

Principios y Problemas Involucrados en la Evaluación de Inmunoestimulantes en Juveniles de Camarón.

Gilles Le Moullac¹, Loïc Phillip de Laborie¹, Denis Saulnier¹, Cyrille Goarant², Marleen Dehasque³

¹ IFREMER, Centre Océanologique du Pacifique, BP 7004, Taravao, Tahiti, Polynésie Française

² IFREMER, Station d'Aquaculture de St Vincent, BP 2059, 98845 Nouméa Cedex, Nouvelle Calédonie

³ INVE Technologies NV, Oeverstraat 7, B-9200 Baasrode, Belgium

Resumen

Anderson (1992) y Raa (1996) han escrito impresionantes críticas acerca del uso de inmunoestimulantes en acuicultura. La mayoría de los trabajos citados se refieren principalmente al cultivo de peces y pocos acerca del camarón. Así que este trabajo está enfocado al camarón y las pocas pruebas publicadas. Varios de los inmunoestimulantes y su manera de actuar sobre el sistema inmune en camarones se describen brevemente, así como los métodos usados para administrar las sustancias inmunoestimuladoras para camarón. La dificultad para experimentar en este campo está señalada con algunos ejemplos.

Introducción

La producción mundial del cultivo de camarón se ha incrementado constantemente durante los últimos veinte años. En 1995 se produjeron 712,000 toneladas métricas de camarón entero; unas 21,000 tons menos que para el registro anual de 1994. Hasta avanzados los 80's este crecimiento resultó principalmente de un incremento de las áreas de crecimiento y también de las más altas densidades de los estanques. En el proceso, se deterioraron las condiciones ambientales dentro y fuera de las granjas en muchas áreas, y la incidencia de enfermedades afectó rápida y negativamente la producción; situación similar a lo que ya ha ocurrido en otras producciones de animales. El ambiente deteriorado y las condiciones de cultivo son factores predisuestos que estresan al animal y lo hacen más receptivo a patógenos.

Numerosos patógenos de camarón son conocidos y los más importantes que se desarrollan durante la crianza larvaria son bacterias o virus. Los más importantes pertenecen al género *Vibrio*: *V. harveyi*, *V. vulnificus*, *V. damsella* y *V. parahaemolyticus*, que son frecuentemente implicados en el desarrollo de enfermedades en la larva (Le Groumellec *et al.*, 1995), mientras que *V. penaeicida* afecta al camarón solamente cuando alcanza el nivel juvenil (Goarant *et al.*, 1998). El brote de bacterias puede causar importantes mortalidades en granjas de camarón. Esas patologías son a menudo desencadenadas por virus epizooticos. Algunos virus han sido caracterizados en *Penaeus monodon*: virus cabeza amarilla (YHV), síndrome del baculovirus de mancha blanca (WSBV), mientras que el virus de infecciones hipodérmicas y

Le Moullac, G., L. Phillip de Laborie¹, D. Saulnier, C. Goarant, M. Dehasque. 2000. Principios y problemas envueltos en la evaluación de inmunoestimulantes en juveniles de camarón. pp 509-519 En: Civera-Cerecedo, R., Pérez-Estrada, C.J., Ricque-Marie, D. y Cruz-Suárez, L.E. (Eds.) Avances en Nutrición Acuícola IV. Memorias del IV Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. Noviembre 15-18, 1998. La Paz, B.C.S., México.

hematopoyéticas que causan necrosis (IHHN) y el virus que causa el síndrome de Taura (TSV) son patógenos para *P. vannamei* y *P. stylirostris*. La bacteriosis puede ser controlada por el tratamiento con antibióticos, pero su uso representa riesgo ambiental, y la propagación de genes resistentes a éste son un potencial inconveniente. Es conocido que algunos antibióticos como la oxitetraciclina también disminuyen la respuesta inmune en peces (Rijkers *et al.*, 1981). Además, el origen viral de algunos epizooticos limita la eficiencia de tal tratamiento.

Sustancias inmunoestimulantes como alternativa

Como tratamiento alternativo, existen componentes biológicos, 'inmunoestimulantes', jugando el papel de moléculas de alarma que activan el sistema inmune. El sistema inmune de animales responde a un inmunoestimulante como a una agresión microbiana. La mayoría de las moléculas inmunoestimulantes son fragmentos de la pared celular de microorganismos que hacen a los animales más resistentes a infecciones microbianas. Muchos componentes activos son extraídos de paredes celulares bacterianas: fragmentos de péptidos muramil, lipopolisacáridos (LPS), lipopéptidos, aciloligopéptidos y ciertos péptidos. En la pared celular de levaduras y mohos, hay principalmente β -glucanos, moléculas poliglucosas ligadas a través de β -1,3 en una larga cadena y con ramificaciones β -1,6 de glucosa.

