

EL CAMARÓN *PENAEUS VANNAMEI* Y SUS PATÓGENOS VIRALES, ESTADO ACTUAL DE CONOCIMIENTOS DE MECANISMOS DE DEFENSA CELULAR.

Jenny Rodríguez¹, Fabrizio Echeverría¹, Martha Maldonado²,
Sara Blake², Balladares Alejandra², Julio Ruiz¹.

¹ Fundación CENAIM-ESPOL, Casilla 09-01-4519, Guayaquil, ECUADOR

² Escuela Superior Politécnica del Litoral (ESPOL)

Campus Galindo, Km. 30.5 vía Perimetral

Apartado 09-01-5863, Guayaquil, Ecuador

Email: jrodrigu@cenaim.espol.edu.ec

Resumen

Durante las infecciones virales no se observan zonas inflamadas con fuerte infiltración de hemocitos y melanización típicas de las infecciones bacterianas. Dos tipos de respuesta celular ante infecciones virales se han reportado en camarón. Infecciones con el virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV) se caracterizan por ausencia de respuesta celular visible en cortes histológicos, en tanto que se presentan alteraciones hematológicas como coloración rosada de la hemolinfa y hemocitos alterados. La ausencia de respuesta celular evidente llevó a Flegel a postular su teoría de la acomodación viral, la misma que se basa en la supresión de la apoptosis. Existe controversia en cuanto al rol de la apoptosis en infecciones virales. En tanto algunos autores la relacionan con alta mortalidad, otros sugieren que se trata de un mecanismo empleado por el hospedero para frenar la replicación viral. Sin embargo las infecciones con el virus del síndrome de Taura (TSV) y las mionecrosis provocadas por los patógenos virales emergentes, el virus de la mionecrosis infecciosa (IMNV) y el nodavirus de *Penaeus vannamei* (PvNv) se acompañan de fuertes reacciones celulares, las que se traducen en infiltraciones hemocitarias y en la formación de esferoides (gigantescas masas de células fagocitarias). Los esferoides pueden formarse en el tejido conectivo de distintas zonas del cuerpo, siendo su ubicación habitual los espacios hemales entre los túbulos del órgano linfoide. El órgano linfoide tendría por rol limpiar la hemolinfa de partículas virales circulantes, conduciendo a la formación de esferoides. Recientes estudios han llevado a la identificación de proteínas antivirales en crustáceos tales como el factor antilipopolisacárido (ALF) y a la demostración de silenciamiento viral mediante el ARN de doble cadena. A fin de tener una mayor comprensión de las reacciones celulares en camarones infectados con WSSV, hemos seguido la evolución de las poblaciones hemocitarias en ensayos de desafío con WSSV utilizando animales de distinta susceptibilidad al virus. En este trabajo discutimos estas observaciones en base a la evidencia publicada sobre los posibles mecanismos de defensa celular antiviral en camarón.

Introducción

Los patologías virales son las más devastadoras para el camarón de cultivo. Si bien hay una creciente información sobre el WSSV y otros patógenos virales, los conocimientos relacionados a los mecanismos de defensa desplegados por el hospedero (camarón) son escasos. Por otra parte la información sobre el desarrollo de la enfermedad en los estanques es también fragmentada. Durante las infecciones virales no se observan las típicas zonas inflamadas con fuerte infiltración de hemocitos y melanización típicas de las infecciones bacterianas. Dos tipos de respuesta celular ante infecciones virales se han reportado en camarón. Por ejemplo, Infecciones con WSSV se caracterizan por ausencia de respuesta celular visible en cortes histológicos, en tanto que se presentan alteraciones hematológicas como coloración rosada de la hemolinfa y hemocitos alterados, con claros signos de muerte celular. El color de la hemolinfa en los crustáceos es de color azul verdoso a causa de la hemocianina, proteína respiratoria. Modificaciones en el color de la hemolinfa de rojiza a café se han observado en animales infectados con WSSV (Rodríguez et al., 2003) y con el virus de Taura (Song et al., 2003). Bajos niveles de hemocianina podrían favorecer el cambio de color (Noga, 2000). Sin embargo se ha detectado además que el plasma de animales con hemolinfa rosada puede melanizar rápidamente ennegreciéndose luego de la extracción, indicando la presencia de actividad PO plasmática (www.cenaim.espol.edu.ec). No se ha determinado por que razón este ennegrecimiento no ocurre *in vivo* en el hemocele. La ausencia de una clara respuesta celular llevó a Flegel y colaboradores a postular su teoría de la acomodación viral. Según esta teoría

