

## El camarón de cultivo frente al WSSV, su principal patógeno

Martha Maldonado<sup>1</sup>, Jenny Rodríguez<sup>2</sup>, Ignacio de Blas<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Escuela Superior Politécnica del Litoral. Guayaquil (Ecuador)

<sup>2</sup> Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas. Guayaquil (Ecuador)  
e-mail: jrodrigu@cenaim.espol.edu.ec

<sup>3</sup> Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza (España)

### Resumen

La mancha blanca provocada por el WSSV (White Spot Syndrome Virus, por sus siglas en inglés) constituye hasta el momento la enfermedad más devastadora para el camarón de cultivo. En este artículo se ha realizado una revisión bibliográfica sobre el virus, la enfermedad que provoca, las armas con las que cuenta el hospedero para enfrentar su agresión y finalmente algunas alternativas exploradas por investigadores y productores para manejar la producción de camarón en condiciones de mancha blanca.

*Palabras clave:* mancha blanca, WSSV, camarón, *Litopenaeus vannamei*

### Summary

The white spot disease, produced by the white spot syndrome virus (WSSV), constitutes until now the most lethal disease of shrimp. This article constitutes a review about the virus, the disease, the shrimp mechanisms to fight the viral attack, as well as some approaches used to manage shrimp production under research or culture conditions.

*Key words:* white spot, WSSV, shrimp, *Litopenaeus vannamei*

### Introducción

La principal amenaza para el desarrollo de la industria camaronera son las enfermedades infecciosas especialmente las causadas por virus (Lightner, 1999). Aunque existen cerca de 20 virus reconocidos para camarones peneidos, únicamente cuatro tienen importancia económica para la industria acuícola: YHV (Yellow Head Virus), WSSV (White Spot Syndrome Virus), IHNV (Infectious Hematopoietic Necrosis virus) y TSV (Taura Syndrome Virus). La Mancha Blanca causada por el WSSV, es hasta el momento la más devastadora enfermedad reportada para camarones peneidos cultivados (Lightner, 1996; Flegel, 1997). Después de los primeros reportes de la presencia de WSSV en América Central (Jory y Dixon 1999), la enfermedad se detectó en Ecuador en mayo de 1999 y fue asociada a mortalidades masivas en ciertas camaroneras (Calderón *et al.*, 1999).

### La Mancha Blanca: ¿qué sabemos de la enfermedad?

#### 1. La evolución de la enfermedad

Las pruebas de desafío al WSSV han demostrado que este virus es altamente virulento, llegando a provocar mortalidades de hasta el 100% en los animales desafiados (Sahul *et al.*, 2001). En los estanques de cultivo de *Litopenaeus*

*vannamei* del Ecuador la enfermedad se presenta entre la tercera y sexta semanas de cultivo (CENAIM, resultados no publicados).

Aspectos a considerar en una infección con WSSV son el amplio número de hospederos, las múltiples vías de infección, la gran velocidad de replicación del virus, su poder de propagación y el estado fisiológico del huésped, el mismo que estaría estrechamente asociado a la temperatura. El WSSV tiene una diversidad de hospederos, ya que todos los crustáceos ensayados son susceptibles de infectarse con el virus (Wang *et al.*, 1997; Corbel *et al.*, 2001; Jiravanichpaisal *et al.*, 2001), pueden actuar como vectores y/o reservorios (Wang *et al.*, 1997). Entre las 24 y 35 horas el virus se multiplica 140 veces en los tejidos (Tang y Lightner, 2000).

A nivel histológico, se han detectado lesiones desde las 36 horas post-infección por ingestión (Sonnenholzner *et al.*, 2002). Se han observado grados severos de lesiones por WSSV en muestras tomadas entre los días 3° y 7° después de iniciarse la infección (Lightner *et al.*, 1998; Sonnenholzner *et al.*, 2002). Además la infección por WSSV se caracteriza por afectar un rango amplio de tejidos blancos, entre los que se encuentran el tejido epitelial, tejido conectivo, tejido hematopoyético y hemocitos (Durand *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 2002). Los primeros son de amplia distribución en el animal, en tanto que los hemocitos son los principales efectores de la respuesta inmune en los crustáceos (Johanson y Söderhäll, 1989). Por otra parte el estado fisiológico del hospedero sería también un aspecto crucial.

En *L. vannamei* la susceptibilidad al virus sería mayor a temperaturas frías (inferiores a 29°C). En estanques comerciales se han observado mayores pérdidas en la estación fría-seca que en la estación cálida-lluviosa (Rodríguez *et al.*, 2003b), en tanto que en ensayos de desafío a diferentes temperaturas se ha detectado resistencia en condiciones de hipertermia (Vidal *et al.*, 2001; Sonnenholzner *et al.*, 2002). Así mismo resulta interesante el hecho de que los animales infectados con WSSV mueren en postmuda (Echeverría *et al.*, 2002), sugiriendo una mayor susceptibilidad al virus durante la premuda tardía, tal como ha sido reportado para TSV por Hasson *et al.* (1999a).

La literatura ha reportado diferencias en la susceptibilidad al virus en diferentes especies de crustáceos. Infectando por inyección intramuscular a *Penaeus indicus*, *Penaeus monodon*, *Macrobrachium lamerrae* y *Macrobrachium idella* se ha obtenido el 100% de mortalidad pero a diferentes tiempos 72 horas, 48 horas, 5 días y 8 días post-inoculación respectivamente (Sahul *et al.*, 2000). Mortalidades entre el 3° y 6° día post infección han sido reportados en post-larvas de *Penaeus aztecus*, *Penaeus duorarum* y *L. vannamei*. Se han descrito mortalidades acumuladas del 100% para juveniles de *Penaeus setiferus* y *L. vannamei* al 8° día (Lightner *et al.*, 1998). En contraste *P. aztecus* demostró ser más resistente observándose un 27% de mortalidad acumulada en el mismo tiempo (Lightner *et al.*, 1998). En los cangrejos *Liocarcinus puber* y *Liocarcinus depurator*, el 100% de mortalidad se presentó al 8° y 9° día respectivamente (Corbel *et al.*, 2001). Se señala que el rápido incremento en la mortalidad entre el 4° y 5° día es una característica de las infecciones virales (Corbel *et al.*, 2001; Soon *et al.*, 2001).

Se han realizado infecciones experimentales con WSSV mediante inyección, inmersión e ingestión (Takahashi *et al.*, 1994). Las infecciones por inyección tienen la ventaja de permitir la infección con concentraciones virales conocidas y estandarizadas, sin embargo violan la primera barrera natural de defensa del camarón que es la cutícula y los mecanismos de defensa a ella asociados. El sitio de inyección característico es en la unión basal del 5° pereiópodo para cangrejos y entre el 2° y 3° segmento abdominal para crayfish, camarones y langostas (Corbel

*et al.*, 2001). Al contrario de la inyección, las infecciones realizadas por ingestión representarían una vía natural de infección (Lightner, 1998) y proveen una herramienta para evaluar y comparar resistencia al virus entre familias de *L. vannamei* (Moss *et al.*, 2001). Las infecciones por inmersión con WSSV realizadas en *L. vannamei* (Wu *et al.*, 2001) han demostrado que el agua constituye un vehículo de transmisión indicando el potencial peligro de altas cargas virales en los estanques de cultivo.