El sistema inmune en crustáceos está menos desarrollado que en vertebrados. El camarón es principalmente dependiente de procesos inmunes no específicos para su resistencia a infecciones. Por lo tanto, puede esperarse que los inmunoestimulantes deberían llegar a ser una herramienta importante para reducir las enfermedades de crustáceos en la acuicultura. La defensa en crustáceos está basada en los hemocitos multifuncionales tal como coagulación, fagocitosis, encapsulación y cicatrización de heridas (Johansson & Söderhäll, 1989, Hose & Martin, 1989, Bell and Smith, 1993, Bachère *et al.*, 1995a). La mayoría de esas funciones de defensa son desencadenadas por la presencia de microorganismos vivos o fragmentos de microorganismos muertos en la hemolinfa del camarón. El plasma del camarón contiene factores capaces de reconocer a las bacterias o virus. Son caracterizados dos tipos de proteínas ligantes, la proteína ligante LPS y la β -glucano, así como su receptor sobre el macrófago (Duvic y Söderhäll, 1990, Duvic y Söderhäll, 1992, Vargas-Albores, 1995).

Ciertos tipos de hemocitos han sido asociados con muchas proteínas, por ejemplo la profenoloxidasasa (proPO) sistema implicado en la encapsulación y melanización y funciones como un sistema de reconocimiento de lo no propio (Smith & Söderhäll, 1983, Söderhäll y Cerenius, 1992). Los hemocitos remueven partículas extrañas, ej. Bacterias, de la hemolinfa por fagocitosis (Ratner y Vinson, 1983). Durante la fagocitosis son producidas especies reactivas del oxígeno. Este fenómeno conocido como explosión respiratoria, juega un papel importante en la actividad microbicida (Song y Hsieh, 1994).

En un cultivo fundamental de hemocitos de camarón se ha demostrado que las sustancias inmunoestimulantes inducen rápidamente a la liberación del sistema de profenoloxidasasa. LPS y β -glucano son componentes responsables para esta reacción, los cuales son dosis dependientes; altas concentraciones afectan la afinidad en la proteína y el sistema profenoloxidasasa no sería activado (Lanz *et al.*, 1993). La actividad microbicida de los hemocitos es también conocida como explosión respiratoria. La tinción con Nitro azul de Tetrazolio (NBT) es usada para evaluar esta actividad fagocítica, por la cuantificación de O_2^-

liberado el cual es el primer producto de la explosión respiratoria. La enzima NADPH oxidasa es responsable de la producción de radicales superóxido en los hemocitos (Bachère *et al.*, 1995b). Song Y.L y Hsieh (1994) señalaron *in vitro* la acción de β -glucanos sobre la actividad microbicida de hemocitos en *Penaeus monodon*. Cuando las células son tratadas con β -glucanos, gránulos azules son observados en 41% de los hemocitos. Incrementando la concentración de inmunoestimulantes implica una reacción dependiente de la dosis en los hemocitos.

El uso práctico de inmunoestimulantes

Existen numerosos métodos para valorar la efectividad de los inmunoestimulantes. Un primer paso es medir *in vitro* la actividad de hemocitos para el suceso metabólico asociado con fagocitosis en camarón (Song y Hsieh, 1994) y la activación de la profenoloxidasa (Ashida y Söderhäll, 1983, Smith y Söderhäll, 1983, Lang *et al.*, 1993). Entonces, el proceso de prueba *in vivo* puede ser dirigido. De esta manera es similar para la vacunación, la sobrevivencia es medida después de que el camarón ha sido puesto a prueba con un patógeno. El éxito de una vacuna con bacterias muertas fue obtenido en el cultivo de larvas de peneidos (Itami *et al.* 1991) y juveniles (Itami *et al.* 1989; Teunissen *et al.* 1996). Sin embargo, la vacunación por inyección no es una relevante opción porque es impracticable inyectar al camarón uno por uno. Se realizó una prueba de inmersión del camarón en una solución de inmunoestimulantes con postlarvas de *P. monodon* (Sung *et al.*, 1994). La entrega oral parece ser el método más atractivo para la estimulación inmune. Los inmunoestimulantes son incorporados dentro del alimento a muy bajos niveles entre 0,1 y 1%. Es obvio que un resultado experimental no es suficiente para concluir sobre la eficiencia de una sustancia inmunoestimulante. Esos resultados tienen que ser evaluados *in situ* en un área epidémica con especial atención a la interacción con condiciones ambientales.

Inyección

La inyección es el método más efectivo, y la mayor parte de los experimentos realizados con este método tienen éxito en aumentar los mecanismos de defensa y resistencia del camarón. Un cultivo de *Penaeus japonicus* fue experimentalmente "vacunado" con *Vibrio sp* inactivado con formalina (Itami *et al.*, 1989). El camarón llegó a ser más resistente a la vibriosis 30 días después. Goarant y Boglio (*in prep*) probaron la infección del camarón *P. stylirostris* con 100 ml de un cultivo de *Vibrio penaeicida* inactivado con formalina y preparado de acuerdo a Itami *et al.* (1989). Una significativa caída en el conteo total de hemocitos (THC) fue observado en todos los animales inyectados 2 días después de la inyección y después del día 6 al 13. El grupo de la "Vacuna" tuvo un conteo total de hemocitos significativamente más alto cuando se comparó al "control inyectado".

