los cuales pueden mostrar una pérdida evidente de coordinación en sus movimientos, caída fácil sobre el dorso e imposibilidad de volver por sí mismos a su posición normal. Sin embargo, con frecuencia, a no ser que se observen cuidadosamente las aguas, el primer signo de que existe un problema es la presencia de grandes cantidades de cangrejos muertos dentro del río o del lago (Alderman *et al.*, 1987)

En el caso de las especies susceptibles, cuando está presente un número de cangrejos suficiente como para que la infección se extienda con rapidez, sobre todo en aguas con temperaturas veraniegas, la infección se propagará con rapidez y en tramos de más de 50 kilómetros se pueden perder todos sus cangrejos en menos de 21 días a partir de la observación de la primera muerte (D. Alderman, comunicación personal). La plaga del cangrejo tiene efectos de suma gravedad, ya que los cangrejos susceptibles infectados no suelen sobrevivir. Sin embargo, debe hacerse hincapié en que la presencia de un gran número de cangrejos muertos, incluso en cuencas hidrográficas afectadas por esta plaga, no es suficiente por sí misma para el diagnóstico de la enfermedad. Debe evaluarse el estado general de otras especies acuáticas. La mortalidad o desaparición de otros invertebrados acuáticos además de los cangrejos, aunque sobrevivan los peces, puede indicar la existencia de contaminación (ej., los insecticidas, como la cipermetrina, se han asociado a un diagnóstico inicial erróneo).

Especies de cangrejo de Norteamérica

La presencia de melanización en la cutícula en ocasiones se ha sugerido que puede ser un signo de infección por *A. astaci*. Sin embargo, la melanización puede derivar de muchas posibles causas y no es un signo específico de infección por *A. astaci*. Por el contrario, es frecuente observar animales infectados que no presentan melanización.

4.1.2. Alteraciones del comportamiento

Especies muy susceptibles

Los cangrejos de especies muy susceptibles infectados puede abandonar sus escondites durante el día (lo cual no es habitual en el cangrejo) y presentar una reducción en el reflejo de escape y una parálisis progresiva. A veces se encuentran cangrejos moribundos echados sobre el dorso. Estos animales a menudo ya no pueden recuperar por sí solos la posición normal. A veces, pueden verse animales infectados que intentan rascarse o pellizcarse a sí mismos.

Especies de cangrejo de Norteamérica

Los cangrejos de Norteamérica no presentan ningún cambio de comportamiento (B. Oidtmann, datos no publicados).

4.2. Métodos clínicos

4.2.1. Anatomopatología macroscópica

Especies muy susceptibles

Dependiendo de una gran variedad de factores, los focos de infección en los cangrejos se pueden detectar fácilmente a simple vista o bien puede que no se distinguen por mucho que se lleve a cabo un minucioso examen. Tales focos se pueden ver mejor mediante un microscopio estereoscópico de baja potencia y son más fácilmente reconocibles por el blanqueamiento local del músculo de debajo de la cutícula. En algunos casos puede aparecer una coloración marrón de la cutícula y del músculo y, en otros, las hifas son visibles en las cutículas infectadas en forma de finos trazos marrones (melanizados) en la cutícula misma. Los tejidos más adecuados para un examen concreto son la cutícula ventral blanda intersternal del abdomen y la cola, la cutícula de la región perianal, la cutícula situada entre el espaldar y el abdomen, las uniones de los pereiópodos (patas locomotoras), en concreto la unión proximal y, finalmente, las branquias.

Especies de cangrejo de Norteamérica

Los cangrejos de Norteamérica infectados a veces pueden presentar puntos melanizados en sus cutículas blandas, por ejemplo en la cutícula abdominal blanda. Sin embargo, es importante destacar que estas melanizaciones pueden estar causadas por lesiones mecánicas o infecciones por otros hongos acuáticos, y que son muy inespecíficas. Por el contrario, una melanización visible no siempre se asocia a un estado de portador. Los animales infectados pueden estar totalmente desprovistos de melanizaciones visibles.

4.2.2. Bioquímica clínica

No se dispone de métodos adecuados.

4.2.3. Anatomopatología microscópica

A no ser que se haya escogido bien el tejido que va a fijarse, las hifas de *A. astaci* pueden ser difíciles de encontrar en las preparaciones teñidas. Además, este tipo de material no demuestra que ninguna de las hifas observadas pertenezca al patógeno primario. Puede utilizarse una técnica de tinción histológica como la de la tinción de plata de Grocott, que es una tinción de contraste con hematoxilina y eosina convencionales.

Véase también el apartado 4.2.4.

4.2.4. Preparaciones húmedas

Se examinan pequeñas porciones de cutículas blandas extirpadas de las regiones antes mencionadas (apartado 4.2.1) mediante un microscopio compuesto utilizando una potencia de media a baja, que confirmará la presencia de hifas fúngicas no septadas de 7–9 µm de ancho. Las hifas suelen hallarse invadiendo todo el espesor de la cutícula, formando una red tridimensional de hifas en las zonas intensamente afectadas de la cutícula. La presencia de hemocitos hospedadores y posiblemente cierta

melanización encapsulando las hifas y estrechamente asociada a ellas, constituye un buen indicio preliminar de que las hifas constituyen un patógeno y no un invasor oportunista secundario. En algunos casos, el examen de la superficie de tales cutículas montadas demostrará la presencia de esporangios de *A. astaci* característicos con agrupaciones de esporas primarias enquistadas (véase el apartado 4.3).

4.2.5. Frotis

No es adecuado.

4.2.6. Cortes fijados

Véase el apartado 4.2.3.

4.2.7. Microscopía electrónica/citopatología

No es adecuada.