los crustáceos no ofrecerían una resistencia como tal, al contrario en ellos existirían los mecanismos que conducirían a una activa acomodación viral (Flegel et al., 1998) por medio de la cual los animales aprenden a tolerar a los virus, mediante la supresión de la apoptosis. Existe controversia en cuanto al rol de la apoptosis en infecciones virales. Varios autores han relacionado la apoptosis con alta mortalidad en infecciones virales, con el virus de la cabeza amarilla (YHV) en *Penaeus monodon* (Khanobdee et al., 2002), WSSV en la misma especie (Sahtout et al., 2001). Los autores indican que sería la masiva apoptosis la causante de la mortalidad al comprometer importante funciones vitales. En tanto otros autores sugieren que se trata de un mecanismo empleado por el hospedero para frenar la replicación viral. Sin embargo las infecciones con TSV y las mionecrosis provocadas por IMNV y PvNv provocan fuertes reacciones celulares, las que se traducen en la formación de esferoides (gigantescas masas de células fagocitarias) (Poulos et al., 2006). Los esferoides del órgano linfoide (LOS) se han asociado a varios virus YHV (Boonyarapatlin et al., 1993) TSV (Hasson et al., 1995) LOVV (Lightner, 1996). Según Anggraeni y Owens (2000), los LOS son de origen hemocitario y constituyen el principal mecanismo de captura de partículas virales presentes en la hemolinfa. El órgano linfoide tendría por rol limpiar la hemolinfa de partículas virales circulantes, conduciendo a la formación de esferoides. Esferoides ectópicos pueden formarse en el tejido conectivo de distintas zonas del cuerpo.

Estudios más recientes utilizando herramientas moleculares han llevado a la identificación de proteínas antivirales en crustáceos tales como el

antilipopolsaccharide factor (ALF) (Liu et al., 2006) y la demostración de silenciamiento viral silencing mediante el uso de ARN de doble cadena (Robalino et al., 2005).

Por otra parte varios factores intrínsecos y extrínsecos influirían en la aparición de brotes de enfermedad. Entre los factores intrínsecos el más importante es la muda, los animales exhiben una altísima susceptibilidad a desarrollar la enfermedad en premuda, muriendo en postmuda. Entre los factores extrínsecos, estudios epidemiológicos señalan a la densidad como uno de los factores fundamentales en la transmisión del virus (Wu et al., 2001). Por otra parte en *P. vannamei* la temperatura influiría sobre el nivel de resistencia del hospedero frente al WSSV (Vidal et al., 2001) y el descenso estacional en este parámetro ambiental actuarían como detonante de los brotes (Rodríguez et al., 2003). Varios estudios han demostrado la resistencia del *P. vannamei* al WSSV bajo condiciones de hipertermia.

En este trabajo hemos querido analizar la evolución de las poblaciones hemocitarias en animales de diferente susceptibilidad al WSSV en base los conocimientos actuales publicados sobre los mecanismos de defensa del camarón contra los patógenos virales, en particular el WSSV.

Materiales y Métodos

Las técnicas empleada fueron histología, siguiendo el procedimiento de Bell y Lightner (1988) e inmunohistoquímica, según el protocolo de Destoumieux et al (2000). Los anticuerpos específicos de subpoblaciones hemocitarias fueron, 40E10 (marcador de hemocitos hialinos), 41B12 (marcador de

hemocitos hialinos grandes y con gránulos estriados) y 40E2 (marcador de hemocitos granulados) (Rodríguez et al., 1995) y un anticuerpo anti WSSV (DiagXotics). El material biológico empleado fue: 1) Animales en los que el protocolo de larvicultura influyó sobre la resistencia al WSSV, la respuesta inmune a un desafío con WSSV y la producción en piscinas. 2) 3 familias de diferente resistencia al WSSV. 3) Animales sometidos a una infección subletal. En este último trabajo se estudió los eventos celulares en las primeras horas de infección de animales con infección aguda y en animales de apariencia saludable. Para esto se realizó una infección con WSSV por baño a 28°C en animales individualizados. En este estudio se detectó apoptosis mediante TUNEL (Promega). Los dos primeros grupos fueron infectados oralmente. 4) Larvas de camarón infectadas de manera natural. En estos animales el WSSV en los tejidos fue detectado por hibridación in situ.