En cuanto a tolerancia a factores físico químicos, se ha determinado que el WSSV se mantiene viable en agua de mar estéril durante 5 días a una temperatura de 28°C y por más tiempo a temperaturas más bajas. También se puede mantener viable hasta por 4 días entre 25 y 28°C en el agua de estanques en donde han ocurrido brotes de la enfermedad (OIE, 2003).

Estudios sobre inactivación viral han determinado que el virus puede ser inactivado por modificaciones en temperatura, pH, productos químicos y luz ultravioleta. Así la inactivación ocurre a una temperatura de 50°C durante 20 minutos y a 70°C durante 5 minutos, en tanto que la inactivación por desecación se produce a 30°C. En cuanto al pH, el virus puede ser inactivado a pH 1 durante 10 minutos, pH 3 durante 1 hora y a pH 12 durante 10 minutos (a una temperatura de 25°C). Los productos químicos capaces de inactivar el virus son NaCl al 15% a una temperatura de 28°C durante 24 horas, 0.5 µg/ml de ozono residual durante 10 minutos a temperatura ambiente. La inactivación también se obtiene por reactivos oxidantes y éter etílico. Los desinfectantes capaces de inactivar al virus son hipoclorito de sodio y yodo (povidone) (100 ppm) durante 10 minutos y con 10 ppm durante 30 minutos; también con 75 ppm de cloruro de benzalconio durante 10 minutos. La radiación ultravioleta inactiva al virus mediante una exposición a  $9 \times 10^5 \mu\text{w s/cm}^2$  durante 60 minutos (OIE, 2003).

El diagnóstico de infecciones con WSSV involucra PCR, PCR anidado, sondas moleculares (hibridación *in situ*, inmunohistoquímica) y observaciones histológicas usando microscopio óptico y microscopio electrónico de transmisión (Lo *et al.*, 1997).

## 2. Signos clínicos de infección por WSSV

Los signos típicos del WSSV descritos en camarones peneidos son puntos blancos de 1 a 2 mm de diámetro dentro de la superficie del caparazón, observándose en el microscopio óptico una área oscura en el centro de este punto (Takahashi *et al.*, 1994; Soon *et al.*, 2001). El color del cuerpo de los animales enfermos es de pálido a rojizo, el órgano linfoide se presenta turgente, contraído (Takahashi *et al.*, 1994) o hipertrofiado (Vidal *et al.*, 2001).

En animales experimentalmente infectados, las características observadas han sido: coloración rojiza en urópodos, telson, pereiópodos, y pleópodos. Los animales presentan actividad reducida, desorientación, nado errático y falta de apetito. Estos mismos signos clínicos han sido observados después de 3 días de infección en cangrejos como *L. puber* y *L. depurator*, presentándose una rápida reducción en la ingestión del alimento y letargia.

Han sido detectadas alteraciones en el color de la hemolinfa tanto en camarones como en el cangrejo de agua dulce (Rodríguez *et al.*, 2003a; Jiravanishpaisal *et al.*, 2001), la cual puede presentarse de tono rosado en lugar del clásico azul-verdoso.

### 3. Características histopatológicas

Los estudios histológicos de animales moribundos revelan células degeneradas, caracterizadas por cuerpos de inclusión intranuclear eosinófilos a basófilos en núcleos hipertrofiados de células ectodermales y mesodermales de los apéndices, branquias, estómago, intestino anterior y posterior, tejido conectivo, glándula antenal, órgano linfoide, tejido hematopoyético, hemolinfa, corazón y una variedad de otros tipos de células. Sin embargo, no se han reportado inclusiones en el epitelio del hepatopáncreas, intestino medio o ciego del intestino medio (Lightner *et al.*, 1998; Sahul *et al.*, 2000).

Otro signo histopatológico recientemente reportado para infecciones con WSSV es una necrosis general en diferentes tejidos caracterizada por la presencia de células con picnosis y kariorrhexis nuclear, principalmente en órgano linfoide (Pantoja y Lightner, 2003; Rodríguez *et al.*, 2003b). Esta necrosis han conducido a crear confusiones en el diagnóstico entre WSSV y Yellow Head (Pantoja y Lightner, 2003).

### 4. Características ultraestructurales

La replicación del WSSV tiene lugar en el núcleo de las células infectadas. La morfogénesis viral comienza por la formación de membranas *de novo* en el nucleoplasma (Durand *et al.*, 1997). El agente causante de la enfermedad tiene forma de bacilo no ocluido. Las dimensiones de los viriones son de 275 nm de longitud y 83 nm de diámetro y las dimensiones de la nucleocápside son de 216 nm en longitud y 54 nm de diámetro (Takahashi *et al.*, 1994). En los núcleos infectados los viriones tienen una distribución paracristalina o desordenada. En todas las especies de cangrejos infectados, se han reportado envolturas de viriones, nucleocápsides libres y fragmentos de envolturas virales libres en la hemolinfa de animales moribundos (Corbel *et al.*, 2001).

## ¿Qué sabemos del hospedero?: el sistema inmune

La primera línea de defensa en los crustáceos es la cutícula, la cual constituye una barrera física y biológicamente activa (Sugumaran, 1996), a ella estarían asociados actividad microbicida (Destoumieux *et al.*, 2000) y actividad fenoloxidasa (Sugumaran, 1996). Parte esencial de la inmunidad es el estado de alerta por el cual un organismo puede detectar moléculas extrañas o no propias. Un buen sistema de reconocimiento de lo "no propio" estimula las respuestas de defensa. Los mecanismos de defensa innata están basados en componentes celulares y humorales del sistema circulatorio, lo que está interrelacionado con la detección y eliminación de patógenos extraños, microorganismos y parásitos que evidencien un peligro potencial para el huésped (Söderhäll y Cerenius, 1992; Vargas-Albores y Yepiz-Plascencia, 2000).

En vertebrados, el sistema inmune incluye memoria adaptativa, inmunoglobulinas específicas y células especializadas, tanto como la respuesta no específica a través de células fagocíticas y células NK (Vargas-Albores y Yepiz-Plascencia, 2000). Aunque recientemente se ha reportado evidencia de memoria adaptativa en crustáceos (Shelby *et al.*, 2003), éstos y todos los artrópodos no poseen un sistema inmunitario adaptativo basado en inmunoglobulinas que reconozcan epitopos específicos. Sin embargo, son capaces de reconocer y destruir microorganismos invasores y parásitos

por medio de mecanismos inmunitarios celulares y humorales que operan para mantener la integridad del organismo.

El hemocele de los crustáceos es de circulación abierta y las células sanguíneas que se encuentran en este sistema (hemocitos) son análogas a los glóbulos blancos de los vertebrados (Söderhäll y Cerenius, 1992; Söderhäll y Smith, 1983; Roch, 1999).

