

DETEKSI *WHITE SPOT SYNDROME VIRUS* (WSSV) PADA UDANG WINDU (*Penaeus monodon*) DI BALI DAN JAWA TIMUR MENGGUNAKAN METODE *POLYMERASE CHAIN REACTION* (PCR)

Ketut Mahardika¹⁾, Zafran²⁾, dan Isti Koesharyani³⁾

ABSTRAK

White spot syndrome (WSS) telah ditemukan pada banyak spesies udang dan kepiting, tidak saja di Asia tetapi hampir di seluruh dunia. WSS disebabkan oleh dsDNA virus yang memiliki amplop, nukleokapsid, dan berbentuk batang. Mortalitas yang ditimbulkannya mencapai 80% selama 2—7 hari setelah kejadian awal. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui jasad penyebab kematian massal pada budi daya udang windu di panti benih maupun tambak yang dideteksi menggunakan metode PCR dengan spesifik primer. Selama tahun 1999—2001, telah dianalisis sampel udang stadia post-larva (dari hatcheri) dan udang dewasa (dari tambak) yang berasal dari Jawa Timur (Situbondo dan Banyuwangi) dan Bali (Jembrana dan Singaraja) di mana kematian massal terjadi. Organ yang diambil adalah seluruh tubuh untuk post-larva sebanyak 50—100 ekor dan karapas, perut, serta kaki renang sebanyak 3—5 ekor untuk induk dan 5—10 ekor yuwana udang. Hasil analisis menunjukkan bahwa semua sampel yang diuji positif terinfeksi virus WSS.

ABSTRACT: *Detection of White Spot Syndrome Virus (WSSV) in Penaeus monodon reared in hatchery and ponds in Bali and East Java using Polymerase Chain Reaction (PCR) technique. By: Ketut Mahardika, Zafran, and Isti Koesharyani*

White spot syndrome (WSS) has been found in many species of shrimp and crabs, not just in Asia but also globally. WSS caused by dsDNA virus, which consists of an enveloped, rod-shaped nucleocapsid. The mortality typically reaches 80% within 2 to 7 days after the onset of the disease. The aim of this study was to know the agent caused mass mortalities of the black tiger shrimp (P. monodon) in hatchery and grow-out pond, detected using PCR method with specific primers. During 1999 to 2001, samples of post-larvae (from hatchery) and adult (from grow-out ponds) located in East Java (Situbondo and Banyuwangi) and Bali (Jembrana and Singaraja) with WSS were analyzed with PCR. Whole body of 50—100 post-larvae and carapace, stomach and swimming legs of 3—5 adults and 5—10 juveniles shrimp were used for analysis. The result showed that all samples were positively infected by WSSV.

KEYWORDS: *Penaeus monodon, WSSV, PCR*

PENDAHULUAN

White spot syndrome virus pertama kali diidentifikasi di daerah Taiwan pada tahun 1992 yang menyebabkan kematian massal pada udang budi daya terutama udang windu (*P. monodon*), udang kuruma (*P. japonicus*), udang ekor kuning (*P. penicillatus*), dan udang greasyback (*Metapenaeus ensis*) (Kasornchandra & Boonyaratpalin, 1996; Wang *et al.*, 1997; Kasornchandra *et al.*, 1998; Peng *et al.*, 1998). Penyebaran virus ini sangat luas di antaranya adalah Jepang, Thailand, Cina, Malaysia, India, dan Indonesia (Kasornchandra *et al.*, 1998). Nomenklatur virus ini sangat beragam, di Jepang virus yang menyerang *P. japonicus* disebut sebagai *Rod-shaped nuclear virus of Penaeus japonicus* atau RV-PJ (Inouye *et al.*,

1994) atau *Penaeid Rod-shaped DNA virus* (PRDV) (Kimura *et al.*, 1996) juga disebut *Penaeid acute viroemia* (PAV) (Inouye *et al.*, 1996). Di Thailand dikenal sebagai SEMBV atau *Systemic Ectodermal Baculovirus* (Wongteerasupaya *et al.*, 1995 dalam Maeda *et al.*, 1998) atau *White Spot Syndrome Virus* (WSSV) (Flegel, 1999). Sedangkan di Taiwan virus ini dikenal sebagai *white spot disease*. Penamaan ini berdasarkan pada tanda spot putih yang tampak pada udang sakit (Wang *et al.*, 1997^b).

