

# **Problemática del Uso de Bioensayos de Reto Virales para Evaluar la Eficacia de Productos con Actividad Antiviral Suministrados en los Alimentos y Otros Productos para Reducir el Impacto del Virus de la Mancha Blanca**

César Marcial Escobedo Bonilla, PhD

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, SC Campus Hermosillo

Centenario Norte 53, Colonia Prados del Centenario, Hermosillo Sonora. Código Postal 83260.

Tel. 01(662) 213 15 93; 212 12 04. E-mail: cesar\_escobedomx@yahoo.com

---

## **Resumen**

El virus del síndrome de mancha blanca (WSSV) es el patógeno más nocivo para la camaronicultura mundial. Las enormes pérdidas que este virus ha causado a la industria camaronícola han promovido el desarrollo de productos y métodos encaminados a reducir el impacto del patógeno. Varios compuestos derivados de paredes celulares de microorganismos, extractos de algas y plantas han mostrado propiedades antivirales *in vitro* e *in vivo*. Estos productos pueden ser incorporados en alimentos balanceados y administrados por vía oral a los animales. Varios productos han sido evaluados en bioensayos de reto para determinar sus propiedades inmunoestimulantes, de crecimiento y resistencia a enfermedades. Aunque muchos de estos resultados son alentadores, existen diversas dificultades prácticas y técnicas que requieren ser considerados y estandarizados antes de realizar bioensayos de eficacia. El presente trabajo propone consideraciones para evaluar adecuadamente la eficacia antiviral de productos. Los problemas más importantes son la concentración real de las sustancias antivirales en los alimentos y la cantidad que es efectivamente ingerida por los animales. Los problemas del reto viral son la falta de estandarización de los bioensayos al usar dosis infecciosas no conocidas o desconocer el efecto de la ruta de inoculación sobre la infectividad del inóculo. Se presentan ejemplos de estos aspectos y se mencionan contribuciones a la estandarización de los bioensayos de reto. El uso de procedimientos estandarizados en los bioensayos de reto permitirá evaluar eficazmente los productos y además harán posible comparar la eficacia antiviral entre dos ó más productos.

La camaronicultura es la industria agroalimentaria de más reciente aparición. En la década de 1930 se desarrollaron las primeras técnicas para el cultivo del camarón como el desove y el desarrollo larvario de *Marsupenaeus japonicus* en laboratorio (Rosenberry, 2001). En la década de 1950 e inicios de los 1960s inició el cultivo comercial de camarón en países como Japón, Taiwan, Filipinas, Indonesia y China. Igualmente en América el cultivo de camarón inició a fines de los 1960s en Ecuador, Honduras y Panamá. A principios de los 1970s Perú y Brasil comenzaron el cultivo comercial de camarón (FAO, 2006). En un periodo de 15 años el cultivo de camarón a nivel mundial aumentó tanto en área de cultivo como en tecnología. Los sistemas de producción se tecnificaron y pasaron de extensivos a semi-intensivos e intensivos. Estos avances permitieron incrementar significativamente el volumen de la producción. No obstante, también hubo consecuencias negativas debido a que se modificaron varios factores ambientales, nutricionales y de manejo que tuvieron repercusiones directas en el equilibrio fisiológico de los animales. Esto propició la aparición de un número de enfermedades infecciosas.

Una de las enfermedades infecciosas que en la actualidad continua causando enormes pérdidas a la camaronicultura mundial es la enfermedad de la mancha blanca (WSD por sus siglas en inglés), la cual es provocada por el virus del síndrome de mancha blanca (WSSV por sus siglas en inglés). Este patógeno tiene forma baciliforme con un tamaño promedio de 270 nm de longitud y 120 nm de ancho y a menudo se observa un apéndice en forma de cola o filamento en un extremo del virión (Chou *et al.*, 1995 Wongteerasupaya *et al.*, 1995, Escobedo-Bonilla *et al.*, 2008). El virión de WSSV tiene una envoltura formada por lípidos y proteínas. Debajo se localiza una nucleocápside formada por proteínas globulares arregladas en subunidades a manera de anillos apilados. Dentro de la nucleocápside se encuentra el genoma viral que es circular, de gran tamaño (promedio 300,000 pares de bases) asociado a la proteína VP15 que tiene una función semejante a las histonas en células eucariontes (Zhang *et al.*, 2001, van Hulten *et al.*, 2002, Witteveldt *et al.*, 2005). Análisis de las secuencias del genoma viral y de varias proteínas estructurales mostraron que WSSV no está relacionado con los baculovirus, un grupo que afecta a invertebrados, especialmente insectos. Como resultado, WSSV fue colocado dentro de su propia nueva familia Nimaviridae (Vlak *et al.*, 2005).