## 1. Compartimento celular

Los hemocitos de los crustáceos han sido clasificados en base a criterios estructurales, citoquímicos, antigénicos y funcionales. También son reconocidos morfológicamente como hialinos, semi-granulosos y granulosos (Smith y Söderhäll, 1983; Tsing, 1987; Hose y Martin, 1989; Söderhäll y Cerenius, 1992; Rodríguez *et al.*, 1995). Estas células pueden remover partículas extrañas del hemocele de crustáceos por medio de funciones de defensa como la fagocitosis o actividades de encapsulación (Johansson y Söderhäll, 1989; Söderhäll y Cerenius 1992; Martin *et al.*, 1998).

Los mecanismos moleculares de la inmunidad celular en artrópodos han sido conocidos con el desarrollo de técnicas que sirven para aislar y mantener los diferentes tipos de células sanguíneas de crustáceos y con la purificación de varias proteínas asociadas con el sistema profenoloxidasa (pro-PO) de cangrejos de agua dulce (Johansson y Söderhäll, 1989), y otras moléculas inmunitarias como peneidinas en peneidos (Destoumieux *et al.*, 1997; Muñoz *et al.*, 2002).

## 2. Características de los hemocitos

Los **hemocitos hialinos** son células de forma ovoide de 12,4 x 7,8  $\mu\text{m}$  de diámetro, libres de gránulos o con pocos gránulos, que bajo el microscopio de contraste de fase no son refráctiles (Martin y Graves, 1985). El núcleo es ovoide, el citoplasma forma una fina capa alrededor de éste y se expande ligeramente hacia los polos, además presentan ribosomas libres, retículo endoplásmico liso y rugoso y no presenta aparato de Golgi (Martin y Graves, 1985). En ellos no se han observado los gránulos presentes en los hemocitos semi-granulosos y granulosos, pero sí se han reportado gránulos estriados (Bachère *et al.*, 1995). En base a sus características ultraestructurales estos hemocitos han sido considerados como células jóvenes e inmaduras (Tsing, 1987; Van de Braak *et al.*, 2002a), precursoras de los otros tipos de hemocitos (Van de Braak *et al.*, 2002b).

Los **hemocitos semigranulosos** son células de forma ovoide (Martin y Graves, 1985). Tienen un diámetro ligeramente más ancho y largo que los hialinos (14,8 x 8,3  $\mu\text{m}$ ) y son fáciles de identificar bajo el microscopio óptico por la presencia de un número variable de pequeños gránulos oscuros en el citoplasma (Martin y Graves, 1985). El citoplasma también contiene ribosomas libres, retículo endoplásmico liso y rugoso y aparato de Golgi (Martin y Graves, 1985).

Los **hemocitos granulosos** son células de forma ovoides a esféricas, tienen un tamaño de 13,6 x 9,5  $\mu\text{m}$  al igual que los hemocitos semigranulosos (Martin y Graves, 1985). Al observarlos en el microscopio de contraste de fases se distinguen gránulos grandes altamente refráctiles que frecuentemente obscurecen el núcleo y provocan que la célula entera aparezca brillante. El citoplasma parece reducido debido a la presencia de los gránulos que llenan toda el área. Existen ribosomas libres y retículo endoplásmico rugoso pero no tan abundante como en los hemocitos semigranulosos (Martin y Graves, 1985).

### 3. Defensas celulares

La fagocitosis es un proceso de respuesta inmunitaria de tipo celular que contribuye a la eliminación directa de partículas extrañas o células envejecidas del propio organismo, y constituye la vía más clásica de defensa celular. En los crustáceos se han reportado fagocitos fijos en la glándula antenal, órgano linfoide, superficie de las arteriolas del sinus hemal del hepatopáncreas, éstos a diferencia de los encontrados en las branquias pueden eliminar proteínas y micropartículas mayores a 30 nm (para revisión ver Johnson, 1987). Las células circulantes pueden fagocitar y ocasionar respuestas inflamatorias las cuales amplifican las reacciones inmunes. Recientemente Muñoz *et al.* (2002) han demostrado en *L. vannamei* que la fagocitosis es realizada principalmente por los hemocitos hialinos. Por otra parte diferentes autores han comprobado la generación de radicales de oxígeno (ROIs) en ensayos de fagocitosis *in vitro* realizados con hemocitos de camarón (Song and Hsieh, 1994; Muñoz *et al.*, 2000).

La encapsulación es un proceso en el cual varios hemocitos cubren la partícula extraña formando capas alrededor de ella, provocando de esta manera su muerte (Söderhäll y Cerenius, 1992). La razón no es bien conocida aún, pero se puede atribuir a una acción tóxica por medio de los quinonas o por asfixia celular (Salt, 1963; Nappi, 1977; Poinar *et al.*, 1979). En efecto el proceso de encapsulación está normalmente acompañado de melanización. Por otra parte Holmblad y Söderhäll (1999) sugieren la generación de radicales de oxígeno en los procesos de encapsulación. Las subpoblaciones hemocitarias involucradas en la encapsulación son los hemocitos granuloso y semigranulosos (Tsing, 1987; Martin *et al.*, 1998).

### 4. Compartimento humoral

En el compartimento humoral de la hemolinfa (plasma) se encuentran en circulación innumerables moléculas de diferente rol fisiológico. Para mencionar sólo algunas podemos citar a la hemocianina, inhibidores de proteasas, proteínas de reconocimiento, varias lipoproteínas, entre ellas el factor de coagulación y la proteína fijadora de  $\beta$ -glucanos.

La hemocianina es considerada la proteína respiratoria, ya que interviene en el transporte de oxígeno. Esta proteína constituye el 60 al 95% de la proteína total del plasma (Djangmah, 1970). Está presente durante toda la vida del crustáceo como un oligomero de uno y dos hexámeros. En algunos crustáceos decápodos esta sujeta a cambios en su composición por factores ambientales y/o fisiológicos (Terwilliger y Dumler, 2001). La hemocianina tendría también actividad fenoloxidasas (Zlateva *et al.*, 1996). Por otra parte recientemente se ha reportado que péptidos antimicrobianos son generados a partir de la región C-terminal de esta proteína (Destoumieux *et al.*, 2001).

Un importante proceso en los crustáceos acuáticos es la rápida coagulación en las heridas para prevenir pérdidas sustanciales de hemolinfa y evitar el ingreso de microorganismos. El factor de coagulación de los crustáceos es un dímero de aproximadamente 400 kDa, el mismo que se reticula bajo la acción de una proteína de tipo transglutaminasa liberada por los hemocitos. Ha sido reportada actividad transglutaminasa en hemocitos granuloso y semi-granulosos (Wang *et al.*, 2001).

Además han sido caracterizados dos tipos de proteínas de reconocimiento, proteína de fijación de lipopolisacáridos (LPS) y proteína de fijación de  $\beta$ -glucanos. Estos factores contenidos en el plasma de los crustáceos son capaces de reconocer bacterias y hongos (Duvic y Söderhäll, 1990; Vargas-Albores, 1995).