4.3. Métodos de detección e identificación del agente

4.3.1. Métodos directos de detección

4.3.1.1. Métodos microscópicos

4.3.1.1.1. Preparaciones húmedas

Como se ha indicado anteriormente, se puede identificar de forma provisional *A. astaci* a partir de la presencia de hifas que invadan la cutícula y de esporangios de los tipos morfológicos correctos (ver más abajo) en la superficie de los exoesqueletos de los cangrejos.

4.3.1.1.2. Frotis

No es adecuado.

4.3.1.1.3. Cortes histológicos

Véase el apartado 4.2.3.

4.3.1.2. Aislamiento e identificación del agente

4.3.1.2.1. Cultivo celular/medios artificiales

Especies muy susceptibles

Debe tenerse cuidado de que los animales utilizados para el aislamiento de *A. astaci* mediante cultivo no queden en ningún momento expuestos a la desecación.

Benisch (1940), Nyhlen y Unestam (1980), Alderman y Polglase (1986), Cerenius *et al.* (1988), Oidtman *et al.* (1999) y Viljamaa-Dirks (2006) han descrito métodos de aislamiento.

Medio de aislamiento (IM) descrito por Alderman y Polglase (1986) es el siguiente: 12,0 g de agar; 1,0 g de extracto de levadura; 5,0 g de glucosa; 10 mg de ácido oxalínico; 1,000 ml de agua de río; y 1,0 g de penicilina G (estéril) que se añade después de la esterilización en autoclave y el enfriado a 40°C. El agua de río es agua de cualquier río natural o agua de lago, en vez de agua desmineralizada.

Toda contaminación superficial debe retirarse en primer lugar de la cutícula abdominal interesternal blanda o de cualquier otra zona de la cual vaya a extirparse cutícula, limpiándola a fondo con papel de cocina limpio húmedo (utilizando H₂O esterilizada en autoclave). Una simple escisión aséptica de tejidos infectados que se colocarán luego en pequeñas porciones (de 3-5 mm²) sobre la superficie de las placas de medio de aislamiento, normalmente darán como resultado un aislamiento exitoso de *A. astaci* a partir de animales moribundos o recién muertos (menos de 24 horas antes). Dependiendo de varios factores, el foco de infección en los cangrejos puede verse a simple vista o puede no ser detectado ni siquiera mediante un minucioso examen. Dichos focos se pueden ver mejor mediante un microscopio estereoscópico de baja potencia y normalmente se reconocen por un blanqueamiento localizado del músculo de debajo de la cutícula.

En algunos casos puede aparecer una coloración marrón de la cutícula y del músculo y en otros, las hifas son visibles en las cutículas infectadas en forma de finos senderos marrones (melanizados) en la cutícula misma. Los tejidos más adecuados para un examen concreto son la cutícula ventral blanda

interesternal del abdomen y la cola, la cutícula de la región perianal, la situada entre el espaldar y la cola, las uniones de los pereiópodos (patas locomotoras), en concreto en la unión proximal y, finalmente, las branquias.

Siempre que la escisión de los tejidos infectados para el aislamiento se haga con las debidas precauciones, los contaminantes no deben suponer un gran problema. Se pueden transferir pequeñas porciones de cutícula y músculo a placas de Petri con agua destilada y a continuación se cortan en pequeños trozos con instrumentos estériles para transportarlos al medio de aislamiento (IM). Los instrumentos adecuados para este trabajo son hojas de bisturí, pinzas de punta fina y tijeras.

Para reducir los posibles problemas de contaminación, se puede mejorar el éxito del aislamiento mediante una desinfección de la cutícula con etanol y fundiendo un anillo de vidrio estéril de 1-2 mm de espesor en el medio de aislamiento (Nyhlen y Unestam, 1980; Oidtmann *et al.*, 1999). Se ha descrito la adición de telurito de potasio a la zona del interior del anillo de vidrio (Nyhlen y Unestam, 1980).

El agar inoculado puede incubarse a temperaturas de entre 16°C y 24°C. Las placas de Petri deben cerrarse con una película sellante (como Parafilm¹) con el fin de evitar que se dessequen.

Cuando se utiliza el agar para el aislamiento, el crecimiento de nuevas cepas de *A. astaci* tiene lugar casi por completo en el interior del agar, excepto a temperaturas inferiores a 7°C, en cuyo caso aparece algún crecimiento superficial. Las colonias son incolores. Las dimensiones y el aspecto de las hifas son casi los mismos en los tejidos de los cangrejos que en el cultivo de agar. Las hifas vegetativas son no septadas y miden (5)7–9(10) µm de ancho (es decir, el tamaño normal es de 7–9 µm, pero se han observado tamaños de entre 5 y 10 µm). Las hifas jóvenes y de crecimiento activo están densamente concentradas con un citoplasma toscamente granular, con numerosos glóbulos muy refractivos (Alderman y Polglase, 1986). Las hifas más viejas son en su mayor parte vacuoladas con el citoplasma restringido en la mayoría de los casos a la periferia, dejando sólo finos haces de protoplasma que crean un puente sobre la gran vacuola central. Las hifas mayores están aparentemente desprovistas de contenido. Las hifas se ramifican de forma profusa, y sus ramificaciones vegetativas a menudo tienden a ser en cierta medida más estrechas que la hifa principal a lo largo de las primeras 20–30 µm de crecimiento.