Inmersión

La inmersión es el método preferido en el tratamiento de grandes grupos de postlarvas para incrementar la su antes del abastecimiento; sin embargo, la mayoría de los estudios han sido hechos en camarón adulto. Itami *et al.* (1989) obtuvieron con el camarón *P. japonicus* más resistencia a la infección de *Vibrio* después de que éste fue tratado con *Vibrio sp* inactivado con formalina. El camarón, bañado en una solución vacuna aereada al 1% por 1 hora, fue más resistente 30 días después. Sung *et al.* (1994) trataron postlarvas de *P. monodon* por

inmersión. Usando Macrogard® β -glucano (pared celular de *Saccharomyces cerevisiae*), mostraron que a la concentración de 0,5 y 1 mg/ml, el camarón llega a ser más resistente a la infección experimental por *Vibrio vulnificus* 18 días más tarde. Las pruebas han sido hechas con adultos de *P. monodon* de 30-40 g. El camarón fue inmerso 3 horas en una suspensión de β -glucano y fueron guardados en tanques con agua aerada (Sung *et al*, 1994). En adultos de camarón, la resistencia es consecuencia de la inducción de la actividad fenoloxidasa y fagocitosis expresado como actividad microbicida en hemocitos (Sung *et al*, 1996).

Repartición oral

Pocos experimentos han sido desarrollados según este tratamiento para camarón. Song y Sung (1990) incorporaron bacterina de *Vibrio vulnificus* al 0.1 % dentro de alimento artificial para camarones PL30 por 60 días. Este tratamiento mejoró el crecimiento y la resistencia a enfermedades. Goarant y Boglio (en prep.) prepararon bacterina de *Vibrio penaeicida* inactivado con formalina y lo incorporaron a la dieta en la cantidad de 10^{11} unidades formadoras de colonias por kg de alimento para alimentar al camarón por 3 semanas. Los efectos del tratamiento fueron evaluados sobre el hemograma y no se obtuvieron efectos significativos. Takahashi *et al.* (1995) incrementaron la actividad fagocítica de los hemocitos y su resistencia contra la infección bacteriana con la ayuda de inmunopotenciadores, como el β -1,3-glucano y péptidoglucano, incorporados en el alimento.

Liao *et al* (1996) probó los β -glucanos del hongo *Schizophyllum* incorporado en una dieta de *P. monodon* de 15-20 g. Ellos mostraron que el β -1,3-glucano mejoró significativamente la resistencia de *P. monodon* contra la infección de *V. damsela*. Por otra parte, la resistencia a enfermedades no específicas inducida por extracto de pared celular de levaduras, β -1,3-1,6-glucano se demostró en el camarón tigre (Song *et al.* 1997). En este estudio β -1,3-1,6-glucano fue administrado al camarón por inmersión antes del cultivo y oralmente durante el período de cultivo. La prueba del tratamiento del camarón con los patógenos virulentos, *V. vulnificus* y agentes virales extraídos de víctimas del síndrome de mancha blanca, produjeron resultados prometedores. La tolerancia al estrés del camarón tratado con β -glucano, fue ligeramente mejor, incluyendo captura, transporte y amonio. Las tasas de crecimiento y sobrevivencia de camarones tratados y no tratados no fueron significativamente diferentes.

Prueba de una sustancia administrada oralmente: ejemplo de dos años de experiencia

En los últimos dos años, algunas sustancias inmunoestimulantes provistas por TECNOLOGIAS INVE NV (Bélgica) han sido probadas experimentalmente en nuestro laboratorio. De 5 sustancias probadas, las más prometedoras fueron probadas experimentalmente 6 veces sucesivamente *in situ* en Nueva Caledonia. En este lugar las mortalidades se presentan en la temporada fría debido a la combinación de infección bacteriana por *Vibrio penaeicida* y el descenso de temperatura. La sustancia probada es una mezcla de hidrolizados marinos, productos de levaduras y β -glucanos. Esto es posteriormente llamado 'sustancia G' y fue incorporada al 1% en el alimento. Los efectos de esta sustancia fueron evaluados sobre la respuesta inmune y la resistencia a la bacteria patógena aislada en Nueva Caledonia, *V. penaeicida*.

Diseño experimental

El experimento realizado en Tahití se llevó a cabo 6 veces, de Septiembre 1996 a Noviembre 1997. El camarón fue distribuido en siete tanques de 0.6 m³, a una densidad de 40 organismos por tanque, la variación de la temperatura del agua de mar fue de 24 a 27 °C y la salinidad fue constante a 37 ppt. Cuatro tanques fueron usados para probar los inmunoestimulantes y 3 para el control. El camarón fue alimentado con los inmunoestimulantes por 3 semanas. Los parámetros inmunes fueron evaluados en 5 camarones en la intermuda por tanque (20 camarones tratados y 15 camarones control). La hemolinfa fue retirada desde el seno ventral dentro de una jeringa y mezclada con un volumen igual de solución Alsever. El conteo total de hemocitos (THC) fue interpretado en un hematocitómetro usando un microscopio de contraste de fases. La actividad de la explosión respiratoria de hemocitos fue cuantificado usando la reducción del NBT a formazán como una medida de la producción de aniones superóxido como lo describió Song y Hsieh (1994). La actividad fenoloxidasa de hemocitos fue medida espectrofotométricamente por el registro de la formación de dopacromo de L-dihydrofenilalanina (L-DOPA) (Le Moullac *et al.*, 1997). La resistencia a la infección experimental fue evaluada con 30 camarones de cada tanque. El camarón fue infectado por inmersión en una suspensión de *Vibrio penaeicida* con una concentración de 5.10⁴ unidades formadoras de colonias.ml⁻¹, durante 2 h y después puestos en tanques. La tasa de mortalidad fue registrada durante los siguientes 4 días.