Resultados

Poblaciones hemocitarias a nivel de tejidos

Las reacciones cruzadas con los anticuerpos anti-hemocitos indican el parentesco antigénico entre diferentes tejidos implicados en mecanismos de limpieza y los hemocitos. El estroma del órgano linfoide (OL) y los podocitos de la glándula antenal (GA), tejidos con capacidad de pinocitosis (Johnson, 1987) fueron positivos con el anticuerpo 40E10, en tanto, señales con el anticuerpo 41B12 se detectaron en el tejido conectivo del estómago, en los bordes de los túbulos del órgano linfoide, y en los esferoides. Esto sugiere la existencia de dos poblaciones antigénicamente distintas de hemocitos hialinos. Las células fagocíticas del corazón, fueron

reconocidas por los tres anticuerpos antihemocitos. Pocas células en el órgano linfoide y en tejido conectivo del estómago fueron reconocidas por el anticuerpo 40E2. Una señal fuerte con este anticuerpo se detectó en el tejido conectivo de la región oral.

Rutas de ingreso del WSSV

Los dos tipos de infección empleados (oral y baño) fueron eficaces. En los tres estudios, la glándula antenal fue positiva desde el inicio, sin alcanzar altos niveles de infección. En las dos infecciones orales tanto el nivel como el porcentaje de animales que presentaron infección en branquias fue bajo, en tanto que en la infección por baño este tejido fue muy afectado. Las células epiteliales de boca esófago y estómago fueron infectadas desde el inicio ya sea por baño u oralmente. La inmunohistoquímica mostró una señal fuerte para WSSV en las glándulas tegumentales (GT), de todo el cuerpo, en particular en las ubicadas en la región oral y en los epitelios más cercanos. Animales muy afectados presentaron descamación del tejido epitelial bajo la cutícula. Las larvas de camarón mostraron una incipiente señal para WSSV en glándula antenal y en tejido nervioso de la cabeza.

Respuesta del huésped

En animales resistentes la inmunohistoquímica mostró señal positiva para WSSV en las GT pero no en los epitelios circundantes. Por otra parte la familia resistente no mostró la presencia de WSSV en las GT. La inmunohistoquímica mostró que las GT y el tejido conectivo que las rodea tienen una fuerte presencia hemocitaria. Se detectó apoptosis en tejidos muy expuestos tales como epitelio de la región oral y estómago y glándula antenal. En los animales resistentes, la apoptosis llegó a comprometer el 80 % de los tejidos,

los mismos que no mostraron infección por WSSV. En los animales muestreados a los 7 días de postinfección no se observó apoptosis. Las partículas virales fueron filtradas y acumuladas en el borde externo de los túbulos del OL y al interior de los esferoides. Esferoides ectópicos fueron detectados en tejido conectivo del estómago y región oral. Los animales con infección aguda murieron en las primeras horas, presentando color rosado y los tejidos muy deteriorados por apoptosis y WSD en GA y epitelios, necrosis, y desorganización del OL.

Discusión

Los resultados obtenidos sugieren que la capacidad de ingreso a través las GT y la de avanzar hacia otros tejidos desde ellas pueden ser dos aspectos vitales en los mecanismos de infección y defensa del hospedero. El rol de la apoptosis podría ser impedir la primera fase de replicación viral dentro del huésped. Si la apoptosis es ineficaz el virus se replica y puede contaminar otros tejidos. Un gen antiapoptosis ha sido identificado en WSSV (Wang, 2004). En infecciones por TSV las GT están relacionadas a la formación de esferoides ectópicos (Hasson et al., 1999). El estudio con larvas de camarón infectadas de manera natural con WSSV mostró que como únicos tejidos infectados las GT y el tejido nervioso de los apéndices de la cabeza. De forma curiosa los epitelios de esos apéndices dieron señal positiva para apoptosis, siendo al mismo tiempo negativos para WSSV. Sugiriendo que bajo niveles incipientes de infección la apoptosis podría frenar la replicación viral en los epitelios.

