



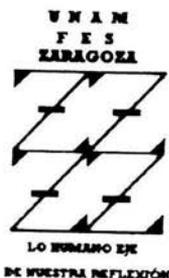
# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

EVALUACIÓN DE LA VIABILIDAD DEL VIRUS  
DEL SÍNDROME DE LA MANCHA BLANCA  
(WSSV) EN MATERIAL COEXTRUIDO DE  
SUBPRODUCTOS DE CAMARÓN INFECTADO

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
**B I Ó L O G O**  
P R E S E N T A :  
**MA. DE LOS ANGELES PERALTA MARTÍNEZ**



DIRECTOR: DRA. LUCÍA ELIZABETH CRUZ SUÁREZ  
ASESOR INTERNO: BIOL. ELOISA GUERRA HERNÁNDEZ

MÉXICO, D.F.

2004



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

TAN SOLO QUERIAMOS HACER  
AQUELLO QUE TENDIA A BROTAR  
ESPONTÁNEAMENTE EN NOSOTROS.  
¿PORQUE HABIA DE SER NOS TAN  
DIFÍCIL?

HERMANN HESS

YO TAMBIEN, ¿PORQUE ME HABRIA DE  
SER AUN MAS DIFÍCIL?

IT'S MY LIFE  
IT'S NOW OR NEVER  
I AIN'T GONNA LIVE FOREVER  
I JUST WANT TO LIVE WHILE I'M ALIVE  
(IT'S MY LIFE)

BON JOVI

POR LO CUAL, POR AMOR A CRISTO ME GOZO  
EN LAS DEBILIDADES, EN AFRENTAS, EN  
NECESIDADES, EN PERSECUCIONES, EN  
ANGUSTIAS; PORQUE CUANDO SOY DEBIL,  
ENTONCES SOY FUERTE.

2ª CORINTIOS 12:10

## DEDICO ESTE TRABAJO A

### DARIEN Y CESAR

Mis preciosos hijos quienes han sido mi motivo mas valioso para lograr la superación.

### MIS PADRES

José Guadalupe y María

Por su constante impulso para seguir adelante, por su paciencia y confianza.

### MIS HERMANOS

Inés, Rosa, Raimundo, Gerardo, Antonio

y

en especial a Lupita

Por su incondicional apoyo, su amistad y comprensión durante tantos años de nuestra vida.

### CARLOS

Por tu valiosa amistad.

ROSA ESTELA, PAOLA, ALEJANDRA, REBECA Y CARMEN

ALEIDA

Como ejemplo de lucha y perseverancia.

ANGELES

## AGRADECIMIENTOS.

Mi mas sincero agradecimiento a la Dra. Lucia E. Cruz Suárez directora de la presente tesis por ser guía y colaboradora en la realización de la misma, y por la confianza que me brindo siempre.

A la Dirección General de Investigación en Acuicultura del Instituto Nacional de la Pesca por su apoyo prestado durante toda la elaboración y realización de esta tesis.

Al Dr. Denis Ricque Marie, por su apoyo en el procesamiento de las muestras, y sus valiosos comentarios y observaciones realizados a este trabajo.

Al Dr. Marco Linne Unzueta Bustamante por la valiosa aportación de sus conocimientos para la realización y conclusión de este trabajo.

Al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste unidad Guaymas por las facilidades prestadas en el uso de sus instalaciones durante la realización de los bioensayos.

A la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León por su valiosa colaboración en el uso de equipo e instalaciones para el procesamiento de las muestras.

Al Laboratorio de Análisis de Calidad de Agua y Sedimentos de CIBNOR unidad Guaymas, por su valiosa colaboración en el análisis de calidad de agua de este trabajo.

Al M en C Vicente Hernández Covarrubias por su apoyo en el diagnostico de WSSV

Al Dr. Jorge Hernández López por la aportación de sus conocimientos y realización del diagnostico de WSSV en las muestras procesadas y organismos del bioensayo.

Al M en C Marco A. Porchas Cornejo por su apoyo en la realización del Bioensayo.

Al Biol. Emilio Romero Beltrán por su apoyo durante la colecta de los organismos.

Al M en C Víctor González Gallardo por su colaboración en la identificación de las granjas.

Al Biol. José L. Sánchez Morales y Luis O. Peña Ortega por su valiosa ayuda durante la molienda, mezclado y extruido de los subproductos.

A la Dra. Anabertha Montero Rocha por sus comentarios, sugerencias y la valiosa información prestada para la realización de este trabajo.

A la Biol. Myriam Ramírez Flores por las facilidades prestadas para la realización del trabajo de investigación.

A la Biol. Eloisa Guerra Hernández, por sus comentarios a este trabajo.

Al M. en C. Salvador Sánchez Aviles por sus comentarios a este trabajo.

A la Dra. Ma. De Lourdes Mora García, por sus comentarios a este trabajo.

A la Biol. Angélica E. González Schaff, por sus comentarios a este trabajo.

Y a todas aquellas personas que de alguna manera u otra participaron en la realización de este proyecto.

## INDICE

	Página.
Resumen.....	1
Introducción.....	2
Antecedentes.....	6
Justificación.....	11
Hipótesis.....	13
Objetivos.....	14
Métodos.....	15
Resultados.....	28
Discusión de resultados.....	37
Conclusiones.....	41
Bibliografía.....	42
Anexo I.....	49
Anexo II.....	68

## RESUMEN

Los subproductos de camarón (cabezas de camarón), procesados en forma de harina presentan un excelente valor nutricional al ser incluidos en alimentos balanceados para engorda de camarón. Sin embargo, a partir de la aparición de las enfermedades virales el uso de estos subproductos se ha cuestionado por la posibilidad de que los virus permanezcan viables y mantengan la capacidad de infectar aun después de ser procesados. Con el objetivo de demostrar que el proceso de co-extrusión con pasta de soya elimina la viabilidad del Virus del Síndrome de la Mancha Blanca en subproductos de camarones infectados (diagnosticados por PCR), se evaluaron de manera paralela en un bioensayo nutricional y por PCR subproductos de camarón infectados y no infectados después de haber sido colectados, congelados transportado y molidos y mezclados con soya, extruidos y no extruidos.

Estos insumos se suministraron como alimento a postlarvas de camarón *Litopenaeus vannamei* (libres de mancha blanca) con un peso promedio de 0.07 gramos durante 15 días, con 2 replicas por tratamiento y 10 organismos por acuario, manteniendo una temperatura promedio de 20.5° C y por medio de PCR.

Después de 15 días las postlarvas alimentadas con los insumos experimentales no manifestaron ninguna sintomatología de la enfermedad a nivel externo, histológico y molecular, demostrando una desactivación del virus en los subproductos infectados por procesos previos a la extrusión. Sin embargo, el diagnóstico con PCR de los subproductos infectados evaluados fue positivo tanto en los subproductos extruidos como en los no extruidos.

La pérdida de viabilidad de los virus en los subproductos antes de la extrusión se podría atribuir a los procesos repetidos de congelación-descongelación a los que fueron sometidos los subproductos durante la transportación del lote de subproductos infectados de Sinaloa a Monterrey, lugar donde se realizó la extrusión.

El presente estudio muestra que para definir la infectividad de subproductos de camarón, un diagnóstico positivo con PCR debe complementarse con un bioensayo de desafío, ya que el PCR detecta ADN que no necesariamente detecta virus viables. Aunque no fue posible concluir sobre el efecto inactivador de la co-extrusión sobre el WSSV en subproductos de camarón, este estudio pone en evidencia la fragilidad del virus a procesos intermedios de congelación y descongelación.

## INTRODUCCIÓN

El camarón es un crustáceo decápodo marino, de cuerpo comprimido y abdomen prolongado. Su carne es muy apreciada, por lo cual posee gran demanda en el mercado nacional e internacional, tal es la demanda, que la pesca en altamar no ha sido suficiente para cubrir el mercado, dando paso así al desarrollo de cultivos camaronícolas intensivos y semiintensivos en diferentes países y estados de la república.

Aún cuando algunos autores señalan que el cultivo de camarón en México dio inicio en la época prehispánica, con la construcción de encierros en las lagunas de Sonora y Nayarit, el país no contaba, hasta ese momento, con una práctica tradicional en la camaronicultura.

Una etapa previa al cultivo de camarón, fue el manejo de los ecosistemas, que se inicia a mediados de los años 60's, con la aplicación de técnicas y métodos rudimentarios para mejorar las condiciones de las lagunas litorales de Huizache y Caimanero en Sinaloa, con la apertura de las bocas para conectar los ríos Presidio y Baluarte y la canalización de esteros (INP, 2000).

A principios de los años 70's, la Universidad de Sonora inició las investigaciones sobre el cultivo de camarón en ambiente controlado, en las instalaciones de puerto Peñasco, Sonora (INP, 2000)

Para los años 80's se genera un impulso mayor en el cultivo de camarón, dando capacitación a técnicos mexicanos para la formación de granjas camaronícolas. La primera granja instalada en el ámbito comercial fue formada en 1984, por la sociedad cooperativa "Acuacultores del norte de Sinaloa" S.C.L. (INP, 2000).

Actualmente el cultivo de camarón en México se realiza principalmente con la especie de *Litopenaeus vannamei* (camarón blanco del pacífico), esta especie muestra una tasa rápida de crecimiento en estanque de cultivo, presentando incrementos de entre 10 y 20 gramos en 4 ó 5 meses (INP 2000). La especie cultivada en los primeros años de desarrollo camaronícola fue principalmente el camarón blanco *L. vannamei*, sin embargo el camarón azul y café también han destacado en el noroeste del país.

La producción total de camarón ha ido creciendo en los últimos diez años, tanto que para 2001 la producción fue de 105,523 t, lo cual refleja un incremento del 40.45% más con respecto a 1991 (62,833 t), los principales estados productores de camarón son Sonora y Sinaloa en el Pacífico y Tamaulipas en el Golfo (Figura 1).

De un total de 450 granjas de cultivo, reportadas por La Dirección General de Investigación en Acuicultura (DGIA) en 2001, el 29% se encuentran en Sonora, el 65% en Sinaloa, el 10% en Nayarit, 2% en Tamaulipas y el 1% en Chiapas (Figura 1)



Figura 1. Estados productores de camarón por pesca y acuicultura y % de granjas de cultivo en los principales estados (Fuente: INP 2001 inédito).

Actualmente el camarón se reconoce como el más importante de los productos marinos que entran en los canales comerciales del mundo. En 1996, aún cuando la industria del cultivo de camarón se vio afectada por el ataque viral del Síndrome de Taura, las capturas de camarón en los litorales mexicanos contribuyeron con el 51% de las divisas totales generadas por el sector pesquero (SEMARNAP 1996). De acuerdo al Anuario Estadístico de Pesca 2001, las divisas generadas por este producto, en la actualidad corresponden al 56% de las totales ingresadas (784 m.d.) por el sector pesquero.

Los organismos en cultivo o en su medio natural en cualquiera de sus etapas de desarrollo, son susceptibles de sufrir enfermedades cuya importancia puede circunscribirse a un sólo individuo o puede ser de características infecto contagiosas y afectar a otros organismos de su mismo nivel taxonómico e incluso a otras especies alejadas filogenéticamente (INP 2000).

La producción camaronícola en México se ha visto afectada en los últimos años considerablemente, debido a la presencia de agentes patógenos de diferentes tipos, siendo quizás los virus, los más agresivos y difíciles de manejar (INP, 2000).

Los primeros reportes apreciables que se tienen de enfermedades virales en México, comienzan en 1991 en Sonora y Sinaloa, donde se reportaron brotes

de Necrosis Hipodérmica Hematopoyética Infecciosa y vibriosis. En 1992 se detectó por primera vez en granjas de Sinaloa el virus conocido como Síndrome de Taura, pero no es sino hasta 1994 que se incrementa considerablemente, afectando principalmente las granjas de Sinaloa en donde para 1996 (13,315.430 t) la producción por cultivo de camarón decayó en un 16% con respecto a 1995 (15,867.450 t) lo que ocasionó pérdidas considerables en la industria (SEMARNAP, 1999).

Uno de los principales factores que favorecen la dispersión de enfermedades en la camaronicultura de México, es la importación de camarón congelado que se comercializa y procesa en el país, cuyo estado sanitario no es confiable y que en particular Nunan *et al*, (1998), definen como la principal vía de introducción de agentes patógenos y enfermedades.

Las enfermedades causadas por virus nativos de América, han golpeado fuertemente la producción acuícola de camarón en nuestro país, sin embargo, el daño que pueden causar los virus exóticos de origen asiático, como son los causantes del Síndrome de la Mancha Blanca (WSSV) y del síndrome de cabeza amarilla (YHV) pueden ser devastadores debido a que todavía no se ha establecido un programa específico de investigación y seguimiento para estas enfermedades.

Actualmente la acuicultura de camarón se ha visto impactada por los efectos del Virus del Síndrome de la Mancha Blanca (WSSV), el cual es catalogado como un báculovirus. Los signos clínicos de este síndrome se caracterizan por presentar en los organismos infectados: una reducción rápida en el consumo de alimento seguido de letargia, la presencia de puntos blancos en la cutícula (representados por un depósito anormal de sales de calcio en la epidermis cuticular), en muchos casos los camarones moribundos despliegan un color que va de rosa a un color rojo fuerte. Histológicamente la infección es caracterizada por cuerpos de inclusión en núcleos hipertrofiados de células infectadas. Los órganos blancos son generalmente de origen mesodermal y ectodermal, como el tejido epitelial y conectivo, los nódulos hematopoyéticos, hemocitos, las branquias, intestino estomacal y epidermis entre otros. Las poblaciones de camarones con estos signos despliegan una alta mortandad que puede llegar al 100% en un rango de 3 a 10 días (Ligtner, 1996).

Otro factor del cual también depende el estado de salud de producción acuícola es el de la nutrición, el alimento que se emplee en los cultivos va a determinar en gran medida el crecimiento, las propiedades nutritivas y la calidad del producto final. Esto pone de manifiesto la necesidad de alimentos balanceados que permitan un crecimiento homogéneo en toda la producción (Cruz *et al*, 1999).

Considerando que en una explotación acuícola el rubro de la alimentación es el que produce una mayor erogación, ya que este punto es fundamental para el

buen desarrollo de la actividad, es importante identificar aquellos insumos, ya sean productos primarios, subproductos o desechos que por su valor alimenticio, disponibilidad, uso y costo, puedan ser utilizados por los productores de alimentos balanceados, con los consecuentes resultados en sus cultivos y en los costos de producción (Cruz *et al*, 1999).

Asimismo se debe considerar que se ha ido incrementando la demanda de productos marinos para consumo humano, por lo cual la acuicultura ha tenido que implementar cultivos intensivos, los cuales a su vez generan una gran cantidad de desechos, tanto de organismos cultivados como de insumos utilizados.

Por otra parte, las restricciones de orden ambiental y económico en la producción de alimento animal, han propiciado un enfoque a la necesidad de utilizar los subproductos reciclables de origen animal. Actualmente las industrias relacionadas con la producción animal se encuentran bajo gran presión debido a su contribución en la contaminación de la superficie de los mantos freáticos. Aún más debido al alto costo de eliminación de los subproductos y a las nuevas regulaciones impuestas en torno a la calidad del agua y de aire se requieren de métodos alternativos de reciclamiento (Kiang, 1994).

A este respecto, la tecnología de extrusión es uno de estos métodos e incluye la conversión de subproductos agroindustriales en ingredientes alimenticios utilizables, además permite obtener pellets de alta calidad.

Dentro de las ventajas que se pueden señalar en el uso de la extrusión para 5reciclamiento de subproductos se mencionan:

- a) Eliminación de factores antinutricionales (inhibidores de tripsina, hemaglutininas, etc.)
- b) Esterilización de los desechos utilizados.

Antes de extruir, los ingredientes deben ser molidos, mezclados y acondicionados a una determinada humedad. En el equipo se combina una alta temperatura, y presión, y que al descargar el material por el dado, se presenta una vaporización súbita, obteniendo pellets y hojuelas de densidad requerida (Quintero, 1999).

El presente trabajo propone una alternativa para reciclar subproductos de camarón y poder evitar un foco de infección viral (específicamente por WSSV), ocasionado por la dispersión de subproductos de camarón infectado, de organismos moribundos que pueden ser movilizados de los lugares del proceso o de cultivo, tanto por aves como por animales, a otras áreas de cultivo o del medio silvestre. Con el aprovechamiento de los subproductos de camarón procesados para la alimentación (y organismos originados por infección en cosechas de emergencia) por medio de la extrusión, se pretende tener un mejor aprovechamiento de estos, sin correr el riesgo de que los organismos consumidores se infecten.

## ANTECEDENTES

Uno de los problemas que más ha afectado la creciente industria del camarón, es el de las enfermedades virales, las cuales han provocado grandes mortandades entre las poblaciones de éstos. Pantoja (1996), reporta que la especie *Litopenaeus stylirostris* (camarón azul), se vio afectada por el virus de la Necrosis Hipodérmica Hematopoyética Infecciosa (IHHNV) haciendo que la población de este organismo decayera. Menciona además que en 1995 aparece el virus conocido como Síndrome de Taura (VST) y que ataca en particular las poblaciones de *Litopenaeus vannamei* en granjas de Sinaloa, Sonora y Guerrero. Posteriormente en 1998 Lightner, *et al*, mencionan que el IHHNV ataca principalmente a los estadios juveniles de *L. stylirostris*, en cambio los juveniles de *L. vannamei* son más resistentes a esta enfermedad. Para el caso de VST el efecto es inverso, es decir, los estados juveniles de *L. vannamei* son mas susceptibles a este virus que los estados juveniles de *L. stylirostris* quienes presentan mayor resistencia. Estos dos virus actualmente no tienen el mismo impacto que causaron en un principio, ya que se han implementado estrategias de cultivo que permiten un mejor control de estos agentes patógenos.

Debido a los recientes impactos que las enfermedades virales han ocasionado en la producción de camarón, el Instituto Nacional de la Pesca a través de la Dirección General de Investigación en Acuicultura se ha ocupado en atender, en la medida de sus posibilidades, dichas problemáticas, participando desde 1997 a la fecha en grupos de trabajo de Acuicultura conformados dentro de la Reunión Binacional MEXUS-Golfo, atendiendo aspectos sanitarios relacionados con las enfermedades virales.

Durante el mes de agosto de 1999 se expusieron los avances de los resultados obtenidos durante el desarrollo de la investigación "Diagnóstico de Enfermedades Virales en el Golfo de México" (Hernández, 1999), los cuales confirman la presencia del Virus de la Necrosis Hipodérmica y Hematopoyética Infecciosa, tanto en poblaciones silvestres y cultivadas de *L. vannamei*, así como la presencia de diversos agentes patógenos tales como bacterias, nemátodos y protozoarios (Microsporidios), además de observarse diversos grados de necrosis multifocal, sin que ninguno de estos pusiera en peligro la vida de los organismos analizados.

Asimismo, cabe mencionar que los resultados obtenidos con esa investigación, permitieron contar con los elementos técnicos necesarios para participar en la elaboración de la Norma Oficial Mexicana NOM-030-PESC-2000 (Anexo II), y así evitar la dispersión de enfermedades virales exóticas.