Tanda yang umum pada kasus WSSV adalah adanya spot putih pada bagian karapas, tanda ini diketahui pertama kali pada kasus infeksi *white spot* pada udang *P. japonicus* yang terjadi di Jepang pada bulan Oktober 1993 (Mamoyama *et al.*, 1994 dan

¹⁾ Peneliti pada Balai Besar Riset Perikanan Budidaya Laut, Gondol
²⁾ Pusat Riset Perikanan Budidaya

Nakano *et al.*, 1994). Selanjutnya tanda klinis tersebut ditemukan pula pada kasus WSSV pada udang budi daya lainnya (Mamoyama *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 1997^b; Zafran *et al.*, 1998; Peng *et al.*, 1998). Secara morfologi, ukuran, patologi selular, dan asam nukleat, WSSV (PmNoBII-Type) dikelompokkan ke dalam genus *Non-Occcluded Baculovirus*, subfamili *Nudibaculoviridae*, dan famili *Baculoviridae*.

Deteksi dini infeksi WSSV adalah hal yang sangat penting guna menghindari penyebaran virus yang lebih luas. Terdapat beberapa metode untuk mendeteksi virus, yaitu dengan irisan histologi sederhana sampai menggunakan pengamatan dengan elektron mikroskop. Tetapi akhir-akhir ini teknik deteksi virus semakin berkembang dengan menggunakan material protein DNA/RNA yaitu *polymerase chain reaction* (PCR). Metode ini telah diterapkan secara luas baik pada krustase maupun pada ikan, karena tingkat akurasinya cukup tinggi dan cepat. Adapun tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui jasad penyebab kelemahan dan kematian massal pada budi daya udang windu di panti benih maupun di tambak yang dideteksi menggunakan metode PCR dengan spesifik primer.

BAHAN DAN METODE

Sampel Udang

Sampel udang diperoleh dari beberapa lokasi perbenihan dan budi daya udang di panti benih dan tambak. Pada umumnya sampel udang ini merupakan hasil perbenihan maupun budi daya yang dilaksanakan oleh pihak swasta baik di Bali maupun Jawa Timur. Sampel biasanya dibawa dalam keadaan mati atau lemah (dalam kantong plastik dengan oksigen) atau dikirim dengan bahan pengawet (alkohol 70%) untuk dilakukan deteksi virus, karena pada lokasi budi dayanya terjadi kematian. Sampel yang digunakan sebanyak 3—5 ekor induk udang atau 5—10 ekor yuwana udang diekstrak dari karapas, perut (*stomach*), dan kaki renang (*pereiopod*), sedangkan sebanyak 50—100 ekor PL diekstrak menggunakan seluruh badan (*whole body*).

Deteksi WSSV dengan *Polymerase Chain Reaction* (PCR)

Terdapat tiga tahapan utama dalam proses deteksi menggunakan teknik PCR, yaitu ekstraksi asam nukleat, amplifikasi, dan elektroforesis.

Ekstraksi DNA, masing-masing sebanyak 50—100 mg sampel organ ditempatkan dalam mikrotube 1,5 mL selanjutnya dihancurkan atau dihomogenase menggunakan 800—1.000 mL ISOGEN (Kimura *et al.*, 1996) dan disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm

selama 10 menit, pada suhu 4°C. Supernatannya kemudian dipindahkan pada mikrotube baru. Untuk memisahkan antara DNA dan RNA ditambahkan 200 mL Chloroform dan disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 15 menit, pada suhu 4°C. Setelah terjadi pemisahan, bagian atau lapisan yang teratas (RNA) dibuang, kemudian lapisan yang tersisa (DNA) diekstrak dengan 300 mL Ethanol Absolut dan DNA tersebut diendapkan dengan mensentrifugasi pada kecepatan 2.000 rpm selama 5 menit, pada suhu 4°C. DNA tersebut selanjutnya dibilas dengan 1.500 mL Ethanol 75% dan disentrifugasi kembali dengan kecepatan 2.000 rpm selama 5 menit, pada suhu 4°C. Cairan yang ada dibuang dan pelet DNA-nya dikeringkan dalam desikator selama 15—20 menit. Selanjutnya DNA tersebut dilarutkan dengan aquades steril sebanyak 50—200 mL dan siap digunakan untuk proses selanjutnya.

