

Influencia de la edad en la susceptibilidad a la afanomicosis del cangrejo señal *Pacifastacus leniusculus* (Dana, 1852)

F. Royo López, O. Gironés Puñet, I. de Blas Giral, J. Diéguez Uribeondo y J. L. Múzquiz Moracho

Departamento de Patología Animal. Patología Infecciosa y Epidemiología. Facultad de Veterinaria. Universidad de Zaragoza. Miguel Servet, 177. E-50013 Zaragoza, España. Correo electrónico: muzquiz@unizar.es

Recibido en julio de 2001. Aceptado en febrero de 2002.

RESUMEN

El cangrejo señal *Pacifastacus leniusculus* (Dana, 1852) es una especie americana introducida en España portadora de afanomicosis. Aunque generalmente los cangrejos de esta especie se encuentran infectados por el hongo causante de esta enfermedad, *Aphanomyces astaci* (Schikora), éstos sólo suelen verse afectados en condiciones de estrés. Entre los factores que predisponen a la afanomicosis destaca la presencia de otras especies parásitas, que pueden hacer que la infección crónica pase a ser aguda y mortal.

Dado que hasta la fecha se han realizado muy pocas investigaciones sobre la sensibilidad de esta especie y la influencia de factores como la edad, se realizó un estudio con cuatro grupos de *P. leniusculus* diferenciados por año de nacimiento. Los cuatro grupos fueron expuestos a zoosporas de *A. astaci* buscando diferencias en la mortalidad entre los grupos.

Los resultados demuestran que *P. leniusculus* puede padecer la enfermedad, incluso a concentraciones consideradas como subletales y en grupos de edad jóvenes, que hasta ahora se habían descrito como menos susceptibles a la afanomicosis. La diferencia observada entre los grupos no es significativa, lo que no permite concluir que existiera distinta susceptibilidad entre los grupos de edades establecidos.

Palabras clave: *Aphanomyces astaci*, sistema inmune, infección experimental.

ABSTRACT

Impact of age on susceptibility to aphanomycosis diseases in signal crayfish *Pacifastacus leniusculus* (Dana, 1852)

The signal crayfish *Pacifastacus leniusculus* (Dana, 1852) is an American species that was introduced into Spanish rivers. This species carries the fungus responsible for aphanomycosis, *Aphanomyces astaci* (Schikora), and can transmit it to the native European crayfish species. Although *P. leniusculus* is often a carrier of this fungus, it generally does not suffer from aphanomycosis; however, if individuals are under stressful conditions, such as the presence of another pathogen or parasite, the chronic infection can develop into an acute, fatal condition.

The present paper describes an experiment in which four groups of *P. leniusculus*, of different ages, were exposed to *A. astaci* zoospores, in order to compare differences in susceptibility. Our results show that *P. leniusculus* can die of this disease at concentrations formerly considered sublethal for this species, and also that crayfish juveniles can suffer from this disease. However, significant inter-group differences were not found.

Keywords: *Aphanomyces astaci*, immune system, experimental infection.

INTRODUCCIÓN

La afanomicosis o peste del cangrejo es una enfermedad producida por el hongo oomycete *Aphanomyces astaci* (Schikora). Este hongo ha afectado a las especies de cangrejo autóctono europeas desde finales de siglo pasado de una forma devastadora y, especialmente, desde que en los años sesenta se produjeron importaciones masivas de cangrejo señal de EE UU (Persson y Söderhäll, 1983).

En España los primeros casos de afanomicosis se describieron en la década de los años setenta, relacionados con la importación de cangrejo rojo, *Procambarus clarkii* (Girard, 1852), y cangrejo señal, *Pacifastacus leniusculus* (Dana, 1852); desde entonces, las poblaciones de cangrejo autóctono, *Austropotamobius pallipes* (Lereboullet, 1858), han sufrido una fuerte regresión (Diéguez-Uribeondo, Temiño y Múzquiz, 1997).