Actualmente otro virus esta causando alarma entre los acuicultores de camarón, es el denominado Síndrome del Virus de la Mancha Blanca (WSSV), el

cual aparece en México en 1999 dentro de las granjas camaroneras de los estados de Sonora, Sinaloa y Nayarit. También se detectó en poblaciones silvestres de litoral del Pacífico, sin que causara altas mortandades. Este virus se detectó por primera vez en 1992 en países asiáticos y se ha venido introduciendo a países occidentales como Centroamérica y Estados Unidos.

La información existente en cuanto a las condiciones y vectores de transmisión de estas enfermedades (Royo, *et al* 1999, Nunan *et al*, 1998), menciona que se ha identificado como probables al agua, desechos sólidos y líquidos de plantas maquiladoras de camarón, camarón congelado para consumo humano y el utilizado para carnada. Nunan *et al*, (1998), llevaron a cabo un estudio en donde establecen que la dispersión de estos virus se da por medio de camarón congelado infectado que se importa de Asia.

Quiong *et al*, (1999) compararon la virulencia de seis cepas (WSSV) de distintas regiones geográficas (China, India, Tailandia, Texas, Carolina del Sur y el Zoológico Nacional de Estados Unidos de Norteamérica) en postlarvas de *L. vannamei* y juveniles de *Farfantopenaeus duorarum*. Observaron que en *L. vannamei*, la cepa de Texas infecta con mayor rapidez alcanzando mortandad al 100% en un periodo más corto (2 días), en comparación con las otras regiones. Con respecto a la especie de *Farfantopenaeus duorarum*, los estados juveniles son mas resistentes, alcanzando una mortandad del 100% en un periodo de 18 días. Las postlarvas de *L. vannamei* son mas susceptibles a la infección, pues alcanzan la mortandad al 100% en un periodo más corto (14 días).

Kanchanaphum *et al*, (1998) determinaron que los cangrejos son portadores del virus de la mancha blanca y que pueden transmitir esta infección viral a los camarones. Desarrollaron un estudio en donde utilizan tres especies de cangrejos (*Sesarma sp*, *Scylla serrata* y *Uca pugilator*) los cuales son infectados con el virus vía inyección. Posteriormente son colocados en acuarios en conjunto con organismos de *Penaeus monodon* (separados físicamente por una malla) bajo las mismas condiciones físico-químicas. La transferencia del virus al camarón fue monitoreada con diagnósticos de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) e hibridación de DNA *in situ* a intervalos de 12 horas después de que comienzan a cohabitar, dando como resultado que la especie *U. Pugilator*, es la que infecta con mayor rapidez al camarón.

Supamattaya *et al*, (1998), utilizaron la especie de *Penaeus monodon* infectado con virus de mancha blanca para evaluar por tres vías (inyección, ingestión e inmersión) la infección de tres especies de crustáceos comunes en la acuicultura del camarón (*Portunus pelagicus*, *Scylla serrata*, y *Acetes sp*), encontrando que en *Acetes sp*, por inyección la mortandad de los individuos se obtiene al 100% en un periodo de 3 días, por inmersión en un periodo de 5 días y por ingestión sólo el 20% de la mortandad se alcanza en 9 días. Para el caso de los cangrejos, la in-

yección es la vía más rápida de infección, alcanzando el 100% de mortandad en un periodo de 8 días, por ingestión no se registró mortandad en estas especies.

Chang *et al.* (1998) evaluaron el efecto de las radiaciones ultra violeta, temperatura, pH, ozono, salinidad y desinfectantes químicos en la infectividad del virus de la mancha blanca y reportan que el virus no es infectante si se somete a una temperatura de 50°C por un lapso de 90 minutos o a 70°C por un periodo de 5 minutos, también reportan que el virus queda completamente inactivado por una alta acidez (pH de 1 por 10 minutos, pH de 3 por 1 hora) y por alta alcalinidad (pH 12 por 10 minutos).

Maeda *et al.* (1998) publicaron un estudio en donde observaron el efecto de varios tratamientos en especies de *Penaeus japonicus* y *P. monodon* infectadas con dos virus Penaeid Rod-Shaped DNA Virus (PRDV) y Systemic Ectodermal and Mesodermal Baculovirus (SEMBV) de la subfamilia de los Baculoviridae, los cuales se agrupan dentro de los llamados White Spot Síndrome Virus. Concluyen que el Hipoclorito de sodio inactiva al PRDV a 1 ppm por 30 minutos y a 5 ppm a 10 minutos. El SEMBV queda inactivo a 10 ppm por un lapso de 30 minutos. A altas concentraciones de cloruro de sodio (12.5%) se inactiva el PRDV con una temperatura de 25°C por 24 horas y el SEMBV (15%) a 28°C por 24 horas. El PRDV pierde actividad por calentamiento a 50°C o más durante 20 minutos y secando por 1 hora a 30°C. En cuanto a la infectividad en agua de mar, ésta se mantiene por 120 días a 4°C y por más de 60 días, pero menos de 120, a temperatura de 25°C. Sin embargo cuando es suspendido en agua de mar a bajas concentraciones se mantiene inactivo por 10 días a 4°C. Y por 7 días a 25°C. Para el caso del SEMBV éste se mantiene activo en agua de mar por un periodo de 5 días a 28°C.

## EL PROCESO DE EXTRUSIÓN EN ALIMENTOS ACUÍCOLAS.

El alimento de alta calidad es vital para el desarrollo y éxito de la industria camaronesa, el cual puede representar hasta el 60% de los costos de producción en una granja. Por esta razón los alimentos deben ser formulados para cumplir con todos los requerimientos nutricionales de la especie. La calidad de alimento de camarón depende de la calidad nutricional de los ingredientes seleccionados, al igual de los métodos utilizados para producirlo. Los procesos utilizados para producir el alimento dictarán cuales van a ser las características físicas del mismo como la estabilidad en el agua, forma y tamaño final del producto (Bortone 2001).

La aplicación de la tecnología de extrusión en la preparación de alimentos balanceados empleando subproductos de organismos marinos puede ayudar a erradicar el problema de los desechos marinos y además puede crear un alimento con gran valor nutricional. Este proceso se define como el proceso por el cual materiales expansibles almidonáceos y/o proteínáceos son plastificados y cocidos en

un tubo por una combinación de humedad, presión, temperatura y corte mecánico (Smith 1976 citado por Hauck y Huber, 1989).

En la extrusión se incluye un proceso de cocción a alta temperatura y presión, en corto tiempo (5 a 10 segundos) que se produce por la disipación de la energía mecánica, la cual es transferida a la mezcla por medio de los elementos del extrusor. Durante el proceso la mezcla con que se alimenta al extrusor esta en forma de harina, a medida que se somete a alta presión y temperatura, y a las fuerzas del corte, esta cambia hasta formar una masa visco-elástica con características similares a un plástico derretido (fluido no Newtoniano en este caso). Por eso también se le conoce como un proceso de cocción termoplástico (Bortone 2001).

Por su amplia versatilidad, la extrusión se ha convertido en un proceso muy usado en la elaboración de alimentos acuícolas, ya sea para alimentos flotantes, de medio fondo, de fondo y semihúmedos, utilizando una gran variedad de ingredientes secos o húmedos, tales como granos de oleaginosas, harinas de cereales y leguminosas, y desechos del procesado de pescados y mariscos, (Carver et al, 1989. Botting, 1991. Dominy y Lim 1991. Kearns 1993 Woodroffe 1993, Kiang, 1994). La incorporación de estos desechos, da características positivas al alimento coextruido: buen sabor y textura, incremento en la estabilidad dentro del agua y complementación nutritiva, mejorando la eficiencia alimenticia (Mendoza, 1993) además de dar un acabado de esterilización del producto. (Melo, 1997).

Los coextruidos se han usado como ingredientes en formulas balanceadas, para proporcionar una mejor nutrición. Los subproductos de camarón se han utilizado en forma de harina, procesando principalmente las cabezas, que constituyen del 40 al 44% del peso corporal el organismo, como una rica fuente de proteínas. Se ha observado también que los componentes de la harina de camarón, son importantes como estimulantes alimenticios y enriquecen considerablemente el valor de la dieta, acelerando el crecimiento del camarón. (Joseph y Meyers 1975; Meyers, 1986) (Melo, 1997).

Melo (1997) realizó un estudio donde utilizó subproductos de camarón coextruidos con pasta de soya, para elaborar dietas balanceadas en nutrición de camarón, observó que la mayor tasa de crecimiento se obtuvo muy ligeramente en dietas balanceadas con 8% de inclusión de harina de camarón y con un coextruido doble de camarón al 39% de inclusión, aunque menciona que no hubo diferencia significativa entre las diferentes dietas elaboradas, por proceso y porcentaje de inclusión.

Cruz-Suárez *et al*, (1999) evaluaron dos subproductos de camarón en forma de harina como fuente proteica en dietas balanceadas para *L. vanammei* y recomiendan la inclusión de harina de subproductos de camarón en la producción de alimentos en la escala comercial a un porcentaje entre 6 y 18% dependiendo de

los imperativos económicos que pueda representar en el costo de la fórmula y de la presencia de otros componentes que aporten fibra o quitina. En este trabajo mencionan que obtuvieron una relación dosis-respuesta positiva, es decir que a mayor inclusión de harina de camarón, mejor crecimiento.

Pelcastre (1996), en un estudio que realiza sobre coextruidos de pasta de soya y subproductos de carpa herbívora para nutrición de bagre, menciona que el calor generado (80-200° C) esteriliza subproductos animales húmedos y alimentos elaborados en este sistema, eliminando la contaminación por bacterias, mohos, levaduras y virus (Smith 1976; Horn 1979; Tacon y Jackson 1985, citados por Tacon 1989; Carver et al 1989; Cluet 1990; Boting 1991; Kiang 1993; Woodrooffe 1993; citado por Choudhury 1995).

Kearns (1993). Explica que en el método Wenger para la extrusión de alimentos acuícolas, las bacterias no sobreviven al procesamiento, menciona que de 775 muestras analizadas todas salieron cero positivas en Salmonella.

## JUSTIFICACIÓN

El cultivo de camarón es la actividad acuícola que ha impulsado el crecimiento sectorial y de las exportaciones de productos pesqueros, actualmente se ha convertido en el producto de exportación más valioso e importante dentro de nuestro país, en 1999 su valor alcanzó los 1,500 millones de pesos (SEMARNAP 2000). En la actualidad numerosos estudios se han enfocado a apoyar la producción masiva en granjas camaroneras, entre las cuales se encuentran, la producción de alimentos balanceados que proporcionen una mejor nutrición y un rápido crecimiento. Con esta creciente industria, los desechos también crecen, lo cual genera una problemática dentro del sector ambiental, social y económico.

El proceso de extrusión es una alternativa para el aprovechamiento de los desechos generados dentro de esta industria, ya que permite obtener un alimento o ingredientes con alta calidad nutricional y almacenables por periodos largos. Se sabe que las altas temperaturas y presiones que maneja este proceso, permiten mantener el producto final libre de organismos patógenos, tales como las bacterias, hongos y virus.

Actualmente, la industria camaronera se ha visto afectada de manera considerable, debido principalmente a la presencia de agentes patógenos de diferentes tipos, siendo los virus los más agresivos.

El Virus de la mancha blanca, que se ha introducido recientemente al país (en 1999) y se sabe que ataca principalmente los estados juveniles de las especies de camarón, Así lo muestran los reportes confirmados de altas mortandades en algunas granjas acuícolas.

Dados los antecedentes anteriores, el Instituto Nacional de la Pesca, ha asumido el compromiso de realizar un seguimiento continuo sobre el desempeño actual de la industria del cultivo de camarón, que permita contar con bases confiables para el ordenamiento de esta actividad, con el fin de cumplir este propósito, este trabajo presenta una alternativa para evitar la dispersión de este virus, aprovechando y controlando las toneladas de subproducto de camarón que se obtienen de:

- 1.- La cabeza y cáscara desechados en las plantas procesadores de camarón que son procesadas en plantas especiales indicadas por la NOM-030-PESC.
- 2.- La cabeza y cáscara que son vertidos en altamar por los barcos camaroneros.
- 3.- Los camarones con un peso menor a 6 g que por causa de infección viral (WSSV) no cumplan con una cierta talla comercial y que tengan que ser cosechados de emergencia )como lo indica la NOM-030-PESC.

Es importante mencionar que los camarones infectados con virus de la mancha blanca no causan efecto alguno en el consumo humano, por lo tanto si éste alcanza una talla comercial dentro de las granjas (mayor a 6 gramos), es cosechado y procesado para su venta como lo indica la NOM-030-PESC (Anexo I). Aún si los subproductos contienen el virus, este puede dispersarse, ya sea por aves o animales que toman estos desechos de las plantas procesadoras en los que son procesados, o debido a los subproductos vertidos en altamar por los barcos camaroneros, los cuales transmitirían la infección a otros organismos como es el caso del cangrejo de mar, el cual también puede ser un portador del virus.

Tomando como referencia lo mencionado anteriormente sobre el proceso de extrusión, el aprovechamiento de todas estas toneladas generadas en la industria de camarón trascendería benéficamente en:

- Aprovechamiento de los subproductos (aún infectados con virus WSSV), los cuales no causarían problemas de desecho, puesto que se estarían aprovechando en la alimentación de otros organismos sin preocuparse de transmitir la infección.
- Mejora de la alimentación en los organismos de cultivo, ya que estudios hechos con anterioridad mencionan que la harina de estos subproductos es rica en proteínas y otras sustancias nutritivas.
- Rompimiento de un foco de infección viral, ya que los desechos no serían vertidos en el mar e infectar a otros organismos, o no serían desechados en basureros y transportados a otros lugares por aves y animales.
- Ingreso extra a las comunidades de pescadores ribereños, a las granjas productoras, y a las compañías de alimentos balanceados.

## HIPOTESIS

Se sabe que el Virus de la Mancha Blanca queda inactivo a temperatura de 70°C por un periodo de 5 minutos. Si el proceso de extrusión maneja temperaturas arriba de los 100°C y altas presiones (400 a 800 psi) en tiempos cortos (5-10 segundos), entonces al pasar los subproductos de camarón infectados, por este proceso, el virus de la WSSV quedará inactivado, convirtiendo así a estos subproductos en un insumo útil y nutritivo que puede ser utilizado en la elaboración del alimento para emplearse en el cultivo de camarón sin correr el riesgo de transmitir esta infección viral.

## OBJETIVOS

### GENERAL:

Demostrar si el proceso de coextrusión inactiva la viabilidad del Virus del Síndrome de la Mancha Blanca en subproductos de camarón infectado, para ser reciclados como ingredientes en alimentos acuícolas.

### PARTICULARES:

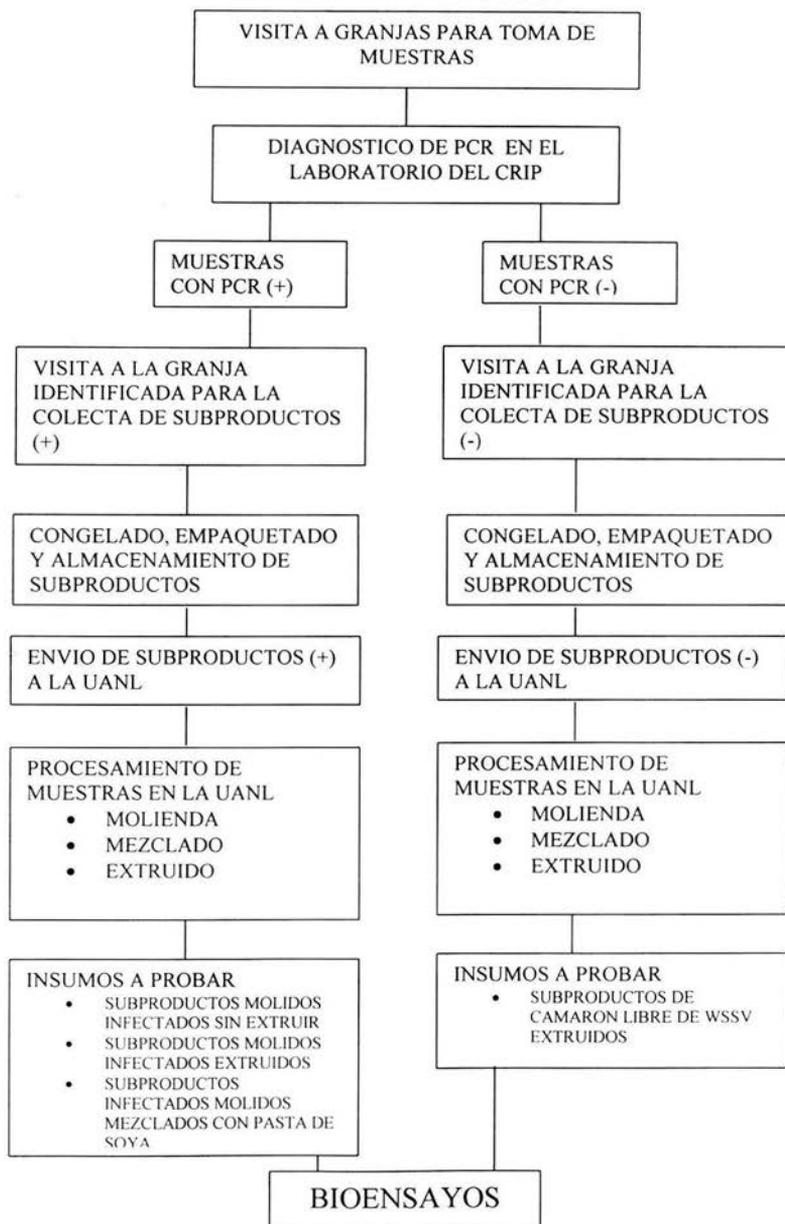
Colectar subproductos positivos a WSSV, en zonas con mayor incidencia de WSSV dentro de Sonora y Sinaloa,

Evaluar la viabilidad del virus en el coextruido, en condiciones de bioensayo.

Establecer si la concentración de nutrimentos en el agua ejercen un efecto considerable sobre los organismos tratados con los insumos preparados.

## MÉTODOS

### DIAGRAMA DE MÉTODOS



## 1. TRABAJO DE CAMPO

### 1.1 IDENTIFICACIÓN DE LAS GRANJAS

Se llevó a cabo un monitoreo dentro de las granjas camaronícolas en los estados de Sonora y Sinaloa para identificar un lote positivo a WSSV y un lote libre de WSSV (para la identificación de las granjas y diagnóstico, se contó con el apoyo de instituciones que desarrollan programas de seguimiento, monitoreo y diagnóstico, pertenecientes a la Red Nacional de Laboratorios como el CRIP en Mazatlán Sinaloa, el ITSON en Cd. Obregón Sonora, el CIBNOR en Guaymas Sonora y a una serie de técnicos, productores y personas relacionadas con la acuicultura de camarón), ya identificadas las granjas se tomó una muestra de 20 organismos por granja, y se conservaron en fijador Davidson para análisis histológico siguiendo el método estándar (Lightner 1996). Se tomó otra muestra de 30 organismos para análisis de PCR (Lightner 1996) y diagnosticar la presencia /ausencia de WSSV. De estos lotes identificados se recolectaron por separado, 50 kg, de subproductos de camarón (cabeza) WSSV positivo y 50 kg de subproductos de camarón WSSV no detectado.

