



MALATTIE INFETTIVE

La peste del gambero: una minaccia per la biodiversità dei nostri eco sistemi fluviali

RICCARDO CAPRIOLI, CARLA GIANANTE E NICOLA FERRI

Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise "G. Caporale"

A *ustropotamobius pallipes* (Lereboullet, 1858), o gambero di fiume dai piedi bianchi, è un gambero di taglia media, 12-13 cm di lunghezza e circa 90 g di peso, la cui livrea varia dal colore bruno al verdastro con sfumature gialle e rossastre (foto 1). Predilige zone montane e pedemontane con acque fresche (non sopravvive a temperature superiori a 22 °C), e poco correnti. È una specie longeva, con durata di vita anche superiore a dieci anni, basso tasso di sopravvivenza giovanile, crescita lenta, maturità tardiva che sopravviene dopo il terzo o quarto anno di vita e bassa fecondità [26]. Presenta abitudini crepuscolari e notturne, comportamento considerato adattativo in quanto riduce i rischi di predazione. Vive negli anfratti, sotto le pietre, tra le radici e sotto le foglie degli alberi posti lungo le rive e in gallerie che scava lungo le sponde. È onnivoro, ma dimostra spiccata preferenza per sostanze di origine animale. Il periodo riproduttivo inizia a fine settembre-ottobre e coincide con la diminuzione della temperatura dell'acqua. L'accoppiamento è lento, laborioso e a volte cruento. Il maschio rovescia la femmina sul dorso e deposita delle spermatofore in prossimità dello sbocco degli ovidutti. Dopo l'accoppiamento, la femmina si rifugia in un nascondiglio dove emette le uova, in numero variabile da cinquanta a cento, a seconda della taglia dell'animale. Le uova restano fissate alle appendici materne, (pleopodi), e sono mantenute pulite e ossigenate dalla femmina, fino alla schiusa, che avviene tra la fine della primavera e l'inizio dell'estate.

L'inquadramento tassonomico delle popolazioni indigene di gamberi di acqua dolce in Italia è stato a lungo oggetto di discussione. I primi studi di genetica molecolare hanno suggerito l'esistenza di due distinte specie, *A. pallipes* e *A. italicus* [10]. Tuttavia, un recente studio pubblicato nel 2011 [7], integrando l'analisi delle sequenze dei geni mitocondriali e il *fingerprinting* genomico, non ha supportato l'esistenza di due specie, riconoscendo *A. pallipes* come unico taxon.

Il gambero di fiume: specie autoctona da salvaguardare

Il gambero di fiume dai piedi bianchi ricopre un importante ruolo nell'ecosistema, ponendosi alla base della catena del pascolo e del detrito [25].

In Europa, le specie indigene di gamberi di fiume hanno subito un generale decremento e sono considerate specie rare, la cui pesca è vietata o soggetta a ben precise regolamentazioni a livello internazionale. In particolare, la specie *A. pallipes* è considerata una specie vulnerabile [3], ed è stata inserita nella Lista Rossa degli Animali a Rischio della *International Union for the Conservation of Nature and Natural Resources* (IUCN), come specie vulnerabile, e negli Allegati II e IV della Direttiva per la Conservazione degli Habitat Naturali e della Flora e Fauna Selvatica (Direttiva 92/43/CEE).

Le cause della rarefazione nel numero e nella distribuzione delle popolazioni di *A. pallipes* sono molteplici e includono l'inquinamento chimico delle acque, le modificazioni dell'habitat fisico, la pesca di frodo. Ma il fattore principale è stato certamente l'introduzione di specie aliene di gamberi di acqua dolce originarie dell'America del Nord, che ha avuto inizio già dalla metà del secolo diciannovesimo [1]. Tra le specie aliene introdotte in Europa, il gambero rosso della Louisiana (*Procambarus clarkii*) è la specie più invasiva e più dannosa per l'ambiente e la biodiversità. Importata in Spagna dagli Stati Uniti nel 1972, ha da allora invaso tutta l'Europa. In Italia è stata segnalata in Piemonte nel 1989 e si è poi diffusa in molte altre Regioni [21]. Altre specie aliene presenti nel nostro Paese sono *Pacifastacus leniusculus* e *Orconectes limosus* [2]. Queste specie Nord americane, oltre a rappresentare dei competitori diretti e indiretti per *A. pallipes*, sono portatori sani della "peste del gambero", una malattia che, in alcuni Paesi europei, ha eliminato intere popolazioni di gamberi indigeni [28].