El gran impacto económico que WSSV ha causado a la industria camaronícola ha promovido la búsqueda de productos y métodos que contribuyan a reducir la mortalidad de animales infectados en granjas. En los últimos 10 años ha habido un número importante de estudios encaminados a

evaluar la eficacia de productos y métodos bajo condiciones experimentales de acuerdo a los siguientes grupos:

1 - nutraceuticos, inmunoestimulantes, extractos de algas y plantas. Los beta glucanos fueron uno de los primeros productos derivados de la pared celular de microorganismos que fueron evaluados para inducir resistencia de *Penaeus monodon* a una infección de WSSV (Chang *et al.*, 1999). Otros compuestos con actividad antiviral incluyen lipopolisacáridos (LPS) (Takahashi *et al.*, 2000), fucoidan del alga *Sargassum polycystum* (Chotigeat *et al.*, 2004) y del alga café *Cladosiphon okamuranus* (Cruz-Suárez *et al.*, 2007), calcio-spirulan del alga verde-azul *Spirulina platensis* (Lee *et al.*, 2001), carotenoides del alga verde *Dunaliella* (Supamattaya *et al.*, 2005), bis-(2-metilheptil)-ftalato de la planta *Pongamia pinnata* (Rameshthangam y Ramasamy, 2006), y varios inmunoestimulantes provenientes de la amplia herbolaria hindú (Citarasu *et al.*, 2006; Balasubramanian *et al.*, 2007, 2008) (Tabla 1).

2 - sustancias con propiedades antivirales de origen natural o sintético. Existen varios trabajos en este tema que evalúan las propiedades antivirales de productos naturales derivados de plantas y algas en condiciones *in vitro*. El efecto protector de dichas sustancias contra una infección de WSSV en especies de camarón *in vivo* ha sido reportado solamente en dos trabajos recientes. Uno de ellos comparó el efecto protector de una dieta suplementada con *Spirulina* y el antiviral sintético cidofovir, el cual es usado en medicina humana y veterinaria para tratar infecciones por herpesvirus (Rahman *et al.*, 2006a). Este estudio es uno de los primeros que utilizan un título viral definido para comparar la eficacia de ambos productos. Cidofovir fue significativamente más efectivo que la dieta suplementada con *Spirulina* para retrasar los signos de enfermedad y mortalidad, comparados con el control (Rahman *et al.*, 2006a). Otro estudio evaluó la actividad antiviral contra WSSV de un extracto alcohólico de una planta con propiedades medicinales. El extracto contiene el compuesto bis-(2-metilheptil)-ftalato, que fue impregnado en dos concentraciones en un alimento peletizado administrado a los animales experimentales. La protección antiviral determinada como superviviencia de animales inoculados con el virus mostró un patrón dosis-dependiente (Rameshthangam y Ramasamy, 2007) (Tabla 1).

3 - proteínas recombinantes del virus o partículas virales inactivadas. Los primeros trabajos hechos sobre la posibilidad de que exista un mecanismo de reconocimiento específico en la

respuesta de defensa del camarón fueron observados en reproductores de *P. monodon* que habían sido tratados con beta glucanos provenientes de levaduras. Dicha protección se observó como un aumento significativo en la supervivencia de larvas producidas por los reproductores tratados con beta glucanos comparadas con larvas provenientes de reproductores no tratados cuando fueron sometidas a una infección experimental de WSSV (Huang y Song, 1999). Otro estudio mostró en cultivos de *M. japonicus* que los pocos animales que sobreviven a un brote de WSSV generalmente adquieren resistencia contra una segunda infección. Estas observaciones condujeron a evaluar experimentalmente dicha hipótesis y encontraron que camarones que habían sobrevivido a un brote natural de WSSV tuvieron una supervivencia significativa mayor que animales que no habían sido previamente expuestos a WSSV cuando fueron sometidos a una infección experimental de WSSV. Resultados semejantes se reportaron cuando se indujo experimentalmente una exposición subletal a WSSV y los supervivientes fueron inoculados con una concentración infecciosa de WSSV (Venegas *et al.*, 2000). Estos resultados sugieren que el sistema de defensa del camarón puede activarse específicamente en presencia de algún factor viral. Diversos trabajos han evaluado el efecto protector de beta glucanos, beta glucanos mezclados con *Vibrio*, WSSV inactivado con formalina (Namikoshi *et al.*, 2004, Bright-Singh *et al.*, 2005), WSSV inactivado con calor (Namikoshi *et al.*, 2004), o la protección de proteínas recombinantes como VP19 (Kumar-Jha *et al.*, 2006), VP26, VP28 (Namikoshi *et al.*, 2004; Witteveldt *et al.*, 2004; 2006, Caipang *et al.*, 2008; Fu *et al.*, 2008) o VP292 (Vaseeharan *et al.*, 2006) administrándolos por diferentes rutas y en diferentes concentraciones. Estos trabajos reportan el aumento significativo de la supervivencia de los animales tratados con estos productos en comparación con los controles cuando se someten a una infección experimental de WSSV.