### 1.2 DIAGNÓSTICO POR PCR DE MATERIA PRIMA COLECTADA

**PRINCIPIO:** La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es un método enzimático para hacer múltiples copias de un segmento predeterminado de ADN. En esencia la PCR es la repetición de ciclos de temperatura y tiempos con el fin de favorecer la actividad de la ADN polimerasa hasta obtener la cantidad de ADN deseado para su detección por medios moleculares. Dependiendo de la temperatura aplicada, podemos dividir un proceso de PCR en las siguientes etapas:

- Etapa de desnaturalización a 94°C
- Etapa de alineación de los primers a 62°C
- Etapa de extensión a 72°C

#### **Técnica PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa).**

Las muestras colectadas fueron analizadas mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), con un análisis compuesto de diez organismos por tubo de reacción (para el caso de identificación de WSSV en granjas e insumos, en el caso de los organismos del bioensayo, se utilizó un organismo por tubo), la técnica se llevó a cabo mediante kit comercial IQ2000®, que consiste en la amplificación de ADN viral en dos pasos, un producto de un tamaño de 910 pares de bases en el primero y de 550 y 296 pares de bases en el segundo, además de un producto más de 848 pares de bases que constituye un control de la extracción y amplificación de ADN de camarón.

### Extracción de ADN por buffer de lisis

1.- Las muestras se colocaron (tejido de 10 organismos) en un microtubo eppendorf estériles de 1.5 ml de capacidad y debidamente identificado con su etiqueta. En este paso se utilizaron.

3 tubos por estanque (para el caso de identificación en las granjas).

3 tubos por tratamiento (para el caso de identificación de en los insumos)

1 tubo para cada organismo (para el caso de los organismos utilizados en el bio-ensayo)

2.- Se añadió 500 µl de buffer de lisis a cada tubo utilizando pipetas con puntas estériles, con filtro y se homogenizó con un homogenizador manual de plástico estéril para tubos eppendorf.

3.- Las muestras se incubaron a 95°C por diez minutos en un MULTI-BLOCK y se centrifugaron a 12,000 r.p.m. durante 10 minutos utilizando una centrifuga (eppendorf Centrifuge 5410, JICA) para sedimentar restos celulares.

4.- Se transfirieron 200 µl del sobrenadante a un nuevo tubo de 1.5 ml, que contenía 400 µl de alcohol al 95%.

5.- Se agitó brevemente en el vortex (MISTRAL MIXTER) y se centrifugó a 12000 r.p.m. durante 5 minutos, se decantó el contenido líquido y se dejó secar la muestra (sedimento).

6.- Por último, se disolvió el sedimento en 200µl de H2O destilada.

### Amplificación

a).- En este paso se prepararon las siguientes mezclas en tubos de 0.2 ml (Thermowell TM Tubbes) utilizando micropipetas estériles y con filtro:

Primer reactivo premezcla----- 7.5 µl

Taq AND polimerasa 2U/µl----- 0.5µl

b).- Añadiendo estos reactivos a cada uno de los tubos (las muestras, los controles positivos, controles negativos y el blanco) debidamente etiquetados se obtuvo una mezcla de 8µl.

c).- Se tomaron 2µl de la muestra de ADN extraída, y se añadieron a los tubos junto con la mezcla anterior de Primer reactivo premezcla y Taq ADN polimerasa. Para los estándares (controles y blanco) se tomó la misma cantidad (incluidos en el kit).

Los tubos con las mezclas se colocaron en un Termociclador Minicycler TM y los parámetros de amplificación fueron los siguientes, utilizando las recomendaciones del sistema IQ2000:

Perfil de la primera corrida de reacción:

94°C por 30 segundos; 62°C por 30 segundos; 72°C por 20 segundos. Repetidos 5 ciclos.

Luego:

94°C por 15 segundos; 62°C por 30 segundos. Repetidos 13 ciclos.

Luego:

72°C por 15 segundos; 20°C por 30 segundos.

Después de esta primera corrida, se sacaron los tubos del termociclador y se le añadieron a cada tubo

Segundo reactivo (anidado) premezcla-----14µl

Taq ADN polimerasa 2U/µl----- 1µl

Se vuelven a colocar los tubos en el termociclador y se programa la segunda corrida de la siguiente manera:

94°C 20 por segundos; 62°C por 20 segundos; 72°C por 30 segundos. Repetidos 5 ciclos.

Luego:

72°C por 30 segundos; 20 C por 30 segundos.

Después de completar la segunda corrida de reacción, se tomaron 8µl del producto de PCR de cada tubo y se colocó sobre una tira de papel parafina (PARAFILM "M"), se mezcló con 2µl de colorante 6X (Coading Dye, incluida en el kit).

## Electroforesis

Para este paso se necesitaron 350 ml de solución para electroforesis, la cama de electroforesis (320 ml) y para el gel (30 ml), y se prepararon de la siguiente manera:

En un matraz se colocaron 280 ml de agua destilada con 70 ml de solución TBE 5X, de la mezcla se colocaron 320 ml en la cama para electroforesis y los restantes 30 ml se prepararon con 2% agarosa.

Para la preparación del gel 2% agarosa se utilizaron 30 ml de solución para electroforesis y 0.6 gr de agar, utilizando un termoagitador Termoline Cimarec R 2 y un mezclador magnetico; se agitó el matraz hasta alcanzar la temperatura de ebullición, retirando el matraz antes de la ebullición.

Posteriormente se dejó enfriar y se añadieron 8µl de Bromuro de Etilo, se agitó hasta diluir para después colocar la solución en un molde para su coagulación.

Después de coagular, el gel 2% agarosa se sumergió en la solución para electroforesis que contiene la cama para electroforesis y se procedió a colocar los productos de PCR en los orificios del gel.

Los 10µl de mezcla (8µl de producto de PCR y 2µl de colorante 6X ) se colocaron en el gel 2% agarosa, en cada orificio se separando las muestras, controles, blanco y en este paso se añadió un marcador de peso molecular para ADN.

Después de colocar cada una de las muestras, con ayuda de un aparato para electroforesis se le aplicó 80 Volts por 25 minutos al gel. Al termino de este tiempo los resultados fueron observados con ayuda de una meza de luz ultravioleta 3uv TM Transilluminator y fotografiados con una cámara Polaroid Gel Cam mostrando resultados como se muestra en la figura 6 y 7.

### 1.3 RECOLECTA DE SUBPRODUCTOS LIBRES DE WSSV.

El muestreo se realizó durante el periodo comprendido del 25 de Julio al 4 de Agosto del 2001, en donde se tomaron muestras para diagnostico por PCR en el CRIP de Mazatlán. La recolecta se hizo durante la cosecha de una granja ubicada en el centro del estado de Sinaloa. Se descabezaron 150 kg de camarón en la granja y las cabezas se colocaron dentro de bolsas de dos kilos, las cuales se acomodaron dentro de dos hieleras de 50 kg c/u, a las que se les agregó hielo en la base y parte superior después de colocar las cabezas. Se transportaron las hieleras a una congeladora, se destaparon y se mantuvieron en un cuarto frío por 72 horas a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente se colocaron las bolsas con las cabezas dentro de hieleras de polipropileno con una cama de hielo seco en la base y otra en la parte superior, las hieleras se sellaron con cinta canela y se metieron dentro de bolsas grandes las cuales se introdujeron dentro de cajas de cartón bien selladas, y se enviaron a la Universidad Autónoma de Nuevo León en Monterrey, en donde se guardaron en un cuarto frío ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) hasta su procesamiento (Tiempo aproximado de envío hasta su recepción 10 Horas).

### 1.4 RECOLECTA DE SUBPRODUCTOS DETECTADOS POSITIVOS A WSSV.

El muestreo de subproductos WSSV positivo se realizó durante el periodo comprendido del 11 al 20 de octubre del 2001. Se realizaron dos recolectas, la primera en el municipio de Guasave, donde se había detectado una muestra positiva a WSSV en el mes de Julio. El lote detectado positivo fue recolectado por personal del CRIP en una congeladora después de ser descabezado (tiempo estimado, desde la cosecha hasta su recepción en una congeladora de los Mochis, 12 horas en hielo), los 50 kg colectados se mantuvieron en refrigeración por un lapso

de 12 horas y se transportaron en hieleras a Mazatlán Sinaloa (6 horas de camino), de donde se tomaron muestras para diagnóstico por PCR y confirmar la presencia de WSSV. Manteniéndose en congelación por un lapso de 72 horas a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente se colocaron en bolsas dentro de hieleras de polipropileno con una cama de hielo seco en la base y otra en la parte superior. Las hieleras se sellaron con cinta canela y se metieron dentro de bolsas grandes, se introdujeron dentro de cajas de cartón bien selladas, y se enviaron a la Universidad Autónoma de Nuevo León en Monterrey, donde se conservaron en un cuarto frío ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) hasta su procesamiento (10 horas aproximadamente de transporte).

La segunda recolecta se realizó en Cd. Obregón, dentro de una congeladora en donde se espero a que llegaran tres taras de 50 kg c/u con camarón de una granja que dio positivo a WSSV, diagnosticado por el CIBNOR en septiembre del 2001, estas taras fueron marcadas para no confundirlas con las demás. En el mismo día en que llegaron las taras se descabezaron los camarones y las cabezas se guardaron en bolsas dentro de hieleras de polipropileno destapadas, las cuales se metieron al cuarto frío (dentro de la misma Procesadora de alimentos a  $-70^{\circ}\text{C}$  por un lapso de 48 horas). Posteriormente, las cabezas se sacaron del congelador, se taparon, se metieron dentro de cajas y se sellaron para ser enviadas a la UANL, el transporte de estas hieleras en el vuelo hasta Monterrey sería de 10 horas, pero en realidad la compañía que realizó el envío, lo entregó 26 horas después.

## 2. PROCESAMIENTO DE MUESTRAS

La preparación de los productos se realizó en la Universidad Autónoma de Nuevo León 30 días después de la recolecta), para evitar contaminación se procesaron primeramente los subproductos no infectados y posteriormente los positivos a WSSV de la primera recolecta realizada en el municipio de Guasave.

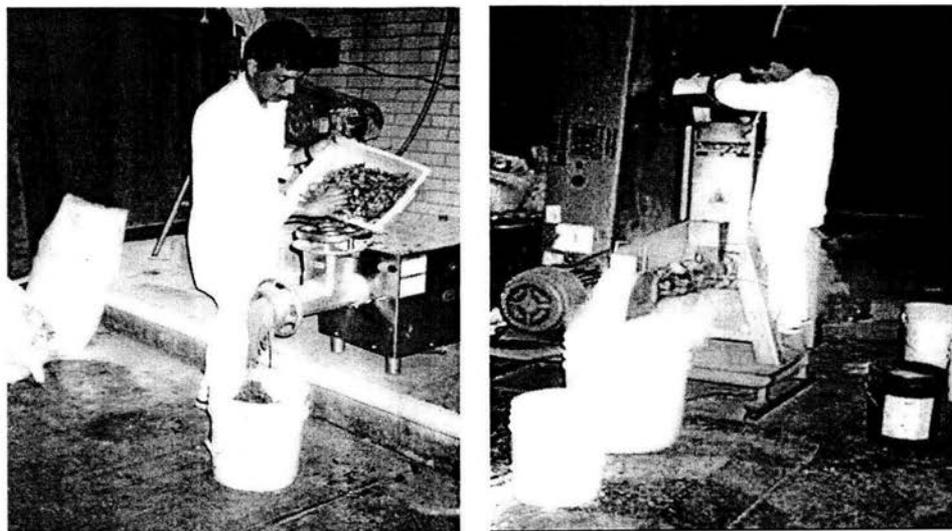
Los subproductos se sacaron del congelador, se pesaron 15 kg de subproductos, se molieron en un molino de carne Torrey (Figura 2) y se mezclaron en una mezcladora modelo con 35 kg de pasta de soya Teksoy, la humedad final de esta mezcla fue de 28% para el caso de subproductos no detectados positivos a WSSV, y de 29.7% para los subproductos detectados positivos a WSSV. Las mezclas se guardaron en el cuarto frío a  $-20^{\circ}\text{C}$  y 48 horas después cada mezcla se paso por el extrusor, el cual se calentó previamente con parte de la mezcla preparada. La temperatura alcanzada en el momento de extruir osciló entre los  $110^{\circ}\text{C}$  y  $120^{\circ}\text{C}$  y la corriente eléctrica alcanzada osciló entre 40 y 50 amperes.

Las mezclas extruidas se secaron a temperatura ambiente por 24 horas y se guardaron en bolsas de plástico.

Las mezclas se procesaron en un extrusor Insta-Pro 600 (Figura 2), con las siguientes condiciones:

Tornillo de alabe sencillo	
Configuración del tornillo (secuencia de anillos de presión)	600-10/600-08/600-08/600-08
Velocidad de alimentación	70 r.p.m.
Cono de salida (diámetro interno)	8mm de diámetro
No. de vueltas del cono de salida	6

Se monitoreó el proceso de extrusión registrando las variaciones de la temperatura y amperaje cada 20 seg. durante el tiempo que duró la transformación de la mezcla. De estos coextruidos se tomaron 5 gramos de muestra y se fijaron en alcohol al 90% para un diagnóstico posterior de WSSV, IHNNV y STV por PCR (Lightner, 1996).



**Figura 2.** Molienda y extruido de subproductos de camarón en la Universidad Autónoma de Nuevo León

De todo este proceso se obtuvieron los siguientes insumos para evaluar en los bioensayos con camarón sano y en el diagnóstico con PCR.

**Tratamiento 1. SUBPRODUCTOS INFECTADOS SIN EXTRUIR:** De la mezcla de subproductos infectados molidos y pasta de soya se tomó una muestra de 2 Kg, y se mantuvo en congelación a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su uso en los bioensayos y diagnóstico por PCR

**Tratamiento 2. SUBPRODUCTOS INFECTADOS EXTRUIDOS:** Mezcla de Pasta de Soya con Subproductos positivos WSSV extruidos. Esta muestra de 2 Kg. se conservó a temperatura ambiente dentro de bolsas hasta su uso en los bioensayos y diagnóstico por PCR

**Tratamiento 3. SUBPRODUCTOS DE CAMARÓN LIBRE DE WSSV EXTRUIDOS:** Mezcla de Pasta de Soya y Subproductos no detectados positivos a WSSV, extruidos, 2 kg Esta muestra se conservó a temperatura ambiente hasta su uso en los bioensayos.

**Tratamiento 4 CABEZA DE CAMARÓN INFECTADA MOLIDA.** Se molió la cabeza de camarón infectada y se mantuvo en congelación a  $-5^{\circ}\text{C}$  hasta la realización de los bioensayos y diagnóstico por PCR, y a  $-10^{\circ}\text{C}$  durante la realización de los bioensayos.

### 3. BIOENSAYOS PARA EVALUAR LA VIABILIDAD DEL WSSV EN SUBPRODUCTOS EXTRUIDOS Y NO EXTRUIDOS.

La realización de los bioensayos se llevo a cabo en el CIBNOR bajo la dirección de Dr. Marco Linne, para llevar a cabo la prueba de cuatro insumos, Tratamiento 1, Tratamiento 2, Tratamiento 3 y Tratamiento 4. Se utilizaron 13 acuarios de 50 litros cada uno, en cada acuario se instalaron 10 camarones de estadio postlarva 20 *L. vannamei* libres de WSSV, verificados por PCR, de peso promedio 0.07 g, aproximadamente. Cada tanque recibió aireación por medio de un solo difusor que fue cubierto con un plástico para impedir la fuga de los animales, los acuarios se llenaron con agua de mar previamente en reposo y al iniciar el llenado se tomó una muestra de esta agua para determinar el estado de los nutrimentos, y posteriormente al séptimo día de iniciados los bioensayos se realizó un muestreo diurno en periodo de 24 horas, con tomas de muestra cada 4 horas. Los animales se alimentaron con los tratamientos a saciedad, durante los 15 días que duro el experimento. Es importante mencionar que los tratamientos se complementaron con un alimento elaborado comercialmente, ya que el producto obtenido de la extrusión de subproductos no cubre todas las necesidades nutricionales de los organismos.

La biomasa de camarón por acuario fue determinada al principio del estudio. Tres acuarios se alimentaron con el Tratamiento 1, tres con el Tratamiento 2, tres con el Tratamiento 3 y tres con el Tratamiento 4 y 1 con un alimento comercial (para comprobar la inocuidad de este alimento). Los camarones se alimentaron en dos proporciones por día, a las 9 AM con tratamiento 1, 2, 3 y 4, y a las 6 PM con alimento comercial. La alimentación de los organismos se llevó a cabo de acuerdo con la siguiente tabla:

Acuario No.	No. de Camarones totales	Dieta.	Forma de Alimentación	
			9 AM	4 PM
1, 2, 3.	30	Tratamiento 1	X	
		A. Comercial		X
4, 5, 6.	30	Tratamiento 2	X	
		A. Comercial		X
7, 8, 9.	30	Tratamiento 3	X	
		A. Comercial		X
10, 11,12	30	Tratamiento 4	X	
		A. Comercial		X
13	10	A. Comercial		

Un recambio de agua del 20% se realizó en todos los tanques cada día y cada tanque se sifoneó para eliminar el exceso de alimento y heces, antes de cada alimentación matutina. La temperatura del agua y Oxígeno disuelto se midieron antes de cada una de las dos alimentaciones diarias con un multisensor TSI 85, la salinidad se midió diariamente con un refractómetro modelo 2949-41. Para prevenir contaminaciones cruzadas se usó un equipo diferente para cada acuario control y problema, además de colocar el agua y material de desecho en un tanque con cloro (200 ppm de cloro libre) para su desinfección antes de ser desechada.

Cuando se detectaron animales moribundos se retiraron de los acuarios y se fijaron en solución Davidson para análisis histológicos siguiendo el método estándar (Lightner, 1996).

En el día 13 del bioensayo se dejó de alimentar a los organismos, para que se limpiara el intestino de los alimentos aplicados.

Al término del experimento en el día 15, todos los camarones se contaron, se pesaron en una balanza Ohaus (de 0.01g. de sensibilidad) y se fijaron para su posterior análisis por PCR e Histología de rutina, evaluando en cada acuario el porcentaje de crecimiento y la tasa de sobrevivencia.

$$\text{Porcentaje de crecimiento} = \frac{\text{Peso final} - \text{Peso inicial}}{\text{Peso inicial}} \times 100$$

$$\text{Porcentaje de sobrevivencia} = \frac{\text{No. final de organismos}}{\text{No. inicial de organismos}} \times 100$$

Los análisis de calidad de agua fueron realizados por el Laboratorio de Calidad de Agua y Sedimentos del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste Unidad Guaymas. El día de inicio de los bioensayos se tomó una muestra de agua de mar, utilizada en el llenado de los acuarios, considerada como control (MC). Posteriormente, al séptimo día, se realizó un muestreo de agua de los acuarios en periodo de 24 horas, con tomas de muestra cada 4 h. Se inició a las 9:00 a.m. con muestreos a las 13:00, 17:00, 21:00, 1:00, y 5:00. Se realizó el análisis de nutrientes tales como fosfatos, amonio, nitritos y nitratos por medio de técnica en micro placa de acuerdo con Hernández-López *et al*, 1999.