La peste del gambero

Eziologia e patogenesi

La peste del gambero è la più importante malattia infettiva dei crostacei d'acqua dolce ed è causata da *Aphanomyces astaci*, un oomicete appartenente alla famiglia delle Saprolegniaceae. Il fungo è in grado di attaccare le aree meno calcificate della cuticola e le membrane delle articolazioni dei Crostacei. L'infezione da *A. astaci* può provocare gravi morie tra le popolazioni di specie indigene europee e per questo motivo l'agente è stato incluso tra le 100 specie aliene invasive più dannose al mondo [18]. La peste del gambero è inclusa nella lista delle malattie sottoposte a obbligo di denuncia all'Ufficio Internazionale delle Epizoozie (OIE), pertanto i focolai confermati da una diagnosi di laboratorio devono essere immediatamente notificati.

A differenza di quelle europee, le specie di origine Nord americana presentano scarsa sensibilità all'infezione, che si manifesta in genere in forma subclinica. Gli individui infetti agiscono quindi da portatori sani di *A. astaci* favorendone la diffusione [22, 23].

Le specie Nord americane, grazie al loro comportamento invasivo, sono ormai largamente diffuse in Europa e hanno contribuito alla diffusione della peste del gambero tra le popolazioni autoctone in molte aree del continente [13]. Nella maggior parte dei casi, infatti, l'introduzione di *A. astaci* in una popolazione suscettibile di gamberi europei provoca elevati livelli di mortalità, portando spesso alla scomparsa dell'intera popolazione colpita in un breve periodo di tempo.

A. astaci è un parassita specializzato dei gamberi di acqua dolce in quanto non sono stati osservati né ospiti intermedi né stadi di quiescenza [30]. La malattia si trasmette da gambero a gambero tramite zoospore mobili. La zoospora rappresenta lo stadio infettante di *A. astaci* e ne consente la

diffusione nell'acqua; essa è infatti attratta da molecole rilasciate dalla cuticola dei gamberi, aderisce al loro esoscheletro tramite flagelli e lo perfora grazie all'azione di enzimi. Un tubo germinativo penetra poi attraverso gli strati della cuticola e le ife vegetative cominciano a svilupparsi invadendo il tessuto sottocutaneo. La morte del gambero è probabilmente la conseguenza di squilibri metabolici e osmotici indotti dall'oomicete e dalla diffusione delle ife nel tessuto nervoso.

Epidemiologia

L'agente è stato probabilmente introdotto in Europa per la prima volta nel 1859 proprio in Italia [8], insieme alle



Foto 2. Gamberi di fiume rinvenuti morti a seguito di infezione di *A. astaci* in un torrente del bacino del fiume Vomano.



Foto 1. Esemplare maschio di gambero di fiume fotografato ai margini della sponda riparia.



Foto 3. Incubatoio di gamberi di fiume dell'IZS Abruzzo e Molise "G. Caporali" allestito alle sorgenti del fiume Tirino nel comune di Capestrano.

prime importazioni di gamberi dal Nord America [1]. Da qui in breve tempo si è diffuso in tutta Europa colpendo le specie autoctone sensibili alla malattia [30]. Attualmente le tecniche di tipizzazione molecolare basate sulla PCR, come la RAPD (*Random Amplification of polymorphic DNA*), hanno consentito di riconoscere almeno cinque diversi genotipi di *A. astaci* presenti in Europa [14, 19]. Questi genotipi sono stati probabilmente introdotti in Europa insieme alle diverse specie di gamberi Nord americani e sembrano essere tuttora associate a queste. Il genotipo As è probabilmente quello che ha causato la prima ondata epidemica nel XIX secolo e da allora ha continuato a circolare in Europa. Questo genotipo sembra attualmente associato solo alle specie autoctone europee e si ritiene possa essere meno aggressivo degli altri quattro genotipi, probabilmente introdotti in Europa negli ultimi 50 anni con le successive importazioni di specie aliene [15; 16]. I genotipi Psl e PsII sono stati isolati da *Pacifastacus leniusculus*, il genotipo Pc da *Procambarus clarkii*, mentre il genotipo Or è riferibile a *Orconectes limosus* [17].