Primer yang digunakan untuk mendeteksi WSSV adalah hasil sekuensing dari *rod-shaped* DNA Virus *P. japonicus* yaitu primer P1 dan P2 dengan target berat molekul 982 bp dengan susunan rantai primer adalah P1: 5'-ATCATGGCTGCTTCACAGAG-3' dan primer P2: 5'-GGCTGGAGAGGACAAGACAT-3'. Sedangkan untuk hasil yang lebih akurat dilakukan dengan dua kali amplifikasi (*nest-step* PCR) menggunakan primer P3 dan P4 dengan target berat molekul 570 bp dengan susunan primer yaitu P3: 5'-TCTTCATCAGATGCTACTGC-3' dan P4: 5'-TAACGCTATCCAGTATCACG-3' (Kimura *et al.*, 1996).

Amplifikasi, dilakukan dengan cara mencampurkan beberapa reagen Kit DNA Takara: MMS-DNA 47,75 mL (5 mL 10 x PCR Buffer, 4 mL 2,5 mM MgCl₂, 4 mL 2,5 mM dNTP mix, dan 34,75 mL aquades), masing-masing primer 0,5 mL; Tag polymerase 0,25 mL; dan 1 mL DNA *template*. Campuran tersebut selanjutnya diinkubasi pada alat Thermal Cycler Takara sebanyak 30 kali dengan suhu denaturasi 93°C selama 60 detik, suhu *annealing* 57°C selama 90 detik, dan suhu polimerasi atau *extension* 72°C selama 60 detik (Kimura *et al.*, 1996).

Analisis hasil amplifikasi dilakukan dengan metode elektroforesis terhadap bahan yang sudah diamplifikasi sebanyak 10 mL yang dicampur dengan 2 mL 6x *loading buffer* (Glycerol & *bromothymol blue*) pada 1,5% agarose gel menggunakan 20x TAE buffer (2 Na EDTA, Tris, dan aquades) dengan kekuatan 100 V, selama 20—25 menit. Marker yang digunakan adalah IHind III (125—23.130). Hasil elektroforesis selanjutnya diwarnai dengan Ethidium Bromide 0,5 mg/mL dalam larutan 20x TAE buffer selama 10—15 menit. Pembacaan hasil dilakukan pada Ultraviolet transluminator dan didokumentasikan dengan kamera polaroid.

HASIL DAN BAHASAN

Sampel-sampel udang dari beberapa lokasi panti benih maupun tambak di Bali dan Jawa Timur pernah diperiksa/dideteksi dengan metode PCR dan menunjukkan hasil positif WSSV baik dengan 1-step maupun 2-step PCR tertera pada Tabel 1.

WSSV dapat menyerang udang windu (*P. monodon*) pada stadia post-larva (PL), calon induk/ukuran konsumsi (*subadult*) dan induk udang (*adult*). Kejadiannya hampir setiap bulan tanpa mengenal musim (panas atau hujan), pada tempat yang berbeda, baik itu di Bali khususnya Kabupaten Jembrana dan Singaraja maupun di Jawa Timur yaitu Kabupaten Situbondo dan Banyuwangi. Virus ini stabil pada suhu dan pH yang ekstrim dan akan bertambah kestabilannya di dalam lingkungan eksternal karena adanya pelekatan virion pada kristal pelindung protein virus (polyhedrin, granulin, spheroidin). Kristal pelindung ini akan melindungi virus agar tidak larut pada pH tinggi di dalam saluran pencernaan udang (Walker *et al.*, 1999).