Cuando los talos o porciones de talos que han crecido activamente en caldo o en medio sólido se transfieren a agua de río (el agua natural con cationes disponibles estimula mejor la esporulación que el agua destilada), se forman rápidamente esporangios en 20-30 horas a 16°C, y en 12-15 horas a 20°C. Los talos transferidos del caldo de cultivo pueden lavarse con agua de río estéril en un tamiz estéril de acero inoxidable, antes de transferirse a agua de río estéril y fresca para inducir la esporulación. Los talos que están en agar deben transferirse cortando un trocito superficial de agar que contenga el hongo de forma que se transfiera una cantidad mínima de agar con nutrientes. Se utilizará siempre un gran volumen de agua de río estéril con respecto a la cantidad de hongo a transferir (100:1). Los esporangios son miceloides, terminales o intercalados, que se desarrollan a partir de hifas vegetativas no diferenciadas. La forma esporangial varía: los esporangios terminales son simples, se desarrollan a partir de una hifa extramatricial nueva, mientras que los esporangios intercalados pueden tener una forma compleja. Los esporangios intercalados se desarrollan por el crecimiento de una ramificación extramatricial lateral nueva que forma el conducto de descarga del esporangio. El citoplasma de tales conductos de descarga es notablemente denso, y estas ramificaciones son ligeramente más anchas (10–12 µm) que la hifas vegetativas ordinarias. Los esporangios están delimitados por un solo septo basal en el caso de los esporangios terminales y por septos en ambos extremos del segmento esporangial en los esporangios intercalados. Tales septos son notablemente más gruesos que la pared hifal y tienen un índice refractario alto. Las secciones consecutivas de hifas vegetativas pueden convertirse en esporangios y la mayor parte del talo vegetativo también es capaz de convertirse en esporangios.

Dentro de los esporangios que están en desarrollo, el citoplasma se separa formando una serie de unidades alargadas (10–25 × 8 µm) que inicialmente están unidas por hebras de protoplasma. Aunque los extremos de estas unidades citoplásmicas se vuelven redondeados, dichos extremos permanecen alargados hasta y durante la descarga. La descarga de esporas es acloide, es decir, la primera fase de la spora es una aplanospora que se enquistas en el orificio esporangial y probablemente representa la zoospora primaria de la saprolegniacea suprimida. No se han hallado indicios de que exista una spora primaria flagelada, por tanto, en esta descripción se han utilizado los términos “esporangio”, no “zoosporangio”, y “espora primaria”, no “zoospora primaria”. La

1 Las referencias a productos comerciales concretos como ejemplos no implica su aprobación por parte de la OIE. Esto es aplicable a todos los productos comerciales mencionados en este *Manual Acuático*.

descarga es bastante rápida (termina en menos de 5 minutos) y las esporas primarias individuales (igual a unidades citoplasmáticas) pasan a través de la punta del esporangio y se acumulan alrededor del orificio esporangial. La velocidad de separación y descarga del citoplasma depende de la temperatura. En el momento de su liberación, cada espora primaria conserva brevemente su forma ameboidea irregular alargada antes de que se produzca el enquistado.

El enquistado está marcado por un redondeado gradual seguido por el desarrollo de una pared quística que se manifiesta por un cambio en el índice refractario de la célula. Entre la liberación y el enquistado pasan de 2 a 5 minutos. Algunas esporas pueden alejarse de la masa de esporas en la punta esporangial y enquistarse por separado. La pared quística primaria se forma rápidamente y, tras producirse el enquistamiento, las esporas permanecen juntas como un grupo coherente y se adhieren bien a la punta esporangial, de tal forma que tendría que darse una alteración física considerable para que se rompiera la masa de esporas.

Las esporas primarias enquistadas son esféricas, miden 9–11 μm de diámetro, aunque se han observado esporas de entre 8 y 15 μm y son relativamente poco numerosas, de 15 a 30 μm por esporangio (de todas formas, existen casos de entre 8 y 40 por esporangio) en comparación con otras subespecies de *Aphanomyces*. Las esporas permanecen enquistadas durante 8–12 horas. Las temperaturas óptimas para la formación de esporos y la descarga para la mayoría de las cepas europeas de *A. astaci* están comprendidas entre los 16 y los 24°C (Alderman y Polglase, 1986). Para algunas cepas, en concreto las que proceden de aguas españolas, pueden requerirse unas temperaturas óptimas ligeramente superiores (Dehus *et al.*, 1999). La descarga de zoosporas secundarias de los quistes primarios alcanza el máximo a los 20°C, y a los 24°C no se produce. En las nuevas cepas de *A. astaci*, es habitual que la mayoría de los quistes de espora primarios descargue como zoosporas secundarias, aunque esto depende de la degeneración que tiene lugar en los cultivos de laboratorio a largo plazo. La formación esporangial y la descarga se producen a los 4°C. *A. astaci* no sobrevive en un cultivo a –5°C o menos durante más de 24 horas, aunque pueden necesitarse –20°C durante >48 horas en los tejidos de cangrejos infectados, ni tampoco es viable en los que hayan estado sometidos a procedimientos normales de cocción. (Alderman, 2000; Oidtmann *et al.*, 2002).

En muchos casos, algunas de las esporas primarias no son descargadas del esporangio y muchos esporangios ni siquiera se descargan. En su lugar, las esporas primarias parecen enquistarse *in situ* dentro del esporangio, a menudo desarrollan una forma esférica en lugar de una forma alargada y ciertamente están sometidos a los mismos cambios en el índice refractivo que indican el enquistamiento de las esporas fuera del esporangio. Se ha observado este enquistamiento dentro de los esporangios en los cangrejos. Las esporas enquistadas en esta situación parecen ser capaces de germinar y producir así un crecimiento hifal adicional.