Una de las líneas de investigación más interesantes emprendidas sobre la afanomicosis es la que abordó el problema desde el estudio del sistema inmune del cangrejo, especialmente el del cangrejo señal, que presenta una alta resistencia a esta enfermedad de forma natural (Persson y Söderhäll, 1983).

Las experiencias llevadas a cabo en este terreno han mostrado siempre que todas las especies de cangrejos presentaban un sistema inmunológico con elementos comunes. Intervienen mecanismos humorales y celulares, que desencadenan una serie de reacciones enzimáticas conocidas como sistema de activación de la profeniloxidasasa (ProPO), un equivalente al sistema de complemento de los mamíferos (Söderhäll, Cerenius y Johansson, 1996), en los que diferentes proteínas determinan el reconocimiento de los β -1-3-glucanos de la pared del hongo, la activación del sistema ProPO y la activación de los hemocitos, células que van a actuar en la encapsulación y la fagocitación de las hifas que penetran en la cutícula (Holmblad y Söderhäll, 1999).

Se ha descrito la actividad de algunas enzimas liberadas que actúan cuando *A. astaci* es encapsulado en la cutícula del cangrejo. Estas enzimas, por ejemplo, inhibidores de proteinasas, presentan una actividad específica contra las enzimas proteolíticas de *A. astaci* (Diéguez-Uribeondo y Cerenius, 1998). Sin embargo, esta inmunidad innata del cangrejo contra el hongo no es suficiente, de forma que el cangrejo autóctono termina sucumbien-

do rápidamente a la enfermedad. Por el contrario, en las especies americanas como *P. leniusculus*, el sistema inmunológico controla la infección de forma que el hongo queda generalmente aislado, por ejemplo, melanizado en la cutícula, o la infección progresa más lentamente (Persson y Söderhäll, 1983).

La presencia de una infección crónica disminuye la posibilidad de reacción del sistema inmunológico de *P. leniusculus* frente a otras enfermedades. Por ejemplo, las infecciones por el parásito *Psorospermium haeckeli* (Hilgendorf, 1883) (Protozoa, Mesomycetozoea, Ichthyophonida), suponen una mayor activación de células de la hemolinfa, desencadenan un desequilibrio entre la afanomicosis que portan los cangrejos señal y su sistema inmunológico, y ocasionan la muerte de los cangrejos por la afanomicosis de la que son portadores (Söderhäll y Cerenius, 1992).

Con estos datos, parecería lógico pensar que el grado de desarrollo o madurez del sistema inmune podría influir en la resistencia a la afanomicosis del cangrejo señal. Para valorar esta diferencia, realizamos un experimento consistente en una exposición de cuatro grupos de cangrejo señal de diferentes edades a las zoosporas producidas por una cepa de *A. astaci*, aislada a partir de un caso de mortalidad en cangrejos de río, siendo el indicador de la diferente susceptibilidad a la enfermedad la mortalidad presente en los diferentes grupos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se establecieron cuatro grupos de edades, con 6 ejemplares cada grupo: juveniles del año, cangrejillos de 2.º año, cangrejos de 3.º año y adultos reproductores.

Los cangrejos se colocaron en acuarios, con oxigenación forzada y refugios formados por ladrillos, una semana antes del inicio del experimento. Se les administró una dieta compuesta por patata cocida y pienso para trucha, distribuida regularmente cada siete días. El agua de los acuarios se renovó cada quince días a lo largo de la experiencia.

La cepa de *A. astaci* fue la cepa CHX, que había sido aislada en nuestro laboratorio el año anterior de un caso de mortalidad en cangrejo autóctono, habiéndose comprobado su virulencia mediante una experiencia similar con cangrejo autóctono.

Para llevar a cabo la infección experimental se siguió el procedimiento descrito por Cerenius *et al.*

(1987) para la producción masiva de zoosporas. La concentración final de esporas, medida en una cámara de recuento de células sanguíneas, fue de 10^3 zoosporas/ml. Esta concentración es diez veces menor que la utilizada por dichos autores en las infecciones experimentales sobre *Astacus astacus* (Linnaeus, 1758).