Funcionamiento zootécnico

En nuestras condiciones experimentales, esas sustancias no cambiaron el funcionamiento zootécnico y alimenticio. Después de 3 semanas, el crecimiento del camarón tratado fue similar al crecimiento del camarón control. Estos empezaron con un peso promedio de ± 11-12 g y se incrementó a 0.7 g por semana en el camarón tratado y 0.8 g por semana en el camarón control. La supervivencia siempre estuvo alrededor del 90% durante estos experimentos, el peor resultado fue del 80% en junio de 1997 para ambos tratamientos.

Respuesta inmune

La respuesta inmune del camarón varió mucho como se muestra en la Figura 1, pero no de acuerdo al mismo patrón. Se registró una disminución significativa en el número de hemocitos en julio de 1997 ($p < 0.0001$), y en una menor magnitud en octubre de 1997. Por otro lado, el aumento de actividad fenoloxidasa en ambos tratamientos fue muy alta en julio de 1997. La variación de actividad fenoloxidasa fue significativa ($p < 0.0001$) entre la serie. Este cambio fue seguido por la disminución de THC en el mismo período y fue ciertamente debido a una infección ligera o a un factor de estrés como causas desconocidas.

A pesar de un fuerte efecto de serie, las dos maneras que ANOVA mostró un efecto significativo y positivo del inmunoestimulante en el número de hematocitos en el camarón tratado ($p=0.013$); este efecto se repitió tres veces entre los seis ensayos. Este aumento de la circulación de hemocitos fue el resultado del aumento de todos los tipos celulares. Ningún efecto del inmunoestimulante en la actividad fenoloxidasa fue registrado. La explosión respiratoria en hemocitos no se evaluó en los primeros dos ensayos, pero en los cuatro últimos este parámetro fue significativamente más alto en octubre de 1997 ($p < 0.0001$) para ambos tratamientos comparados a la otra serie. Ningún efecto debido al inmunoestimulante se descubrió en la actividad de la explosión respiratoria en hemocitos.