La liberación de las zoosporas secundarias es papilada, y la papila se desarrolla poco después de la descarga. El citoplasma de la espora emerge lentamente de manera ameboidea a través de un estrecho poro situado en la punta de una papila, se redondea y comienza un movimiento de balanceo lento a medida que comienza una extrusión flagelar y la forma de la espora cambia gradualmente, pasando de esférica a arriñonada. La unión flagelar es lateral (Scott, 1961); las zoosporas son zoosporas secundarias típicas de la familia saprolegniaceae, que miden 8 × 12 μm . La movilidad activa tarda en aparecer de 5 a 20 minutos (depende de la temperatura) y, al principio, las zoosporas son lentas y descoordinadas. A temperaturas de entre 16 y 20°C, las zoosporas pueden continuar nadando al menos durante 48 horas (Alderman y Polglase, 1986).

La sensibilidad y especificidad del método del cultivo puede variar mucho en función de la experiencia de la persona que lo lleve a cabo, pero en general serán inferiores a las de la PCR.

Especies de cangrejo de Norteamérica

El aislamiento de *A. astaci* mediante cultivo siguiendo los métodos descritos para las especies muy susceptibles suele fracasar. Actualmente, el método recomendado para detectar la infección en estas especies es la PCR.

4.3.1.2.2. Métodos de detección del antígeno basados en anticuerpos

No se dispone de ninguno.

4.3.1.2.3. Técnicas moleculares

Animales

En el caso de un brote sospechoso de la enfermedad en especies de cangrejos muy susceptibles, para la extracción de ADN preferiblemente deben escogerse cangrejos moribundos o que hayan

muerto recientemente (en las últimas 24 horas). Los cangrejos vivos pueden sacrificarse mediante cloroformo. Si los únicos animales de los que se dispone son ejemplares que han muerto unos pocos días antes de la extracción, también pueden incluirse en el análisis, pero los resultados negativos en la PCR deberán interpretarse con cautela, puesto que puede haberse producido una degradación del ADN. Puede aplicarse controles endógenos para evaluar si se ha producido degradación. En estos preferiblemente deben utilizarse tejidos del hospedador más ricos en células hospedadoras que la cutícula; la cutícula en sí contiene muy pocos núcleos de células hospedadoras. Si las circunstancias impiden enviar cangrejos al laboratorio en un plazo de 24 horas, pueden fijarse en etanol al 70% ($\geq 3:1$ etanol:tejido de cangrejo), pero ello puede dar lugar a una reducción del ADN obtenido.

Extracción de ADN

Cuando se analizan animales de especies muy susceptibles, el tejido de elección para la extracción de ADN es la cutícula abdominal blanda. Toda posible contaminación superficial debe eliminarse antes limpiando bien la cutícula abdominal blanda con papel de cocina limpio humedecido (mediante H₂O esterilizada en autoclave). A continuación, se extirpa la cutícula abdominal blanda y se trituran 30 a 50 mg en nitrógeno líquido hasta liofilizar la muestra, utilizando una mano de mortero (pueden utilizarse otras técnicas de trituración, pero deben compararse con el método del nitrógeno líquido antes de utilizarlas de forma sistemática). Para la identificación de portadores, se toman 30-50 mg de tejido de cada cutícula abdominal blanda, y el telson y los urópodos y se procesan de forma independiente. A continuación, se extrae ADN de la cutícula triturada mediante un método de extracción de ADN basado en la proteinasa K (como el *DNeasy tissue kit*, Qiagen, Hilden, Alemania; protocolo para tejido de insecto) siguiendo las instrucciones de la casa comercial (Oidtman *et al.*, 2006) o utilizando una prueba basada en CTAB (bromuro de cetiltrimetilamonio) (Vrålstad *et al.*, 2009). Deben analizarse controles negativos paralelamente a las muestras. Como controles negativos pueden utilizarse tejidos de camarón.

4.3.1.2.3.1. PCR

Se han desarrollado varias PCR con distintos niveles de sensibilidad y especificidad. Aquí se describen dos pruebas que han demostrado ser altamente sensibles y específicas. Ambas tienen como diana la región ITS (espaciador transcrito interno) de la agrupación de genes ribosomales nucleares que se encuentra en el genoma de *A. astaci*. Como debe hacerse siempre para cualquier prueba diagnóstica basada en la PCR, deberán analizarse controles negativos paralelamente a las muestras, con el fin de controlar una posible contaminación. Deben incluirse controles ambientales (utilizando, por ejemplo, tejido de camarón, como se indica arriba) y controles blancos durante la extracción de ADN, junto con controles de PCR "sin molde" (el ADN molde se sustituye por agua de grado molecular). Los controles de la PCR que no son moldes deben incluir un control de PCR ambiental que se dejará abierto durante el pipeteado del ADN de la muestra.

Método 1:

Esta PCR convencional se basa en cebadores específicos de especie situados en las regiones ITS1 e ITS2. El cebador directo (BO 42) 5'-GCT-TGT-GCT-GAG-GAT-GTT-CF-3' y el cebador inverso (BO 640) 5'-CTA-TCC-GAC-TCC-GCA-TTC-TG-3'. La PCR se realiza en un volumen de reacción de 50 μ l que contenga tampón 1 \times para PCR (Tris/HCl 75 mM, pH 8,8, [NH₄]₂SO₄ 20mM, Tween 20 al 0,01% (v/v)), MgCl₂ 1,5 mM, dATP, dCTP, dTTP y dGTP, cada una a una concentración 0,2 mM, 0,5 μ mol de cada cebador, y 1,25 unidades de ADN polimerasa (por ejemplo, Thermoprime Plus (AB Gene, Epsom, Reino Unido) o polimerasa *Taq* equivalente) y 2 μ l de ADN molde. Se desnaturaliza la mezcla a 96°C durante 5 minutos y a continuación se realizan 40 ciclos de amplificación de 1 minuto a 96°C, 1 minuto a 59°C y un minuto a 72°C, y, finalmente, una extensión de 7 minutos a 72°C. Se analiza el ADN amplificado mediante electroforesis en gel de agarosa. El producto objetivo es un fragmento de 569 pb. Se recomienda la confirmación de la identidad del producto de PCR mediante secuenciación. La prueba detecta sistemáticamente hasta 500 fg de ADN diana genómico o la cantidad equivalente de diez zoosporas sometidas a la PCR (Tuffs y Oidtman, 2011).