La inmunohistoquímica nos permitió observar acumulación de material viral en los bordes de los tubules del OL y en los esferoides de las familia de

resistencia media al WSSV. Este proceso fue prácticamente indetectable en la familia susceptible. Por otra parte el inmunomarcado con el anticuerpo antihemocitos 41B12, sugiere que la principal población hemocitaria implicada en la retención de virus en el OL y la formación de esferoides es la de hemocitos hialinos con gránulos estriados. Por otra parte la familia de mayor resistencia se caracterizó por la presencia preferencial de esferoides de tipo A sobre los esferoides de tipo B, más abundantes en la familia de resistencia media. En su estudio sobre TSV, Hasson et al (1999) dan una clasificación de los esferoides. El tipo A ha sido asociado a una infección ínfima casi indetectable o a la eliminación del virus por mecanismos aún desconocidos. Los esferoides del tipo B han sido encontrados en los niveles más altos de infección, ellos muestran una mayor prevalencia viral y por consiguiente una mayor destrucción celular, sugiriendo replicación viral en este tipo de esferoides.

Tanto en infecciones experimentales (Kim et al., 1999) como naturales (Montesdeoca et al., 2002) con el WSSV se ha observado animales con un alto contenido de hemocitos hialinos. Al respecto el trabajo de Montesdeoca et al (2002) como el de Espinosa (2003) indican que esta modificación del hemograma se presenta en los animales sobrevivientes. El incremento de hemocitos hialinos podría ser explicado por selección natural, sobreviven los animales con alta capacidad de proliferación, al ser los hemocitos hialinos células jóvenes y poco diferenciadas, (Van de Braak et al., 2002) podrían considerarse como indicadores de proliferación. Adicionalmente se ha reportado que

estos hemocitos no serían infectados por el WSSV (Wang et al., 2002).

Las razones que motivan una mayor reacción celular en las infecciones con los virus causantes de las mionecrosis deben ser evaluadas en el futuro. Sin embargo llama la atención que en estas patologías no se han reportado infecciones de tejido hematopoyético y OL, sugiriendo que la ausencia de respuesta celular en el WSSV que si infecta estos tejidos podría deberse al bloqueo de la capacidad de proliferación hemocitaria.

En el camarón, un factor intrínscico muy importante en el desarrollo de enfermedades virales y mortalidad es la muda. Tanto en infecciones con TSV (Hasson et al., 1999) como en infecciones con WSSV (Echeverría et al., 2002), la fase aguda de la enfermedad se desarrolla en tardía premuda ocasionando la muerte en ecdisis o postmuda. En premuda tardía, el virus tendría la oportunidad de incrementar su virulencia en el animal, sacando beneficio posiblemente de las modificaciones fisiológicas asociadas a la muda (incremento de la actividad de las células epiteliales), consumo de reservas. Por otra parte provocar la mortalidad en postmuda favorecería la propagación del virus, muchas partículas virales serían liberadas con los exuvios, en tanto que los animales debilitados y blandos serían fácil presa de los sanos, principalmente de aquellos que están en intermuda y premuda temprana, periodo de mayor ingestión de alimentos. Sin embargo de manera curiosa, en los animales sobrevivientes de la infección subletal se observó detención en el proceso de muda, las implicaciones de esto en el crecimiento deben evaluarse en el futuro. La bibliografía señala una

correlación inversa entre crecimiento y resistencia (Gitterle et al., 2005).

El factor extrínscico más importante en la resistencia a los patógenos es la temperatura.

Chavarría (WWW.CENAIM.Acuiclima) ha reportado que la producción de camarón en el Ecuador está en relación directa con el clima (temperatura del mar) y con los eventos fríos (La Niña) y cálidos (El Niño) presentes en esta region geográfica. El efecto de la temperatura sobre la resistencia al WSSV ha motivado el desarrollo de innumerables estudios que van desde la capacidad del virus a replicarse en hipertermia hasta el efecto del estrés en animales sometidos a hipertermia.