Pada stadia PL, calon induk dan induk udang yang positif terinfeksi WSSV 1-step PCR dan terlihat dengan menunjukkan gejala nafsu makan menurun, udang tampak lemah, dan seringkali malas berenang serta pada udang yang dipelihara di tambak tampak bergerombol di tepi tambak. Pada udang yang sakit terlihat bercak putih pada karapasnya dan pada induk udang warnanya menjadi merah. Tanda ini sama dengan yang ditemukan Momoyama *et al.* (1997); Lo & Kou (1998); Sudha *et al.* (1998) bahwa udang yang

terinfeksi WSSV akan terjadi perubahan pola tingkah laku yaitu menurunnya aktivitas renang, berenang tidak terarah, dan seringkali berenang pada salah satu sisinya saja. Selain itu, udang cenderung bergerombol di tepi tambak dan berenang ke permukaan. Pada fase akut terdapat bercak-bercak putih pada karapas dengan diameter 0,5—3,0 mm. Bercak putih ini pertama kali muncul pada cephalothorax, segmen ke-5 dan ke-6 dari abdominal dan terakhir menyebar ke seluruh kutikula tubuhnya (Kasornchandra & Boonyaratpalin, 1996; Wang *et al.*, 1997^a; Lo & Kou, 1998). Sedangkan Koesharyani *et al.* (2001) mengatakan bahwa induk udang windu yang berwarna kemerahan termasuk juga insang dan hepatopankreasnya setelah dideteksi dengan metode PCR dari organ stomach, lymphoid, dan kaki renang menunjukkan positif terinfeksi WSSV. Kejadian ini dapat menimbulkan kematian lebih dari 80% selama seminggu.

Virus ini mempunyai virion yang berupa partikel berbentuk batang pendek dengan amplop apikal ukuran 305 ± 30 x 127 ± 11 nm. Di dalam nukleusnya terdapat satu nukleosom yang akan bergabung pada tingkat awal replikasi (Wang *et al.*, 1999). Virus WSSV merusak lambung, insang, sel epitel, subkutikula, organ lymphoid, antennal gland, dan hemocyte. Dari pengamatan histopathologi, terjadi degenerasi sel yaitu pembesaran pada berbagai jaringan meso dan ectodermal seperti pada lapisan kulit, jaringan penghubung, organ lymphoid, kelenjar antennal dan haematopoietik, insang, serta jaringan syaraf (Wang *et al.*, 1997^a).

Tabel 1. *White spot syndrome virus (WSSV) pada beberapa tempat budi daya udang di Bali dan Jawa timur yang dideteksi dengan PCR*

Table 1. *White spot syndrome virus (WSSV) in several shrimp culture in Bali and East Java was detected by PCR*

Tanggal deteksi <i>Detection dates</i>	Jenis udang <i>Shrimp species</i>	Umur <i>Age</i>	Asal <i>Origin</i>	PCR Test	
				1-step	2-step
10/6/1999	<i>P. monodon</i>	Adult	Banyuwangi (<i>hatchery</i>)	-	+
11/5/1999	<i>P. monodon</i>	PL-9	Banyuwangi (<i>hatchery</i>)	-	+
2/11/2000	<i>P. monodon</i>	Adult	Situbondo (<i>hatchery</i>)	-	+
9/11/2000	<i>P. monodon</i>	PL-10	Situbondo (<i>hatchery</i>)	-	+
9/11/2000	<i>P. monodon</i>	Adult	Situbondo (<i>hatchery</i>)	+	+
10/16/2000	<i>P. monodon</i>	Subadult	Jembrana (<i>pond</i>)	+	+
4/26/2001	<i>P. monodon</i>	Subadult	Singaraja (<i>pond</i>)	+	Nt
5/3/2001	<i>P. monodon</i>	Subadult	Singaraja (<i>pond</i>)	+	Nt
5/10/2001	<i>P. monodon</i>	PL-85	Jembrana (<i>pond</i>)	-	+
5/28/2001	<i>P. monodon</i>	PL-80	Singaraja (<i>pond</i>)	+	Nt
6/6/2001	<i>P. monodon</i>	Adult	Banyuwangi (<i>hatchery</i>)	+	+
9/4/2001	<i>P. monodon</i>	PL-33	Singaraja (<i>pond</i>)	+	+