#### 4. PROCESO HISTOLOGICO

##### Fijación y preservación.

El proceso Histológico se llevo a cabo dentro del CIBNOR, para ello, los organismos se fijaron en solución Davidson por 24 horas y posteriormente se pasaron a una solución de alcohol etílico al 70%.

Una vez obtenidas las muestras fijadas, se colocaron en cassetes de plástico, los cuales contenían la siguiente información:

- Número de la muestra
- Tratamiento
- Fecha

##### Proceso de deshidratación e inclusión.

Se utilizó el aparato de deshidratación modelo 4640-B de la Tissue Tek.

##### Deshidratación

- Alcohol 70°                    1 hora
- Alcohol 70°                    1 hora
- Alcohol 80°                    1 hora
- Alcohol 80°                    1 hora
- Alcohol 95°                    1 hora
- Alcohol 95°                    1 hora
- Alcohol 100°                   1 hora
- Alcohol 100°                   1/2 hora
- Alcohol 100°                   1/2 hora

### Aclaración

- Alcohol-Xilol 1 hora
- Xilol 15 minutos

### Inclusión

- Parafina I 1 hora
- Parafina II 1 hora
- Parafina III 1 hora

### Proceso de inclusión:

Para obtener el bloque se utilizó un centro de inclusión, modelo Histoembeder, este consta de un depósito de parafina, una placa fría y una caliente. Cabe señalar que la parafina utilizada fue "Paraplast X-tra" con un punto de fusión de 54° a 56° C. Para hacer los bloques se utilizan cajas especiales de plástico o metal. Una vez que se obtiene el bloque, se procede a realizar el corte fino del tejido con un micrótopo de rotación (modelo Leica 2040 Reicher Jung) de 5 a 8 micrómetros de grosor.

### Corte (micrótopo).

Se procedió de la siguiente manera:

- Corte del bloque: Se quitó el exceso de parafina que rodea al tejido.
- Fijación del bloque y orientación: El bloque fue colocado en el porta bloques del micrótopo y la orientación se obtuvo mediante un sistema de rótula, el plano del corte está determinado por la orientación de la cuchilla.
- Corte y extensión: los cortes tuvieron un grosor entre 4 y 8 micras como máximo, después de cortar, los cortes se extendieron y se colocaron sobre el portaobjetos. El principio de la extensión se basa en la dilatación de los cortes por calor. Para que este se efectúe libremente, se hace flotar el corte sobre un líquido, el cual contiene una sustancia adhesiva, y luego se somete a una temperatura ligeramente inferior al punto de fusión de la parafina.

Para facilitar la extensión del corte se prepara una solución de alcohol al 30 %, y se colocan unas gotas en el portaobjetos conteniendo el corte entre ellos, antes de ser pasado al baño de flotación a 20°C + gelatina, este paso facilita la extensión del corte, posteriormente se coloca en una mufla de 5 a 6°C para su secado.

### Coloración (tinción de hematoxilina-eosina).

Está es una coloración ácido-básica, por lo que los componentes ácidos tienen una afinidad con la eosina y se tiñen de rosa a rojo, los componentes básicos se tiñen de azul a morado. A continuación se describe el modo de empleo de la tinción:

- Hemo-de 5 minutos
- Hemo-de 5 minutos
- Alcohol etílico al 100% 10 baños
- Alcohol etílico al 100% 10 baños
- Alcohol etílico al 95% 10 baños
- Alcohol etílico al 95% 10 baños
- Alcohol etílico al 80% 10 baños
- Alcohol etílico al 80% 10 baños
- Agua destilada 6 enjuagues
- Hematoxilina 4-6 minutos
- Baño de agua corriente 4-6 minutos
- Eosina 2 minutos
- Alcohol etílico al 95% 10 baños
- Alcohol etílico al 95% 10 baños
- Alcohol etílico al 100% 10 baños
- Alcohol etílico al 100% 10 baños
- Hemo-de 10 baños
- Hemo-de 10 baños

1. **Desparafinación:** Las láminas son cubiertas con la solución de xilol (I, II, III) durante 5 minutos c/u. (Se substituyó por Hemo-de)

2. **Aclaración:** se colocó una solución de Carbol-Xilol-Creosota durante 3 minutos.

3. **Hidratación:** Posteriormente se cubrieron con alcohol a diferentes concentraciones.

- Alcohol 100° 5 minutos
- Alcohol 95° 5 minutos
- Alcohol 70° 5 minutos
- Agua destilada 5 minutos

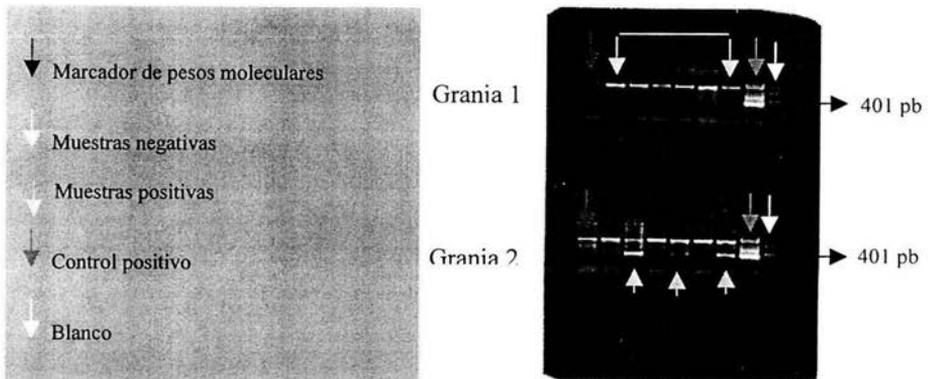
#### 4. Tinción:

- Se cubrieron con la solución de hematoxilina férrica 5 minutos.
- Lavar rápidamente con agua corriente 3 minutos.
- Lavar con agua destilada 2 minutos

- Se cubrieron los portaobjetos con la solución de eosina 4 minutos.
- 5. **Deshidratación:** Se deshidratan con alcoholes de concentraciones crecientes
  - Alcohol 95°                      5 minutos
  - Alcohol 100°                    5 minutos

Posteriormente se montaron las muestras en resina sintética.

**RESULTADOS DE MUESTRAS COLECTADAS EN GRANJAS**



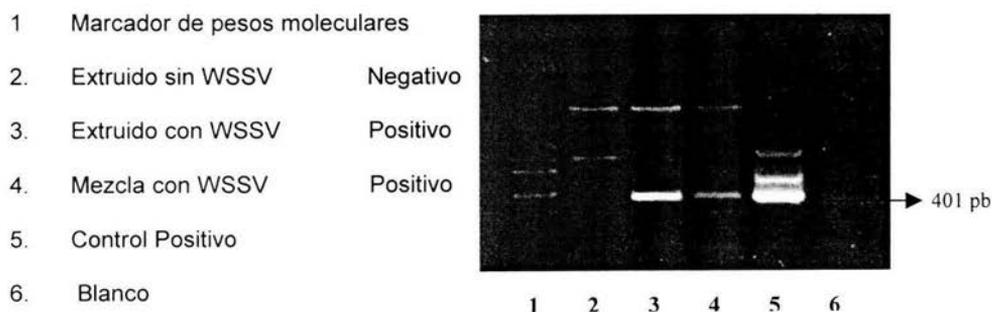
**Figura. 3.** Resultados de las pruebas de PCR que se aplicaron en el monitoreo de dos granjas, las flechas amarillas indican la presencia de WSSV en la segunda granja

En las pruebas de PCR que se aplicaron a las muestras para detectar la presencia /ausencia de WSSV, se encontró que algunas granjas presentaban el patógeno desde los inicios del ciclo como se observa en la Figura 3, que muestra el diagnóstico de dos granjas monitoreadas el mismo día antes de presentarse el Huracán Juliett.

La granja 1 dio negativo a PCR, mientras que la granja 2 se detecta positiva a WSSV en camarones de 18 gr. de talla promedio.

## RESULTADOS DEL DIAGNÓSTICO REALIZADO A LAS MUESTRAS EXPERIMENTALES EN DIFERENTES FASES DE PROCESAMIENTO.

El monitoreo de las muestras de subproductos, se realizó con el fin de evaluar el efecto de los diferentes procesos sobre la presencia ausencia del WSSV. La Figura 4 muestra como en los insumos obtenidos con subproductos infectados (banda 3 y 4) dan positivo a WSSV aun después de ser pasados por un proceso como molienda, mezclado y extruido.



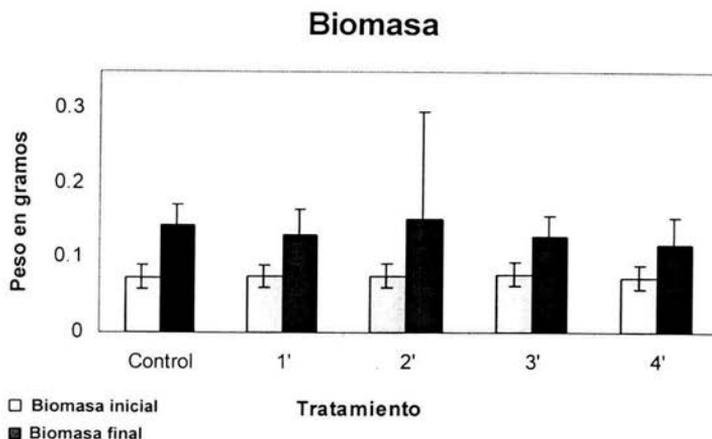
**Figura. 4** Diagnostico de PCR realizado a las muestras tomadas de cada proceso de transformación (molienda, mezclado y extruido )

## RESULTADO DE LOS BIOENSAYOS

**Tabla 1.** Porcentaje de crecimiento y parámetros medidos en cada acuario durante la realización de los bioensayos.

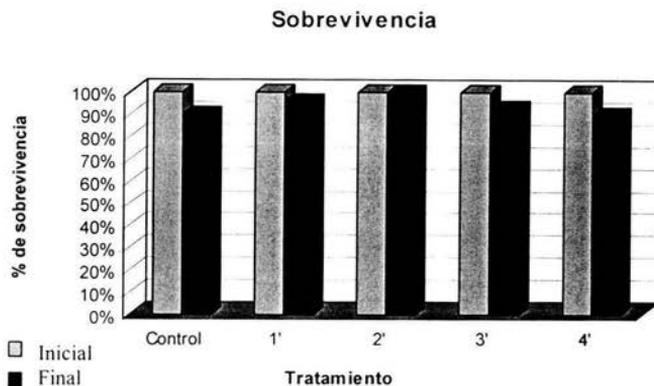
NO. DE ORGANISMOS	TRATAMIENTO	% DE CRECIMIENTO	TASA DE CRECIMIENTO g/ SEMANA	% DE SOBREVIVENCIA	TEMP. PROM. °C	SALINIDAD PROM. ppm	OXIGENO PROM. ppm
10	Control	75.67	0.028	90	20.69	38	9.1
10	T1	66.99	0.025	96	20.63	38	9.36
10	T2	80.80	0.038	100	20.63	38	9.23
10	T3	54.24	0.021	93	20.50	38	9.23
10	T4	43.34	0.016	90	20.35	38	9.10

En la realización de los bioensayos, se colocaron 10 organismos por acuario con dos replicas por tratamiento, utilizando en total 130 para la prueba de los cuatro tratamientos, el porcentaje de crecimiento fue variado, en la mayoría de los tratamientos, los organismos crecieron más del 50% de su peso en gramos a excepción del tratamiento 4 quien presento un valor por debajo del 50%. La tasa de crecimiento presentó intervalos de 0.016 a 0.038 g/semana. El porcentaje de sobrevivencia se mantuvo por arriba del 90% en todos los acuarios. La temperatura se mantuvo en un rango promedio de 20.35- 20.69 °C. La salinidad no mostró variación manteniéndose en los 38 ppm y la concentración de oxígeno mantuvo un rango de 9.1 ppm – 9.3 ppm, no encontrando una variación significativa que afectara en la prueba de los bioensayos. Tabla 1.



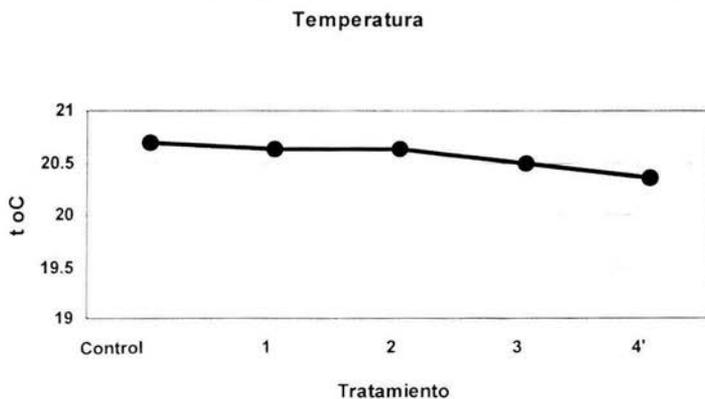
**Figura 5.** Biomasa inicial y final promedio de cada acuario en los diferentes tratamientos

La alimentación de los organismos se realizó dos veces al día, por la mañana se administraban los tratamientos y por la tarde alimento comercial. La Figura 5 muestra el incremento de biomasa que se dio en cada acuario, en ella se observa que la mayoría de los organismos sobrepasó el 0.1 g. de crecimiento promedio en todos los tratamientos.



**Figura 6.** Porcentaje de sobrevivencia presente en cada acuario durante la aplicación de los diferentes tratamientos

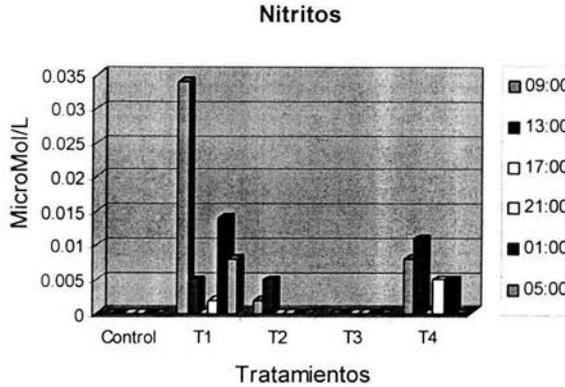
En la mayoría de los acuarios los organismos sobrevivieron al periodo de aplicación de los tratamientos, logrando un porcentaje de sobrevivencia arriba del 90% como se muestra en la Figura 6.



**Figura 7.** Temperatura promedio del agua en cada acuario durante los diferentes tratamientos

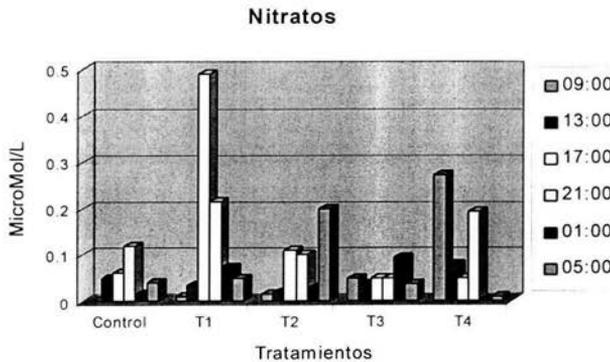
La temperatura promedio en cada acuario se mantuvo en un rango de 20.35 a 20.63 °C, no encontrando una variación significativa.

EFFECTO DE LOS INSUMOS EVALUADOS SOBRE LA CALIDAD DEL AGUA



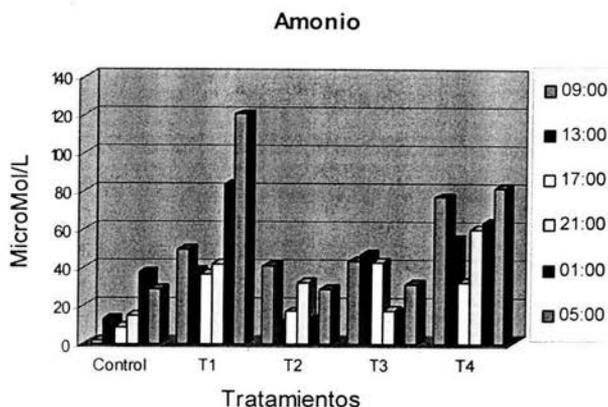
**Figura 8.** Concentración de nitritos en los diferentes tratamientos (valores obtenidos de un acuario por tratamiento)

Los nitritos registraron un promedio de 0.003  $\mu\text{Mol/l}$ , un mínimo de 0 y un máximo de 0.034  $\mu\text{Mol/l}$ . En la muestra control, el T2 y T3, no se detectó la presencia de nitritos, pero en el T1 y T4 la concentración fue elevada. En general para nitritos no se observa un patrón definido, teniendo alta variabilidad entre los tratamientos en diferentes horas del muestreo Figura 8.



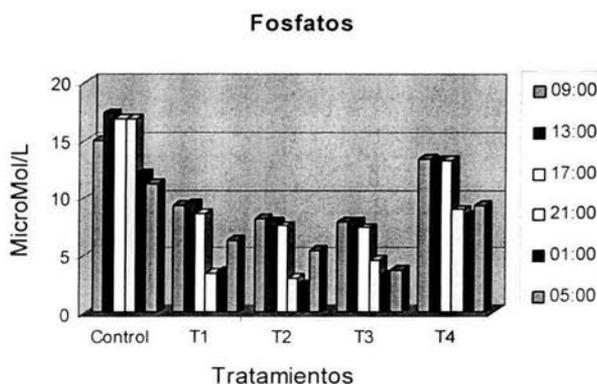
**Figura 9.** Concentración de nitratos en los diferentes tratamientos (valores obtenidos de un acuario por tratamiento)

Los nitratos presentaron un promedio de 0.085  $\mu\text{Mol/l}$  un mínimo de 0 y máximo de 0.490  $\mu\text{Mol/l}$ . La muestra control y el T3 registraron una concentración muy similar, mientras que en los tratamientos 1, 2 y 4 las concentraciones fueron mas elevadas Figura 9.



**Figura 10.** Concentración de Amonio en los diferentes tratamientos (valores obtenidos de un acuario por tratamiento)

El amonio presentó un promedio de  $39.41 \mu\text{Mol/l}$ , un mínimo de  $1.73$  y un máximo de  $120.54 \mu\text{Mol/l}$ . Se observa una tendencia de aumento en la concentración de amonio, resalta el pico registrado en el tratamiento 1 de  $120.5 \mu\text{Mol/l}$ , y la concentración elevada del tratamiento 4. En general existe una amplia variabilidad entre las cinéticas de amonio producida por cada tratamiento Figura 10.