Negli ultimi 50 anni, quindi, la principale via di diffusione della peste in Europa è coincisa con l'introduzione deliberata di gamberi americani a fini di popolamento, oppure con la fuga di esemplari della stessa specie, da impianti di allevamento. La colonizzazione da parte dei gamberi americani, di ambienti già occupati da popolazioni di gamberi europei altamente sensibili all'infezione da *A. astaci*, porta spesso allo sviluppo di focolai epidemici di peste.

Il corredo sintomatico legato alla malattia è variabile, e può dipendere anche dalla carica infettante o dalla temperatura dell'acqua. Nella prima fase dell'infezione i gamberi evidenziano un aumento dell'attività motoria, seguito da apatia e paralisi per alterazione del sistema nervoso. La morte sopraggiunge in genere dopo 6 giorni dal contatto con le zoospore, ma il decorso può protrarsi fino a 15 giorni, nel caso di dosi infettanti non elevate, unite a basse temperature dell'acqua. Al culmine dell'infezione, gli esemplari si rovesciano sul dorso, muovono convulsamente le appendici e manifestano atassia locomotoria (foto 2).

Un primo segno della presenza di un focolaio di peste è rappresentato dalla presenza, durante il giorno, di gamberi al di fuori dei ripari. Gli esemplari possono manifestare, già in questa fase, movimenti scoordinati con tendenza a ribaltarsi sul dorso e difficoltà nel riassumere la posizione normale.

In assenza di regolari attività di monitoraggio, i focolai vengono generalmente individuati con l'osservazione di episodi

di mortalità diffusa. L'infezione si diffonde più rapidamente nella stagione calda e nei tratti dove le popolazioni di gamberi presentano elevate densità. In queste condizioni, la mortalità è spesso del 100% e, nei grandi corsi d'acqua, tratti di decine di chilometri possono essere spopolati in poche settimane.

Diagnostica

L'osservazione di una moria di gamberi non è tuttavia sufficiente a stabilire una diagnosi di peste, anche in aree in cui la