Conclusiones

El sistema inmune del camarón no sería indiferente a las agresiones virales reaccionando contra estas mediante efectores humorales y celulares (fagocitosis y formación de esferoides). El virus que llega a la hemolinfa puede ser filtrado y acumulado en el OL por parte de los hemocitos grandes hialinos, los cuales forman esferoides. La ubicación de estos hemocitos en tejido conectivo les daría fácil acceso a diferentes zonas del animal. Los sobrevivientes de la infección subletal, dejaron de mudar y no mostraron lesiones, pero la presencia masiva de esferoides sugiere que llegan a niveles crónicos de infección, con una fuerte inversión en tejido inmune. Futuros estudios deben determinar si la causa es la inversión de energía en tejido inmune. Otro mecanismo empleado por el hospedero para frenar la replicación viral sería la apoptosis de las células invadidas por los agentes virales. Los restos celulares serían eliminados mediante fagocitosis y encapsulación. Sin embargo en este punto existe mucha

información controversial sobre el rol de la apoptosis en la patogenicidad de la mancha blanca. El nivel de respuesta estaría modulado por factores intrínscicos y extrínscicos, particularmente ciclo de muda y temperatura del agua. El manejo de la tolerancia a diferentes temperaturas se presenta como una alternativa a explorar a fin de incrementar la rentabilidad de los cultivos.

Referencias

Anggraeni MS, Owens L. The haemocytic origin of lymphoid organ spheroid cells in the penaeid prawn *Penaeus monodon*. *Dis. Aquat. Org*, 2000; **40**, 85-92.

Bell, T.A. and Lightner, D.V., 1988. A Handbook of normal penaeid shrimp histology. The World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, USA.

Boonyarapatlin S, Supamattaya K, Kasorchandra J, Direkbusaracom S, Aekpanithanpong U, Chantanachooklin C. Non-occluded baculo-like virus, the causative agent of yellow head disease in the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Fish Pathol*, 1993; **28** (3): 103-109.

CENAIM informa. 2000. Los camarones afectados de WSSV presentan la hemolinfa rosada relacionada a una elevada actividad PO en el plasma. Boletín informativo quincenal # 15.

Destoumieux, D., Muñoz, M., Cosseau, C., Rodríguez, J., Bulet, Ph., Comps, M. and Bachère, E., 2000. Penaidins, antimicrobials peptides with chitin-binding activity, are produced and stored in shrimp granulocytes and released after microbial challenge. *Journal of Cell Science*. 113, 461-469.

- Echeverría F, Otero V, Cornejo F, Rodríguez J, WSSV y ciclo de muda en el camarón blanco *Litopenaeus vannamei*. *El Mundo Acuícola*, 2002; 8 (1), 43-46.
- Espinosa Y. Inmunoestimulación temprana de *Litopenaeus vannamei* para inducir una mayor respuesta inmune al virus de la mancha blanca. M.Sc Thesis, Escuela Superior Politécnica del Litoral, Guayaquil-Ecuador. 2003.
- Flegel TW, Pasharawipas T. 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, 1998; 245-250.
- Gitterle, T., Gjerde, B., Cock, J., Salazar, M., Rye, M., Vidal, O., Lozano, C., Erazo, C and Salte, R., 2006. Optimization of experimental infection protocols for the estimation of genetic parameters of resistance to White Spot Syndrome Virus (WSSV) in *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*. *Aquaculture* 261, 501 – 509.
- Hasson K, Lightner D, Mohny L, Redman RM, White BM. Role of lymphoid organ spheroids in chronic Taura syndrome virus (TSV) infections in *Penaeus vannamei*. *Dis. Aquat. Org*, 1999; 38: 93-105.
- Hasson K, Lightner D, Poulos B, Redman R, White B, Brock J, 1995, Bonami R. Taura syndrome in *Penaeus vannamei*: demonstration of a viral etiology. *Dis. Aquat. Org*, 1995; 23: 115-126.
- Hasson KW, Lightner DV, Mohny LL, Redman RM, Poulos BT, White BM. Taura syndrome virus (TSV) development and the disease cycle in the Pacific white shrimp *Penaeus vannamei*. *Dis. Aquat. Org*, 1999; 36: 81-93.
- Khanobdee K, Soowannayan Ch, Flegel T, Ubol S, Withyachumnarnkul. Evidence for apoptosis correlated with mortality in the giant black tiger shrimp *Penaeus monodon* infected with yellow head virus. *Dis. Aquat. Org*, 2002, 48:79-90.
- Kim YJ, Choi WC, Kim HR, Jung SJ, Oh MJ. Changes in *Penaeus chinensis* haemocytes during white spot baculovirus (WSBV) infections. *Bull Eur Ass. Fish Pathol*, 1999; 19(5): 213-215.
- Lightner DV. A handbook of shrimp pathology and diagnostic procedures for diseases of cultured penaeid shrimp. The world Aquaculture Society, Baton Rouge, LA., 1996.
- Liu, H., Jiravanichpaisal, P., Söderhäll, I., Cerenius, L. and Söderhäll, K., 2006. Antilipopopolysaccharide factor interferes with White Spot Syndrome Virus replication in vitro and in vivo in the crayfish *Pacifastacus leniusculus*. *Journal of virology* 80 (21), 10365 – 10371.
- Montesdeoca M, Amano Y, Echeverría F, Betancourt I, Panchana F, Sotomayor M et al. La respuesta inmunitaria celular del camarón *Litopenaeus vannamei* al WSSV y su utilidad en el control de la enfermedad en los estanques. *El mundo Acuícola*, 2002; 8: 38-42.
- Noga EJ. Hemolymph biomarkers of crustacean health. In: *Recent Advances in Marine Biotechnology, Immunobiology and Pathology*, Vol.5. M. Fingerma &