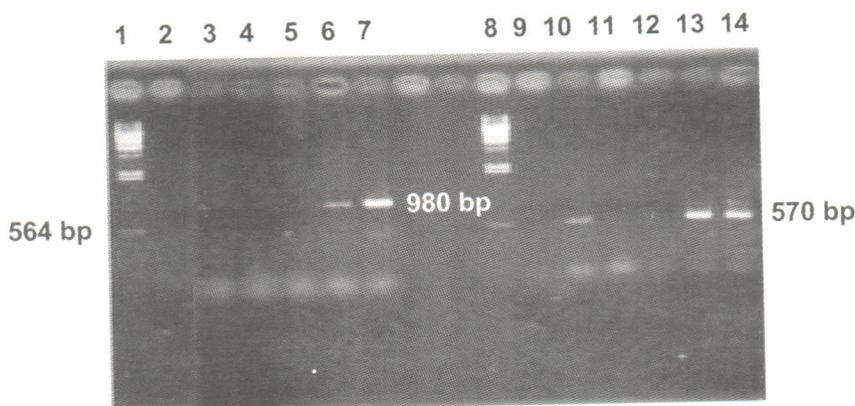
Nt: Tidak dilaksanakan (*not done*)

WSSV pada stadia PL, calon induk dan induk udang windu dengan metode PCR menggunakan ekstrak jaringan dari seluruh tubuh (*whole body*) pada PL dan karapas, lambung (alat pencernaan), serta kaki renang pada calon induk dan induk udang windu dapat terdeteksi dengan baik. Udang windu yang positif terinfeksi WSSV dengan 1-step PCR tampak mempunyai berat molekul 980 bp, sedangkan dengan 2-step PCR mempunyai berat molekul 570 bp (Gambar 1). Berat molekul ini sama dengan berat molekul dari pasangan primer P1/P2 yaitu 980 bp dan P3/P4 yaitu 570 bp (Kimura *et al.*, 1996).

Gambar 1 menunjukkan bahwa induk udang yang positif terinfeksi WSSV yang tampak dengan cara 1-step maupun 2-step PCR dengan mortalitas 80% dalam waktu kurang dari seminggu dinyatakan telah terserang oleh virus WSS pada tahap ganas. Menurut Sudha *et al.* (1998), infeksi WSSV dengan dominasi bintik putih pada karapasnya, tingkat infeksi pada jaringan tinggi, dan menimbulkan kematian dalam waktu 7—10 hari dikategorikan dalam tipe I (*acute* sampai *subacute*). Sedangkan tipe II (*prelacute*) dengan gejala klinis udang menjadi merah dan tingkat infeksi pada jaringan sangat tinggi sudah dapat menyebabkan kematian dalam waktu 2—3 hari. Sedangkan udang windu stadia PL-10 yang mati positif terinfeksi WSSV terlihat dalam 2-step PCR. Sedangkan PL-10 yang masih hidup walaupun dalam satu bak pemeliharaan infeksi WSSV adalah negatif terlihat baik dengan cara 1-step maupun 2-step PCR, demikian pula halnya dengan PL-10 dari bak lain

ternyata WSSV negatif. Udang yang positif terinfeksi WSSV dan hanya terdeteksi dengan 2-step PCR, hanya menunjukkan gejala nafsu makan menurun dan lemah tetapi tidak tampak bercak-bercak putih dan kemerahan pada tubuhnya. Keadaan ini menurut Sudha *et al.* (1998) termasuk dalam kategori tipe III (kronis) di mana infeksi yang dialami oleh jaringan rendah, bercak putih, dan kemerahan pada udang tidak tampak, kematian terjadi lebih lama yaitu 15—28 hari. Kondisi ini merupakan masa *pre-patent* yang hanya terdeteksi dengan 2-step PCR saja karena hasil amplifikasi 2-step PCR menunjukkan 10^3 — 10^4 kali lebih banyak daripada hasil amplifikasi 1-step PCR. Diagnosa 2-step PCR memungkinkan untuk mendeteksi 10—50 kopi target DNA dalam reaksi PCR, sehingga dinyatakan sebagai metode yang paling spesifik dan sensitif untuk mendeteksi PRDV atau WSSV (Lo & Kou, 1998; Maeda *et al.*, 1998; Peng *et al.*, 1998).