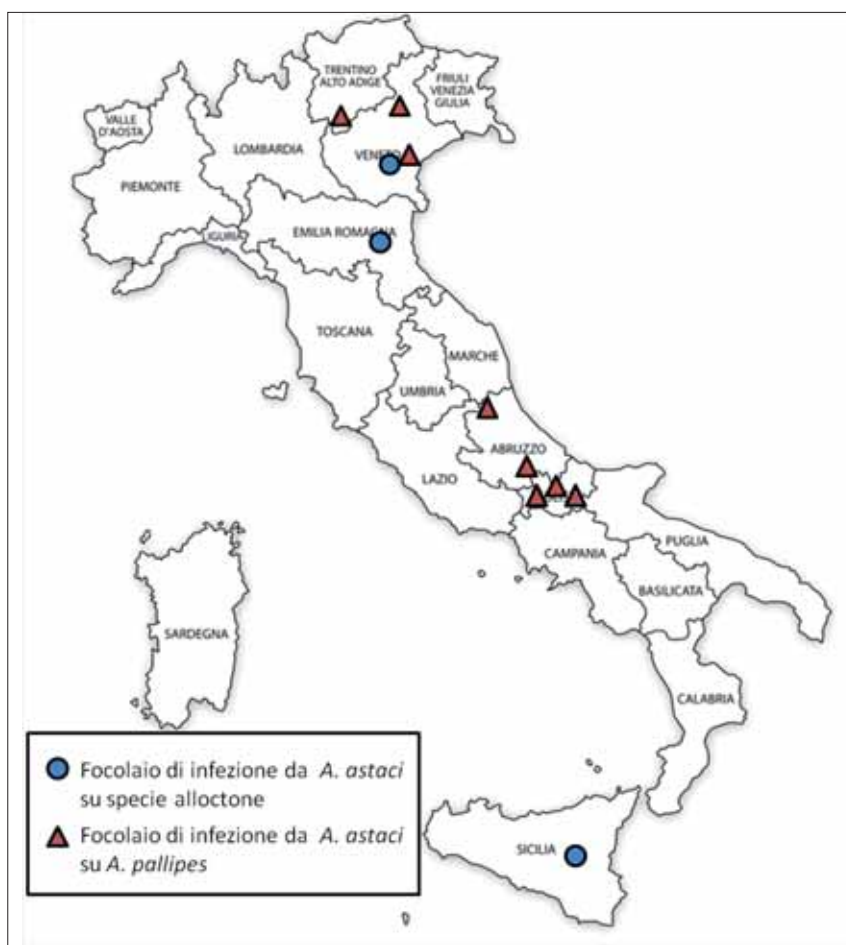


Figura 1. Localizzazione dei focolai di aphanomycosi segnalati in Italia.

malattia è già stata segnalata. Un elemento diagnostico importante è rappresentato dal verificarsi di una mortalità concomitante in altre specie della fauna acquatica, elemento non presente in caso di aphanomycosi, ma caratteristico invece di sversamenti accidentali o dolosi di sostanze chimiche tossiche. La successiva diagnosi di laboratorio è basata su un esame anatomico-patologico dei soggetti colpiti. Tale esame, pur se non patognomico, può evidenziare lesioni abbastanza tipiche, quali aree di melanizzazione sulla cuticola ventrale dell'addome e della coda, nonché sulle articolazioni delle appendici toraciche (pereiopodi).

Per la diagnosi di laboratorio, i campioni da prelevare ed

esaminare sono soprattutto la cuticola molle dell'addome, le articolazioni delle zampe, gli uropodi e i peduncoli oculari [23]. Frammenti di tessuto possono essere osservati a fresco al microscopio per la ricerca di ife e sporangi con le caratteristiche proprie di *A. astaci*. Gli stessi frammenti possono essere seminati su terreni nutrienti agarizzati, contenenti antibiotici per inibire la crescita dei contaminati batterici, ai fini dell'isolamento del patogeno. L'isolamento di *A. astaci* può essere tentato solo su campioni provenienti da individui morti da poche ore e conservati al fresco. La procedura richiede tempi lunghi, a volte superiori a 15 giorni. La fase di incubazione, è resa difficile dalla concomitante crescita di altre specie fungine e di batteri presenti nei campioni. Pertanto il metodo raccomandato dall'OIE per la diagnosi di un focolaio di peste del gambero è rappresentato dalla ricerca del DNA direttamente nei tessuti degli animali morti o moribondi. Il metodo prevede l'uso della real-time PCR, attraverso l'amplificazione di una sequenza target specifica di *A. astaci* (*Internal transcribed spacer 1*, o ITS1). Per la conferma definitiva della diagnosi molecolare, un frammento di 569 paia di basi della regione ITS viene poi amplificato mediante PCR convenzionale e sequenziato, per verificarne l'omologia con le sequenze archiviate nelle banche dati.

Profilassi

Lo sviluppo e il mantenimento di reti di sorveglianza attiva possono giocare un ruolo importante nel controllo della diffusione dell'aphanomicosi. Lo sviluppo di una rete di sorveglianza attiva prevede *in primis* il monitoraggio della presenza del gambero nei corpi idrici dell'area interessata, e dell'abbondanza delle relative popolazioni. Gli esemplari presenti nei differenti bacini idrici dovrebbero poi essere caratterizzati sotto il profilo morfologico e genetico, mediante analisi del DNA mitocondriale, per determinare la sottospecie di appartenenza e la dinamica delle popolazioni locali. Questa informazione riveste una particolare importanza anche per programmare le eventuali attività di ripopolamento.

Le azioni di monitoraggio hanno come obiettivo primario l'osservazione di episodi di mortalità che, spesso rappresentano la fase iniziale di un focolaio di peste, e il rilievo della presenza di gamberi alloctoni, competitori del gambero autoctono e potenziali portatori sani di *A. astaci*.