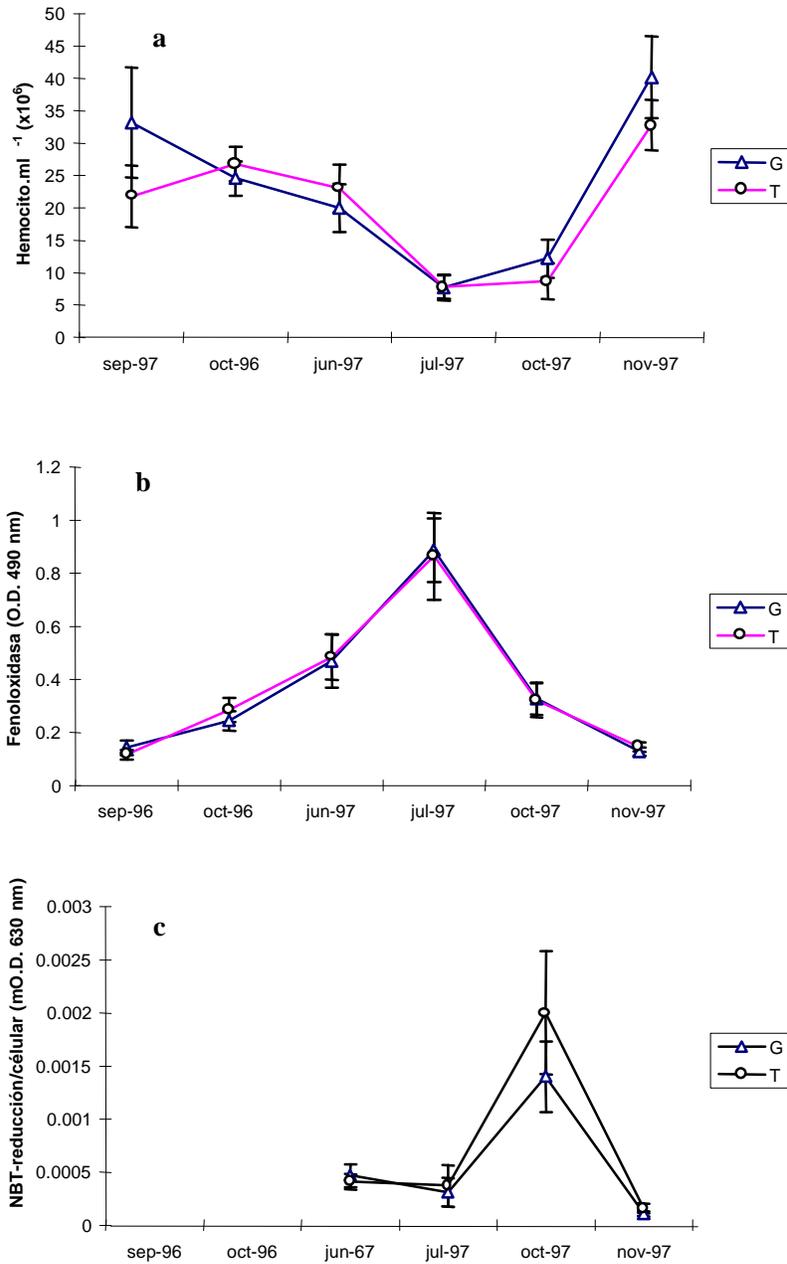


Figura 1. Efecto del inmunoestimulante G suministrado oralmente en THC (a), actividad de la fenoloxidasas (b) y NBT-reducción (c) las variaciones en intermuda del camarón según la serie experimental. n = 20, G = el inmunoestimulante, T = control.

Infección experimental

Los resultados de la infección experimental mostraron una gran diferencia entre las diferentes series pero no un efecto significativo de la sustancia inmunoestimulante para la protección del camarón contra la bacteria *Vibrio penaeicida*. El promedio de sobrevivencia fue del 63 % para el camarón tratado y 58 % para el camarón control. La diferencia entre las series puede ser explicado por el hecho que la infección experimental no puede ser perfectamente controlada. La tasa de sobrevivencia a la infección en Octubre de 1996 y Julio de 1997 también fue alta, probablemente debido a la baja concentración de bacterias durante la infección.

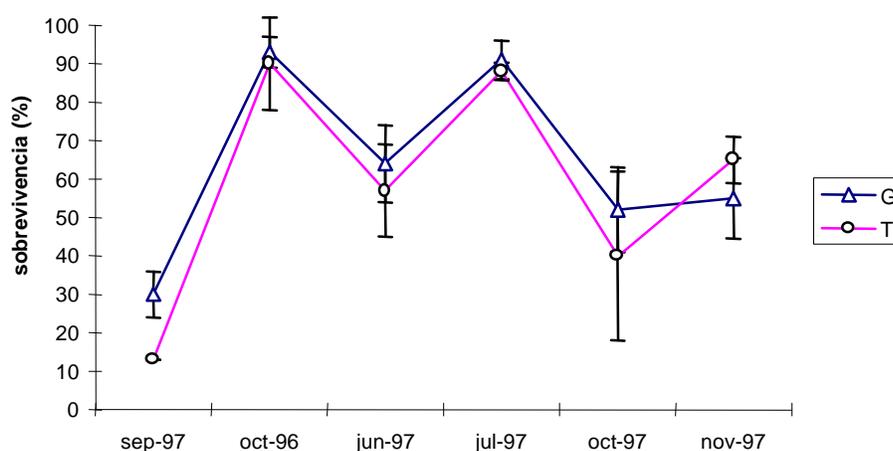


Figura 2: Efecto del inmunoestimulante G suministrado oralmente en resistencia a infección experimental. nG = 120, nT = 90. G = el inmunoestimulante, T = control.

Aplicación *in situ* en Nueva Caledonia

Los resultados obtenidos a escala experimental tienen que ser validados en el área de la producción. En Nueva Caledonia, hay dos estaciones distintas, la estación caliente y la fría. Los problemas principales ocurren en la estación fría, donde ocurre el descenso de temperatura del agua de mar y los problemas patológicos aparecen simultáneamente. Se han dirigido experimentos durante estas dos estaciones para mostrar el efecto de un inmunoestimulante en parámetros hematológicos y en resistencia al estrés con o sin la incidencia de vibriosis estacional. El camarón se puso en tanques de concreto al aire libre con recambio del agua de mar y aereación. En la estación caliente, un experimento se hizo (diciembre de 1996) y se realizaron 4 experimentos durante la estación fría en 1997 de agosto-septiembre. La duración de cada experimento fue de 15 y 20 días. De nuevo los mismos parámetros eran determinados al final de cada período.

La Figura 3 muestra que el THC en el camarón fue significativamente bajo ($p < 0.0001$) en la estación caliente comparada a la estación fría. En la estación caliente, el promedio de THC en el camarón control era de 16.6×10^6 células.mL⁻¹ mientras en la estación fría el promedio de THC fue de 27.2×10^6 células.mL⁻¹.