Asimismo el hemocele es el sitio de descarga y actividad de importantes moléculas tales como  $\alpha$ -2-macroglobulina (Rodríguez *et al.*, 1995), aglutininas, componentes del sistema proPO, responsable de la melanización, la cual acompaña todas las reacciones inflamatorias de los crustáceos (Söderhäll y Cerenius, 1992) y péptidos antibacterianos, como las peneidinas (Destoumieux *et al.*, 1997). Las peneidinas han sido completamente caracterizadas en *L. vannamei*, ellas son activas contra bacterias Gram + y hongos (Destoumieux *et al.* 1997), en tanto que funcionarían como opsoninas de bacterias Gram – (Muñoz *et al.*, 2002).

## 5. El sistema inmune de los crustáceos frente a infecciones virales.

Los mecanismos de resistencia al WSSV y a otros agentes virales no se conocen bien. Las imágenes histopatológicas de animales afectados por infecciones virales carecen de los focos inflamados, altamente melanizados muy comunes de las infecciones bacterianas (Flegel y Pasharawipas, 1998). Algunos autores sugieren que en los crustáceos no existe una respuesta inmune contra los patógenos virales, soportando la teoría de la acomodación viral. Sin embargo en varios estudios realizados en camarón infectados por virus se reportan procesos inmunitarios tales como: infiltración, fagocitosis y encapsulación en lugares afectados (Durand *et al.*, 1997; Momoyama *et al.*, 1994). Las cápsulas observadas no presentan signos de melanización y la literatura sugiere que el material encapsulado son células apoptóticas (Rodríguez *et al.*, 2003).

Adicionalmente, Hasson *et al.* (1999b) destacan el rol importante que cumple el órgano linfoide en los mecanismos de defensa antiviral del *L. vannamei* contra el virus del síndrome de Taura. El órgano linfoide forma parte integral del sistema circulatorio (Bell y Lightner, 1988) y actuaría como filtro de partículas virales (Hasson *et al.*, 1999b). Durante las infecciones virales en el órgano linfoide se forman estructuras esféricas multicelulares sin un vaso central, llamadas esferoides (Bonami *et al.*, 1992). La formación de esferoides en el órgano linfoide se ha visto asociada por lo menos con seis diferentes infecciones virales en camarones peneidos (Hasson *et al.*, 1999b, Anggraeni y Owens, 2000), incluido el WSSV (Vidal *et al.*, 2001). Existen tres tipos de esferoides según el grado de vacuolización: Tipo A, una masa de células homogéneas que contienen pocas o ninguna célula necrótica, ligeramente basófilo; Tipo B que es una evolución del tipo A pero difiere por el incremento de las células necróticas y poco a moderado número de vacuolas citoplasmáticas; y Tipo C que presenta un incremento en la basofilia, conteniendo un alto porcentaje de núcleos basófilos (~ 33 a 50%) más pequeños que los observados en el tipo A y B, y vacuolas citoplásmicas en menor número. Según la literatura, hemocitos infiltrantes en el órgano linfoide conducirían a la formación de esferoides (Anggraeni y Owens, 2000). Al respecto habría que señalar que Van de Braak *et al.* (2002b) han determinado por medio de anticuerpos la migración de hemocitos desde los túbulos del órgano linfoide a la periferia de los mismos, en animales infectados con WSSV.

Por otra parte modificaciones de la fórmula hemocitaria han sido reportados en animales infectados con WSSV. Destacándose el incremento en el porcentaje de hemocitos hialinos (Kim *et al.*, 1999), al respecto cabe señalar que Wang *et al.* (2002) han encontrado que los hemocitos hialinos son resistentes a la infección con WSSV, lo que conduciría a suponer que durante las infecciones sobreviven animales con alto contenido de hemocitos hialinos. Por otra parte Sonnenhözner *et al.* (2002) han observado proliferación y migración de hemocitos a tejidos expuestos y blancos del virus, en animales resistentes al WSSV por haber sido desafiados en condiciones de hipertermia.

Un aspecto que sin duda merece mencionarse es la aparición de células apoptóticas en animales afectados por virus (Flegel y Pashirawipas, 1998; Khanobdee *et al.*, 2002). La apoptosis parece manifestarse en diferentes tejidos incluidos los hemocitos de animales infectados por WSSV (Rojtinnakorn *et al.*, 2002). Según Granja *et al.* (2003), la expresión de los mecanismos de apoptosis sería más importante en camarones resistentes al WSSV.

Finalmente cabe destacar que Pan *et al.* (2000) han reportado una amplia actividad antiviral en los tejidos de los crustáceos y la primera molécula antiviral ha sido identificada en *P. monodon* (Luo *et al.*, 2003).

---

## **Estrategias para controlar el problema de la Mancha Blanca**

---

### **1. Selección genética**

Diversos ensayos de desafíos con WSSV realizados en familias de *L. vannamei* han mostrado diferencias significativas en supervivencia, encontrándose familias con supervivencias del 15% y otras del 4% (Pérez *et al.*, 2001). La susceptibilidad al WSSV observada en las familias indica la diferencia en la respuesta al virus. Argue *et al.* (1999) reportan una heredabilidad baja, siendo ésta menor a 0,01 para resistencia de *L. vannamei* a TSV. En este caso la selección familiar es importante ya que cuando se presenta una baja heredabilidad, el carácter bajo mejoramiento no puede ser medido directamente en el individuo a seleccionar (Pérez *et al.*, 2001).

### **2. Manejo**

Con el objetivo de frenar el virus de la mancha blanca, la industria camaronera ha ensayado varias opciones para atenuar su impacto, adaptando medidas de bioseguridad en laboratorio y piscinas de cultivo de camarón. Alday (1999) publicó reglas de bioseguridad para laboratorios de maduración y larvas y para piscinas camaroneras recomendando desinfección de los huevos con agua estéril y yodo. En camaroneras, se recomendó sembrar animales PCR negativos para WSSV, utilizar mallas para filtrar agua en compuertas de entrada y salida y el uso de redes anticangrejos para evitar el ingreso del virus por medio de estos vectores (Alday, 1999). Otras medidas de seguridad implicaron restricciones al ingreso de animales vivos contaminados como: reproductores, nauplios y postlarvas de camarón, así como al consumo de balanceado producido de la cabeza de camarón.

La dinámica de ocurrencia de patógenos en sistemas acuáticos está probablemente modulada por parámetros ambientales tales como salinidad y temperatura (Jiménez *et al.*, 2000). Así se encontró una correlación negativa entre la prevalencia del virus TSV y la temperatura en granjas de cultivo de camarón en Ecuador, sugiriendo que el clima frío podría ser un factor de riesgo que precipite la ocurrencia del virus (Jiménez *et al.*, 2000), resultados similares para WSSV han sido reportados por Rodríguez *et al.* (2003b). Por otra parte se han reportado supervivencias del 100% en camarones desafiados al WSSV en condiciones de hipertermia (Vidal *et al.*, 2001; Sonnenholzner *et al.*, 2002). El efecto dramático de la hipertermia sobre la susceptibilidad del camarón blanco al WSSV ha promovido con éxito el establecimiento en el Ecuador de cultivos intensivos de camarón en piscinas cubiertas (invernaderos) a fin de mantener la temperatura en niveles superiores a los 31°C (Calderón y Sonnenholzner, 2003).