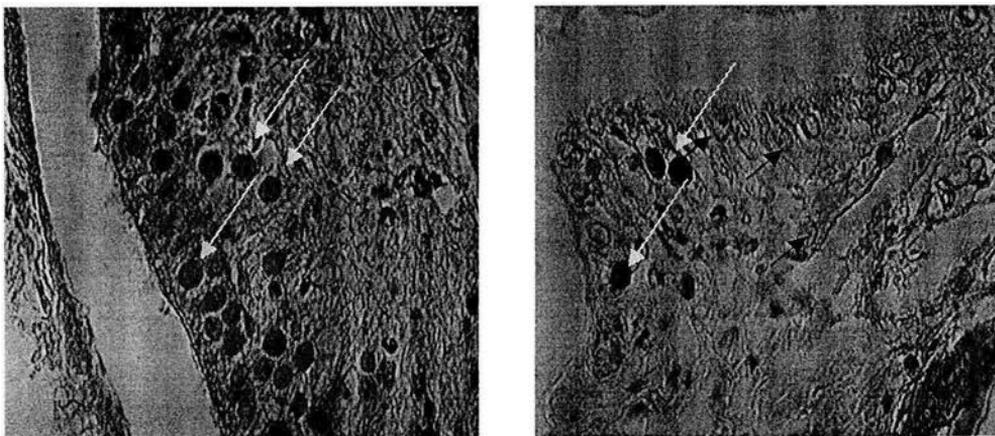
**Figura 11.** Concentración de Fosfatos en los diferentes tratamientos (valores obtenidos de un acuario por tratamiento)

Por último en los fosfatos, se registró un promedio diario de  $8.87 \mu\text{Mol/l}$ , con un mínimo de  $2.5$  un máximo de  $17.4 \mu\text{Mol/l}$ . Conforme transcurre el muestreo diario, las muestras de cada tratamiento disminuyen su concentración de fosfatos; esta tendencia se presentó en todos los tratamientos. La concentración promedio de fosfatos más alta se registró en el control y la más baja en el tratamiento 2. Se

observa una variabilidad moderada entre las muestras de los tratamientos y entre los tratamientos Figura 11.

#### HISTOLOGIA REALIZADA EN LOS ORGANISMOS DEL BIOENSAYO.

Los resultados histológicos de los organismos utilizados en el bioensayo, no muestran signos de infección viral por WSSV, en cada organismo analizado las células se muestran de forma normal en ellas se puede apreciar claramente el núcleo característico de una célula libre de WSSV( Figura13). La Figura 12 muestra la histología realizada en un organismo infectado con WSSV, las fotografías ejemplifican como se manifiesta la infección viral por WSSV en los tejidos de la cámara gástrica de un organismo *L. Vannamei*, en ellas se observan células con núcleos hipertrofiados indicadas por las flechas blancas.



**Figura 12.** Fotografías de la cámara gástrica de un organismo infectado con WSSV, las cuales representan como se manifiesta el virus de WSSV dentro del tejido. Las flechas rojas, muestran una célula aparentemente normal, las flechas verdes muestran los cuerpos de inclusión de WSSV. Amplificación 900X



**Figura 13.** Tejido epitelial de la cámara gástrica de un organismo *L. Vannamei* utilizado en los bioensayos. No se observan cuerpos de inclusión de WSSV. Amplificación 1300X

## DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La colecta de los subproductos se llevo a cabo en 2 granjas de los estados de Sonora y Sinaloa, para la identificación de las granjas se contó con el apoyo de varias instituciones y se consulto a una serie de personas relacionadas con el cultivo de camarón, quienes proporcionaron una valiosa información de los granjas que se encontraban infectadas con este patógeno, así como la contaminación hacia otras después de presentarse el fenómeno natural del huracán Juliett (Anexo II). Es importante mencionar que fu difícil localizar las granjas infectadas ya que debido a los lineamientos impuestos par la prevención y control de este patógeno, los productores no facilitan la información y con el fin de no perder la cosecha por lo que invierten, prefieren ocultar la presencia del patógeno.

En cuanto a los alimentos procesados, la detección de WSSV, en los insumos preparados, la realizaron tres laboratorios por separado, CIBNOR; CRIP- Mazatlán y El Laboratorio de Diagnóstico Patológico de la Universidad de Arizona, coincidiendo los tres en confirmar la presencia de WSSV en los insumos (cabeza molida infectada, cabeza molida infectada mezclada con pasta de soya, y cabeza molida mezclada con pasta de soya extruida, lo que manifiesta claramente la presencia del patógeno. Durante la preparación de los insumos se tuvo especial cuidado de no contaminar los subproductos libres de WSSV y la realización del monitoreo de los procesos se realizo con el fin de confirmar que el patógeno se encontraba presente , lo que efectivamente ocurrió, ya que los tres laboratorios que diagnosticaron por PCR coincidieron en detectar la presencia del patógeno.

En relación a los bioensayos, el porcentaje de crecimiento fue muy variado, en un Manual de Cultivo de Camarón en México de BANCOMEXT (1999) se menciona que el crecimiento de los organismos depende de factores como: especie, variedad, alimento, diferencias nutricionales, etc. Con respecto a la especie, mencionan que las tasas de crecimiento para *L. Vannamei* en condiciones de cultivo, varían entre 0.4 y 1.5 gramos por semana, con cuatro alimentaciones diarias durante el primer mes para postlarva. En este caso las tasas de crecimiento se mantuvieron muy por debajo de este rango, pues aunque el alimento se aplico *ad libitum* solo se administro dos veces al día, encontrando que la mayoría de los organismos aumentaron su biomasa en promedio 50% de su peso

La salinidad se mantuvo constante en 38 ppm. Páez (2001) señala que para *L. Vannamei* Boyd (1989) establece valores de 15 a 25 ppm como ideales para cultivo, sin embargo aclara que puede ser cultivado con buenos resultados en salinidades inferiores o superiores, marcando para *L. Vannamei* una concentración de 45 ppm como máximo, que permite el crecimiento y sobrevivencia. También

menciona que en diversas granjas del sur de Sinaloa, se ha trabajado hasta con salinidades de 59 ppm en la época de sequía.

En las concentraciones de oxígeno disuelto se encontraron valores de 8.5 a 9.9 ppm. Páez (2001) menciona que Boyd (1989) establece concentraciones para cultivo en granjas de camarón, de 3.5 ppm y niveles de saturación, como mejores para la sobrevivencia y crecimiento. Señala que el agua de mar superficial limpia contiene niveles cercanos a la saturación que van de 6.5 a 8.0 ppm. En este caso los valores encontrados se encuentran levemente por encima de los niveles de saturación por lo cual no se considera pueda influir en la infección con WSSV de los insumos.

La temperatura registrada tuvo un promedio de 20.5 °C. Los intervalos de temperatura para crecimiento de camarones en cultivo establecen valores de 23 a 30 °C. En este caso nuestros valores se encuentran 2.5 °C debajo de la mínima establecida, aun así la producción de postlarvas en laboratorios se mantiene con valores de 20 a 25 °C. Consideramos que la temperatura registrada cae dentro de los parámetros establecidos como óptimos para el crecimiento de la postlarva.

En la calidad de agua de los bioensayos, los nitritos registraron un promedio de 0.003  $\mu\text{Mol/l}$ . En cultivos experimentales de *L. vannamei* realizados en el área de Bahía Kino, Martínez *et al* 1995; reporta un intervalo de nitritos de 0 a 0.3  $\mu\text{Mol/l}$ . Por otra parte, Hernández *et al* (1999); observó concentraciones de 0.1 hasta 0.25  $\mu\text{Mol/l}$ , en cultivo comercial de *L. stylirostris*. Y además durante los muestreos correspondientes a un proyecto interno del CIBNOR (proyecto PEM-6 de 1996-1997) en el Estero de Bacochibampo, los nitritos registraron intervalos de 0 a 0.38  $\mu\text{Mol/l}$  (Informe interno). Analizando los datos obtenidos en el muestro diario de este bioensayo, en general se encuentran dentro de los intervalos mencionados.

Los nitratos presentaron un promedio de 0.085  $\mu\text{Mol/l}$ , Martínez *et al* (1995)., reporta un intervalo de 0.5 a 6.7  $\mu\text{Mol/l}$  de nitratos. Por otra parte, en el Estero de Bacochibampo se han encontrado concentraciones entre 1.48 y 6.28  $\mu\text{Mol/l}$  de nitratos. Los valores reportados por Martínez *et al* (1995); y los registrados en el Estero de Bacochibampo, están por encima de los obtenidos en el muestreo de este bioensayo y solo el pico observado en el T1 a las 05:00, supera dichos intervalos. En comparación con otros cultivos de camarón, las concentraciones de nitratos de este bioensayo, son bajas.

El amonio presentó un promedio de 39.41  $\mu\text{Mol/l}$ , Martínez *et al* (1995)., reporta un promedio de 0.1 a 0.4  $\mu\text{Mol/l}$ , obtenido en cultivo experimental. Por otra parte, Hernández *et al* (1999), encontró un intervalo de 1.3 a 2.35  $\mu\text{Mol/l}$ . Finalmente, en el Estero de Bacochibampo, se han registrado concentraciones entre 1.5 y 6.2  $\mu\text{Mol/l}$ . Los resultados obtenidos en este bioensayo, están muy por encima de las referencias anteriores, sin embargo, esto no representa problema para los

camarones, ya que la concentración tóxica para animales acuáticos es de 1000  $\mu\text{Mol/l}$  de amonio (Wright, 1995; Wright y col., 1996).

Es importante resaltar que todos los nutrientes analizados se encontraron en concentraciones mas altas en los tratamientos 1 (subproductos molidos mezclados con pasta de soya) y 4 (subproductos infectados molidos) que son los insumos de subproductos sin extruir, y las concentraciones mas bajas en los tratamientos 2 y 3 que son los tratamientos con subproductos extruidos. Lo que manifiesta claramente la digestibilidad de los coextruidos, tal como lo menciona Kiang (1990): "Pese a que la soya es una enorme fuente de nutrientes, debido a la cantidad y calidad de las proteínas y grasas, no puede consumirse en crudo debido a sus factores anti-nutricionales. Los inhibidores de tripsina, de ureasa y de hemaglutinina tienen un efecto negativo sobre la eficiencia de la digestión, sin embargo, este se reduce en gran medida por medio del calor, a niveles seguros".

Los fosfatos presentaron una concentración promedio de 8.87  $\mu\text{Mol/l}$ . En referencia a fosfatos, Martínez, *et al* (1995), reporta un intervalo de 0.4 a 2.7  $\mu\text{Mol/l}$ ; Hernández *et al* (1999), un intervalo de 2 a 2.8  $\mu\text{Mol/l}$  y en el Estero de Bacochibampo, se han registrado un intervalo de 2.05 a 4.31  $\mu\text{Mol/l}$ . Como se aprecia, los valores de las muestras del bioensayo son moderadamente mayores a las referencias anteriores y solo el mínimo, cae dentro de estas. Aun así es notable que el Control (alimento comercial) es quien presento la concentración mas alta.

En general se determina que en los nutrientes analizados no se evidencia ninguna anomalía que pueda influir en forma directa en los animales, principalmente, en amonio, nitritos y nitratos quienes caen dentro de los valores aceptados, no así los valores obtenidos para fosfatos en donde se reporta un valor muy por encima de los rangos normales, que no se considera como un factor de riesgo dentro del bioensayo, ya que según Páez *et al* (2001), se han reportado dentro de estanques de cultivo semintensivo e intensivo valores máximos de 6.1 y 7.4  $\mu\text{Mol/l}$  respectivamente, mencionando que el fosfato disuelto en las aguas de un estanque a lo largo de un ciclo de cultivo, sin importar la época del año, tiene la tendencia a incrementarse con el tiempo de cultivo, lo cual se relaciona con el aumento de la carga de alimento balanceado que se suministra a los estanques conforme el camarón incrementa su tamaño. El aumento en fosfatos dentro de los acuarios del bioensayo, se debió a que el alimento no se aplicó de acuerdo con la biomasa total, sino a llenar a saciedad, lo que llevó a tener gran cantidad de este balanceado comercial dentro de cada acuario, después de cada alimentación matutina.

Al detectar la presencia de DNA de WSSV en los insumos preparados y no infectar a los organismos en los bioensayos se llego a la conclusión de que el virus no se encontraba activo, ya que el diagnostico histológico y por PCR realizado en cada organismo del bioensayo al final del experimento no detectaron la presencia de WSSV en estos.

La inactivación del virus en los subproductos infectados molidos, previo a la extrusión, se atribuye a los procesos repetidos de congelación-descongelación que se dieron durante la transportación de los subproductos de Sinaloa a Monterrey, lugar donde se realizó la extrusión, así como a otros procesos de conservación, como el secado, que también pueden ser capaces de inactivar al WSSV. Chang *et al.* (1998) mencionan que a temperaturas de 40 y 55 °C por periodos de 30-90 minutos el virus queda completamente inactivo, lo que nos lleva a pensar que al descongelar y volver a congelar pasando esto en tiempos aproximados a los que menciona Chang, la estructura viral permaneció dentro de los insumos preparados, no así su actividad infectiva.

Duran *et al* (1997) describen la estructura viral del WSSV y mencionan que el virus de la mancha blanca se encuentra envuelto dentro de una capa que lo protege, si esta capa se encuentra fuera del agua tiene la posibilidad de romperse, el virus pierde su actividad, y por lo tanto su potencial de infección, lo que hace suponer que ocurrió en este caso.

Los resultados obtenidos en este experimento coinciden, en parte, con los obtenidos por Pongmaneerat. *et al.* 2001, quienes después de procesar cabezas de camarón *P. monodon* infectadas con mancha blanca, en forma de harina, encontraron que a pesar de dar diagnóstico (PCR) positivo al ser ingeridas en alimentos peletizados, no causaban la enfermedad.

Es importante mencionar que se debe tener especial cuidado en el empaquetado y envío de los subproductos, pues se deben de mantener las mejores condiciones para la conservación del virus.

## CONCLUSIONES

Es difícil obtener muestras de camarón infectado con WSSV por el problema económico que representa para el productor, pues esto hace que el productor no declare abiertamente el problema de la enfermedad

Los subproductos extruidos contaminan menos que los crudos, ya que su digestibilidad es mayor a los alimentos crudos.

El alimento balanceado comercial utilizado, produjo una alta contaminación por fosfatos.

No fue posible concluir sobre el poder inactivador de la coextrusión sobre el WSSV en subproductos de camarón, ya que el virus en el testigo positivo se inactivó antes de ese proceso.

## BIBLIOGRAFÍA

### LITERATURA CITADA

- Bortone D E.2001. "*Diseño de plantas de alimento balanceados especializados para peces y crustáceo*". En: Curso Lance Acuicultura. 48 pag.
- Botting, Ch. 1991. "*Extrusion Technology in aquaculture feed processing*". Review in Proceedings of the Aquaculture Feed Processing and Nutrition Workshop. Akiyama, D.M. and R.K.M. Ten (Editors) September 19 - 25, 1991. Thailand and Indonesia. ASA/Singapore. pp 116-120, 129-137
- Boyd, C.E. 1996. "Pond bottom soil and water quality management for pond aquaculture". Department of Fisheries and Allied Aquacultures, Auburn University, USA, 62 pp.
- Boyd C.E. 1989. "Water Quality Management and Aeration in Shrimp Farming". Fisheries and Allied Aquacultures Departmental Series No. 2, Alabama Agricultural Experimental Station, Auburn University Alabama. 70 pp
- Carver, L.A., D.M. Akiyama y W.G. Dominy, 1989. "Processing of Wet Shrimp Head and Squid Viscera with Soy Meal by a Dry Extrusion Process". ASA Technical Bulletin. 3 AQ 1689-4.
- Clifford, H. C. 1994. "Semi-intensive sensation: A case study in marine shrimp pond management", World Aquaculture, 25(3):6-18.
- Contreras, F. 1984. "Manual de Técnicas Hidrobiológicas", Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, División de Ciencias Biológicas y de la Salud, México, D.F, 149 pp.
- Cruz-Suárez E, Ricque M D. y Martínez V. J.A. 1999 "*Evaluación de dos subproductos de camarón en forma de harina como fuente proteína en dietas balanceados para *Penaeus vannamei**". Avances en nutrición acuícola I Memorias del Primer Simposium Internacional de Nutrición y tecnología de alimentos UANL Monterrey, Nuevo León, México. Programa maricultura Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL. pp 205-241.
- Chang P.S. , Chen L-J, y Wang Y-CH, 1998. "*The effect of ultraviolet irradiation, heat, pH, ozone, salinity and chemical disinfectants on the infectivity of white spot syndrome baculovirus*" *Acuaculture* 166 : 1- 17.

- Choudhury, G.S. 1995. "Application of Extrusion Technology to Process Fish Muscle. Review in: Nutrition and Utilization Technology in Aquaculture". Lim, Ch. and D.J. Sessa (Editors). AOCS Press. Champaign, Illinois, U.S.A. pp 233-245.
- Dominy, W.G y Lim. Ch. 1991. "Evaluation of soybean meal extruded with wet squid viscera as source of protein in shrimp feeds". Review in Proceedings of the Aquaculture Feed Processing and Nutrition Workshop. Akiyama, D.M. and R.K.M. Ten (Editors) September 19 - 25, 1991. Thailand and Indonesia. ASA/Singapore. pp 116-120
- Durand S, Lightner D, Redman M.R., Bonami J-M. 1997. "Ultra estructura and morphogenesis of White Spot Syndrome Baculovirus WSSV". Diseases Aquatic Organisms. June, .29, 205-211.
- Hauck, B.W. y G.R. Huber. 1989. "Single Screw vs Twin Screw Extrusion". Cereal World. November 1989. 34. 11. 929-939.
- Hernández M. M. 1999. "Programa Operativo Anual. Dirección General de Investigación en Acuicultura", Instituto Nacional de la Pesca. 27 pag.
- Hernández-Ibarra A. 1999. "Tesis de Licenciatura. Comportamiento de la Calidad de Agua en una Granja Camaronícola del Noroeste de México". Instituto Tecnológico del Mar, Unidad Guaymas. 56 pp.
- Hernández-López J., F. Vargas-Alvares y P. Hinojosa-Baltazar, 1999. "Técnicas en Micro placa para la Cuantificación de Compuestos Nitrogenados (NO<sub>2</sub>, NO<sub>3</sub> y NH<sub>4</sub>) Y Fosfatos (PO<sub>4</sub>) en Agua de Mar". 13 pp.
- Instituto Nacional de la Pesca (INP) 2000. Estado de Salud de la Acuicultura. México D. F. Capítulo XVI.
- Instituto Nacional de la Pesca (INP) 2001. Base de datos de las granjas camaronearas de los estados de Sonora y Sinaloa. Dirección General de Investigación en Acuicultura.
- Joseph, J.D. y S.P. Meyers. 1975. "Lipid fatty acids composition of shrimp meals and crustacean diets". Reprinted from Feedstuffs, September 1, 47.35.
- Kanchanaphum P, Wongteerasu Ch., Stidilokratana Ch., Boonsaeng V., Sakolpanyim, Tassanakajon A., Whithyachamnarnkul B., Flegel T.W. 1998 "Experimental Transmisión of White Spot Síndrome Virus(WSSV) from Cralos to shrimp *Penaeus monodom*." Diseases of aquatic organisms. 34:1-7.