Método 2:

Esta prueba es una PCR en tiempo real con unión al surco menor TaqMan que tiene por diana una secuencia motivo particular de 59 pb de *A. astaci* situada en la región ITS1. El cebador directo es AphAstITS-39F (50-AAG-GCT-TGT-GCT-GGG-ATG-TT-30), el cebador inverso, AphAstITS-97R (50-CTT-CTT-GCG-AAA-CCT-TCT-GCT-A-30), y la sonda, TaqMan MGB AphAstITS-60T (50-6-FAM-TTC-GGG-ACG-ACC-CMG-BNF-Q-30) marcados con la tinción indicadora fluorescente FAM en el extremo 50 y un grupo extintor de la fluorescencia no fluorescente MGBNFQ en el extremo 30. Las amplificaciones mediante PCR en tiempo real se llevan a cabo en un volumen total de 25 μ l que contiene 12,5 μ l de la mezcla de reacción para la PCR (por ejemplo, Universal PCR Master Mix o

Environmental PCR Master Mix, Applied Biosystems), los cebadores directo (AphAstITS-39F) e inverso (AphAstITS-97R), ambos a una concentración 0,5 µM, la sonda MGB (AphAstITS-60T) 0,2 µM, 1,5 µl de agua de grado molecular y 5 µl de ADN molde (no diluido y diluido a una décima parte). La amplificación y la detección se llevan a cabo en placas de reacción óptica (*Optical Reaction Plates*) selladas con película adhesiva óptica u otra similar sobre un ciclador térmico en tiempo real. El programa de PCR consiste en una descontaminación inicial de 2 minutos a 50°C para que tenga lugar una actividad óptima de la enzima UNG, seguida de 10 minutos a 95°C para activar la ADN polimerasa, desactivar la UNG y desnaturalizar el ADN molde, y a continuación 50 ciclos de 15 segundos a 95°C y 60 segundos a 58°C. Junto con las muestras debe procesarse una dilución seriada con ADN de referencia cuyo contenido en ADN se conozca.

El límite absoluto de detección de esta prueba se observó que era de unas 5 unidades formadoras de PCR (=copias del ADN molde diana), lo cual equivale a menos de un genoma de *A. astaci* (Vrålstad *et al.*, 2009). En otro estudio se observó que esta prueba permitía una detección sistemática de hasta 50 fg (Tuffs y Oidtmann, 2011).

La sensibilidad diagnóstica de cualquier prueba depende en gran medida de la calidad de las muestras obtenidas. Cuando se estudia un brote de plaga del cangrejo, lo esperable es que la sensibilidad diagnóstica sea alta cuando se trabaja con ejemplares que han muerto por esta enfermedad 12 horas o menos antes de la toma de muestras, o bien en cangrejos vivos que presenten claros signos de la enfermedad. No se han llevado a cabo estudios para investigar el efecto que el deterioro de la calidad de la muestra tiene en la pérdida de sensibilidad (por ejemplo, cuando el muestreo o el procesado se retrasan, o cuando las muestras se guardan de forma inadecuada). Es recomendable analizar varios cangrejos (5-10) con el fin de compensar las posibles variaciones en la calidad de la muestra y en la zona afectada del cangrejo.

Se ha estudiado la especificidad analítica (Oidtmann *et al.*, 2006; Tuffs y Oidtmann, 2011; Vrålstad *et al.*, 2009) y no se ha observado reacción cruzada. Sin embargo, debido a los frecuentes descubrimientos de nuevas cepas de *Aphanomyces*, es muy recomendable secuenciar para confirmar el diagnóstico. En el caso de la PCR en tiempo real, esto requiere una amplificación independiente del producto de la PCR, o bien utilizando los cebadores según se ha descrito en el método 1, o bien utilizando cebadores ITS1 e ITS4 (véase el apartado “secuenciación”, a continuación).

4.3.1.2.3.2. Secuenciación

Se puede amplificar un producto de la PCR de 569 pb utilizando los cebadores BO42 y BO640. El tamaño del amplicón obtenido mediante PCR se verifica con una electroforesis en gel de agarosa, y se purifica extrayéndolo de este gel (por ejemplo, mediante un sistema de purificación de ADN Freeze n' Squeeze, Anachem, Luton, Reino Unido). Ambas hebras de ADN deben secuenciarse utilizando los cebadores que se han empleado en la amplificación inicial. La secuencia consenso se genera aplicando un programa informático de análisis de la secuencia y comparándola con secuencias publicadas, utilizando una herramienta de búsqueda de alineación, como la BLAST. Si se halla un 100% de coincidencia entre la secuencia problema y las secuencias publicadas, el producto amplificado será *A. astaci*. Si la secuencia no es idéntica al 100%, deberá llevarse a cabo otra secuenciación utilizando los cebadores ITS-1 (5'-TCC-GTA-GGT-GAA-CCT-GCG-G-3') y ITS-4 (5'-TCC-TCC-GCT-TAT-TGA-TAT-GC-3') (White *et al.*, 1990), que generarán un amplicón de 757 pb que proporcionará datos de secuencia de la misma región, pero alargados por ambos extremos respecto a la secuencia generada por los cebadores BO42 y BO640. Esta secuencia alargada debe confirmar la identidad del agente patógeno a nivel de especie.