La infección se llevó a cabo poniendo en contacto los cangrejos con las zoosporas en un litro de agua durante dos horas, reintegrándolos luego al acuario, junto al agua con zoosporas.

Los cangrejos fueron mantenidos en el acuario durante dos meses, realizando inspecciones diarias. Cuando se producía alguna baja, esta se retiraba inmediatamente y se analizaba mediante microscopio óptico su cutícula y sus branquias para detectar la presencia de hifas, y en concreto la presencia de *A. astaci*, para lo cual las cutículas se mantenían en agua.

Al término de los dos meses, los animales supervivientes fueron sacrificados, previa anestesia por frío, y las cutículas analizadas mediante microscopía óptica en busca de hifas; asimismo, se realizaron cultivos de las muestras en PD1 (Medio Peptona Glucosa 1) para el aislamiento de *A. astaci*.

RESULTADOS

Al término de la experiencia, los ejemplares se tallaron y se pesaron; los valores medios de estas medidas se resumen en la tabla I.

Durante la experiencia, se produjeron dos bajas: un ejemplar del grupo de juveniles del año, y otro del grupo de 3.^{er} año. El resto de cangrejos no presentó ningún síntoma de enfermedad y fue sacrificado al término de los dos meses.

De las bajas producidas, la del cangrejo juvenil se produjo la tercera semana postinfección, y pudo aislarse *A. astaci* tanto en la superficie de la cutícula subabdominal como en las branquias, presentando éstas una infección masiva.

La muerte del cangrejo de 3.^{er} año se produjo en la sexta semana postinfección y no se detectó ningún tipo de lesiones, ni crecimiento de hifas en la cutícula subabdominal del cangrejo.

Al término de la experiencia, se realizó el sacrificio y la necropsia de los ejemplares de los cuatro grupos. Los resultados obtenidos se exponen en la tabla II.

Tabla I. Longitud y peso medios de cada grupo al término del experimento.

Grupo	Longitud (mm)	Peso (g)
Cangrejos del año	3,8	4,0
Cangrejos de 2. ^o año	6,6	10,4
Cangrejos de 3. ^{er} año	9,7	25,2
Cangrejos adultos	11,4	38,0

Tras el sacrificio, sólo en los cangrejos del año pudieron identificarse hifas mediante microscopía óptica. Sin embargo, tras 48 h en agua, se desarrollaron hifas en todas las cutículas. De igual forma, pudo aislarse el hongo *A. astaci* mediante cultivo en los cuatro grupos.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Tras analizar los resultados obtenidos, se puede destacar la existencia de una baja debida a una infección por afanomicosis y la existencia de infecciones crónicas en los juveniles de primer año. Los resultados a partir de la necropsia muestran la presencia de hifas desarrolladas únicamente en el grupo de cangrejos más jóvenes.

Esta presencia podría estar relacionada con una menor capacidad de los mecanismos defensivos para limitar el desarrollo de las hifas, a diferencia de lo que ocurre en cangrejos más adultos, que son portadores de hifas vivas de *Aphanomyces*, pero que no llegan a desarrollar micelios externos hasta 48 h post mórtem.

La peor eficacia en la neutralización de las hifas por parte de los cangrejos más jóvenes podría suponer también que existen importantes diferencias en la capacidad de transmisión de la enfermedad entre cangrejo señal y autóctonos según la edad de los primeros.

Debemos enfatizar el hecho de que, contrariamente a lo que en algunas ocasiones se ha sugerido, el cangrejo señal es una especie que sufre mortalidad, tanto experimentalmente como en la

Tabla II. Resultados de los análisis, mediante microscopía óptica y cultivo, al término del experimento.