Udang yang positif terinfeksi WSSV, walaupun hanya terlihat pada 2-step PCR diusahakan untuk dipisahkan atau dikeluarkan dari kelompok udang yang sehat. Oleh karena itu, jika udang yang positif terinfeksi WSSV melalui deteksi 2-step PCR dalam keadaan stres maka tingkat infeksi *pre-patent* ini akan mengalami masa transisi dalam beberapa jam saja. Di bawah pengaruh stres, virus mereplikasi diri secara berulang-ulang di dalam organ target dan mudah terdeteksi dengan 1-step PCR dan menjadikan udang dalam infeksi *patent*. Selain itu, udang ini dapat menjadi sumber penyebaran virus karena virus WSS



Gambar 1. Gel agarose elektroforesis RT-PCR hasil amplifikasi sampel udang windu *P. monodon*. Baris 1) Marker I Hind III, 2) Negatif kontrol, 3) PL-10 mati, 4) PL-10 hidup, 5) PL-10 sehat dari bak lain, 6) Induk udang, 7) Positif kontrol (1-step PCR), 8) Marker, 9) Negatif kontrol, 10) PL-10 mati, 11) PL-10 hidup, 12) PL-10 sehat dari bak lain, 13) Induk udang, 14) Positif kontrol (2-step PCR)

Figure 1. PCR amplification of WSSV fragment from templates prepared from black tiger shrimp *P. monodon*. Line 1) Marker I Hind III, 2) Negative control, 3) PL-10 was dead, 4) PL-10 live, 5) PL-10 healthy from different tank, 6) Adult, 7) Positive control (1-step PCR), 8) Marker, 9) Negative control, 10) PL-10 was dead, 11) PL-10 live, 12) PL-10 healthy from different tank, 13) Adult, 14) Positive control (2-step PCR)

dapat menyebar secara langsung melalui sekresi yang dilakukan oleh udang yang positif terinfeksi WSSV. Sel udang yang terinfeksi WSSV akan mengalami lisis dan kemudian diekskresikan oleh *antennal gland* sehingga virus terlepas bebas ke dalam air melalui saluran pengeluaran (Peng *et al.*, 1998).

KESIMPULAN

Dari hasil deteksi *White Spot Syndrome Virus* (WSSV) dengan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) secara 1-step dan 2-step terhadap sampel udang windu (*P. monodon*) dari Jawa Timur (Situbondo dan Banyuwangi) dan Bali (Jembrana dan Singaraja) dari akhir tahun 1999 sampai 2001 dapat disimpulkan bahwa:

- ❖ WSSV merupakan jasad penginfeksi pada udang windu stadia post-larva (PL) sampai stadia induk, baik yang dibudidayakan di panti benih (hatcheri) maupun di tambak (*grow-out pond*).
- ❖ Dari hasil monitoring WSSV dengan metode PCR dari akhir tahun 1999—2001, diketahui bahwa infeksi WSSV pada udang windu di Jawa Timur (Situbondo dan Banyuwangi) dan Bali (Jembrana dan Singaraja) terjadi hampir setiap bulan.