4 - manejo de la temperatura del agua para inhibir replicación viral. Los primeros trabajos que reportan la influencia de las altas temperaturas sobre la replicación viral se hicieron con baculovirus que infectan insectos nocivos para cultivos vegetales (Kobayashi *et al.*, 1981; Fan *et al.*, 1996; Shikata *et al.*, 1998, van Beek *et al.*, 2000). Este concepto fue trasladado a la camaronicultura y se reportó la reducción de la replicación de WSSV en *L. vannamei* en condiciones de hipertermia ( $\geq 32^{\circ}\text{C}$ ) (Vidal *et al.*, 2001). Otros trabajos reportaron la inhibición de replicación viral en hipertermia para especies de camarón tropicales (Granja *et al.*, 2006, Reyes *et al.*, 2007) y en hipotermia para otros crustáceos como *M. japonicus* (Guan *et al.*, 2003),

*Pacifastacus leniusculus* y *Astacus astacus* (Jiravanichpaisal *et al.*, 2004) en zonas templadas. No obstante, dichos estudios fueron hechos usando distintos métodos de inoculación y títulos virales no definidos. Una serie de trabajos recientes determinaron el efecto protector de la hipertermia (33°C) usando procedimientos estandarizados de inoculación intramuscular ú oral y usando títulos infecciosos definidos (Rahman *et al.*, 2006b, 2007a, 2007b). Estos últimos trabajos determinaron claramente que la hipertermia del agua de cultivo es eficaz para inhibir la replicación viral aún en presencia de altas dosis infecciosas.

5 - herramientas biotecnológicas basadas en la construcción de plásmidos de DNA para expresar proteínas virales en las células de animales susceptibles. Las vacunas tradicionales se hacen a partir de antígenos de microorganismos “vivos” “muertos” ó “recombinantes” (Giese, 1998). No obstante, desde 1982 la inmunización con ácidos nucleicos se ha desarrollado como un método profiláctico más seguro para tratar un número de enfermedades de origen autoinmune, metabólico, cancerígeno ó infeccioso (Giese, 1998). En la acuicultura este tipo de vacunas se han usado para proteger peces de infecciones causadas por bacterias, hongos y virus (Gómez-Chiarri y Chiaverini, 1999). Recientemente se desarrollaron construcciones de DNA que codifican alguna de las proteínas estructurales de WSSV (VP15, VP28, VP35 ó VP281) y se evaluó su eficacia para reducir la mortalidad de camarón contra una infección experimental de WSSV. Las construcciones hechas con las secuencias de VP28 y VP281 fueron las más efectivas para reducir la mortalidad de camarón sometido a una infección experimental con WSSV a los 7 (23% mortalidad VP28), 14 (30% mortalidad VP28) y 25 (50% mortalidad VP281) días post vacunación (dpv). No obstante, el efecto protector disminuyó significativamente después de 35 ó 50 dpv (Rout *et al.*, 2007). Otro estudio sobre estas construcciones de DNA reportó la transcripción de VP28 en células de camarón y como resultado se activan efectores de la respuesta de defensa del camarón como la profenoloxidasa y la superóxido dismutasa. Los resultados sugieren que la activación de la respuesta de defensa está relacionado con en el efecto protector observado (Kumar *et al.*, 2008).

Otro método biotecnológico para controlar la mortalidad de camarones infectados con WSSV es el RNA de interferencia. Este sistema fue revelado en 1998 cuando se estudió en el nemátodo *Caenorhabditis elegans* (Fire *et al.*, 1998). Recientemente surgieron los primeros trabajos que demostraron la existencia de este sistema en el camarón y su aplicación para inhibir la infección

por WSSV (Robalino *et al.*, 2004; Westenberg *et al.*, 2005). Otros estudios se han enfocado a la forma de producir y administrar de forma simple y eficiente este tipo de construcciones (Sarathi *et al.*, 2008a, 2008b). En México se han producido construcciones de RNA de interferencia contra genes que codifican proteínas estructurales (VP28, VP26) y se evaluaron bajo condiciones experimentales estandarizadas usando un título viral definido inoculado por vía intramuscular. Los resultados mostraron que ambas construcciones fueron semejantes en su capacidad de reducir la mortalidad por WSSV a los 10 dpi. En contraste, la construcción contra VP28 fue más eficaz para reducir la mortalidad de camarones re-inoculados tres veces con el virus durante un periodo de 30 días (Mejía-Ruiz *et al.*, datos no publicados).