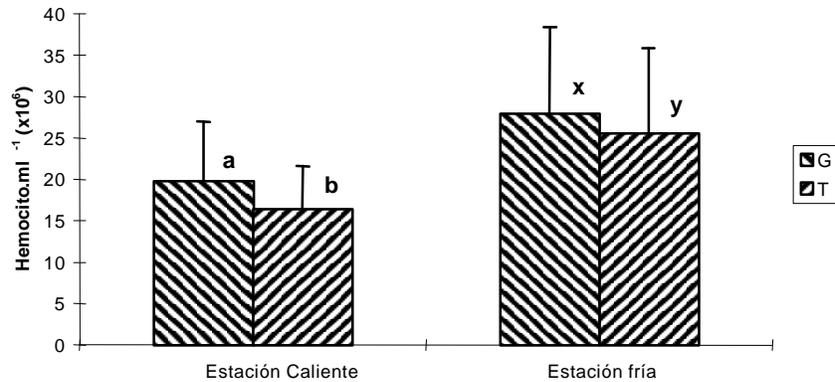


Figura 3: Conteo total de hemocitos en el camarón tratado con inmuoestimulantes en la estación caliente y fría en Nueva Caledonia, en la estación caliente nG=40, nT=40, en la estación fría nG=92, nT=94. G = el inmuoestimulante, T = el control

El conteo total de hemocitos en el camarón tratado fue significativamente más alto ($p < 0.05$) que en el camarón control en cada estación. La ganancia fue de 8.6% en la estación fría y 17% en la estación caliente. El aumento del número de hemocitos fue debido al aumento de cada tipo celular.

El estado inmune del camarón en estación fría fue asombroso porque que se sabe bien que el camarón estresado a baja temperatura sufre una disminución del número de hemocitos que hace a los animales más susceptibles a la infección. De hecho al principio del experimento en la estación fría, el número de hemocitos estaba abajo de 18×10^6 células.mL⁻¹. El aumento del promedio del número de hemocitos fue probablemente debido a un tipo de estímulo en el camarón sobreviviente debido a la incidencia de vibriosis estacional y a la mortalidad del camarón débil. La supervivencia durante estos experimentos en estación fría sólo estaba alrededor de 35%, no habiendo ninguna diferencia en cualquier tratamiento. En la estación caliente, no había infección debido a *V. penaeicida*, y por lo tanto ninguna mortalidad.

Discusión

La inmuoestimulación intramuscular es el más eficiente en términos de defensa y aumenta la resistencia (Itami *et al*, 1989). Sin embargo, los mecanismos de defensa son aumentados por un corto período, dos días después de la inyección (Goarant y Boglio, en prep). La inmersión en una solución inmuoestimulante (LPS el o β -glucano) es también eficiente (Sung *et al*, 1994). La explosión respiratoria y la actividad de la fenoloxidasa son mejorados (Sung *et al*, 1996) probablemente debido a un aumento del número de hemocitos, pero eso no ha sido medido. Sin embargo, esas dos maneras de inmuoestimulación son inútiles a escala de producción para el camarón juvenil, ya que parece difícil de imaginar el manejo de uno por uno de los camarones para inyectarle inmuoestimulantes. La inmuoestimulación por inmersión sólo puede ser útil para la postlarva para reforzar su estado inmune antes del abastecimiento.

La inmuoestimulación oral es el mejor método aplicable para el cultivo del camarón. El aditivo puede ser fácilmente incorporado en el alimento. Esta forma de tratamiento no tiene ninguna implicación en prácticas industriales de crianza, pero la efectividad aún no se conoce

bien. En una escala experimental, las sustancias del inmunoestimulante refuerzan la defensa del camarón. El número de hemocitos se incrementa significativamente con β -glucano como aditivo del inmunoestimulante (nuestros datos), la actividad fagocítica aumenta con β -glucano y péptidoglucano (Takahashi *et al.*, 1995). Por administración oral, hay una discusión sobre el nivel de incorporación, el cual se recomienda de 0.1 a 1%, pero los efectos en la respuesta inmune y a veces en resistencia fueron obtenidos. La sustancia G proporcionada por TECNOLOGÍAS INVE NV se probó al 1%, como una mezcla de diferentes compuestos activos, de los cuales algunos son menos puros. Macrogard está incorporado en el nivel de 0.1% (Raa, 1996). El experimento realizado con bacterina, preparado de *V. vulnificus*, mostró un efecto cuando se incorporó al 0.1% (Song y Sung, 1990).

La mayoría de estos trabajos muestran que la respuesta inmune del camarón se refuerza con inmunoestimulantes de levadura o de origen bacteriano cualquiera que sea el método de administración. Sin embargo, la ganancia no es constante y no-reproducible. A veces el número de hemocitos aumenta 70% en *P. stylirostris* estimulado con inyección de bacterias inactivadas, pero a menudo en otros casos, la ganancia es débil. Con los inmunoestimulantes G probados en Tahití se observó una mejoría significativa del número de hemocitos en algunas series experimentales (entre 22% y 50%). Esta misma sustancia probada en Nueva Caledonia permitió la obtención de un aumento del número de hemocitos de 16% en la estación caliente, pero sólo de 8% en la estación fría comparada con el control. Sin embargo, este estímulo fue ineficaz contra la infección de *Vibrio* (ninguna sobrevivencia más alta fue obtenida).