DAFTAR PUSTAKA

- Flegel, T.W. 1999. Molecular diagnostic for shrimp viruses in the Asian Region: an overview of prawn viral disease work in Thailand: *PCR for Shrimp Disease Diagnosis 10—13th February 1999*, Mahidol University, Salaya Campus, Thailand, L3-1 – L3-11.
- Inouye, K., S. Miwa, N. Oseko, H. Nakano, T. Kimura, K. Momoyama, and M. Hiraoka. 1994. Mass mortalities of cultured kuruma shrimp *Penaeus japonicus* in Japan in 1993: Electron microscopic evidence of the causative virus. *Fish Pathology*, 29(2): 149—158.
- Inouye, K., K. Yamano, N. Ikeda, T. Kimura, H. Nakano, K. Mamoyama, J. Kobayashi, and S. Miyajima. 1996. The Penaeid Rod-Shaped DNA Virus (PRDV), which causes Penaeid Acute Viremia (PAV). *Fish Pathology*, 31(1): 39—45, 3.
- Kasornchandra, J. and S. Boonyaratpalin. 1996. Red disease with white patches or White Spot Disease in cultured penaeid shrimp in Asia. *Asian Shrimp News*, 3rd Quarter 1996. Thailand, 273 (3): 4 pp.
- Kasornchandra, J., S. Boonyaratpalin, and T. Itami. 1998. Detection of white-spot syndrome in cultured penaeid in Asia. Microscopic observation and polymerase chain reaction. *Aquaculture*, 164: 243—251.
- Kimura, T., K. Yamano, H. Nakano, K. Momoyama, M. Hiraoka, and K. Inouye. 1996. Detection of Penaeid Rod-Shaped DNA Virus (PRDV) by PCR. *Fish Pathology*, 31 (2): 6, 93—98.
- Koesharyani, I., D. Roza, K. Mahardika, F. Johnny, Zafran, and K. Yuasa. 2001. *Manual for Fish Disease Diagnosis-II*. Research Institute for Mariculture, Central Research Institute for Fisheries and Japan International Cooperation Agency, 48 pp.
- Lo, C.F. and G.H. Kou. 1998. Virus-associated White Spot Syndrome of shrimp in Taiwan: A Review. *Fish Pathology*. 33(4): 10, 365—371.
- Maeda, M., T. Itami, A. Furumoto, O. Hennig, T. Imamura, M. Kondo, I. Hirono, T. Aoki, and Y. Takahashi. 1998. Detection of Penaeid Rod-Shaped DNA Virus (PRDV) in wild-caught shrimp and other crustacean. *Fish Pathology*, 33 (4): 10, 373—380.
- Momoyama, K., M. Hiraoka, K. Inouye, T. Kimura, H. Nakano, and M. Yasui. 1997. Mass mortalities in the production of juvenile greasy-back shrimp, *Metapenaeus ensis*, caused by Penaeid Acute Viremia (PAV). *Fish Pathology*, 32 (1): 3, 51—58.
- Nakano, H., H. Koube, S. Umezawa, K. Momoyama, M. Hiraoka, K. Inouye, and N. Oseko. 1994. Mass mortalities of cultured kuruma shrimp, *Penaeus japonicus* in Japan in 1993: Epizootiological survey and infection trials. *Fish Pathology*, 29 (2): 135—139.
- Peng, S.E., C.F. Lo, K.F. Liu, and G.H. Kou. 1998. The transition from pre-patent to patent infection of White Spot Syndrome Virus (WSSV) in *Penaeus monodon* triggered by periopod excitation. *Fish Pathology*, 33(4): 10, 395—400.
- Sudha, P.M., C.V. Mohan, K.M. Shankar, and A. Hegde. 1998. Relationship between White Spot Syndrome Virus infection and clinical manifestation in Indian cultured penaeid shrimp. *Aquaculture*, 167: 95—101.
- Walker, P.J.^a. 1999. *Molecular Diagnostics for Shrimp Viruses in the Asian Region: Introduction to Virology*. 10—13th Feb. 1999, Mahidol University, Salaya Campus, Thailand, L3-1 – L3-9.
- Wang, C.S., K.F.J. Tang, G.H. Kou, and S.N. Chen. 1997^a. Light and electron microscopic evidence of white spot disease in the giant tiger shrimp, *Penaeus monodon* (Fabricus), and the kuruma shrimp, *Penaeus japonicus* (Bate), cultured in Taiwan. *Journal of Fish Diseases*, 20: 323—331.
- Wang, C.S., Y.J. Tsai, G.H. Kou, and S.N. Chen. 1997^b. Detection of White Spot Syndrome Disease Virus infection in wild caught Greasyback shrimp, *Metapenaeus ensis* (deHaan) in Taiwan. *Fish Pathology*, 32 (1): 3, 35—41.
- Wang, Y.G., M.D. Hassan, M. Shariff, S.M. Zamri, and X. Chen. 1999. Histopathology and cytopathology of White Spot Syndrome Virus (WSSV) in cultured *Penaeus monodon* from Paninsular Malaysia with emphasis on pathogenesis and the mechanism of white spot formation. *Disease of Aquatic Organism*, 39: 1—11.
- Zafran, D. Roza, I. Koesharyani, F. Johnny, and K. Yuasa. 1998. *Manual for Fish Diseases Diagnosis: Marine Fish and Crustacea Disease in Indonesia*. Gondol Research Station for Coastal Fisheries, 44 pp.