Varios de los productos pertenecientes a los grupos 1, 2, 3 y 5 pueden ser aplicados como aditivos en alimentos balanceados, a través de algún vehículo (bacteriano ú otro) o administrados directamente por vía oral.

Las características de los productos del grupo 1 los hacen más adecuados y atractivos para ser incluidos en alimentos balanceados. De esta forma, las sustancias con actividad antiviral pueden ser administradas en forma masiva a los animales cultivados y así poder extender el efecto protector a poblaciones enteras.

Para aplicar este tipo de sustancias en los alimentos es necesario resolver algunos problemas:

- (1) Deben ser incorporados una vez que el alimento ya fue procesado para evitar su inactivación
- (2) Se añaden en la superficie del alimento asociado a algún aceite para reducir su disolución en agua
- (3) Esto aumenta la posibilidad de “leaching-out” del producto y por lo tanto que se reduzca el contenido del antiviral en el alimento
- (4) La administración de sustancias antivirales a los animales por medio de la alimentación hace difícil comprobar el consumo de una cantidad minima necesaria para inducir la protección.

El otro aspecto a considerar es el de la estandarización de las condiciones de los bioensayos de reto. Específicamente el uso de inóculos virales con títulos infecciosos o letales definidos y el efecto de la ruta de inoculación sobre la infectividad. Otro problema es determinar el número adecuado de réplicas en estos estudios para obtener reproducibilidad. Estas consideraciones

hacen complicado conocer la eficacia verdadera de un producto y dificulta la comparación entre dos ó más productos.

Los aspectos relevantes a considerar cuando se evalúan productos con potencial para reducir el impacto de infecciones virales en la camaronicultura son los siguientes:

#### 1 - Productos

ruta de administración - la vía de administración del producto generalmente determina la vía de inoculación viral

- oral (per os, intubación o alimentación forzada)
- intramuscular
- suspensión en agua (inmersión)

#### 2 - Animales experimentales

- unidad experimental (número de animales; individual o en grupos)
- talla (edad) (importante para determinar la ruta de inoculación viral más adecuada)
- status sanitario (animales SPF ó libres de los patógenos endémicos [IHHNV, TSV, WSSV])

#### 3 - Virus

- origen del virus (brote infeccioso, laboratorio; aislado Mexicano o exótico)
- pureza del inóculo (contiene solamente WSSV y no otros virus o bacterias)
- título viral determinado (dosis infecciosa en camarón con punto final 50% [SID<sub>50</sub> ml<sup>-1</sup>] ó dosis letal en camarón con punto final 50% [LD<sub>50</sub> ml<sup>-1</sup>])
- ruta de inoculación (intramuscular, oral [per os, intubación] o inmersión)

#### 4 - Diseño de los experimentos

- número de réplicas
- análisis estadístico adecuado para establecer significancia entre resultados

#### 5 - Variables ambientales

- temperatura - intervalo 27 - 31 óptimo para replicación WSSV
- salinidad - 15 -40 g / L
- pH 7.8 - 8.5
- amonía, nitratos, nitritos 0.5 a 2.0 ppm

En los últimos cinco años se han publicado algunos estudios encaminados a reducir la variabilidad en los factores de sistemas controlados para bioensayos de infección. Los puntos críticos han sido usar animales libres de patógenos específicos (SPF) para reducir la posibilidad de contaminación o que la presencia de un patógeno enmascare el efecto protector del producto. Otro punto crítico es conocer el título infeccioso o letal del inóculo viral que se utiliza en los bioensayos (Prior *et al.*, 2003; Escobedo-Bonilla *et al.*, 2005). Este tipo de bioensayos debe contar con un número mínimo adecuado de réplicas por tratamiento para tener confianza en la reproducibilidad de los resultados. Con estos procedimientos estandarizados de inoculación es posible evaluar el efecto de varios productos con potencial para reducir el impacto de agentes infecciosos y tener reproducibilidad en los resultados. Ejemplos de la aplicación de este tipo de bioensayos son los estudios hechos por Rahman *et al.*, 2006a, 2006b, 2007a, 2007b.

La tabla 1 presenta de forma resumida los principales datos de varios trabajos hechos con sustancias añadidas a dietas y con potencial actividad antiviral.