Nagabushanam (Eds). Enfield, NH: USA: Science Publishers, Inc. 2000; 125-163.

Poulos, B., Tang, K., Pantoja, C., Bonami, J.R. and Lightner, D., 2006. Purification and characterization of infectious myonecrosis virus of penaeid shrimp. *Journal of general virology*. 87, 987-996.

Robalino, J., Bartlett, T., Shepard, E., Prior, S., Jaramillo, G., Scura, E., Chapman, R., Gross, P., Browdy, C. and Warr, G. Double-Stranded RNA induces sequence-specific antiviral silencing in addition to non-specific immunity in a marine shrimp: Convergence of RNA interference and innate immunity in the invertebrate antiviral response?. *Journal of Virology* 79 (21), 13571 – 13571.

Rodríguez, J., Boulo, V., Mialhe, E. and Bachère, E., 1995. Characterization of shrimp haemocytes and plasma components by monoclonal antibodies. *Journal of cell Science*. 108, 1048–1050.

Rodríguez J, Bayot B, Amano Y, Panchana F, de Bla I, Alday V, et al. White spot síndrome virus infection in cultured *Penaeus vannamei* (Boone) in Ecuador with emphasis on histopathology and ultrastructure. *J. fish Dis*, 2003; 26:1-12.

Sahtout AH, Hassan MD, Shariff M. DNA fragmentation, an indicator of apoptosis, in cultured black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Dis. Aquat. Org*, 2001; 44, 155-159.

Song YL, Yu ChI, Lien TW, Huang ChCh, Lin MN. Haemolymph parameters of pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) infected with Taura syndrome virus. *Fish Shellfish Immunol*, 2003; 14: 317-331.

Van de Braak, K, Botterblom MHA, Liu W, Taverne N, Van der Knaap WPW, Rombout JHWM. The role of the haematopoietic tissue in haemocyte production and maturation in the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Fish Shellfish immunol*, 2002; 12, 253-272.

Vidal OM, Granja CB, Aranguren F. A profound effect of hyperthermia on survival of *Litopenaeus vannamei* juveniles infected with White Spot Syndrome Virus. *J. World Aquaculture Society*, 2001, 32; 364-372.

Wang YT, Liu W, Seah JN, Lam CS, Xiang JH, Korzh V, Kwang J. White Spot Syndrome Virus (WSSV) infects specific hemocytes of the shrimp *Penaeus merguensis*. *Dis. Aquat. Org*, 2002; 52, 249-259.

Wu JL, Namikoshi A, Nishizawa, Mushiake T, Teruya K densidad, et al. Effects of shrimp density on transmission of penaeid acute viremia in *Penaeus japonicus* by cannibalism and the waterborne route. *Dis. Aquat. Org*, 2001; 47: 129-135