Grupo	Presencia de hifas	Cultivo
Cangrejos del año	Sí	<i>A. astaci</i>
Cangrejos de 2. ^o año	No	<i>A. astaci</i>
Cangrejos de 3. ^{er} año	No	<i>A. astaci</i>
Cangrejos adultos	No	<i>A. astaci</i>

naturaleza, a causa de las infecciones fúngicas por *A. astaci*. También es importante reseñar que los juveniles de un año pueden morir y padecer la enfermedad de forma tan acusada como los ejemplares adultos.

Distintas experiencias han evidenciado que el número de hemocitos circulantes influye de forma definitiva en la resistencia del cangrejo señal, y cuando aquel descende (por ejemplo, en las infecciones producidas por el parásito *Psorospermium*) o se induce dicha inmunosupresión de forma experimental inyectando extractos de pared celular de levaduras, la mortalidad debida a la propia infección crónica es casi tan elevada como la de las epidemias que afectan al cangrejo autóctono (Söderhäll y Cerenius, 1992; Persson, Cerenius y Söderhäll, 1987).

En todo caso, se deben tomar con cautela los resultados obtenidos en el presente estudio, válido en las condiciones experimentales utilizadas y con la cepa empleada para la infección. El estudio deberá completarse con experiencias que tengan como objetivo alcanzar un mayor grado de mortalidad mediante la inducción de inmunosupresión en los cangrejos y la exposición a concentraciones más altas de zoosporas, lo cual permitirá sin duda establecer mayores diferencias entre los cangrejos de diversas edades.

AGRADECIMIENTOS

A la Diputación General de Aragón (DGA) que financia mediante una beca de formación de personal investigador (referencia B004/2000) a Félix Royo López, así como el proyecto "Recuperación del cangrejo de río (*Austropotamobius pallipes*) de

Aragón" (referencia PO 17/ 99-AV); al Plan de Recuperación de *A. pallipes* del Servicio de Medio Ambiente del Gobierno de Navarra. A la Caja de Ahorros de la Inmaculada (CAI) que financió mediante el proyecto "Europa" a Félix Royo López en su estancia en el Departamento de Fisiología Comparada, del Centro de Biología Evolutiva de Uppsala, Suecia.

BIBLIOGRAFÍA

- Cerenius, L., K. Söderhäll, M. Persson y A. Ajaxon. 1987. The crayfish plague fungus *Aphanomyces astaci*- diagnosis, isolation and pathobiology. *Freshwater Crayfish* 7: 131-144.
- Diéguez-Uribeondo, J., C. Temiño y J. Múzquiz. 1997. The crayfish plague fungus (*Aphanomyces astaci*) in Spain. *Bull. Franç. Pêche Piscic.* 347: 753-763.
- Diéguez-Uribeondo, J. y L. Cerenius. 1998. The inhibition of extracellular proteinases from *Aphanomyces* spp. by three different proteinase inhibitors from crayfish blood. *Mycological Research* 102: 820-824.
- Holmblad, T. y K. Söderhäll. 1999. Cell-adhesion molecules and antioxidative enzymes in a crustacean, possible role in immunity. *Aquaculture* 172: 111-123.
- Persson, M. y K. Söderhäll. 1983. *Pacifastacus leniusculus* Dana and its resistance to the parasitic fungus *Aphanomyces astaci* Schikoria. *Freshwater Crayfish* 5: 292-298.
- Persson, M., L. Cerenius y K. Söderhäll. 1987. The influence of the haemocyte number on the resistance of the freshwater crayfish, *Pacifastacus leniusculus* Dana, to the parasitic fungus *Aphanomyces astaci*. *J. Fish Diseases* 10: 471-477.
- Söderhäll, K. y L. Cerenius. 1992. Crustacean immunity. *Annual Review of Fish Diseases* 2: 3-23.
- Söderhäll, K., L. Cerenius y M. W. Johansson. 1996. The prophenoloxidase activating system in invertebrates. En: *New directions in Invertebrate Immunology*. K. Söderhäll, S. Iwanaga y G. Vasta (eds.): 229-253. SOS Publications. Fair Haven (New Jersey), EE UU.