Se ha observado que el aumento de la temperatura incentiva la proliferación de los hemocitos favoreciendo también la infiltración de éstos a los tejidos. Sonnenholzner *et al.* (2002) sugieren que el virus puede infectar a los camarones a cualquier temperatura y que el aumento en la supervivencia estaría relacionado por el incremento de la respuesta del camarón al virus. Otros autores también sugieren que la respuesta del sistema inmune podría ser la responsable de las diferencias en la susceptibilidad a las enfermedades de acuerdo a las estaciones o la temperatura (Jiménez *et al.*, 2000).

Según Le Moullac *et al.* (1998) en el camarón, las reacciones de resistencia a patógenos están basadas en el número de hemocitos circulantes en la hemolinfa. Los camarones con un alto número de hemocitos resisten mejor a la infección que camarones con un bajo número de hemocitos (Le Moullac *et al.*, 1998). En este sentido la inmunoestimulación se vislumbra como una alternativa para manipular la respuesta inmune del camarón antes de que estos se enfrenten a desafíos microbianos en los estanques. Los objetivos preventivos de su utilización serían, inducir un estado de alerta inmunitaria y promover la proliferación de hemocitos.

Los inmunoestimulantes son moléculas que se derivan de paredes celulares de microorganismos y que activan el sistema inmune. Estos componentes activos son fragmentos de peptidomuramilo (peptidoglicanos), lipopolisacáridos (LPS), presentes en bacterias Gram + y Gram -. En la pared celular de las levaduras y hongos existen principalmente  $\beta$ -glucanos que son moléculas de poliglucosas ligadas a través de cadenas de 1,3 y con ramificaciones de 1,6 de glucosa (Le Moullac *et al.*, 1998; Dalmo *et al.*, 1998). Le Moullac *et al.* (1998) han reportado que la respuesta inmune de los camarones es mejorada con inmunoestimulantes de origen bacteriano o levadura cualquiera que sea el método de administración, sin embargo, la ganancia no es constante ni reproducible. En *L. stylirostris* por ejemplo, estos autores reportan que el inmunoestimulante G (nombre comercial de  $\beta$ -glucanos) probado en Tahití incrementó entre el 22 y 50% el número de hemocitos en algunas series de experimentos. Sin embargo esta misma sustancia en Nueva Caledonia incrementó el número de hemocitos en un 16% en la estación caliente pero únicamente en un 8% en la estación fría. Además esta estimulación no fue eficaz ya que no se incrementó la supervivencia en desafíos microbianos (Le Moullac *et al.*, 1998).

La inmunoestimulación por vía oral, incorporando las sustancias inmunoestimulantes en el alimento, sería el método más práctico para los sistemas de cultivo de camarón. La concentración de los inmunoestimulantes es muy importante para observar el efecto protector. Sung *et al.* (1994) encontraron efectos positivos en infecciones experimentales con bacterias en *P. monodon* a concentraciones de 0,5 y 1 mg/ml de glucano, pero no fue efectivo a 0,25 y 2 mg/ml de glucano, con un efecto protector que duró hasta 18 días después de la inmersión. Otero (2001) señala 50 mg de  $\beta$ -1,3 glucano/kg de alimento para juveniles como la concentración adecuada para observar un efecto positivo.

Los  $\beta$ -glucanos están involucrados en el incremento de la actividad fagocítica de los hemocitos (Chang *et al.*, 2000; Sung *et al.*, 1994), adhesión celular y producción de anión superóxido en reproductores (Chang *et al.*, 2000). Los peptidoglicanos derivados de *Bifidobacterium thermophilum*, también mejoran la actividad fagocítica de los hemocitos granulados en animales desafiados experimentalmente con WSSV, incrementando la resistencia y supervivencia de los animales al virus (Itami *et al.*, 1998). Chang *et al.* (1999) realizaron una infección con WSSV en camarones que fueron inmunoestimulados con  $\beta$ -1,3-glucano por 20 días y obtuvieron supervivencias del 20% y 12% en juveniles y postlarvas respectivamente, al 6º día

de infección a diferencia del control que llegó con supervivencia de 0% al 4º día de infección. En ensayos de campo se han obtenido resultados muy prometedores para sistema de cultivo semiextensivo combinando  $\beta$ -1,3-glucanos con precría en hipertermia (Rodríguez *et al.*, 2003b).

El sistema inmune se puede también modular mediante aditivos nutricionales como vitaminas C y E, las que promueven un buen funcionamiento de las células inmunitarias (Molina *et al.*, 2001).

Una forma de evaluar la eficacia de inmunoestimulantes y otras moléculas inmunomoduladoras, además de la supervivencia, sería mediante la cuantificación de parámetros inmunitarios. Estudios sobre parámetros celulares y humorales, tales como generación de radicales de oxígeno, actividad fenoloxidasa, hemoaglutinación, etc. (Rodríguez y Le Moullac, 2000), se están realizando como indicadores de salud.

El diagnóstico hemocitario podría constituir un marcador del estado fisiológico e inmunitario de los camarones (Tsing, 1987), estableciendo de esta forma un sistema de control inmune que permita la detección de inmunodeficiencias y el control de la calidad ambiental (Tsing, 1987; Bachère, 2000). El hemograma consiste en el número y la proporción de diferentes tipos de hemocitos presentes en una muestra de hemolinfa provenientes de un individuo (Hose y Martin, 1989). Los cuales son realizados mediante tinciones y microscopía de contraste de fases lo que permite distinguir hemocitos granulados, hialinos y semigranulosos, siendo el último el método más práctico e informativo (Muñoz, 1996).

Otra forma de estudiar los hemocitos y los mecanismos de defensa desplegados bajo desafío microbiano es mediante observaciones histológicas con la ayuda de sondas moleculares, anticuerpos o sondas nucleicas (Muñoz *et al.*, 2002, Van de Braak *et al.*, 2002a, 2002b).

## Bibliografía

1. Alday, V. (1999). Diagnóstico y prevención de la enfermedad del punto blanco. *El Mundo Acuicola* 5(1), 3-6.
2. Anggraeni, M.S., and L. Owens. (2000). The haemocytic origin of lymphoid organ spheroid cells in the penaeid prawn *Penaeus monodon*. *Diseases of Aquatic Organisms* 40, 85-92.
3. Argue, B., S. Arce, J. Lotz, and S. Moss. (1999). Heritability for resistance to Taura syndrome virus in specific pathogen free *Litopenaeus vannamei*. Page 28 in *World Aquaculture '99: Book of abstracts*, 26 April-2 May, 1999, Sidney, Australia. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA.
4. Bachere, E. (2000). Shrimp immunity and disease control. *Aquaculture* 191, 3-11.
5. Bachère, E., E. Mialhe, and J. Rodríguez. (1995). Identification of defence effectors in the haemolymph of Crustacean with particular reference to the shrimp *Penaeus japonicus* (Bate): prospects and application. *Fish & Shellfish Immunology* 5, 597-612.
6. Bell, T., and D.V. Lightner. (1988). *A Handbook of Normal Penaeid Shrimp Histology*. World Aquaculture Society, Baton Rouge, L.A. EE.UU.
7. Bonami, J.R., D.V. Lightner, R.M. Redman, and, B.T. Poulos. (1992). Partial characterization of a togavirus (LOVV) associated with histopathological changes of the lymphoid organ of penaeid shrimp. *Diseases of Aquatic Organisms* 14, 145-152.
8. Calderón, J., and S. Sonnenholzner. (2003). Cultivo de camarón: Experiencia y desafíos en el uso de invernaderos. *El Mundo Acuicola* 9, 4-8.
9. Calderón, J., B. Bayot, I. Betancourt, and V. Alday de Graindorge. (1999). Monitoreo del virus de la mancha blanca en Ecuador. *El Mundo Acuicola* 5, 211-214.
10. Chang, C.F. M.S. Su, H.Y. Chen, C.F. Lo, G.H. K, and I.C. Liao. (1999). Effect of dietary  $\beta$ -1,3-glucan on resistance to white spot syndrome virus (WSSV) in postlarval and juvenil *Penaeus monodon*. *Diseases of Aquatic Organisms* 36, 163-168.