Tabla 1. Estudios de dietas experimentales adicionadas con sustancias antivirales

Estudio	Especie	Talla	Tratamiento	Dosis	Inoculo	Titulo (S/N)	Cantidad	Ruta	Mortalidad
Chang <i>et al.</i> , 1999	<i>P. monodon</i>	Pl 15	$\beta$ -glucan	0.2% 10-15% MBW	WSSV	N	1:500 dil 2 h	Inmersión	40% @ 30d
		6 g	<i>Schizophillum comune</i>	0.2% 3-5% MBW	15d después	N	1:20 dil (10 $\mu$ l)	Intramuscular	35% @ 30d
Takahashi <i>et al.</i> , 2000	<i>M. japonicus</i>	14 g	LPS <i>Pantoea agglomerans</i>	20 $\mu$ g/kg	WSSV 8d después	N	1:500 dil 2h	Inmersión	25% @ 10d
				40 $\mu$ g/kg		N			35% @ 10d
				100 $\mu$ g/kg		N			50% @ 10d
Chang <i>et al.</i> , 2003	<i>P. monodon</i>	7 g	<i>Schizophillum comune</i>	0.2% (3-5% MBW)	WSSV (desconocido)	N	1:20 dil (10 $\mu$ l)	Intramuscular	72% @ 24d
				1.0% (3-5% MBW)		N			60% @ 24d
				2.0% (3-5% MBW)		N			75% @ 24d
Chotigeat <i>et al.</i> , 2004	<i>P. monodon</i>	5-8 g	Fucoidan	100 mg/kg <sup>1</sup>	WSSV 4d después	N	Desconocido 2.5h	Inmersión	95% <sup>1</sup> / 90% <sup>2</sup> / 60% <sup>3</sup>
		12-15 g	<i>Sargassum polycystum</i>	200 mg/kg <sup>2</sup> 400 mg/kg <sup>3</sup>		N			60% <sup>1</sup> / 3% <sup>2</sup> /-
Supamattaya <i>et al.</i> , 2005	<i>P. monodon</i>	1-2 g	Carotenoides <i>Dunaliella</i>	0 mg/kg dieta	WSSV	S	1 LD <sub>50</sub> (10 <sup>-6</sup> dil.) (100 $\mu$ l)	Intramuscular	11% @ 15 d
				125 mg/kg dieta		S			0% @ 15 d
				200 mg/kg dieta		S			0% @ 15 d
		12-15 g		300 mg/kg dieta		S			0% @ 15 d

Estudio	Especie	Talla	Tratamiento	Dosis	Inoculo	Titulo (S/N)	Cantidad	Ruta	Mortalidad
Citarasu <i>et al.</i> , 2006	<i>P. monodon</i>	8 g	Indian herbs	100 mg/kg	WSSV	N	30 µg total protein	Intramuscular	100% @ 13d
				200 mg/kg					57% @ 20 d
				400 mg/kg					45% @ 20 d
				800 mg/kg					26% @ 20 d
Sajeevan <i>et al.</i> , 2006	<i>F. indicus</i>	16 g	β-glucan	1%	WSSV	N	1 g	<i>Per os</i>	90% @ 7d
			<i>Candida sake</i>	10%					50% @ 7d
				20%					75% @ 7 d
Balasubrama- nian <i>et al.</i> , 2007	<i>P. monodon</i>	10-15 g	C. dactylon	100 mg/kg	WSSV	N	10 µl extracto + 5 µl WSSV + 15 µl TNE incubado por 3 h	Intramuscular	0% @ 30d
			M. charantia	150 mg/kg					0% @ 30d
	<i>Paratelphusa</i>	20-25 g	L. camara	150 mg/kg					40% @ 30d
	<i>hydrodomous</i>		P. amarus	150 mg/kg					40% @ 30d

Estudio	Especie	Talla	Tratamiento	Dosis	Inoculo	Titulo (S/N)	Cantidad	Ruta	Mortalidad
Cruz-Suárez <i>et al.</i> , 2007	<i>L. vannamei</i>	15 g	<i>Cladosiphon okamuranus</i>	0.2%	WSSV	N	1400 copias/dosis Volumen desconocido	Intubacion oral	90% @ 12 d
				0.4%					70% @ 12 d
				0.6%					40% @ 12 d
				0.8%					40% @ 12 d
				Control					100% @ 5 d
Balasubramanian <i>et al.</i> , 2008	<i>P. monodon</i>	8-10 g	Extracto antiviral <i>Cynodon dactylon</i>	1% en alimento	WSSV 6 d despues	N	desconocido	<i>Per os</i> 2X/1 día	100% @ 15 d
				2% en alimento					0% @ 30 d
				Control					100% @ 5 d
Rahman <i>et al.</i> , 2006	<i>L. vannamei</i>	3-6 g	Spirulina platensis Cidofovir	25% (W/W)	WSSV 4 d despues T=0	S	30 SID <sub>50</sub> (50 µl)	Intubación oral	100% @ 84 d
				200 mg/kg MBW					80-90% @ 12 d
				Control					100% @ 84-10 d
Rameshthangam y Ramasamy, 2007	<i>P. monodon</i>	10-12 g	Bis-(2-metilheptil)-ftalato <i>Pongamia pinnata</i>	200 µg/g 300 µg/g Control	WSSV 4 d despues	N	desconocido	<i>Per os</i>	60% @ 15 d 20% @ 15 d 100% @ 6 d