Una azione efficace e permanente di controllo delle popolazioni autoctone di *A. pallipes* comporta il coinvolgimento di diversi soggetti quali:

- servizi veterinari delle ASL;
- corpo Forestale dello Stato;
- amministrazioni dei parchi naturali e delle aree protette;
- guardie ittiche antibraconaggio;
- associazioni di pescatori sportivi;
- organizzazioni per la difesa e la conservazione dell'ambiente;
- tutti i soggetti che a vario titolo esercitano una presenza costante sul territorio.

L'organizzazione di eventi formativi e divulgativi, aperti a tutti i portatori di interesse, e mirati a far crescere la consapevolezza dell'importanza della protezione del gambero di fiume autoctono e della prevenzione della immissione di specie alloctone può contribuire in maniera determinante alla salvaguardia della specie in questione.

Gli Istituti zooprofilattici sperimentali possono contribuire alla profilassi della peste del gambero fornendo un supporto tecnico-scientifico ed epidemiologico alla organizzazione di programmi di sorveglianza, da attivare in presenza dei focolai di malattia.

La situazione in Italia

Le informazioni sulla presenza della peste del gambero in Italia sono sporadiche, sebbene si ritenga che il primo focolaio europeo possa essersi verificato in Val Padana intorno al 1860 [8, 9]. Nel corso del 1900 sono stati riportati episodi di mortalità tra le popolazioni di diverse regioni italiane, ma una specifica diagnosi di laboratorio di infezione da *A. astaci* non è mai stata effettuata [12]. Il patogeno è stato identificato per la prima volta nel nostro Paese in esemplari di origine Nord Americana della specie *P. clarkii*, catturati in provincia di Bologna nel 1998 [11]; più recentemente, tra il 2009 e il 2011, l'infezione ha colpito anche specie di origine australiana, *Cherax destructor* e *Cherax quadricarinatus*, allevate per scopi commerciali in un impianto veneto e uno siciliano [24,20].

Il primo focolaio italiano di peste del gambero in una popolazione selvatica di *A. pallipes* è stato documentato nel 2009 in Molise, in 3 torrenti del bacino del fiume Trigno [4]. Dopo questo primo episodio, altri focolai di peste, sono stati identificati e notificati all'OIE: in Veneto in provincia di Treviso nel 2010 e nel 2011, in provincia di Trento nel 2011, nuovamente in Molise, questa volta nel bacino del fiume Volturno nel 2011 e in provincia di Teramo, nel bacino del Fiume Vomano ancora nel 2011 [5]. Altri due gravi episodi si sono verificati tra luglio e inizio settembre del 2013 in provincia di Chieti e Isernia, rispettivamente sul torrente Rio Verde, affluente del fiume Sangro e sul torrente Gamberale, affluente del Trigno (figura 1).

Nei focolai del Nord Italia è stato possibile ipotizzare che la fonte dell'infezione potesse essere rappresentata dalla presenza diffusa di gamberi appartenenti a specie alloctone Nord americane. Al contrario, la presenza di gamberi alloctoni non è stata documentata nei bacini fluviali dell'Abruzzo e del Molise, e pertanto l'origine di quei focolai è rimasta sconosciuta.

Focolai di infezione da *A. astaci* in aree dove la presenza di gamberi appartenenti a specie americane non è mai stata riportata, sono già stati descritti per altre specie europee, come *Astacus leptodactylus* in Turchia [29, 16] e nel delta del Danubio [27] e *Astacus astacus* in alcuni laghi scandinavi [15, 31]. In entrambe le situazioni, le popolazioni di gamberi europee coinvolte non sono state completamente distrutte dall'infezione, ed è stata pertanto ipotizzata la persistenza

dell'infezione in forma cronica nelle popolazioni, forse favorita dall'evoluzione del patogeno verso un'attenuazione della virulenza [16]. In effetti, i ceppi di *A. astaci* coinvolti nei focolai appartenevano al genotipo As [14], mai riscontrato nei gamberi americani e che sembra essere meno virulento degli altri 4 genotipi descritti finora [17]. Sfortunatamente, i ceppi coinvolti nei focolai verificatisi in Abruzzo e Molise non sono stati isolati e tipizzati.