La relación de inmunidad-resistencia esta basada en el número de hemocitos circulantes en la hemolinfa (Le Moullac *et al.*, 1998). El camarón con un alto número de hemocitos resiste mejor a la infección que el camarón con un número de hemocitos bajo. Es obvio que la aplicación de este resultado involucra la valoración de efectos del inmunoestimulante. Cuando se observa un ascenso en el conteo total de hemocitos, es debido a este tipo de aditivo, uno puede asumir que la resistencia del camarón es mejorada. El problema de valoración de resistencia a vibriosis basado en infección experimental esta imperfectamente controlado. Aunque el LD 50 es conocido, el éxito de infección es basado en una buena estimación *a priori* del crecimiento bacteriano para usar la cantidad apropiada para infectar al camarón. Además, la patogenicidad de *V. penaeicida* disminuye con el envejecimiento en el medio sintético, lo que significa que la cepa bacteriana tiene que ser almacenada en congelación a -80°C para conservar su virulencia.

La duración de la "eficiencia de la vacunación" observado por Itami *et al.* (1992) es de al menos 50 días después de haber bañando en una solución al 1% de la vacuna durante cinco horas. La aplicación de la "vacuna" por inyección e inmersión, reducen la mortalidad de los langostinos cuando fueron cambiados a una inyección de *Vibrio* 30 días después (Itami *et al.*, 1989). Se observó el efecto protector del tratamiento del glucano por inmersión en términos de resistencia hasta el día 18 siguiendo la inmersión (Sung *et al.*, 1994). Según Sung *et al.* (1991), una sola inmersión de postlarva en solución del bacterina es suficiente para proteger el camarón durante 83 días permitiendo un crecimiento mejor que el camarón control. En este caso, sería sorprendente que la defensa se estimulara durante todo este tiempo. Nosotros podemos suponer que la defensa se refuerza para el período durante el cual las postlarvas son normalmente sensibles, y la ganancia obtenida durante este período se registra al final de la crianza. La administración oral diaria de bacterina durante 86 días mostró el mejoramiento del crecimiento del camarón durante este período (Song y Sung, 1990).

Como conclusión, está claramente demostrado que es muy difícil evaluar la efectividad de los inmunoestimulantes. Aunque ellos tienen efectos positivos significativos en algunos parámetros *in vitro*, no siempre es posible correlacionar esto con una supervivencia más alta en pruebas. Hay necesidad de una alternativa, reproducible en métodos de valoración *in vivo* que pueda confirmar los resultados *in vitro*.

Referencias:

- Anderson D.P.** 1992. Immunostimulants, adjuvants, and vaccine carriers in fish : applications to aquaculture. *Annual Rev. Fish Dis.* 2, 281-307.
- Ashida M. and K. Söderhäll,** 1983. The prophenoloxidase activating system in crayfish. *Comp. Biochem. Physiol.*, 77B, 21-26.
- Bachère, E., E. Miahle, T. Noël, V. Boulo, A. Morvan and J. Rodriguez,** 1995a. Knowledge and research prospects in marine mollusc and crustacean immunology. *Aquaculture*, 132,17-32.
- Bachère E., E. Mialhe and J. Rodriguez,** 1995b. Identification of defence effectors in the haemolymph of Crustaceans with particular reference to the shrimp *Penaeus japonicus* (Bate) : prospects and applications. *Fish and Shellfish Immunology*, 5, 597-612.
- Bell K.L. and V.J. Smith,** 1993. *In vitro* superoxyde production by hyaline cells of the shore crab *Carcinus maenas* (L.). *Dev.Comp. Immunol.*, 17 : 211-219.
- Duvic B. and K. Söderhäll,** 1990. Purification and characterization of a b-1.3-glucan binding protein from plasma of the crayfish *Pacifastacus leniusculus*. *J. Biol. Chem.*,265, 9327-9332..
- Duvic B. and K. Söderhäll,** 1992. Purification and partial characterization of a b-1.3-glucan-binding-protein membrane receptor from blood cells of the crayfish *Pacifastacus leniusculus*. *Eur. J. Biochem*, 207, 223-228.
- Goarant C., F. Régnier, R. Brizard and A.L. Marteau,** 1998. Acquisition of susceptibility to *Vibrio penaeicida* in *Penaeus stylirostris* postlarvae and juvenile. Submitted
- Goarant C. and E. Boglio.** Haemocyte counts change in shrimp *Litopenaeis stylirostris* submitted to sublethal infection and vaccination trials (Submitted)
- Hose J.E., et Martin G.G.,** 1989. Defense functions of granulocytes in the ridgback prawn *Sicyonia ingentis*. *J. Inverteb. Pathol.*, 53 : 335-346.
- Itami T., Takahashi Y. and Nakamura Y.,** 1989. Efficacy of vaccination against vibriosis in cultured Kuruma prawns *Penaeus japonicus*. *J. aquatic Animal Health*, 1 : 238-242.
- Itami T., Y. Tarahashi, K. Yoneoka and Y. Yan,** 1991. Survival of larval giant tiger prawns *Penaeus monodon* after addition of killed vibrio cells to a microencapsulated diet. *J. Aquat. Anim. Health*, 3, 151-152.
- Johanson M.W. and K. Söderhäll** 1989. Cellular immunity in crustaceans and the proPOsystem. *Parasitology Today*, 5 : 171-176.
- Lanz H., S. Hernandez, E. Garrido-Guerrero, V. Tutsumi and H. Aréchiga,** 1993. Prophenoloxidase system activation in the crayfish *Procambarus clarki*. *Dev. Comp. Immunol.*, 17, 399-406.
- Le Groumellec, P. Haffner, B. Martin and C. Martin** 1995. Comparative study of bacterial infections responsible for mass mortality in penaeid hatcheries of the Pacific coast zone. *In Diseases in Asian Aquaculture II.* M. Shariff, J.R. Arthur and R.P. Subasinghe (eds), p 163-173 Fish Health Section, ASIAN Fisheries Society, Manila.
- Le Moullac G., M. Le Groumellec, D. Ansquer, S. Froissard, P. Levy and Aquacop,** 1997. Haematological and phenoloxydase activity changes in the shrimp *Penaeus stylirostris* in relation with the moult cycle : protection against vibriosis. *Fish and shellfish Immunology* 7, 227-234.
- Le Moullac G., D. Saulnier, J. Rodriguez, E. Bachère, M. Barracco, J. Cuellar-Anjel, P. Jiravanichpaisal,** 1998. Establishment of health criteria in reared penaeid shrimp and analysis of immune parameters under stress conditions. *Workshop "Shrimp immunity and disease control, INCO-DC, November 8-11, 1998, Chiang Mai, Thai land.*
- Liao IC., M.S. Su, C.F. Chang, B.Y. Her and T. Kojima,** 1996. Enhancement of the resistance of grass prawn *Penaeus monodon* against *Vibrio damsella* infection by b-1,3 glucan. *J. Fish. Soc. Taiwan*, 23, 109-116.