## Referencias

- Balasubramanian G, Sarathi M, Rajesh-Kumar S, Sahul Hameed AS (2007) Screening the antiviral activity of Indian medicinal plants against white spot syndrome virus in shrimp. *Aquaculture* 263:15-19
- Balasubramanian G, Sarathi M, Venkatesan C, Thomas J, Sahul Hameed AS (2008) Oral administration of antiviral plant extract of *Cynodon dactylon* on a large scale production against white spot syndrome virus (WSSV) in *Penaeus monodon*. *Aquaculture* 279:2-5
- Bright-Singh IS, Manjusha M, Somnath-Pai S, Philip R (2005) *Fenneropenaeus indicus* is protected from white spot disease by oral administration of inactivated white spot syndrome virus. *Diseases of aquatic organisms* 66:265-270
- Caipang CMA, Verjan N, Ooi EL, Kondo H, Hirono I, Aoki T, Kiyono H, Yuki Y (2008) Enhanced survival of shrimp, *Penaeus (Marsupenaeus) japonicus* from white spot syndrome disease after oral administration of recombinant VP28 expressed in *Brevibacillus brevis*. *Fish & shellfish immunology* 25:315-320
- Chang CF, Su MS, Chen HY, Lo CF, Kou GH, Liao IC (1999) Effect of dietary  $\beta$ -1,3 -glucan on resistance to white spot syndrome virus (WSSV) in postlarval and juvenile *Penaeus monodon*. *Diseases of aquatic organisms* 36:163-168
- Chotigeat W, Tongsupa S, Supamataya K, Phongdara A (2004) Effect of fucoidan on disease resistance of black tiger shrimp. *Aquaculture* 233:23-30
- Chou HY, Huang CY, Wang CH, Chiang HC, Lo CF (1995) Pathogenicity of a baculovirus infection causing white spot syndrome in cultured penaeid shrimp in Taiwan. *Diseases of aquatic organisms* 23:165-173
- Citarasu T, Siravam V, Immanuel G, Rout N, Murugan V (2006) Influence of selected Indian immunostimulant herbs against white spot syndrome virus (WSSV) infection in black tiger shrimp, *Penaeus monodon* with reference to haematological, biochemical and immunological changes. *Fish & shellfish immunology* 21:372-384
- Cruz-Suárez EL, Hernández-López J, Porchas-Cornejo M, Coronado-Molina D, Linné-Unzueta M, Nieto-López M, Tapia-Salazar M, Ricque-Marie D (2007) The antiviral effect of algal fucoidans. *Aqua Culture Asia Pacific Magazine* p 19
- Escobedo-Bonilla CM, Alday-Sanz V, Wille M, Sorgeloos P, Pensaert MB, Nauwynck HJ (2008) A review on the morphology, molecular characterization, morphogenesis and pathogenesis of white spot syndrome virus. *Journal of fish diseases* 31:1-18
- Escobedo-Bonilla CM, Wille M, Alday-Sanz V, Sorgeloos P, Pensaert MB, Nauwynck HJ (2005) *In vivo* titration of white spot syndrome virus (WSSV) in SPF *Litopenaeus vannamei* by intramuscular and oral routes. *Diseases of aquatic organisms* 66:163-170
- Fan X, Thirunavukkarasu K, Weaver RF (1996) Temperature-sensitive mutations in the protein kinase-1 (pk-1) gene of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus that block very late gene expression. *Virology* 224:1-9
- FAO fisheries department fishery information, data and statistics unit (2006) Fishstat, universal software for fishery