- Kearns, J. P. 1993 "Método Wenger para la extrusión de alimentos acuícolas. Memorias del Primer Simposium Internacional de Nutrición y Tecnología de Alimentos para Acuicultura". Cruz- Suárez, L.E., D. Ricque y R. Mendoza (Editores) 22-24 de Febrero de 1993. FCB/UANL, Monterrey, N.L. México. pp 431-464
- Kiang, M.J. 1990. "La extrusion como herramienta para mejorar el valor nutritivo de los alimentos". Memorias del Primer Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. Cruz-Suárez E. Y Ricque D, Mendoza A.R. (Editores) FCB/UANL, Monterrey , N.L .pp 415-429.
- Kiang, M.J. 1994. "Reciclamiento de subproductos para la elaboración de alimentos acuáticos por medio del proceso de extrusión en seco". Memorias del Segundo Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. Mendoza A.R., Cruz-Suárez E. Y Ricque D. (Editores) FCB/UANL, Monterrey , N.L .pp 337-344.
- Lightner, D.V. 1996. A "Handbook of Shrimp Pathology and Diagnostic Procedures for Disease of Cultured Penaeid Shrimp". World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana.
- Lightner. D.V, Hasson, K. W, White.B.L, y Redman. R.M. 1998. "Experimental Infection of Western Hemisphere Penaeid Shrimp with Asian White Spot Syndrome virus and Asian Yellow Head Virus". Journal of Aquatic Animal Health 10:271-281.
- Maeda. M, Kasornchandra J, Itami T, Suzuki N, Henning O, Kondo M, Albaladejo J.D, y Takahashi Y. 1998. "Effect of Various Treatments on White Spot Syndrome Virus (WSSV) From *Penaeus japonicus* (Japan) and *P. monodon* (Thailand)". Fish Patology, 33 4:, 381-387.
- Martínez-Córdova L.R., Villareal H. Y Porchas M.A. 1995. "Culture of white shrimp *Penaeus vannamei* in reduced water exchange ponds in Sonora, México". Word Aquaculture 26 (4)
- Meyers, S.P. 1986. "Utilization of shrimp processing wastes". Infofish Marketing Digest 4/86.
- Melo del Angel A.L. 1997 "Utilización de subproductos de camarón coextruido con pasta de soya como ingrediente en dietas balanceadas para camarón *Penaeus vannamei*". Enero 1997 Tesis de M. en C. Facultad Ciencias Biológicas Div. Estudios de Postgrado UANL. Monterrey, Nuevo León. 56 pag.
- Mendoza, A. R. 1993. "Utilización de fuentes de proteína no convencionales y reciclamiento de subproductos para acuicultura". Memorias del Curso Teórico-Práctico sobre Extrusión y sus aplicaciones en Nutrición Animal. Cruz-

- Suárez L. E., D. Ricque y R. Mendoza (Editores). 12-13 de Agosto de 1993. FCB/UANL. Monterrey, N.L. México. 29 pag.
- Nicovita, camarón de mar. Boletín informativo vol. 6, Edición 06 Junio 2001, Lima Perú.
- Nunan, L.M., Poulos, B.T., Lightner, D.V. 1998 "*The detection of white spot syndrome virus (WSSV) and Yellow head virus (YHV) in imported commodity shrimp*" *Aquaculture* 160: 19-30.
- Páez O. F. 2001 "*Camaronicultura y Medio Ambiente*" Editores : Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, Programa universitario de alimentos, El Colegio de Sinaloa. Mazatlán Sinaloa, México. 452 pp.
- Pantoja, C. R. 1996. "*Principales enfermedades de camarón en México*". Memorias del Foro Internacional de Camaronicultura 96, Mazatlán, Sin. México.
- Pelcaste V. M. 1996 "*Desarrollo de Coextruido de Pasta de Soya (Glycine max) y subproductos de carpa herbívora (ctenopharyngodon idella) para nutrición de bagre (Ictalurus punctatus)*". Tesis de M. en C. en Recurso Alimenticios y Producción Acuícola. Facultad de Ciencias Biológicas Div. De estudios de Postgrado Universidad Autónoma de Nuevo León. 131 pag.
- Pongmaneerat J., Kosornachandra, J., Boonyaratpalin, S. y Boonyaratpalin, M. 2001."Effect of dietary shrimp head meal contaminated with white spot syndrome virus (WSSV) on detection of WSSV in black tiger shrimp (*Penaeus monodon* Fabricus)". *Aquaculture Research* 32 (Suppl, 1) 383-387.
- Quintero R. A. 1999 "*Aplicaciones y las tendencias de la tecnología de extrusión-cocción*". Avances en nutrición acuícola I Memorias del Primer Simposium Internacional de Nutrición y tecnología de alimentos UANL Monterrey, Nuevo León, México. Programa maricultura Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL. pp. 465-477.
- Quiong W., White L.B., Redman M.R., Lightner V.D.1999. "*Per os Challenge of Litopenaeus vannamei postlarva and Farfantepenaeus duorarum, juveniles whit six geographic isolates of White Spot Syndrome Virus*". *Aquaculture* 170 179-194.
- Royo F. Girones O. y Ania S. 1999. "*Revisión sobre la enfermedad de la mancha blanca (WSSV). Epidemiología, Diagnostico, y Métodos de Lucha*". *AcuaTIC*, #8 Noviembre España, pp 1-6
- Secretaría de Agricultura Ganadería Desarrollo Rural Pesca y Alimentación (SAGARPA). Norma Oficial Mexicana NOM- 030-PESC-2000. Que esta-

- blece los requisitos para determinar la presencia de enfermedades virales de crustáceos acuáticos vivos, muertos, sus productos o subproductos en cualquier presentación y artemia para su introducción al territorio nacional y movilización. 2002. México.
- Secretaria del Medio Ambiente Recursos Naturales y Pesca (SEMARNAP) 1999. Anuario Estadístico de Pesca. Instituto Nacional de la Pesca México D.F. 271 pag.
- Supamattaya K. Hofftmann R.W., Boonoyatotpalin S., Kanchanaphum P. 1998. "Experimental transmission of Whit Spot Syndrome Virus (WSSV) forma black tiger shrimp crab portunus pelagicus. Mud crab scylla serrata and krill Acetes sp". Diseases and organisms Vol. 32:79-85.
- Tacon, A.G.J. 1989. "Nutrición y Alimentación de Peces y Camarones Cultivados. Manual de Capacitación. Programa Cooperativo Gubernamental". Documento de Campo No. 4. Proyecto Aquila IIGCP/RLA/102 ITA. Brasil. 572 pp.
- Woodrooffe, J.M. 1993. "Dry extrusion applications in the feed industry. American Soybean Association". Technical Bulletin. A.Q.40 1993/5. pp 1-16.
- Wright, J. C., Caveney S., O'Donnell, J.M. y Reichert J. 1996. "Increases in tissue Amino acid levels in response to ammonia stress in the terrestrial isopod *Porcellio scaber* Latr". *J. Exp. Zool.* 274, 265-274.
- Wright, P. A., 1995. "Nitrogen excretion: Three end products, many physiological roles". *J. Exp. Biol.* 198, 273-281.

## LITERATURA CONSULTADA

- Boyd, C.E. 1990. "Water quality in ponds for aquaculture". Department of Fisheries and Allied Aquacultures, Auburn University, Alabama, USA, 482 pp.
- Chen, J.C. y C.T. Chen, 1996. "Changes of osmotic and electrolyte concentrations in the hemolymph of *Penaeus japonicus* exposed to ambient ammonia". Com. Biochem Physiol. 114c(1):35-38.
- Chen, J.C. y F.H. Nan, 1991. "Lethal effect of nitrite on *Metapenaeus ensis* larvae". J. Word Aquaculture Soc. 22(1):51-56.
- Chen, J.C. y F.H. Nan, 1992. Effect of ambient ammonia on ammonia-N excretion and ATPase activity of *Penaeus chinensis*. Aquatic toxicology. 23:1-10.
- Chen, J.C. y F.H. Nan, 1993." Effect of ammonia on oxygen consumption and ammonia-N excretion of *Penaeus chinensis* after prolonged exposure to ammonia". Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology. 51:122-129.
- Chen, J.C. y J.N. Lin, 1992b. "Oxygen consumption and ammonia-N excretion of *Penaeus chinensis* juveniles exposed to ambient ammonia at different salinity levels". Comp Biochem Physiol. 102c(2):287-291.
- Chen, J.C. y J.N. Lin, 1995." Responses oxygen consumption and ammonia-N excretion and Urea-N excretion of *Penaeus chinensis* exposed to ambient ammonia at different salinity and pH levels". Aquaculture. 136:243-255.
- Chen, J.C. y S.H. Lai, 1992. "Oxygen consumption and ammonia-N excretion of *Penaeus japonicus* adolescents exposed to ambient ammonia". Comp Biochem Physiol. 102c(1):129-133.
- Chen, J.C. y S.Y. Chen, 1993a. "Hemolymph PCO<sub>2</sub> hemocyanin, protein levels and excretions of *Penaeus monodon* exposed to ambient ammonia". Aquatic Toxicology. 27:281-292.
- Chen, J.C. y S.Y. Chen, 1993b. "Hemolymph osmolality, acid-base balance and shift of ammoniotelic to ureotelic excretory pattern of *Penaeus japonicus* exposed to ambient ammonia". Com Bioche Physiol. 106c(3): 733-737.
- Chen, J.C. y S.Y. Chen, 1995. "Hemolymph oxygen content, oxyhemocyanin, protein levels and ammonia excretion in the shrimp *Penaeus monodon* exposed to ambient nitrite". J. Comp. Physiol. B. 164:530-535.

- Chen, J.C. y S.Y. Cheng y C.T. Chen, 1994. "Changes of hemocyanin, protein and free aminoacid levels in the hemolymph of *Penaeus japonicus* exposed to ambient ammonia". *Com Bioche and Physiol.* 109A (2):339-347.
- Chen, J.C. y Y.Z. Kou, 1992. "Effects of ammonia on growth and molting of *Penaeus japonicus* juveniles". *Aquaculture* 104:249-260.
- Chen, J.C. y Y.Z. Kou, 1993. "Accumulation of ammonia in the hemolymph of *Penaeus monodon* exposed to ambient ammonia". *Aquaculture* 109:177-185.
- Quiróz B. S. "Evaluación de dietas con diferentes niveles de inclusión de harinas de camarón en presencia de harina de trigo o sorgo, en el camarón *Penaeus stylirostris*". mayo 1999. Facultad de Ciencias Biológicas Depto. De Ecología. UANL, Monterrey, Nuevo León. 52 pag.

## ANEXO I

**NORMA Oficial Mexicana NOM-030-PESC-2000, Que establece los requisitos para determinar la presencia de enfermedades virales de crustáceos acuáticos vivos, muertos, sus productos o subproductos en cualquier presentación y Artemia (*Artemia* spp.), para su introducción al territorio nacional y movilización en el mismo.**

Al margen un sello con el Escudo Nacional, que dice: Estados Unidos Mexicanos.- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación.

NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-030-PESC-2000, QUE ESTABLECE LOS REQUISITOS PARA DETERMINAR LA PRESENCIA DE ENFERMEDADES VIRALES DE CRUSTACEOS ACUATICOS VIVOS, MUERTOS, SUS PRODUCTOS O SUBPRODUCTOS EN CUALQUIER PRESENTACION Y ARTEMIA (*ARTEMIA* SPP.), PARA SU INTRODUCCION AL TERRITORIO NACIONAL Y MOVILIZACION EN EL MISMO.

LILIA ISABEL OCHOA MUÑOZ, Coordinadora General Jurídica de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, con fundamento en lo dispuesto en los artículos 35 fracciones IV, XXI y XXII de la Ley Orgánica de la Administración Pública Federal; 1o., 2o. y 3o. fracciones VI y VIII de la Ley de Pesca; 1o., 2o. fracciones IV, VIII, X, XIII, XV, XVI y XVII, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136 y 137 de su Reglamento; 38 fracción II, 40 fracciones I, X y XIII, 41, 44, 45, 46, 50 y 56 de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización; así como en los artículos 1o., 2o. fracciones IV, XXV y XXVI, 3o. fracciones II y III, 15 fracciones IV y XXX, 32, 33 fracción V, 35 fracción XX, 37, 39 fracciones XVI, XX, XXIII y XXIV, 42 fracciones I, II, V y VI, 49 fracciones I, II, III, IV, VI, VII, XII, XIV, XVI, XXIV, XXVII y XXIX del Reglamento Interior de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación; expido la siguiente Norma Oficial Mexicana NOM-030-PESC-2000, Que establece los requisitos para determinar la presencia de enfermedades virales de crustáceos acuáticos vivos, muertos, sus productos o subproductos en cualquier presentación y Artemia (*Artemia* spp.), para su introducción al territorio nacional y movilización en el mismo.

### INDICE

0. Introducción
1. Objetivo y campo de aplicación
2. Referencias.
3. Definiciones
4. Requisitos para determinar la presencia de enfermedades virales de crustáceos acuáticos vivos, muertos, sus productos o subproductos en cualquier presentación y Artemia (*Artemia* spp.), para su introducción al territorio nacional y movilización en el mismo
5. Grado de concordancia con normas y recomendaciones internacionales
6. Bibliografía
7. Evaluación de la conformidad
8. Observancia de esta Norma

#### 0. Introducción

0.1 Las enfermedades virales en los cultivos representan uno de los factores limitantes en el desarrollo de la acuicultura, puesto que a la fecha no se cuentan con tratamientos para su control. Aquellos virus que afectan a las especies de camarones peneidos, producen lesiones generalizadas en diferentes órganos de los ejemplares infectados causando mortalidades masivas, teniendo registros de mortalidades hasta de 100% de las poblaciones de camarón cultivado.

0.2 Entre las principales formas de dispersión de patógenos causales de enfermedades en la acuicultura, destaca el traslado de organismos vivos portadores asintomáticos de éstos, particularmente a través de la introducción al territorio nacional y movilizaciones en el mismo.

0.3 Existen registros que demuestran que algunas enfermedades virales infectan a otras especies de crustáceos y que los medios de dispersión de los virus que las causan son diversos, ya que son portadores de varias especies de crustáceos vivos, muertos, sus productos o subproductos en cualquier presentación; así como la Artemia (*Artemia* spp.) que se utiliza como alimento de las fases larvarias de camarón y otras especies de organismos acuáticos.

0.4 Existen evidencias que demuestran que los agentes causales de las enfermedades virales se dispersan mediante el agua, utensilios, equipo, vehículos, aves y otros animales.

0.5 En diversas publicaciones científicas se ha demostrado que la transmisión de los patógenos causales de las enfermedades denominadas Virus del Síndrome de Taura (TSV), Síndrome del Virus de la Mancha Blanca (WSSV) y Virus de la Cabeza Amarilla (YHV), puede realizarse de los progenitores a la descendencia, o bien, a través del agua, utensilios y otros mecanismos que pongan en contacto al patógeno con los organismos que se cultivan.

0.6. Se ha demostrado que a través de la importación de camarón congelado infectado por los virus causales de las enfermedades denominadas Síndrome del Virus de la Mancha Blanca (WSSV) y Virus de la Cabeza Amarilla (YHV), procedentes de países en los que se han detectado partículas virales de las enfermedades mencionadas, representa un alto riesgo de introducir algún virus diferente al identificado en el territorio nacional, el cual se dispersa a través de desechos sólidos y agua residual de las descargas de las plantas en las cuales se reprocessa dicho producto.

0.7. La introducción al territorio nacional y la movilización en el mismo, de crustáceos vivos, muertos, sus productos o subproductos, en cualquier presentación, así como de organismos en estado latente como los quistes de *Artemia*, bien sea con fines de cultivo, comercialización, industrialización, investigación o consumo, representa un alto riesgo de dispersión de los agentes causales de las enfermedades citadas, que pueden ocasionar pérdidas a la acuicultura y a las poblaciones naturales de crustáceos, representando, por tanto, un peligro potencial de desequilibrio ecológico.

0.8 En consideración a que las postlarvas de poblaciones naturales de camarones peneidos se capturan para abastecer las necesidades de las granjas camaronerías, se requiere el establecimiento de programas de diagnóstico y certificación de enfermedades virales en estas poblaciones y en las instalaciones en las que se mantienen una vez capturadas hasta su entrega a la granja.

0.9 La enfermedad denominada Síndrome del Virus de la Mancha Blanca (WSSV) fue detectada en granjas camarónicas y poblaciones naturales de camarones peneidos en el litoral del Golfo de México, en aguas territoriales de los Estados Unidos de América y recientemente en Centro y Sur América, mientras que la conocida como Virus de la Cabeza Amarilla (YHV) ha afectado a camarones cultivados en países de Asia, lo que ha ocasionado fuertes pérdidas económicas.

0.10 En artículos científicos publicados en diversas revistas especializadas, se ha demostrado que la enfermedad denominada Síndrome del Virus de la Mancha Blanca (WSSV) identificada en Asia, es causada por formas diferentes de este virus, pero estrechamente relacionadas entre sí.

0.11 En las instalaciones de producción acuícola de los Estados Unidos Mexicanos, recientemente se ha identificado a un virus causante de la enfermedad denominada Síndrome del Virus de la Mancha Blanca (WSSV), quedando pendiente determinar si es semejante al detectado en otros países.

0.12 Aunque se tiene vigente la Norma Oficial Mexicana NOM-010-PESC-1993, que establece los requisitos sanitarios para la importación de organismos acuáticos vivos en cualesquiera de sus fases de desarrollo, destinados a la acuicultura u ornato, en el territorio nacional, publicada en el Diario Oficial de la Federación el 16 de agosto de 1994, ésta no incluye entre las enfermedades certificables a las denominadas Síndrome del Virus de la Mancha Blanca (WSSV) y Virus del Síndrome de Taura (TSV) y aunque incluye como tal la denominada Virus de la Cabeza Amarilla (YHV), no establece regulaciones de control sanitario por lo que hace a esta última enfermedad, para especímenes acuáticos muertos, sus productos o subproductos en cualquier presentación, además de incluir regulaciones aplicables a crustáceos diferentes a camarones peneidos.

0.13 Asimismo, la Norma Oficial Mexicana NOM-011-PESC-1993, para regular la aplicación de cuarentenas, a efecto de prevenir la introducción y dispersión de enfermedades certificables y notificables, en la importación de organismos acuáticos vivos en cualesquiera de sus fases de desarrollo, destinados a la acuicultura u ornato en los Estados Unidos Mexicanos, publicada en el Diario Oficial de la Federación el 16 de agosto de 1994, exceptúa de mantener en cuarentena a todo tipo de crustáceos.

0.14 En los cultivos de camarón del territorio nacional, a partir de 1995 y hasta la fecha, se ha identificado constantemente la presencia del virus causante de la enfermedad denominada Virus del Síndrome de Taura, "Taura Syndrome Virus" (TSV), ocasionando mortalidades de magnitud variable.

0.15 A partir de la aparición de la enfermedad citada en el numeral anterior, los laboratorios productores de nauplios y postlarvas han venido desarrollando líneas resistentes a esta enfermedad.

0.16 Tomando en consideración que la enfermedad conocida como Virus del Síndrome de Taura (TSV) actualmente ya se encuentra diseminada en el territorio nacional resultaría innecesario tomar cualquier medida; sin embargo, como este virus se llega a presentar asociado al Síndrome de la Mancha Blanca (WSSV), así como al Virus de la Necrosis Hematopoyética e Hipodérmica Infecciosa (IHNN), es indispensable tomar medidas diversas.

0.17 Por las razones anteriores, es necesario establecer los requisitos para determinar la presencia de enfermedades virales de crustáceos acuáticos vivos, muertos, sus productos o subproductos en cualquier presentación y *Artemia* (*Artemia* spp.), para su introducción al territorio nacional y movilización en el mismo.