11. Chang, C.F., H.Y. Chen, M.S. Su, and I.C. Liao. (2000). Immunomodulation by dietary  $\beta$ -1,3-glucan in the brooders of the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Fish and Shellfish Immunology* 10, 505-514
12. Corbel, V., Z. Zuprizal, C. Shi, H. Sumartono, J.M. Arcier, and J.R. Bonami. (2001). Experimental infection of European crustaceans with white spot syndrome virus (WSSV). *Journal of Fish Diseases* 24:377-382.
13. Dalmo, R.A., B. Martinsen, T.E. Horsberg, A. Ramstad, C. Syvertsen, R. Seljelid, and K. Ingebrigtsen. (1998). Prophylactic effect of  $\beta$ (1,3)-D-glucan (laminaran) against experimental *Aeromonas salmonicida* and *Vibrio salmonicida* infections. *Journal of Fish Diseases* 21, 459-462.
14. Destomieux, D., M. Muñoz, C. Cosseau, J. Rodríguez, P. Bulet, M. Comps, and E. Bachère. (2000). Penaeidins, antimicrobial peptides with chitin-binding activity, are produced and stored in shrimp granulocytes and released after microbial challenge. *Journal of Cell Science* 113, 461-469.
15. Destomieux, D., P. Bulet, D. Loew, A. Van Dorsselaer, J. Rodríguez, and E. Bachère. (1997). Penaeidins, a new family of antimicrobial peptides isolated from the shrimp *Penaeus vannamei* (Decapoda). *The Journal of Biological Chemistry* 272(45), 28398-28406.
16. Destomieux-Garzón, D., D. Saulnier, J. Garnier, C. Jouffrey, P. Bulet, and E. Bachère. (2001). Crustacean Immunity: Antifungal peptides are generated from the C-terminus of shrimp hemocyanin in response to microbial challenge. *Journal Biol. Chem* 276, 47070-47077.
17. Djangmah, J.S. (1970). The effects of feeding and starvation on copper in the blood and hepatopancreas, and on blood proteins of *Crangon vulgaris* (Fabricius). *Comp. Biochemistry Physiology* 32,709-731.
18. Durand, S., D. Lightner, R.M. Redman, and J.R. Bonami. (1997). Ultrastructure and morphogenesis of White Spot Syndrome Baculovirus (WSSV). *Diseases of Aquatic Organisms* 29,205-211.
19. Durand, S., D.V. Lightner, L.M. Nunan, R.M. Redman, J. Mari, and R. Bonami. (1996). Application of gene probe as diagnostic tools for White Spot Baculovirus (WSBV) of penaeid shrimp. *Diseases of Aquatic Organisms* 27, 59-66.
20. Duvic, B., and K. Söderhäll. (1990). Purification and characterization of a  $\beta$ -1,3-Glucan binding protein from plasma of the Crayfish *Pacifastacus leniusculus*. *The Journal of Biological Chemistry* 265(16), 9327-9332.
21. Echeverría, F., V. Otero, F. Cornejo, and J. Rodríguez. (2002). WSSV y ciclo de muda en el camarón blanco *Litopenaeus vannamei*. *El mundo acuícola* 8 (1), 43-46.
22. Flegel, T.W. (1997). Special topic review, major viral diseases of the black tiger prawn *Penaeus monodon* in Thailand. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 13, 433-442.
23. Flegel, T.W., and T. Pasharawipas. (1998). Active viral accommodation: A new concept for Crustacean Response to Viral Pathogens. In: Flegel, T.W. (Eds), *Advances in Shrimp Biotechnology*. National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Bangkok, pp. 245-250.
24. Granja, C.B., L.F. Aranguren, O.M. Vidal, L. Aragón, and M. Salazar. (2003). Does hyperthermia increase apoptosis in white spot syndrome virus (WSSV)-infected *Litopenaeus vannamei*. *Diseases of Aquatic Organisms* 54, 73-78
25. Hasson, K. D. Lightner, L. Mohny, R. Redman, B.T. Poulos, and B.L. White. (1999)b. Taura Syndrome Virus (TSV) lesion development and the disease cycle in the Pacific white shrimp *Penaeus vannamei*. *Diseases of Aquatic Organisms* 36, 81-93.
26. Hasson, K., D. Lightner, L. Mohny, R. Redman, and B. White. (1999)a. Role of lymphoid organ spheroids in chronic Taura syndrome virus (TSV) infections in *Penaeus vannamei*. *Diseases of Aquatic Organisms* 38, 93-105.
27. Holmblad, T., and K. Söderhäll. (1999). Cell adhesion molecules and antioxidative enzymes in a crustacean, possible role in immunity. *Aquaculture* 172, 111-123.
28. Hose, J.E., and G. Martin. (1989). Defense functions of granulocytes in the ridgeback prawn *Sicyonia ingentis*. *Journal of Invertebrate Pathology* 53, 335-346.
29. Itami, T., M. Asano, K. Tokushige, K. Kubono, A. Nakagawa, N. Takeno, H. Nishimura, M. Maeda, M. Kondo, and Y. Takahashi. (1998). Enhancement of disease resistance of kuruma shrimp, *Penaeus japonicus*, after oral administration of peptidoglycan derived from *Bifidobacterium thermophilum*. *Aquaculture* 164, 272-288.
30. Jiménez, R., R. Barniol, L. De Barniol, M. Machuca, and X. Romero. (2000). Viral-like particles associated with cuticular epithelium necrosis in cultured *Litopenaeus vannamei* (Decapoda: Crustacea) in Ecuador. *Aquaculture Research* 31, 519-528.