Especies muy susceptibles

La PCR (convencional o en tiempo real) es un método adecuado para investigar brotes sospechoso de plaga del cangrejo (véase el apartado 7.1). Cuando se cumplan las condiciones de un caso sospechoso, la amplificación de un producto del tamaño esperado obtenido por PCR y utilizando PCR convencional o en tiempo real puede considerarse un diagnóstico confirmativo suficiente, si se detecta un alto nivel de ADN molde. Cuando se detecten niveles bajos de ADN molde (amplificación débil) o se analicen muestras procedentes de lugares donde no se cumplan las condiciones de caso sospechoso, para confirmar el diagnóstico se recomienda secuenciar productos de PCR generados como se ha descrito en el apartado sobre secuenciación.

4.3.1.2.4. Purificación del agente

No disponible.

4.3.2. Métodos serológicos

No disponibles.

5. Idoneidad de las pruebas para cada uso previsto

Los métodos de los que se dispone actualmente para el diagnóstico de casos clínicos de la plaga del cangrejo (*Aphanomyces astaci*) en especies muy susceptibles se muestran en la Tabla 5.1. Los métodos de vigilancia dirigida destinados a demostrar la ausencia de enfermedad en especies muy susceptibles se muestran en la Tabla 5.2.

La enfermedad clínica es extremadamente infrecuente en el cangrejo de Norteamérica. Por tanto, no se proporciona un orden de preferencia de los métodos de diagnóstico de los casos clínicos utilizados en estas especies. Sin embargo, en la Tabla 5.3. Se muestran los métodos de vigilancia dirigida destinados a demostrar la ausencia de enfermedad en cangrejos de Norteamérica.

Las denominaciones utilizadas en las tablas indican: a = este es el método recomendado por motivos de disponibilidad, utilidad y especificidad y sensibilidad diagnósticas; b= este es el método estándar con una buena sensibilidad y especificidad diagnósticas; c= este método es aplicable en ciertas situaciones, pero el coste, la exactitud u otros factores limitan mucho su aplicación; y d= actualmente este método no se recomienda 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 rutinaria y el hecho de que se hayan usado generalmente sin resultados dudosos las hace aceptables.

Tabla 5.1. Métodos de diagnóstico de la plaga del cangrejo en especies de cangrejo muy susceptibles

Método	Diagnóstico provisional	Diagnóstico confirmativo
Signos macroscópicos y microscópicos	b	d
Aislamiento y cultivo	b	d
Histopatología	d	d
PCR	a	b o a ¹
Secuenciación de los productos de la PCR	n/a	b o a ¹
ME de transmisión	d	d
Pruebas basadas en anticuerpos	n/a	n/a
Sondas de ADN – <i>in situ</i>	n/a	n/a

PCR = reacción en cadena de la polimerasa; q PCR = PCR cuantitativa; ME = microscopía electrónica; n/a = no aplicable o disponible; ¹ = véanse las definiciones de caso confirmado en el apartado 7.1.

Tabla 5.2. Métodos de vigilancia dirigida en especies de cangrejo muy susceptibles para declarar la ausencia de plaga del cangrejo

Método	Método de detección	Método de confirmación
Inspección en busca de signos macroscópicos y mortalidad	a	c
Signos microscópicos (preparaciones húmedas)	c	c
Aislamiento y cultivo	c	b
Histopatología	d	d
PCR	a	b, posiblemente a ¹
qPCR	a	b, posiblemente a ¹

Método	Método de detección	Método de confirmación
Secuenciación de los productos de la PCR	n/a	a
ME de transmisión	d	d
Pruebas basadas en anticuerpos	n/a	n/a
Sondas de ADN – <i>in situ</i>	n/a	n/a

PCR = reacción en cadena de la polimerasa; q PCR = PCR cuantitativa; ME = microscopía electrónica; n/a = no aplicable o disponible; ¹ = véanse las definiciones de caso confirmado en el apartado 7.1.

Tabla 5.3. Métodos para la vigilancia dirigida en especies de cangrejo de Norteamérica para declarar la ausencia de plaga del cangrejo

Método	Método de detección	Método de confirmación
Signos macroscópicos y microscópicos	d	d
Aislamiento y cultivo	c	c
Histopatología	d	d
PCR	a	b
qPCR	a	b
Secuenciación de los productos de la PCR	n/a	a
ME de transmisión	d	d
Pruebas basadas en anticuerpos	n/a	n/a
Sondas de ADN – <i>in situ</i>	n/a	n/a

PCR = reacción en cadena de la polimerasa; qPCR = PCR cuantitativa; ME = microscopía electrónica; n/a = no aplicable o disponible

6. Prueba(s) recomendada(s) para la vigilancia dirigida destinada a declarar la ausencia de plaga del cangrejo (*Aphanomyces astaci*)

6.1. Especies muy susceptibles

Es necesaria una inspección de las piscifactorías en las que se críen cangrejos susceptibles, con la frecuencia señalada en el capítulo 2.2.0. Los métodos adecuados para este propósito son la observación del historial de mortalidades no relevantes (lo cual excluye las pérdidas derivadas de la depredación) que se producen en la población durante un período de al menos 12 meses combinada con la ausencia de signos clínicos, así como de lesiones macroscópicas o microscópicas en el momento de la inspección. La vigilancia de las poblaciones de cangrejos salvajes constituye un mayor problema, especialmente cuando se trata de una especie en peligro. Como los desplazamientos de las poblaciones de peces procedentes de aguas infectadas constituyen un riesgo de transmisión de la enfermedad, es necesario realizar un seguimiento del estado de las poblaciones de cangrejos para confirmar que permanecen sanos.

En el contexto de una piscifactoría, una infección por plaga del cangrejo debe detectarse con relativa rapidez, debido al inicio relativamente rápido de la mortalidad en la población de cangrejos de la explotación.