statistical time series. Version 2.3

- Fire A, Xu SQ, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391:806-810
- Fu LL, Li WF, Du HH, Dai W, Xu ZR (2008) Oral vaccination with envelope protein VP28 against white spot syndrome virus in *Procambarus clarkii* using *Bacillus subtilis* as delivery vehicles. *Letters in applied microbiology* 46:581-586
- Giese M (1998) DNA-antiviral vaccines: New developments and approaches- A review. *Virus genes* 17:219-232
- Gómez-Chiari M, Chiaverini LA (1999) Evaluation of eukaryotic promoters for the construction of DNA vaccines for aquaculture. *Genetic analysis: Biomolecular engineering* 15:121-124
- Granja C, Vidal OM, Parra G, Salazar M (2006) Hyperthermia reduces viral load of white spot syndrome virus in infected *Litopenaeus vannamei*. *Diseases of aquatic organisms* 68:175-180
- Guan Y, Yu Z, Lia C (2003) The effects of temperature on white spot syndrome infections in *Marsupenaeus japonicus*. *Journal of invertebrate pathology* 83:257-260
- Huang CC, Song YL (1999) Maternal transmission of immunity to white spot syndrome associated virus (WSSV) in shrimp (*Penaeus monodon*). *Developmental and comparative immunology* 23:545-552
- Jiravanichpaisal P, Soderhall K, Soderhall I (2004) Effect of water temperature on the immune response and infectivity pattern of white spot syndrome virus (WSSV) in freshwater crayfish. *Fish & Shellfish Immunology* 17:265-275
- Kobayashi M, Inagaki S, Kawase S (1981) Effect of high temperature on the development of nuclear polyhedrosis virus in the silkworm *Bombyx mori*. *Journal of invertebrate pathology* 38:386-394
- Kumar SR, Ishaq Ahamed VP, Sarathi M, Nazeer Basha A, Sahul Hameed AS (2008) Immunological responses of *Penaeus monodon* to DNA vaccine and its efficacy to protect shrimp against white spot syndrome virus (WSSV). *Fish & shellfish immunology* 24:467-478
- Kumar-Jha R, Xu-Rong Z, Shen J, Bai-Juan S, Sun-Yu J, Fen-Li W (2006) The efficacy of recombinant vaccines against white spot syndrome virus in *Procambarus clarkii*. *Immunology letters* 105:68-76
- Lee J-B, Srisomporn P, Hayashi K, Tanaka T, Sankawa u, Hayashi T (2001) Effects of structural modification of calcium spirulan, a sulfated polysaccharide from *Spirulina platensis*, on antiviral activity. *Chemical pharmacology bulletin* 49:108-110
- Namikoshi A, Wu JL, Yamashita T, Nishizawa T, Nishioka T, Arimoto M, Muroga K (2004) Vaccination trials with *Penaeus japonicus* to induce resistance to white spot syndrome virus. *Aquaculture* 229:25-35
- Prior S, Browdy C, L., Shepard EF, Laramore R, Parnell PG (2003) Controlled bioassay systems for determination of lethal infective doses of tissue homogenates containing Taura syndrome or white spot syndrome virus. *Diseases of aquatic organisms* 54:89-96
- Rahman MM, Corteel M, Dantas-Lima JJ, Wille M, Alday Sanz V, Pensaert MB, Sorgeloos P, Nauwynck HJ (2007b) Impact of daily fluctuations of optimum (27°C) and high water temperature (33°C) on *Penaeus vannamei* juveniles infected with white spot syndrome virus (WSSV). *Aquaculture* 269:107-113
- Rahman MM, Corteel M, Wille M, Alday-Sanz V, Pensaert MB, Sorgeloos P, Nauwynck HJ (2007a) The effect of

- raising water temperature to 33°C in *Penaeus vannamei* juveniles at different stages of infection with white spot syndrome virus. *Aquaculture* 272:240-245
- Rahman MM, Escobedo-Bonilla CM, Corteel M, Dantas-Lima JJ, Wille M, Alday-Sanz V, Pensaert MB, Sorgeloos P, Nauwynck HJ (2006b) Effect of high water temperature (33 °C) on the clinical and virological outcome of experimental infections with white spot syndrome virus (WSSV) in specific pathogen-free (SPF) *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture* 261:842-849
- Rahman MM, Escobedo-Bonilla CM, Wille M, Alday Sanz V, Audoorn L, Neyts J, Pensaert MB, Sorgeloos P, Nauwynck HJ (2006a) Clinical effect of cidofovir and a diet supplemented with *Spirulina platensis* in white spot syndrome virus (WSSV) infected specific pathogen-free *Litopenaeus vannamei* juveniles. *Aquaculture* 255:600-605
- Rameshthangam P, Ramasamy P (2007) Antiviral activity of bis-(2-methylheptyl)-phthalate isolated from *Pongamia pinnata* leaves against white spot syndrome virus of *Penaeus monodon* Fabricius. *Virus research* 126:38-44
- Reyes A, Salazar M, Granja C (2007) Temperature modifies gene expression in subcuticular epithelial cells of white spot syndrome virus-infected *Litopenaeus vannamei*. *Developmental and comparative immunology* 31 23-29
- Robalino J, Browdy CL, Prior S, Metz A, Parnell P, Gross P, Warr G (2004) Induction of antiviral immunity of double-stranded RNA in a marine invertebrate. *Journal of virology* 78:10442-10448
- Rosenberry R (2001) World shrimp farming 2000. *Shrimp news international*. U.S.A., p 1-324
- Rout N, Kumar S, Jaganmohan S, Murugan V (2007) DNA vaccines encoding viral envelope proteins confer protective immunity against WSSV in black tiger shrimp. *Vaccine* 25:2778-2786
- Sarathi M, Simon MC, Ishaq-Ahmed VP, Rajesh-Kumar S, Sahul Hameed AS (2008a) Silencing VP28 gene of white spot syndrome virus of shrimp by bacterially expressed dsRNA. *Marine biotechnology* 10:198-206
- Sarathi M, Simon MC, Venkatesan C, Sahul-Hameed AS (2008b) Oral administration of bacterially expressed VP28 dsRNA to protect *Penaeus monodon* from white spot syndrome virus *Marine biotechnology* 10:242-249
- Sajeevan TP, Philip R, Bright-Singh IS (2006) Immunostimulatory effect of a marine yeast *Candida sake* S165 in *Fenneropenaeus indicus*. *Aquaculture* 257:150-155
- Shikata M, Sano Y, Hashimoto Y, Matsumoto T (1998) Isolation and characterization of a temperature-sensitive mutant of *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus for a putative RNA polymerase gene. *Journal of General Virology* 79:2071-2078
- Supamattaya K, Kiriratnikom S, Boonyaratpalin M, Borowitzka L (2005) Effect of a *Dunalliella* extract on growth performance, health condition, immune response and disease resistance in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Aquaculture* 248:207-216
- Takahashi Y, Kondo M, Itami T, Honda T, Inagawa H, Nishizawa T, Soma GI, Yokomiso Y (2000) Enhancement of disease resistance against penaeid acute viraemia and induction of virus-inactivating activity in haemolymph of kuruma shrimp, *Penaeus japonicus*, by oral administration of *Pantoea agglomerans* lipopolysaccharide (LPS). *Fish & shellfish immunology* 10:555-558
- van Beek N, Hughes PR, Wood HA (2000) Effects of incubation temperature on the dose-survival time relationship