31. Jiravanichpaisal, P., E. Bangyeekhun, K. Söderhäll, and I. Söderhäll. (2001). Experimental infection of white spot syndrome virus in freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus*. *Diseases of Aquatic Organisms* 47,151-157.
32. Johansson, M.W., and K. Söderhäll. (1989). Cellular immunity in Crustaceans and the proPO system. *Parasitology Today* 5(6), 171-176.
33. Johnson, P.T. (1987). A review of fixed phagocytic and pinocytotic cells of decapod crustaceans, with remarks on hemocytes. *Developmental and Comparative Immunology* 11, 679-704.
34. Jory D.E., and H.M. Dixon. (1999) Shrimp white spot virus in the hemisphere. *Aquaculture Magazine* 25, 83-91.
35. Khanobdee, K., C. Soowannayan, T.W. Flegel, S. Ubol, and B. Withyachumnarnkul. (2002). Evidence for apoptosis correlated with mortality in the giant black tiger shrimp *Penaeus monodon* infected with yellow head virus. *Diseases of Aquatic Organisms* 48,79-90.
36. Kim, Y.J., W.C. Choi, H.R. Kim, S.J. Jung, and M.J. Oh. (1999). Changes in *Penaeus chinensis* haemocytes during white spot baculovirus (WSBV) infections. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* 19(5),213.
37. Le Moullac, G., L.P. De Laborie, D. Saulnier, C. Goarant, and M. Dehasque. (1998). Principles and problems involved in the evaluation of immunostimulants on juvenile shrimp. IV Simposium International de Nutrition Acuicola, La Paz, B.S.C. Mexico.
38. Lightner, D.V. (1996). Handbook of pathology and diagnostic procedures for diseases of penaeid shrimp. World Aquaculture Society, Baton Rouge, L.A. EE.UU.
39. Lightner, D.V. (1999). The penaeid shrimp viruses TSV, IHHNV, WSSV, and YHV: current status in the Americas, available diagnostic methods, and management strategies. *Journal of Applied Aquaculture* 9, 27-52.
40. Lightner, D.V., K.W. Hasson, B.L. White, and R.M. Redman. (1998). Experimental infection of Western hemisphere penaeid shrimp with asian white spot syndrome virus and Asian yellow head virus. *Aquatic Animal Health* 10, 271-281.
41. Lo, C.F., C.H. Ho, C.H. Chen, F.K. Liu, Y.L. Chiu, P.Y. Yen, S.E. Peng, H.C. Hsu, H.C. Liu, C.F. Chang, M.S. Su, C.H. Wang, and G.H. Kou. (1997). Detection and tissue distribution of white spot syndrome baculovirus (WSBV) in captured brooders of *Penaeus monodon* with a special emphasis on reproductive organs. *Diseases of Aquatic Organisms* 30, 53-72.
42. Luo, T., X. Zhang, Z. Shao, and X. Xu. (2003). PmAv, a novel gene involved in virus resistance of shrimp *Penaeus monodon*. *FEBS Letters* 551, 53-57.
43. Martin, G., and B. Graves. (1985). Fine structure and classification of shrimp hemocytes. *Journal of Morphology* 185, 339-348.
44. Martin, G.G., J. Kay, D. Poole, and C. Poole. (1998). In vitro nodule formation in the ridgeback prawn, *Syciona ingentis*, and the american lobster, *Homarus americanus*. *Invertebrate Zoology* 117, 155-168.
45. Molina, C., J. Rodríguez, J.I. Arango, F. Echeverría, and M. Sotomayor. (2001). Efectos combinados de las vitaminas C y E dietéticas en la inmunorespuesta del juvenil *Litopenaeus vannamei* antes y después de la suplementación con glucanos. *El mundo acuícola* 8(1), 29-33.
46. Momoyama K. H. Hiraoka. H. Nakano, K. Koube, K. Inouye, and N. Oseko. (1994). Mass mortalities of cultured kuruma shrimp, *Penaeus japonicus* in Japan in 1993: histopathological study. *Fish Pathology*, 29, 141-148.
47. Moss, S.M., B.J. Argue, F.L. Castille, S.M. Arce, and J.M. Lotz. (2001). Family survival of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* to Taura syndrome virus in field and laboratories challenges. Proceedings of the World Aquaculture 2001 Conference, Orlando, World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, USA.
48. Muñoz, M. (1996). Desarrollo y optimización de ensayos para evaluar el estado inmunitario del camaron *Penaeus vannamei*. Tesis de Grado, Escuela Superior Politecnica del Litoral, Guayaquil, Ecuador.
49. Muñoz, M. R. Cedeño, J. Rodríguez, W.P.W. van der Knaap, E. Mialhe, and E. Bachère. (2000). Measurement of reactive oxygen intermediate production in haemocytes of the penaeid shrimp, *Penaeus vannamei*. *Aquaculture* 191, 89-107.
50. Muñoz, M., F. Vandenbulcke, D. Saulnier, E. and Bachère. (2002). Expression and distribution of penaeidin antimicrobial peptides are regulated by haemocyte reactions in microbial challenge shrimp. *European Journal of Biochemistry* 269, 2678-2689.
51. Napi, J. (1977). Comparative ultrastructural studies of cellular immune reactions and tumorigenesis in *Drosophila*. pp 155-188 in L.A. Bulla, Jr. and T.C. Cheng (ed). *Comparative Pathology*, Volume 3, Plenum Press, New York, NY, USA.
52. OIE. (2003). Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals. URL: [http://www.oie.int/esp/normes/fmanual/A\\_00048.htm](http://www.oie.int/esp/normes/fmanual/A_00048.htm)