Para llevar a cabo una vigilancia dirigida, es recomendable realizar inspecciones periódicas, durante las cuales deberán tomarse muestras si existe sospecha de mortalidad o enfermedad. Si se hallan animales moribundos o muertos, se recomienda analizar las muestras mediante PCR, y si la PCR da un resultado positivo, se secuenciarán los productos de esta PCR generados mediante cebadores 42 y 640, o ITS-1 y 5, y las secuencias obtenidas se analizarán.

6.2. Especies de cangrejo de Norteamérica

En las especies de cangrejo de Norteamérica, deben tomarse ejemplares y analizarse mediante una de las PCR descritas anteriormente. La PCR en tiempo real es el método de elección porque ofrece una mayor sensibilidad. Esto es aplicable tanto a las poblaciones de piscifactoría como a las poblaciones salvajes aclimatadas, y en los programas de vigilancia se deben tener en cuenta los riesgos de una transmisión indirecta derivados de los desplazamientos de peces.

7. Criterios para el diagnóstico confirmativo

7.1. Definición de caso sospechoso

Especies de cangrejo muy susceptibles

Los casos que presentan una mortalidad alta exclusivamente en las especies muy susceptibles de cangrejos de agua dulce, en lugares en que todas las demás especies de flora y fauna, y en concreto otros crustáceos acuáticos, están normales y sanos.

Especies de cangrejo de Norteamérica

Toda población de cangrejos de Norteamérica en general se considera potencialmente infectada por *A. astaci*.

7.2. Definición de caso confirmado

Especies de cangrejo muy susceptibles

Confirmación de la presencia de *A. astaci* mediante PCR o qPCR y secuenciación.

Cuando (1) una mortalidad de cangrejos cumple la definición de caso sospechoso y (2) los resultados de la PCR indican la presencia de altos niveles de ADN molde (en el caso de la PCR en tiempo real, esto corresponde a valores de Ct \leq 30), y (3) el caso sospechoso estudiado no es el primer caso de detección de *A. astaci* en el país o región, el resultado de la PCR por sí mismo puede considerarse suficiente como confirmación.

Especies de cangrejo de Norteamérica

Confirmación de la presencia de *A. astaci* mediante PCR o qPCR y secuenciación.

8. Bibliografía

ALDERMAN D.J. (1996). Geographical spread of bacterial and fungal diseases of crustaceans. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, **15** (2), 603–632.

ALDERMAN D.J. (2000). Summary final report: effects of exposure to high and low temperatures on the survival of the crayfish plague fungus *A. astaci* *in vitro* and *in vivo*. Australian Quarantine and Inspection Service, Canberra, Australia.

ALDERMAN D.J., HOLDICH D. & REEVE I. (1990). Signal crayfish as vectors in crayfish plague in Britain. *Aquaculture*, **86**, 3–6.

ALDERMAN D.J. & POLGLASE J.L. (1985). Disinfection for crayfish plague. *Aquaculture and Fisheries Management*, **16**, 203–205.

ALDERMAN D.J. & POLGLASE J.L. (1986). *Aphanomyces astaci*: isolation and culture. *J. Fish Dis.*, **9**, 367–379.

ALDERMAN D.J., POLGLASE J.L. & FRAYLING M. (1987). *Aphanomyces astaci* pathogenicity under laboratory and field conditions. *J. Fish Dis.*, **10**, 385–393.

ALDERMAN D.J., POLGLASE J.L., FRAYLING M. & HOGGER J. (1984). Crayfish plague in Britain. *J. Fish Dis.*, **7**, 401–405.

BENISCH J. (1940). Kuenstlich hervorgerufener *Aphanomyces* Befall bei Wollhandkrabben. *Zeitschrift fuer Fischerei*, **38**, 71–80.