Lo studio di questi ultimi focolai ha comunque evidenziato che, in bacini fluviali costituiti principalmente da torrenti di montagna caratterizzati da bassa temperatura ed elevata velocità delle acque, nonché dalla presenza di cascate e altri ostacoli alla risalita a monte dei gamberi infetti o delle spore, la peste può non avere lo stesso massiccio impatto sulle popolazioni di *A. pallipes*, che si può invece riscontrare nei corsi d'acqua di pianura. Allo stesso tempo, la rarità di morie diffuse e il difficile accesso a molti tratti delle rive di questi torrenti rende difficile il rilevamento dei focolai. Questo rende ancora più importante lo sviluppo di programmi di monitoraggio attivo delle popolazioni di *A. pallipes*, al fine di evidenziare episodi di mortalità, la presenza di specie non autoctone e anche, mediante indagini molecolari su individui apparentemente sani, lo stato di portatore dell'infezione da *A. astaci*.

Le attività per la salvaguardia del gambero di fiume autoctono

Nel corso degli anni 2000, sono state portate avanti numerose iniziative per lo studio e la salvaguardia di questa specie, in particolare nell'ambito del Programma LIFE che cofinanzia progetti di conservazione dell'ambiente e della natura in tutto il territorio dell'Unione Europea.

Nell'ambito della componente tematica "Natura e biodiversità", dedicata alla conservazione di specie o habitat di interesse comunitario che vivono nel territorio dell'Unione, sono stati finanziati diversi progetti (LIFE03/NAT/IT/000137; LIFE+/08/NAT/IT/000352) che si ponevano quale obiettivo, la conservazione/incremento delle popolazioni di gambero autoctono, per mezzo di azioni di ricognizione sui corsi d'acqua, attività di caratterizzazione genetica, azioni di monitoraggio e contenimento delle specie alloctone, azioni di manutenzione e ripristino degli habitat, nonché azioni specifiche finalizzate alla reintroduzione di giovani individui di *A. pallipes*.

Il progetto LIFE RARITY (LIFE/10/NAT/IT/000239), descritto recentemente su questa stessa rivista [21], è invece focalizzato prevalentemente sul contenimento del gambero rosso della Louisiana (*Procambarus clarkii*) e sul rafforzamento delle popolazioni native di gamberi di acqua dolce in Friuli Venezia Giulia.

Anche l'Istituto Zooprofilattico dell'Abruzzo e del Molise "G. Caporale" (IZSAM), oltre ad esercitare le sue funzioni istituzionali nel controllo dei focolai di peste, si è impegnato in un progetto di ripopolamento di *A. pallipes* nei fiumi e torrenti della regione Abruzzo. Il progetto, sviluppato nell'ambito delle attività di salvaguardia dell'ambiente e del territorio locale, è stato finanziato nell'ambito della campagna di rac-

colta fondi relativi al "5 per mille", negli anni 2009 e 2010. Un finanziamento di origine comunitaria, attribuito nell'ambito dei Progetti "LEADER plus" a una *partnership* composta dal Comune di Capestrano, dal Parco Nazionale del Gran Sasso e Monti della Laga, e dai gruppi di Azione Locale (GAL) di Teramo e L'Aquila. Questi fondi hanno consentito la realizzazione e la gestione di un incubatoio per gamberi, sul fiume Tirino (foto 3). Nella struttura, situata nel Comune di Capestrano (L'Aquila) sono attualmente ospitati circa 100 esemplari dedicati alla riproduzione, provenienti da diversi bacini idrici della Regione Abruzzo. Questi riproduttori, indenni da *A. astaci*, hanno già compiuto due cicli riproduttivi [6]. La reintroduzione dei primi esemplari nati in cattività in un tratto del fiume Tirino ritenuto idoneo allo scopo è prevista per la seconda metà di ottobre.

Conclusioni

Le attività di prevenzione rappresentano allo stato attuale l'unica possibilità di contrastare la diffusione dell'aphanomicosi tra le popolazioni di gamberi di fiume autoctoni. Non sono infatti disponibili contromisure efficaci da adottare a seguito della comparsa della malattia in una popolazione selvatica.