53. Otero, V. (2001). Evaluación de los  $\beta$ -Glucanos como inmunoestimulantes del sistema de defensa del camarón blanco *Penaeus vannamei* (Boone,1931). Tesis de grado, Universidad Laica "Eloy Alfaro", Portoviejo, Manabí, Ecuador.
54. Pan, J.A., Kurosky, B. Xu, A.K. Chopra, D.H. Coppenhaver, I.P. Singh, and S. Baron. (2000). Broad antiviral activity in tissues of crustaceans. *Ativiral Research* 48, 39-47.
55. Pantoja C.R., and D.V. Lighner. (2003) Similarity between the histopathology of White Spot Syndrome Virus and Yellow Head Syndrome Virus and its relevance to diagnosis of YHV disease in the Americas. *Aquaculture* 218, 47-54.
56. Pérez, F., L. Gómez, V. Otero, F. Volckaert, and J. Calderón. (2001). Supervivencia diferenciada de familias de *Litopenaeus vannamei* desafiadas con el virus de la mancha blanca. *El Mundo Acuicola* 8(1), 25-29.
57. Poinar, G.O., R.T. Hess, and J.J. Petersen. (1979). Immune responses of mosquitoes against *R. culiensifax* (Nematoda). *Journal of Nematology* 11, 110-116.
58. Roch, P. (1999). Defense mechanisms and disease prevention in farmed marine invertebrates. *Aquaculture* 172, 125-145.
59. Rodríguez, J., and G. Le Moullac. (2000). State of the art of immunological tools and health control of penaeid shrimp. *Aquaculture* 191, 109-119.
60. Rodríguez, J., F. Echeverría, C. Molina, S. Sonnenholzner, A. Arias, J. Apolo, and J. Calderón. (2003)a. El efecto combinado de una precría en hipertermia e inmunoestimulación. Una alternativa para incrementar la producción de cultivos semi-intensivos en condiciones WSSV. *El Mundo Acuicola* 9, 9-11.
61. Rodríguez, J., B. Bayot, Y. Amano, F. Panchana, I. de Blas, V. Alday, and J. Calderón. (2003)b. White spot syndrome virus infection in cultured *Penaeus vannamei* (Boone) in Ecuador with emphasis on histopathology and ultrastructure. *Journal of Fish Diseases* 26, 439-450.
62. Rodríguez, J., V. Boulo, E. Mialhe, and E. Bachere. (1995). Characterisation of shrimp haemocytes and plasma components by monoclonal antibodies. *Journal of Cell Science* 108.
63. Rojttinnakorn, J., I. Hirono, T. Itami, Y. Takahashi, and T. Aoki. (2002). Gene Expression in haemocytes of Kuruma prawn, *Penaeus japonicus*, in response to infection with WSSV by EST approach. *Fish and Shellfish Immunology* 13(1), 69-83.
64. Sahul Hameed, A.S. K., Yoganandhan, S. Sathish, M. Rasheed, V. Murugan, and K. Jayaraman. (2001). White spot syndrome virus (WSSV) in two species of freshwater crabs (*Paratelphusa hydrodomous* and *P. pulvinata*). *Aquaculture* 201, 179-186.
65. Sahul Hameed, A.S., M.X. Charles, and, M. Anilkmar. (2000). Tolerance of *Macrobrachium rosenbergii* to white spot syndrome virus. *Aquaculture* 183, 207-213.
66. Salt, G. (1963). The defense reactions of insects of metazoan parasites. *Parasitology* 53, 527-642.
67. Shelby, J.P., D.S.W. Lim, J.S. Kuo, and D.T. Chiu. (2003). Evidence for memory in invertebrate immunity. *Nature* 425, 37-38.
68. Smith, V.J., and K. Söderhäll. (1983). Induction of degranulation and lysis of haemocytes in the freshwater crayfish, *Astacus astacus* bt components of the prophenoloxidase activating system in vitro. *Cell Tissue Research* 233, 295-303.
69. Söderhäll, K., and L. Cerenius. (1992). Crustacean immunity. *Annual Review of Fish Diseases* 1, 3-23
70. Söderhäll, K., and V. Smith. (1983). Separation of the haemocyte populations of *Carcinus maenas* and other marine decapods, and prophenoloxidase distribution. *Developmental and Comparative Immunology* 7, 229-239.
71. Song, Y.L., and Y.T. Hsieh. (1994). Immunostimulation of tiger shrimp (*Penaeus monodon*) hemocytes for generation of microbicidal substances: Analysis of reactive oxygen species. *Developmental Comparative Immunology* 18, 201-209.
72. Sonnenholzner, S., J. Rodríguez, F. Pérez, I. Betancourt, F. Echeverría, and J. Calderón. (2002). Supervivencia y respuesta immune de camarones juveniles *Litopenaeus vannamei* desafiados por vía oral a WSSV a diferentes temperaturas. *Boletín El Mundo Acuicola* 8(1), 50-56.
73. Soon, L.T., K.L. Lee, M. Shariff, M.D. Hassan, and A.R. Omar. (2001). Quantitative analysis of an experimental white spot syndrome virus (WSSV) infection in *Penaeus monodon* Fabricius using competitive polymerase chain reaction. *Journal of Fish Diseases* 24, 315-323.
74. Sugumaran, M. (1996). Roles of insect cuticle in Host Defense Reactions. In: Söderhäll K. Sadaaki, I. Vasta, G. (Eds.), *New Directions in Invertebrate Immunology*. SOS Publications, Fair Haven. pp. 355-374.
75. Sung, H.H., G.H. Kou, and Y.L. Song. (1994). Vibriosis resistance induced by glucan treatment in tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Fish Pathology* 29, 11-17.

76. Takahashi, Y., T. Itami, M. Kondo, M. Maeda, R. Fujii, S. Tomonaga, K. Supamattaya, and S. Boonyaratpalin. (1994). Electron microscopic evidence of bacilliform virus infection in kuruma shrimp (*Penaeus japonicus*). *Fish Pathology* 29(2), 121-125.
77. Tang, K., and D. Lightner. (2000). Quantification of white spot syndrome virus DNA through a competitive polymerase chain reaction. *Aquaculture* 189, 11-21.
78. Terwilliger, N.B., and K. Dumler. (2001). Ontogeny of decapod crustacea hemocyanin: effects of temperature and nutrition. *The Journal of Experimental Biology* 204, 1013-1020.
79. Tsing, A. (1987). Reserches sur les hémocytes el l'immunité chez le crustacé *Penaeus japonicus* (Bate 1991). Thèse de Doctorat, Université des Sciences et Techniques du Languedoc, Montpellier, Francia.
80. Van de Braak C.B.T., M.H.A. Botterblom, E.A. Huisman, Rombout, J.H.W. and W.P.W. Van der Knaap. (2002)b. Preliminary study on haemocyte response to white spot syndrome virus infection in black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Diseases of Aquatic Organisms* 51, 149-155.
81. Van de Braak, K., M.H.A. Botterblom, W. Liu, N. Taverne, W.P.W. Van der Knaap and J.H.W.M. Rombout. (2002)a. The role of the haematopoietic tissue in haemocyte production and maturation in the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Fish & Shellfish immunology* 12, 253-272.
82. Vargas-Albores, F. (1995). Sistema de defensa del camarón café (*Penaeus californiensis*). *Ciencia* 46, 33-45.
83. Vargas-Albores, F., and G. Yepiz-Plascencia. (2000). Beta glucan binding protein and its role in shrimp immune response. *Aquaculture* 191, 13-21.
84. Vidal, O., C. Granja, and F. Aranguren. (2001). A profound effect of hyperthermia on survival of *Litopenaeus vannamei* juveniles infected with White Spot Syndrome Virus. *Journal of the World Aquaculture Society* 32(4), 364-372.
85. Wang C.S., K.F.J. Tang, G.H. Kou, and S.N. Chen. (1997). Light and electron microscopic evidence of white spot disease in the giant tiger shrimp, *Penaeus monodon* (Fabricius), and the kuruma shrimp, *Penaeus japonicus* (Bate), cultured in Taiwan. *Journal of Fish Diseases* 20, 323-331.
86. Wang, R., M. Liang, M. Hall, and K. Söderhäll. (2001). A transglutaminase involved in the coagulation system of the freshwater crayfish, *Pacifastacus leniusculus*. Tissue localization and cDNA cloning. *Fish & Shellfish Immunology* 11, 623-637.
87. Wang, Y.T., W. Liu, J.N. Seah, C.S. Lam, J.H. Xiang, V. Korzh, and J. Kwang. (2002). White Spot Syndrome Virus (WSSV) infects specific hemocytes of the shrimp *Penaeus merguensis*. *Diseases of Aquatic Organisms* 52, 249-259.
88. Wu, J.L., A. Namikoshi, T. Nishizawa, K. Mushiake, K. Teruya, and K. Muroga. (2001). Effects of shrimp density on tranmission of penaeid acute viremia in *Penaeus japonicus* by cannibalism and the waterborne route. *Diseases of Aquatic Organisms* 47, 129-135.
89. Zlateva, T., P. Di Muro, B. Salvato, and M. Beltramini. (1996). The odiphenol oxidase activity of arthropod hemocyanin. *FEBS Letters* 384, 251-254.