- CERENIUS L. & SÖDERHÅLL K. (1984a). Chemotaxis in *Aphanomyces astaci*, an arthropod-parasitic fungus. *J. Invertebr. Pathol.*, **43**, 278–281.
- CERENIUS L. & SÖDERHÅLL K. (1984b). Repeated zoospore emergence from isolated spore cysts of *Aphanomyces astaci*. *Exp. Mycol.*, **8**, 370–377.
- CERENIUS L., SÖDERHÅLL K., PERSSON M., AJAXON R. (1988). The crayfish plague fungus, *Aphanomyces astaci* – diagnosis, isolation and pathobiology. *Freshw. Crayfish*, **7**, 131–144.
- DEHUS P., BOHL E., OIDTMANN B., KELLER M., LECHLEITER S. & PHILLIPSON S. (1999). German conservation strategies for native crayfish species with regard to alien species. In: Crustacean Issues 11: Crayfish in Europe as Alien Species (How to Make the Best of a Bad Situation?), Gherardi F. & Holdich D.M., eds. A.A Balkema, Rotterdam, The Netherlands, pp. 149–160.
- DIEGUEZ URIBEONDO J., HUANG T.-S., CERENIUS L. & SÖDERHALL K. (1995). Physiological adaptation of an *Aphanomyces astaci* strain isolated from the freshwater crayfish *Procambarus clarkii*. *Mycol. Res.*, **99**, 574–578.
- EDSMAN L. (2004). The Swedish story about import of live crayfish. *Bulletin Français de la Pêche et de la Pisciculture*, **372–373**, 281–288.
- HUANG, T.S., CERENIUS L. & SÖDERHALL K. (1994). Analysis of genetic diversity in the crayfish plague fungus, *Aphanomyces astaci*, by random amplification of polymorphic DNA. *Aquaculture*, **126**, 1–10.
- NINNI A.P. (1865). Sulla mortalità dei gambari (*Astacus fluviatilis* L.) nel veneto e più particolarmente nella provincia trevigiana. *Atti Inst. Veneto Ser. III*, **10**, 1203–1209.
- NYHLEN L. & UNESTAM T. (1980). Wound reactions and *Aphanomyces astaci* growth in crayfish cuticle. *J. Invertebr. Pathol.*, **36**, 187–197.
- OIDTMANN B., GEIGER S., STEINBAUER P., CULAS A. & HOFFMANN R.W. (2006). Detection of *Aphanomyces astaci* in North American crayfish by polymerase chain reaction. *Dis. Aquat. Org.*, **72**, 53–64.
- OIDTMANN B., HEITZ E., ROGERS D. & HOFFMANN R.W. (2002). Transmission of crayfish plague. *Dis. Aquat. Org.*, **52**, 159–167.
- OIDTMANN B., SCHMID I., ROGERS D. & HOFFMANN R. (1999). An improved isolation method for the cultivation of the crayfish plague fungus, *Aphanomyces astaci*. *Freshw. Crayfish*, **12**, 303–312.
- OIDTMANN B., THRUSH M., ROGERS D. & PEELER E. (2005). Pathways for transmission of crayfish plague, *Aphanomyces astaci*, in England and Wales. Meeting of the Society for Veterinary Epidemiology and Preventive Medicine. Nairn, Inverness, Scotland, 30.03.-01.04.05, Poster.
- RAHE R. & SOYLU E. (1989). Identification of the pathogenic fungus causing destruction to Turkish crayfish stocks (*Astacus leptodactylus*). *J. Invertebr. Pathol.*, **54**, 10–15.
- REYNOLDS J.D. (2002). Growth and reproduction. In: Biology of Freshwater Crayfish, Holdich D.M., ed. Blackwell Science, Oxford, UK, pp 152–191.
- SCOTT W.W. (1961). A monograph of the genus *Aphanomyces*. *Virginia Agricultural Research Station Technical Bulletin*, **151**, 1–95.
- SELIGO A. (1895). Bemerkungen ueber die Krebspest, Wasserpest, Lebensverhaeltnisse des Krebses. *Zeitschrift fuer Fischerei und deren Hilfswissenschaften*, **3**, 247–261.
- SKURDAL J. & QVENILD T. (1986). Growth, maturity and fecundity of *Astacus astacus* in Lake Steinsfjorden, S.E. Norway. *Freshwater Crayfish*, **6**, 182–186.
- SOUTY-GROSSET C., HOLDICH D.M., NOEL P.Y., REYNOLDS J.D. & HAFFNER P. (Eds) (2006). Atlas of Crayfish in Europe. Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris (Patrimoines naturels, 64), 188 p.
- SVENSSON E. & UNESTAM T. (1975). Differential induction of zoospore encystment and germination in *Aphanomyces astaci*, Oomycetes. *Physiologia Plantarum*, **35**, 210–216.

TUFFS S & OIDTMANN B (2011). A comparative study of molecular diagnostic methods designed to detect the crayfish plague pathogen, *Aphanomyces astaci*. *Vet. Microbiol.* (accepted).

UNESTAM T. (1966). Studies on the crayfish plague fungus *Aphanomyces astaci*. II. Factors affecting zoospores and zoospore production. *Physiologia Plantarum*, **19**, 1110–1119.

UNESTAM T. (1969a). On the adaptation of *Aphanomyces astaci* as a parasite. *Physiologia Plantarum*, **22**, 221–235.

UNESTAM T. (1969b). Resistance to the crayfish plague in some American, Japanese and European crayfishes. *Report Institute Freshw. Res.*, 202–206.

UNESTAM T. (1976). Defence reactions in and susceptibility of Australian and New Guinean freshwater crayfish to European-crayfish-plague fungus. *Australian J. Exp. Biol. Med. Sci.*, **53**, 349–359.

UNESTAM T. & SÖDERHÄLL K. (1977). Specialisation in crayfish defence and fungal aggressiveness upon crayfish plague infection. *Freshw. Crayfish*, **3**, 321–331.

UNESTAM T. & WEISS D.W. (1970). The host-parasite relationship between freshwater crayfish and the crayfish disease fungus *Aphanomyces astaci*: responses to infection by a susceptible and a resistant species. *J. Gen. Microbiol.*, **60**, 77–90.

VILJAMAA-DIRKS S. (2006). Improved detection of crayfish plague with a modified isolation method. *Freshw. Crayfish*, **15**, 376–382.

VILJAMAA-DIRKS S., HEINIKAINEN S., NIEMINEN M., VENNERSTRÖM P. & PELKONEN S. (2011): Persistent infection by crayfish plague *Aphanomyces astaci* in a noble crayfish population – a case report. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.*, (in press).

VRÅLSTAD T., JOHNSEN S.I., FRISTAD R., EDSMAN L. & STRAND D.A. (2011). Potent infection reservoir of crayfish plague now permanently established in Norway. *Dis. Aquat. Org.*, **97**, 75–83.

VRÅLSTAD T., KNUITSEN A.K., TENGS T. & HOLST-JENSEN A. (2009). A quantitative TaqMan[®] MGB real-time polymerase chain reaction based assay for detection of the causative agent of crayfish plague *Aphanomyces astaci*. *Vet. Microbiol.*, **137**, 146–155.

WHITE T.J., BRUNS T., LEE S. & TAYLOR J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Innis M.A., Gelfand D.H., Sninsky J.J., White T.J., eds. Academic Press, San Diego, California, USA, pp. 315–322.

*
* *

NB: Existen Laboratorios de Referencia de la OIE para la Plaga del cangrejo de río (*Aphanomyces astaci*) (puede consultarse la lista actualizada en la Tabla del final de este *Manual Acuático* o en la página web de la OIE: www.oie.int).