- Raa J.** (1996) The use of immunostimulatory substances in fish and shellfish farming. *Fisheries Sciences*, 4(3)
- Ratner S. and S. B. Vinson**, 1983. Phagocytosis and encapsulation : cellular immune responses in arthropoda. *American Zoology*, 23, 185-194.
- Smith V.J. and Söderhäll K.** 1983. Induction of degranulation and lysis of haemocytes in the freshwater crayfish *Astacus astacus* by components of the prophenoloxdase activating system *in vitro*. *Cell and Tissue Research* 233 : 295-303.
- Söderhäll K. and L. Cerenius**, 1992. Crustacean immunity. *Annual Rev. Fish Diseases*, 3-23.
- Song Y.L. and H.H. Sung**, 1990. Enhancement of growth in tiger shrimp (*Penaeus monodon*) by bacterin prepared from *Vibrio Vulnificus*. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.* 10, 98.
- Song Y.L. et Hsieh Y.T.**, 1994. Immunostimulation of tiger shrimp (*Penaeus monodon*) hemocytes for generation of microbicidal substances : analysis of reactive oxygen species. *Dev. Comp. Immunol.*, 18 (3) : 201-209.
- Song Y.L., J.J. Liu, L.C. Chan and H.H. Sung**, 1997. Glucan-induced disease resistance in tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Dev. Biol. Stand.* 90, 413-421.
- Sung H.H., Y.L. Song and G.H. Kou**, 1991. Potential use of bacterin to prevent shrimp vibriosis. *Fish and Shellfish Immunol.* 1, 311-312.
- Sung H.H. , G.H Kou. and Y.L Song.** 1994. Vibriosis resistance induced by glucan treatment in tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Fish Pathol.* 29(1):11-17.
- Sung H.H. ,Y.L. Yang and Y.L Song**, 1996. Enhancement of microbicidal activity in the tiger shrimp *Penaeus monodon* via immunostimulation. *J. Crust. Biol.*, 16, 278-284.
- Rijkers G.T., R. van Oosterom and van Muiswinkel**, 1981. The immune system of cyprinid fish. Oxytetracycline and the regulation of humoral immunity in carp (*Cyprinus carpio*). *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2, 281-290.
- Takahashi Y., T. Itami, A. Nakagawa, H. Nishimaru and T. Abe.** 1985. Therapeutic effects of oxytetracycline trial tablets against vibriosis in cultured kuruma prawns *Penaeus japonicus* Bate. *Bull. of Jap. Soc. Sci. Fish.* 51(10):1639-1643.
- Teunissen OSP, Boon JH, Latscha T, Faber R.** 1996. Effect of vaccination on vibriosis resistance in the giant black tiger shrimp *Penaeus monodon*. Book of abstracts, second international conference on the culture of Penaeid prawns and shrimps.; 1996 May 14-1996 May 17; Sarabia Manor Hotel, Iloilo, Philippines. pp. 51: SEAFDEC.
- Vargas-Albores F.**, 1995. The defense system of brown shrimp (*Penaeus californiensis*) : Humoral recognition and cellular responses. *J. Mar. Biotech.*,