È in questa prospettiva che l'Istituto zooprofilattico dell'Abruzzo e del Molise, insieme al Centro di Referenza Nazionale per le Malattie dei Crostacei dell'Istituto zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, oltre a garantire una potenzialità diagnostica rapida e affidabile in grado di escludere o confermare la presenza di *A. astaci* in caso di episodi di morie di gamberi, contribuisce alla elaborazione e al coordinamento di piani di monitoraggio e sorveglianza, nonché alla implementazione di studi epidemiologici volti a comprendere le fonti e le vie di trasmissione della malattia, e a limitarne la diffusione.

Bibliografia

1. Alderman DJ. Geographical spread of bacterial and fungal diseases of crustaceans. *Revue Scientifique Et Technique De L'Office International Des Epizooties*. 1996;15:603-632.
2. Aquiloni L, Tricarico E, Gherardi F. Crayfish in Italy: distribution, threats and management. *International Aquatic Research*. 2010;2:1-14.
3. Baillie J, Groombridge B. *Red List of Threatened Animals*. IUNC, Gland, Switzerland, 1996.
4. Cammà C, Ferri N, Zezza D, Marcacci M, Paolini A, Ricchiuti L, Lelli R. Confirmation of crayfish plague in Italy: detection of *Aphanomyces astaci* in white clawed crayfish. *Disease of Aquatic Organism*. 2010;89:265-268.
5. Caprioli R, Cargini D, Marcacci M, Cammà C, Giansante C, Ferri N. Self-limiting outbreak of crayfish plague in an *Austropotamobius pallipes* population of a river basin in the Abruzzi region (central Italy). *Diseases of Aquatic Organisms*. 2013;103:149-156.