#### 1. Objetivo y campo de aplicación

Esta Norma Oficial Mexicana tiene por objeto establecer los requisitos para determinar la presencia de enfermedades virales de crustáceos acuáticos vivos, muertos, sus productos o subproductos en cualquier presentación y *Artemia* (*Artemia* spp.), para su introducción al territorio nacional y movilización en el mismo.

#### 2. Referencias

No existen normas oficiales mexicanas complementarias. Esta Norma Oficial Mexicana se complementa con:

#### 3. Definiciones

Para los efectos de esta Norma se entiende por:

3.1 **Certificado de sanidad acuícola:** es el documento emitido por la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, a través de la Dirección General de Ordenamiento Pesquero y Acuícola, de la Comisión Nacional de Acuicultura y Pesca (CONAPESCA), en el que se hace constar que los organismos que se cultivan, capturan y movilizan en territorio nacional, o se destinen a otros países o se pretendan introducir en cuerpos de agua de jurisdicción federal, están libres de las enfermedades denominadas Síndrome del Virus de la Mancha Blanca (WSSV) y Virus de la Cabeza Amarilla (YHV) y aquellas enfermedades que, en su caso, dé a conocer la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, mediante aviso que se publicará en el **Diario Oficial de la Federación**.

3.2 **Certificado de sanidad de origen:** es el documento mediante el cual la autoridad competente en materia de sanidad acuícola del país en donde se extrajo del medio natural o cultivó la especie o especies, o elaboraron sus productos o subproductos, certifica que los organismos a introducir al territorio nacional, se encuentran libres de las enfermedades denominadas Síndrome del Virus de la Mancha Blanca (WSSV), Virus de la Cabeza Amarilla; para los crustáceos acuáticos vivos que se destinen a la acuicultura, además se deberá certificar la ausencia de la enfermedad denominada Virus del Síndrome de Taura (TSV).

3.3 **Hemolinfa:** denominación que recibe la sangre de los camarones.

3.4 **Lote:** conjunto de organismos acuáticos vivos, muertos, sus productos y subproductos y *Artemia* (*Artemia* spp.) introducidos al territorio nacional, cultivados o capturados en éste, de los que se extrae una muestra estadísticamente representativa que se utiliza para el diagnóstico y certificación de enfermedades.

3.5 **Pleópodo:** cualquiera de los apéndices natales de los crustáceos.

3.6 **Producto pesquero:** las especies acuáticas obtenidas mediante su extracción, captura o cultivo, así como cualquiera de sus partes.

3.7 **Subproducto:** los productos pesqueros y sus partes después de aplicar algún proceso de transformación.

3.8 **Terceros especialistas:** son los laboratorios de diagnóstico de enfermedades en organismos acuáticos cultivados de los que se auxilia la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y

Alimentación, para evaluar la conformidad de las normas oficiales mexicanas vigentes en materia de Sanidad Acuicola, previa aprobación por la misma Secretaría con fundamento en la Ley Federal sobre Metrología y Normalización. El listado será proporcionado por la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación a través de la Dirección General de Ordenamiento Pesquero y Acuicola, de la CONAPESCA, a solicitud de los interesados.

**4. Requisitos para determinar la presencia de enfermedades virales de crustáceos acuáticos vivos, muertos, sus productos o subproductos en cualquier presentación y Artemia (*Artemia* spp.), para su introducción al territorio nacional y movilización en el mismo**

**4.1** La introducción al territorio nacional de crustáceos acuáticos vivos, muertos, sus productos y subproductos en cualquier presentación, así como la Artemia (*Artemia* spp.), podrá realizarse bajo el siguiente procedimiento:

**4.1.1** La solicitud para la introducción a territorio nacional de crustáceos acuáticos vivos para ser destinados a la acuicultura deberá presentarse utilizando el formato "SEMARNAP 05-007 solicitud de certificado de sanidad acuicola para la importación de organismos acuáticos vivos destinados a la acuicultura u ornato".

**4.1.2** La solicitud para obtener la autorización para la introducción al territorio nacional de los crustáceos acuáticos muertos, sus productos o subproductos en cualquier presentación y Artemia (*Artemia* spp.), deberá presentarse en escrito libre que contenga la siguiente información:

- I. Nombre o razón social del solicitante, domicilio, teléfono y fax, en su caso.
- II. Nombre científico y común de la(s) especie(s) o, en su caso, de los productos o subproductos
- III. País de origen y/o país de procedencia.
- IV. Nombre o razón social del proveedor, domicilio, teléfono y fax, en su caso.
- V. Número de organismos o kilogramos y presentación.
- VI. Calendario de introducciones a territorio nacional.
- VII. Lugar de entrada al territorio nacional.
- VIII. Informar la ubicación de la planta procesadora o cualquier otro sitio, según corresponda, donde se llevarán los organismos a introducir.

**4.1.3** La solicitud para obtener los certificados de sanidad acuicola a que se hace referencia en los numerales 4.1.1 y 4.1.2, para la introducción al territorio nacional de los crustáceos objeto de esta Norma, deberá presentarse ante la Dirección General de Ordenamiento Pesquero y Acuicola, de la CONAPESCA, de la Comisión Nacional de Acuicultura y Pesca, dependiente de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación o en las delegaciones de esta Secretaría en los estados, de conformidad con los procedimientos que se establezcan.

La Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación por conducto de la Dirección General de Ordenamiento Pesquero y Acuicola de la CONAPESCA, resolverá la solicitud para obtener las autorizaciones antes mencionadas, en un plazo de 15 días hábiles, contado a partir de la recepción de la solicitud, autorizando o negando la introducción.

**4.2** La introducción al territorio nacional de los embarques de crustáceos acuáticos vivos en cualquier fase de desarrollo, así como los de Artemia, sólo podrá efectuarse por los siguientes lugares:

- I. BAJA CALIFORNIA SUR: Aeropuerto Internacional de La Paz.
- II. DISTRITO FEDERAL: Aeropuerto Internacional de la Ciudad de México "Benito Juárez".
- III. ESTADO DE MEXICO: Aeropuerto Internacional de la ciudad de Toluca "Lic. Adolfo López Mateos".
- IV. JALISCO: Aeropuerto Internacional de Guadalajara "Miguel Hidalgo" y Aeropuerto Internacional de Puerto Vallarta.
- V. NUEVO LEÓN: Aeropuerto Internacional de Monterrey "Mariano Escobedo".

- VI. QUINTANA ROO: Aeropuerto Internacional de Cancún y Puerto Internacional Marítimo de Puerto Morelos.
- VII. SINALOA: Aeropuerto Internacional de Mazatlán "General Rafael Buelna".
- VIII. SONORA: Puentes Internacionales de Nogales y San Luis Río Colorado y Aeropuerto Internacional de Hermosillo "General Ignacio L. Pesqueira".
- IX. TAMAULIPAS: Aeropuerto Internacional de Tampico "Francisco Javier Mina" y Puente Internacional de Matamoros.
- X. YUCATAN: Aeropuerto Internacional de Mérida.

Mediante aviso que publique la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación en el **Diario Oficial de la Federación**, se autorizarán otros puntos de ingreso al territorio nacional que dispongan de la infraestructura y personal para la verificación de los productos que regula esta Norma.

4.2.1 En el punto de ingreso al territorio nacional, se deberán cumplir los siguientes requisitos:

I. Presentar, para su cotejo, original y copia del certificado de sanidad de origen, especificando las pruebas realizadas y los resultados obtenidos, y

- a) Tratándose de nauplios y postlarvas de camarones peneidos, la certificación de referencia deberá precisar que los progenitores existentes en la unidad de producción de tales especímenes, así como el o los lotes de organismos en estas fases de desarrollo a introducir a la República Mexicana, fueron analizados de conformidad con las especificaciones del Anexo 1 de esta Norma, utilizando la prueba de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y que se encontraron libres de las enfermedades denominadas Síndrome del Virus de la Mancha Blanca "White Spot Syndrome Virus" (WSSV), Virus de la Cabeza Amarilla "Yellow Head Virus" (YHV), y Virus del Síndrome de Taura, "Taura Syndrome Virus" (TSV) y aquellas enfermedades que en su caso dé a conocer la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación mediante aviso que se publicará en el **Diario Oficial de la Federación**.
- b) En el caso de reproductores de camarones peneidos, la certificación deberá precisar que los organismos a introducir a territorio nacional, fueron analizados de conformidad con las especificaciones del Anexo 1 de esta Norma y que se encontraron libres de las enfermedades citadas en el inciso a) de este punto.

II. Tomar muestras de cada lote, excepto para el caso de crustáceos acuáticos vivos que se destinen para el consumo humano y los reproductores de camarones peneidos. La toma de muestras se realizará de conformidad con las siguientes especificaciones:

- a) Para nauplios y postlarvas, la muestra se integrará tomando organismos de cada uno de los lotes a introducir al territorio nacional, de acuerdo con el tamaño de muestra establecido en el Anexo 1 de esta Norma.
- b) En el caso de reproductores de camarones peneidos, la muestra será tomada en la unidad de cuarentena que autorice la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, por conducto de la Dirección General de Ordenamiento Pesquero y Acuícola, de la CONAPESCA. El tamaño de muestra corresponderá al que se especifica en el Anexo 1 de esta Norma. Las muestras a tomar se integrarán con pleópodos o hemolinfa de todos los animales que constituyan la muestra, agrupando los pleópodos en conjuntos de 20, o la hemolinfa extraída de cada 20 animales. Para estos efectos el interesado deberá solicitar por escrito la presencia de personal de la Comisión Nacional de Acuicultura y Pesca (CONAPESCA) o del Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA) para que en su presencia se tomen las muestras correspondientes. Para el caso de que el personal de la Comisión Nacional de Acuicultura y Pesca (CONAPESCA) o del Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA) no asista a la toma de muestra, el interesado podrá proseguir con lo especificado en las fracciones III y IV de este apartado.
- c) Cuando se trate de Artemia, la muestra se tomará de conformidad con el Anexo 1 de esta Norma.

III. Remitir las muestras, a costa de los interesados, a cualquiera de los terceros especialistas que apruebe la Dirección General de Ordenamiento Pesquero y Acuicola, de la CONAPESCA, a fin de que se lleven a cabo las pruebas y diagnósticos utilizando la prueba de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) e informando de tal circunstancia a la Comisión Nacional de Acuicultura y Pesca (CONAPESCA) o al Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA).

IV. Una vez tomadas las muestras, los embarques de:

- a) Nauplios y postlarvas de camarones peneidos vivos deberán enviarse a las unidades de aclimatación de las instalaciones de cultivo de destino, en las que deben permanecer hasta disponer de los resultados de las pruebas y diagnósticos que se especifican en esta Norma. El agua que se utilice durante el citado periodo de aclimatación, no deberá eliminarse sin antes ser desinfectada mediante alguno de los métodos especificados en el Anexo 2 de esta Norma.
- b) Reproductores de camarones peneidos deberán someterse a un periodo de cuarentena hasta contar con los resultados de las pruebas y diagnósticos que se especifican en esta Norma.
- c) *Artemia* (*Artemia* spp.) podrá enviarse al lugar de destino, donde deberá mantenerse debidamente empacada hasta disponer de los resultados de las pruebas y diagnósticos en los que se especifique que están libres del Síndrome del Virus de la Mancha Blanca (WSSV) y Virus de la Cabeza Amarilla (YHV).

4.3. La introducción al territorio nacional de embarques de crustáceos acuáticos muertos, productos y subproductos de éstos en cualquier presentación deberán cumplir con los siguientes requisitos:

4.3.1 Realizarse únicamente por los siguientes lugares:

- I. BAJA CALIFORNIA SUR: Aeropuerto Internacional de La Paz.
- II. COLIMA: Puerto Internacional de Manzanillo.
- III. DISTRITO FEDERAL: Aeropuerto Internacional de la Ciudad de México "Benito Juárez".
- IV. JALISCO: Aeropuerto Internacional de Puerto Vallarta.
- V. QUINTANA ROO: Aeropuerto Internacional de Cancún, Puerto Internacional Marítimo de Puerto Morelos, Aeropuerto Internacional de Chetumal, Puerto Internacional de Chetumal y Puente Internacional de Chetumal, Subteniente López frontera de Chetumal con Belice.
- VI. SINALOA: Aeropuerto Internacional de Mazatlán "General Rafael Buelna".
- VII. SONORA: Puente Internacional de Nogales y Puente Internacional de San Luis Río Colorado.
- VIII. TAMAULIPAS: Aeropuerto Internacional de Tampico "Francisco Javier Mina" y Puente Internacional de Matamoros.
- IX. TIJUANA: Puente Internacional de Tijuana, Mesa de Otay.
- X. VERACRUZ: Puerto Internacional de Veracruz y Aeropuerto Internacional de Veracruz "Heriberto Jara Corona".
- XI. YUCATAN: Aeropuerto Internacional de Mérida, Puerto Internacional de Progreso.

Mediante aviso que publique la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación en el **Diario Oficial de la Federación**, se autorizarán otros puntos de ingreso al territorio nacional que dispongan de la infraestructura y personal para la verificación de los productos que regula esta Norma.

4.3.2 En el punto de ingreso al territorio nacional, se deberán cumplir los siguientes requisitos:

I. Presentar para su cotejo original y copia del certificado de sanidad de origen especificando las pruebas realizadas y los resultados obtenidos.

Se exceptúa de la aplicación de esta disposición a los productos o subproductos enlatados para consumo humano; a los cocidos a una temperatura mínima de setenta grados centígrados durante un periodo mínimo de cinco minutos; a las especies listadas en el Anexo 4 de esta Norma y aquellos productos o subproductos frescos, enhielados o congelados que acrediten legalmente que son de origen mexicano y que sean

reintroducidos al país, así como la langosta viva para consumo humano, cuando se acredite que su destino final en el país será exclusivamente un restaurante. En el caso de los "pellets", productos panificables y alimentos que han sido tratados en los términos indicados, también quedan exceptuados de la aplicación de esta disposición.

Quienes de conformidad con los señalamientos de esta Norma introduzcan al territorio nacional langosta viva para consumo humano, previo a la eliminación del agua de desecho en la que se mantuvieron estos organismos, están obligados a desinfectarla de acuerdo con los señalamientos del Anexo 2 de esta Norma.

II. Tomar muestras de acuerdo a la metodología establecida en el Anexo 1 de esta Norma (sólo en caso de crustáceos acuáticos muertos, productos o subproductos de éstos, en presentaciones de fresco o fresco congelado, a excepción de los incluidos en el segundo párrafo de la fracción anterior), en presencia de personal autorizado de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, debiendo enviarse a costa de los interesados, a cualquiera de los terceros especialistas que apruebe esta Secretaría.

III. Una vez tomadas las muestras, los crustáceos acuáticos muertos, productos o subproductos, frescos o frescos congelados, deberán remitirse a la planta procesadora o cualquier otro sitio al que se envíen las mercancías manifestado en la declaración de destino y permanecer en ella hasta en tanto se tengan los resultados de las pruebas y diagnósticos para la identificación de las enfermedades virales denominadas Síndrome del Virus de la Mancha Blanca (WSSV) y Virus de la Cabeza Amarilla (YHV).

IV. En caso de crustáceos acuáticos cocidos, deberá presentarse para su cotejo, original y copia del certificado en el que se especifique que el tratamiento térmico se llevó a cabo a una temperatura y tiempo de cocción mínimos de setenta grados centígrados durante cinco minutos, respectivamente, avalado por la autoridad competente del país de origen o de procedencia.

V. Los introductores de "pellets", productos panificables y alimentos que han sido tratados a temperaturas mínimas o mayores de setenta grados centígrados durante cinco minutos, deberán presentar en el punto de ingreso al territorio nacional, para su cotejo, original y copia del certificado expedido por la autoridad competente del país de origen en el que se especifique la temperatura y tiempo de procesamiento de estos productos.

VI. En el caso de la introducción de langosta viva, en el punto de ingreso al territorio nacional, los introductores deberán presentar por escrito el nombre, ubicación, número telefónico y de fax de los restaurantes receptores de los organismos.

4.4 Los interesados en introducir a territorio nacional crustáceos de las especies listadas en el Anexo 4 de esta Norma, así como sus productos o subproductos, deberán presentar en el punto de ingreso al territorio nacional, para su cotejo, original y copia del certificado de la autoridad competente del país de origen en el que se especifique nombre científico y nombre común de la especie o especies y latitud y longitud de la zona de captura.

4.5 Los introductores de organismos, productos o subproductos a territorio nacional que en términos de esta Norma estén obligados a la toma de muestras y realización de pruebas y diagnósticos de laboratorio, deberán entregar a la Comisión Nacional de Acuicultura y Pesca (CONAPESCA) o del Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA), a través de su Delegación en la entidad federativa del lugar de destino de las mercancías, copia con firma autógrafa de las pruebas de laboratorio realizadas y de sus resultados, en un plazo que no exceda de cinco días hábiles, a partir de la fecha en la que se hayan recibido dichas pruebas y resultados; además de remitir copia simple de dichos documentos, a la Dirección General de Ordenamiento Pesquero y Acuicola, de la CONAPESCA, de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación.

El plazo a que se refiere el párrafo anterior podrá ser ampliado por la autoridad cuando medien causas de fuerza mayor o caso fortuito, o bien cuando el interesado lo solicite y lo justifique.

4.6 En caso de que los resultados de las pruebas realizadas por el laboratorio seleccionado sean negativos, el documento que contenga tales resultados será suficiente para que el introductor disponga libremente de los organismos productos o subproductos.

4.7 Si como resultado de los diagnósticos realizados se identifica a los virus causales de las enfermedades denominadas Síndrome del Virus de la Mancha Blanca (WSSV) y Virus de la Cabeza Amarilla (YHV) y aquellas enfermedades que, en su caso, dé a conocer la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación mediante aviso que publicará en el **Diario Oficial de la Federación**, el propietario de los productos está obligado a proceder conforme se especifica a continuación:

- I. En caso de crustáceos acuáticos vivos en cualquiera de sus fases de desarrollo deberán ser regresados al país de origen o, en su defecto, proceder a su destrucción.
- II. Cuando se trate de *Artemia* (*Artemia* spp.) y crustáceos acuáticos muertos, productos o subproductos de éstos, en cualquier presentación, en los que se hubieran diagnosticado las enfermedades denominadas Síndrome del Virus de la Mancha Blanca (WSSV) y Virus de la Cabeza Amarilla (YHV), se procederá a retornarlos al país de origen, o a su cocimiento a una temperatura y tiempo de cocción mínimos de setenta grados centígrados durante cinco minutos.
- III. La destrucción de las mercancías infectadas, así como su cocción, según corresponda, deberá realizarse en presencia del personal de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, por conducto de la Comisión Nacional de Acuicultura y Pesca (CONAPESCA) o del Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA), quien levantará el acta correspondiente. En el caso de retorno al país de origen o de procedencia, tal circunstancia deberá notificarse a la misma CONAPESCA o SENASICA con una antelación mínima de dos días hábiles, mediante escrito en el que se indique fecha y lugar de salida.
- IV. Los productos infectados con los virus objeto de esta Norma deben ser procesados en una planta certificada y registrada por la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, en la que se aplique el procedimiento apropiado para prevenir la transmisión de patógenos virales al verter el líquido y desechos sólidos del proceso en corrientes de agua, todo ello de conformidad con los señalamientos de los puntos 4.10.5 y 4.10.6 de esta Norma.