- of *Trichoplusia ni* larvae infected with *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus. *Journal of invertebrate pathology* 76:185-190
- van Hulten MCW, Reijns M, Vermeesch AMG, Zandbergen F, Vlak JM (2002) Identification of VP19 and VP15 of white spot syndrome virus (WSSV) and glycosylation status of the WSSV major structural proteins. *Journal of general virology* 83:257-265
- Vaseeharan B, Anand PT, Murugan T, Chen JC (2006) Shrimp vaccination trials with the VP292 protein of white spot syndrome virus. *Letters of applied microbiology* 43:137-142
- Venegas CA, Nonaka L, Mushiake K, Nishizawa T, Muroga K (2000) Quasi-immune response of *Penaeus japonicus* to penaeid rod-shaped DNA virus (PRDV). *Diseases of aquatic organisms* 42:83-89
- Vidal OM, Granja CB, Aranguren LF (2001) A profound effect of hyperthermia on survival of *Litopenaeus vannamei* juveniles infected with white spot syndrome virus. *Journal of the world aquaculture society* 32:364-372
- Vlak JM, Bonami JR, Flegel TW, Kou GH, Lightner DV, Loh CF, Loh PC, Walker PW (2005) Nimaviridae. In: Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U, Ball LA (eds) *Virus Taxonomy: VIIIth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses* Elsevier/Academic Press, London, UK, p 187-192
- Westenberg M, Heinhuis B, Zuidema D, Vlak JM (2005) siRNA injection induces sequence-independent protection in *Penaeus monodon* against white spot syndrome virus. *Virus research* 114:133-139
- Witteveldt J, Cifuentes CC, Vlak JM, van Hulten MCW (2004) Protection of *Penaeus monodon* against white spot syndrome virus by oral vaccination. *Journal of virology* 78:2057-2061
- Witteveldt J, Vermeesch AMG, Langenhof M, de Lang A, Vlak JM, van Hulten MCW (2005) Nucleocapsid protein VP15 is the basic DNA binding protein of white spot syndrome virus of shrimp. *Archives of virology*
- Witteveldt J, Vlak JM, van Hulten MCW (2006) Increased tolerance of *Litopenaeus vannamei* to white spot syndrome virus (WSSV) infection after oral application of the viral envelope protein VP28. *Diseases of aquatic organisms* 70:167-170
- Wongteerasupaya C, Vickers JE, Sriurairatana S, Nash GL, Akarajamorn A, Boonsaeng V, Panyim S, Tassanakajon A, Withyachumnarnkul B, Flegel TW (1995) A non-occluded, systemic baculovirus that occurs in cells of ectodermal and mesodermal origin and causes high mortality in the black tiger prawn *Penaeus monodon*. *Diseases of aquatic organisms* 21:69-77
- Zhang X, u X, Leong Hew C (2001) The structure and function of a gene encoding a basic peptide from prawn white spot syndrome virus. *Virus Research* 79:137-144