6. Caprioli R, Garozzo P, Giansante C, Ferri N. Reproductive performance in captivity of *Austropotamobius pallipes* in Abruzzi Region (central Italy). *Invertebrate Reproduction & Development*. 2013;DOI: 10.1080/07924259.2013.827136.
7. Chiesa S, Scalici M, Negrini R, Gibertini G, Nonnis Marzano F. Fine-scale genetic structure, phylogeny and systematic of threatened crayfish species complex. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 2011;61:1-11.
8. Cornalia E. Sulla malattia dei gamberi. *Atti della Società Italiana delle Scienze Naturali*. 1860;2:334-336.
9. Edgerton BF, Henttonen P, Jussila J, Mannonen A, Paasonen P, Taugbøl T, Edsman L, Souty-Grosset C. Understanding the causes of disease in European freshwater crayfish. *Conservation Biology*. 2004;18:1466-1474.
10. Fratini S, Zaccara S, Barbaresi S, Grandjean F, Souty-Grosset C, Crosa G, Gherardi F. Phylogeography of the threatened crayfish (genus *Austropotamobius*) in Italy: Implications for its taxonomy and conservation. *Heredity*. 2005;94:108-118.
11. Galuppi R, Quaglio F, Maxia M, Morolli C, Tampieri MP. Fungal infections in allochthonous freshwater crayfish in Northern Italy. *Freshwater Crayfish*. 2001;13:267-273.
12. Gherardi F. The situation in Italy. In: Gherardi F, Baldaccini GN, Ercolini P, Barbaresi S and others (eds) *Crayfish in Europe as alien species*. AA Balkema, Rotterdam. 1999;107-128.
13. Holdich, DM, Reynolds JD, Souty-Grosset C, Sibley PJ. A review of the ever increasing threat to European crayfish from non-indigenous crayfish species. *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems*. 2009;11:394-395.
14. Huang T-S, Cerenius L, Söderhäll K. Analysis of genetic diversity in the crayfish plague fungus, *Aphanomyces astaci*, by random amplification of polymorphic DNA. *Aquaculture*. 1994;126:1-9.
15. Jussila J, Makkonen J, Vainikka A, Kortet R, Kokko H. Latent crayfish plague (*Aphanomyces astaci*) infection in a robust wild noble crayfish (*Astacus astacus*) population. *Aquaculture*. 2011;321:17-20.
16. Kokko H, Koistinen L, Harlio lu MM, Makkonen J, Aydın H, Jussila J. Recovering Turkish narrow clawed crayfish (*Astacus leptodactylus*) populations carry *Aphanomyces astaci*. *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems*. 2012;404:1-7.
17. Kozubíková E, Viljamaa-Dirks S, Heinikainen S, Petrussek A. Spiny-cheek crayfish *Orconectes limosus* carry a novel genotype of the crayfish plague pathogen *Aphanomyces astaci*. *J. Invertebrate Pathology*. 2011;108:214-216.
18. Lowe S, Browne M, Boudjelas S, De Poorter M. 100 of the world's worst invasive alien species. A selection from the Global Invasive Species Database, the Invasive Species Specialist Group (ISSG), a specialist group of the Species Survival Commission (SSC) of the IUCN. IUCN, Gland, 2004.
19. Makkonen J, Jussila J, Kokko H. The diversity of the pathogenic Oomycete (*Aphanomyces astaci*) chitinase genes within the genotypes indicate adaptation to its hosts. *Fungal Genetics and Biology*. 2012;49:635-642.
20. Marino F, Pretto T, Monaco S, De Stefano C, Manfrin A, Quaglio F. First report of Crayfish plague in *Cherax quadricarinatus* (Von Martens, 1868) reared in Sicily. IAA 19 Conference 2012, Innsbruck, Austria.
21. Nesto N, Zanetti M. Gambero rosso della Louisiana. Impatto sulla biodiversità, attività economiche e salute umana: il progetto RARITY. *Argomenti*. 2013;2:72-75.
22. Oidtmann B, Geiger S, Steinbauer P, Culas A, Hoffmann RW. Detection of *Aphanomyces astaci* in North American crayfish by polymerase chain reaction. *Disease of Aquatic Organisms*. 2006;72:53-64.
23. OIE (Office international des épizooties). Crayfish plague (*Aphanomyces astaci*), Chap 2.2.1. In: *Manual of diagnostic tests for aquatic animals*, 6th edn. Office international des épizooties, Paris, 2009:63-77. Available at: www.oie.int (accessed 22 March 2012).
24. Quaglio F, Pretto T, Dundon W, Zambon M, Gustinelli A, Manfrin A. First occurrence of *Aphanomyces astaci* epidemic infection in cultured yabby *Cherax destructor* (Clark, 1936) in Northern Italy. IAA 19 Conference 2012, Innsbruck, Austria.
25. Scalici M, Gibertini G. Feeding habits of the crayfish *Austropotamobius pallipes* (Decapoda, Astacidae) in a brook of Latium (central Italy). *Italian Journal of Zoology*. 2007;74:157-168.
26. Scalici M, Gibertini G. Reproduction in the threatened crayfish *Austropotamobius pallipes* (Decapoda, Astacidae) in the Licenza brook basin (central Italy). *Italian Journal of Zoology*. 2011;78:198-208.
27. Schrimpf A, Pârvulescu P, Copilas-Ciocianu D, Petrussek A, Schulz R. Crayfish plague pathogen detected in the Danube Delta – a potential threat to freshwater bio-diversity in southeastern Europe. *Aquatic Invasions*. 2012;7:503-510.
28. Strand DA, Holst-Jensen A, Viljugrein H, Edvardsen B, Klaveness D, Jussila J, Vrålstad T. Detection and quantification of the crayfish plague agent in natural waters: direct monitoring approach for aquatic environments. *Diseases of Aquatic Organisms*. 2011;95:9-17.
29. Svoboda J, Kozubíková E, Kozák P, Kouba A, Bahadır Koca S, Diler Ö, Diler I, Policar T, Petrussek A. PCR detection of the crayfish plague pathogen in narrow-clawed crayfish inhabiting Lake E irdir in Turkey. *Disease of Aquatic Organisms*. 2012;98:255-259.
30. Unestam T. On the host range and origin of the crayfish plague fungus. *Report of the Institute of Freshwater Research, Drottningholm*. 1972;52:192-198.
31. Viljamaa-Dirks S, Heinikainen S, Nieminen M, Vennerström P, Pelkonen S. Persistent infection by crayfish plague *Aphanomyces astaci* in a noble crayfish population – a case report. *Bulletin European Association Fish Pathology*. 2011;31:182-188.