En caso de que el propietario de los organismos, productos o subproductos, se niegue a realizar los procedimientos a que se refieren las fracciones anteriores, la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, por conducto de la Comisión Nacional de Acuicultura y Pesca (CONAPESCA) o del Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA), procederá a realizarlos, a costa del obligado.

4.8 Los introductores de crustáceos para el consumo humano o para su maquila en territorio nacional, deberán de someter todos los desechos sólidos de estos organismos, a un proceso de cocción mínimo de setenta grados centígrados durante cinco minutos.

4.9 La movilización dentro del territorio nacional de camarones peneidos vivos en sus distintas fases de desarrollo, *Artemia* (*Artemia* spp.) viva, en quistes, congelada, o en cualquier otra presentación que se produzca en la República Mexicana, requerirá del certificado de sanidad acuícola expedido por la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, por conducto de la Dirección General de Ordenamiento Pesquero y Acuicola, de la CONAPESCA, o por las Delegaciones Estatales de la Secretaría, de conformidad con los procedimientos que se establezcan.

4.9.1 Para la expedición del certificado para la movilización dentro del territorio nacional a que hace referencia el apartado anterior, los interesados deberán dar cumplimiento a los siguientes requisitos:

- I. Presentar la solicitud en el formato "SEMARNAP 05-006 Solicitud de Certificado de Sanidad Acuícola", publicado en el **Diario Oficial de la Federación** el 3 de marzo de 2000, el cual estará disponible en las Delegaciones del Ramo en las entidades federativas, acompañada de los resultados de las pruebas realizadas en el laboratorio y entregar dicho documento requisitado por el laboratorio que haya efectuado las pruebas correspondientes, a la Dirección General de Ordenamiento Pesquero y Acuicola, de la CONAPESCA, dependiente de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, o en las Delegaciones de esta Secretaría en los estados, de conformidad con los procedimientos que se establezcan.

II. Las muestras de los organismos a certificar deberán tomarse conforme a las siguientes especificaciones:

- a) Para reproductores silvestres que se utilicen en la producción de nauplios y postlarvas de camarones peneidos, deberán certificarse individualmente, de conformidad al procedimiento señalado en el punto 4.2.1 fracción II inciso b, para determinar la ausencia de las enfermedades denominadas Síndrome del Virus de la Mancha Blanca (WSSV) y Virus de la Cabeza Amarilla (YHV) y Virus del Síndrome de Taura (TSV) y aquellas enfermedades que, en su caso, dé a conocer la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación mediante aviso que se publicará en el Diario Oficial de la Federación.
- b) Para reproductores cultivados que se utilicen en la producción de nauplios y postlarvas de camarones peneidos, deberá procederse de conformidad con el Anexo 1 de esta Norma, para determinar la ausencia de las enfermedades denominadas Síndrome del Virus de la Mancha Blanca (WSSV), Virus de la Cabeza Amarilla (YHV) y Virus del Síndrome de Taura (TSV) y aquellas enfermedades que, en su caso, dé a conocer la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación mediante aviso que se publicará en el Diario Oficial de la Federación.  
Cuando la vida útil de los reproductores mantenidos en el laboratorio de producción así lo permita, deberán realizarse muestreos bimestrales después de haber sido desovados, de conformidad con el Anexo 1.  
Los reproductores muestreados con objeto de certificación deberán ser debidamente diferenciados o mantenidos por separado del resto de los organismos que integren el lote a ser introducido al laboratorio de producción, a efecto de no utilizarlos nuevamente en otro proceso de certificación.
- c) Para postlarvas en cualquier estadio, producidas en laboratorio, se tomará una muestra bimestral de 150 organismos, e igual número se recolectará cada vez que se reúnan 10 millones de postlarvas. Los organismos de la muestra serán obtenidos al azar de los diferentes contenedores en que se encuentren al momento del muestreo.
- d) Para postlarvas capturadas de poblaciones naturales, se realizará el primer muestreo con fines de diagnóstico de enfermedades objeto de esta Norma, colectando 150 ejemplares de los diferentes contenedores al momento de recibir el primer embarque de organismos capturados, realizándose los muestreos subsiguientes cuando la suma de los embarques recibidos sea de 10 millones de organismos, debiendo tomar la muestra correspondiente de aquellos que se encuentren en las instalaciones al momento de realizar el muestreo. Para postlarvas capturadas de poblaciones naturales, el muestreo se realizará colectando ciento cincuenta organismos por cada diez millones de postlarvas, o en su defecto, al término de la temporada si no llegara a alcanzarse esta cantidad.
- e) Para Artemia (*Artemia* spp.) viva, el muestreo se llevará a cabo según lo establecido en el inciso c) de esta fracción.
- f) Para Artemia (*Artemia* spp.) en quistes o congelada, el muestreo se realizará de conformidad con las especificaciones del Anexo 1 de esta Norma.

III. Remitir las muestras obtenidas para su análisis y diagnóstico a cualquiera de los terceros especialistas que apruebe la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, a través de la Dirección General de Ordenamiento Pesquero y Acuicola, dependiente de la CONAPESCA. Dichas muestras deberán procesarse utilizando la prueba conocida como Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Para el diagnóstico de la enfermedad denominada Virus del Síndrome de Taura (TSV), se utilizarán sondas genéticas que se encuentren disponibles comercialmente.

IV. En el caso de las postlarvas cultivadas, el laboratorio deberá informar la producción mensual estimada durante el año, así como la capacidad instalada de que dispone en sus instalaciones para estos efectos.

4.9.2 La movilización dentro del territorio nacional de reproductores, postlarvas y nauplios de camarones peneidos cultivados y capturados de poblaciones naturales, podrá efectuarse al amparo del certificado de sanidad acuicola, que expedirá la Dirección General de Ordenamiento Pesquero y Acuicola, de la CONAPESCA, dependiente de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, o en las Delegaciones Estatales de la Secretaría, de conformidad con los procedimientos que se

establezcan, con base en las pruebas de laboratorio que exhiba el interesado, en un plazo máximo de seis días hábiles, contados a partir de la recepción de la solicitud debidamente requisitada.

En el caso de postlarvas de laboratorio, el certificado de sanidad acuícola amparará la movilización de la totalidad de la producción que se obtenga de estos organismos durante los dos meses de vigencia de dicho certificado. Asimismo, su movilización podrá realizarse al amparo de los resultados de laboratorio debidamente firmados por el tercero especialista, siempre y cuando dichos resultados sean negativos a las enfermedades objeto de la presente Norma, únicamente durante el lapso comprendido entre la entrega de los resultados de laboratorio y la expedición del certificado.

4.9.3 Si como resultado de los diagnósticos realizados en reproductores y postlarvas producidos en el laboratorio o capturados de poblaciones naturales, se identifican las enfermedades denominadas Virus de la Cabeza Amarilla (YHV) o Síndrome del Virus de la Mancha Blanca (WSSV), se procederá a su destrucción o la inactivación de los virus mediante la cocción de los organismos afectados a una temperatura mínima de setenta grados centígrados durante cinco minutos. La destrucción o su cocción, según corresponda, deberá realizarse en presencia del personal de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación por conducto de la Comisión Nacional de Acuicultura y Pesca (CONAPESCA) o del Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA), quienes levantarán el acta correspondiente.

4.9.4 Si como resultado de los diagnósticos realizados sólo se identifica la enfermedad denominada Virus del Síndrome de Taura (TSV), si se permitirá la movilización de estos organismos bajo el siguiente procedimiento:

- a) **Reproductores producidos en laboratorio o capturados de poblaciones naturales**, el laboratorio de producción deberá identificar y mantener por separado a los organismos positivos a esta enfermedad y realizar los muestreos y diagnósticos necesarios de acuerdo a las fracciones II y III del punto 4.9.1. En el caso de venta, donación o intercambio de reproductores entre laboratorios, el proveedor deberá informar por escrito al comprador o destinatario de la presencia de esta enfermedad en estos organismos.
- b) **Postlarvas cultivadas**, el proveedor estará obligado a entregar por escrito en original, a sus compradores, un documento en el que asiente el nombre de la enfermedad de la que son portadores los organismos en venta.
- c) **Postlarvas capturadas de poblaciones naturales**, el proveedor estará obligado a entregar por escrito en original, a sus compradores, un documento en el que se asiente el nombre de la enfermedad de la que son portadores los organismos en venta.

4.10 La certificación y registro de instalaciones de mantenimiento temporal de postlarvas capturadas de poblaciones naturales, requerirá del certificado de sanidad acuícola expedido por la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación a través de la Dirección General de Ordenamiento Pesquero y Acuícola, de la CONAPESCA, o por las delegaciones de la Secretaría en los estados, de conformidad con los procedimientos que se establezcan.

4.10.1 Para la expedición del certificado de instalaciones de mantenimiento temporal de postlarvas capturadas de poblaciones naturales, al que hace referencia el apartado anterior, los interesados deberán de dar cumplimiento a los siguientes requisitos:

I. Presentar solicitud conteniendo la siguiente información y documentación:

- a) Dirección, teléfono y, en su caso, fax;
- b) Croquis de las instalaciones de mantenimiento, hidráulicas y de filtración de agua;
- c) Capacidad instalada y por contenedor;
- d) Programa de prevención de enfermedades y copia simple del permiso de captura expedido por la autoridad competente.

4.10.2 La Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, por conducto de la Dirección General de Ordenamiento Pesquero y Acuícola, de la CONAPESCA, expedirá el certificado correspondiente, con base en los resultados de la visita que realice personal calificado de la Secretaría a las

instalaciones de mantenimiento temporal de postlarvas capturadas de poblaciones naturales solicitantes, en un plazo de 15 días hábiles, contado a partir de la recepción de la solicitud, autorizando o negando la misma.

La vigencia del certificado de sanidad acuícola de instalaciones de mantenimiento temporal de postlarvas capturadas de poblaciones naturales, será de tres años.

**4.10.4** La renovación del certificado citado en el punto anterior, deberá realizarse con 30 días de anticipación al término de su vigencia.

**4.10.5** Los titulares del certificado de sanidad acuícola de instalaciones de mantenimiento temporal de postlarvas capturadas de poblaciones naturales están obligados a presentar a la Dirección General de Ordenamiento Pesquero y Acuícola, de la CONAPESCA, a través de la Delegación de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación en el Estado, a la Subdelegación de Pesca en la entidad federativa correspondiente, a la autoridad estatal competente en sanidad acuícola, al Instituto Nacional de la Pesca, un informe mensual de la cantidad total vendida o donada de organismos, señalando el nombre de la unidad de producción acuícola receptora y la cantidad de postlarvas vendidas o donadas.

**4.10.6** La movilización en territorio nacional de postlarvas capturadas de poblaciones naturales, se realizará conforme a las disposiciones establecidas en el apartado punto 4.9.1 fracciones I, II inciso d, III y IV y el apartado 4.9.2 de esta Norma.

**4.11.** Disposiciones generales.

**4.11.1** Para el cultivo de camarón queda prohibido el uso de alimentos basado en crustáceos frescos, excepto *Artemia* (*Artemia* spp.).

**4.11.2** Todas las muestras a que se refiere la presente Norma de los virus causales de las enfermedades denominadas Síndrome del Virus de la Mancha Blanca (WSSV) y Virus de la Cabeza Amarilla (YHV), deberán ser procesadas, utilizando únicamente la prueba de diagnóstico de la Reacción en Cadena de la Polimerasa "Polimerase Chain Reaction" (PCR). Para el Virus del Síndrome de Taura (TSV) podrá utilizarse la prueba de Inmuno-dot o hibridación in situ. Para el diagnóstico de las enfermedades objeto de esta Norma, se utilizarán además de las pruebas de laboratorio antes citadas, las que se den a conocer mediante aviso en el Diario Oficial de la Federación.

La prueba confirmatoria de los agentes causales de las enfermedades objeto de esta Norma, deberá realizarse por medio de bioensayos.

**4.11.3** La Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, por conducto de la Dirección General de Ordenamiento Pesquero y Acuícola, de la CONAPESCA, y del Instituto Nacional de la Pesca realizarán monitoreos y diagnósticos de las enfermedades virales objeto de esta Norma.

**4.11.4** Cuando se detecte la presencia de las enfermedades virales denominada Síndrome del Virus de la Mancha Blanca (WSSV) y Virus de la Cabeza Amarilla (YHV) en crustáceos importados, se procederá conforme a lo dispuesto por el apartado 4.7 de la presente Norma y, en los casos en los que se identifiquen estas enfermedades en instalaciones de cultivo de camarón que se localicen en el territorio nacional, se aplicará el siguiente procedimiento:

- I. En los estanques infectados se realizarán muestreos semanales, de conformidad con el Anexo 1 de esta Norma y se enviarán las muestras para su procesamiento a alguno de los terceros especialistas. Cuando los resultados de las pruebas realizadas durante un periodo de 30 días naturales indiquen la presencia de uno o los dos virus citados y los registros de mortalidad de los organismos sean mayores de 50% (cincuenta por ciento), se deberá llevar a cabo la cosecha de los organismos. Aquellos que se encuentren entre 0 y 6 gramos se remitirán sin descabezar a una planta procesadora para su cocción a una temperatura mínima de 70 grados centígrados durante cinco minutos. Aquellos mayores de 6 gramos se remitirán para su procesamiento por congelación a una planta que certifique y registre la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación por conducto de la Dirección General de Ordenamiento Pesquero y Acuícola, de la CONAPESCA, y en las Delegaciones de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación en los estados, de acuerdo a lo establecido en el punto 4.11.5 de esta Norma.

Los vehículos utilizados en el transporte de los organismos previamente referidos deberán de contar con sistemas de control de líquidos comúnmente conocidos como trampas para líquidos.

- II. **Prevía la movilización a la planta, se deberá dar aviso por escrito a la Comisión Nacional de Acuicultura y Pesca (CONAPESCA) o del Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA), en el que se indique nombre y ubicación de la planta a la cual se remitirán los organismos cosechados, cantidad y especie.**
- III. **Los propietarios de las instalaciones, contenedores, utensilios, equipo y vehículos en que se encuentren los elementos infectados quedan obligados a tomar las medidas y acciones profilácticas, contenidas en el Anexo 3 de esta Norma.**
- IV. **Los propietarios de granjas o laboratorios en las que se presenten mortalidades anormales o se identifiquen de conformidad con los señalamientos de esta Norma, la presencia de las enfermedades denominadas Virus del Síndrome de la Mancha Blanca (WSSV), o Virus de la Cabeza Amarilla (YHV), deberán notificar por escrito de este hecho a los propietarios de las instalaciones vecinas y a la Delegación de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación en el Estado.**
- V. **El agua de cultivo del estanque infectado deberá filtrarse a través de basididores colocados en las compuertas de los mismos y con un sistema de filtro de calcetín con una luz de malla de quinientas micras, conformado por tres filtros en serie, colocados en el tren de descarga del estanque correspondiente.**
- VI. **El material contenido en el sistema de filtrado descrito en la fracción anterior, deberá ser desinfectado conforme a lo dispuesto en el Anexo 3 de la presente Norma.**

**4.11.5** Cuando se detecte cualquiera de las enfermedades objeto de esta Norma en cualquier otro tipo de instalaciones, se deberá proceder en lo conducente conforme a las especificaciones de este precepto jurídico.

**4.11.6** Las mercancías sujetas al cumplimiento de esta Norma se listan en el Anexo 3 de esta Norma, las cuales se determinaron de conformidad con el Acuerdo que identifica las fracciones arancelarias de las tarifas de la Ley del Impuesto General de Importación y de la Ley del Impuesto General de Exportación, en las cuales se clasifican las mercancías sujetas al cumplimiento de las normas oficiales mexicanas en los puntos de su entrada al país y de su salida.

**4.11.7** Quienes tengan unidades de producción acuícola de crustáceos, en cualquier fase de desarrollo, quedan obligados a informar a la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, por conducto de la Delegación en la entidad federativa correspondiente a su domicilio, de cualquier mortalidad inusual, por causas desconocidas, que se presente en sus instalaciones. Este aviso deberá ser presentado por escrito dentro de las siguientes 24 horas de ocurrido tal evento.

**4.11.8** Con fundamento en los informes de diagnóstico de los terceros especialistas, la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, dará a conocer mediante aviso que se publique en el **Diario Oficial de la Federación**, las zonas libres de los virus causales de las enfermedades objeto de esta Norma y otros contenidos en regulaciones y recomendaciones internacionales, quedando prohibido introducir a estas zonas, crustáceos acuáticos vivos en cualesquiera de sus fases de desarrollo portadores de estas enfermedades.

**4.11.9** Cuando los informes de diagnóstico de los terceros especialistas indiquen la presencia de una o más de las enfermedades objeto de esta Norma, la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación determinará, conforme a las características de cada caso, el establecimiento de cercos sanitarios y las medidas de contingencia a ser aplicadas en aquellas zonas en las que la incidencia de estas enfermedades sea un riesgo para la camaricultura, dándolas a conocer mediante aviso que publique en el **Diario Oficial de la Federación**.

**4.11.10** Los productos infectados con los virus objeto de esta Norma deben ser procesados en una planta que certifique y registre la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, a través de la Dirección General de Ordenamiento Pesquero y Acuícola de la CONAPESCA, en la que se aplique el procedimiento apropiado para prevenir la dispersión de patógenos virales al verter el líquido y desechos sólidos del proceso en corrientes de agua, de acuerdo al siguiente procedimiento:

**4.11.10.1** La certificación y registro de plantas procesadoras que realicen el procesamiento de crustáceos infectados por los virus objeto de esta Norma, requerirán del certificado de sanidad acuícola, de acuerdo al siguiente procedimiento:

I. Presentar solicitud conteniendo la siguiente información y documentación:

- a) Dirección, nombre, teléfono y fax, en su caso, de la persona física o moral solicitante.
- b) Anexar diagrama(s) de flujo para la recepción, procesamiento y tratamiento de sólidos y aguas residuales de los crustáceos a procesar.
- c) Presentar la descripción del procedimiento para el tratamiento de sólidos y aguas residuales producto del procesamiento.
- d) Indicar en un croquis el lugar en el que se localiza el cuerpo de agua en el que se descargan las aguas residuales de las plantas procesadoras. En el caso de descargas que lleguen a drenajes municipales, indicar el cuerpo de agua receptor de los mismos.

II. La Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, por conducto de la Dirección General de Ordenamiento Pesquero y Acuícola, de la CONAPESCA, expedirá el certificado correspondiente, con base en los resultados de la visita que realice personal calificado a las plantas procesadoras solicitantes, en un plazo de 15 días hábiles, a partir de la recepción de la solicitud, autorizando o negando la misma.

III. La vigencia del certificado de sanidad acuícola para plantas procesadoras, será de tres años.

IV. La renovación del certificado citado en la fracción anterior, deberá realizarse con 30 días de anticipación al término de la vigencia del mismo.

**4.11.11** Las plantas procesadoras beneficiarias del certificado de sanidad acuícola para el procesamiento de crustáceos infectados por los virus objeto de esta Norma, deberán informar mensualmente a la Dirección General de Ordenamiento Pesquero y Acuícola, de la CONAPESCA, a través de la autoridad competente de la Secretaría en la entidad federativa correspondiente, la cantidad en kilogramos de organismos infectados procesados durante este periodo.

**5. Grado de concordancia con normas y recomendaciones internacionales**

Esta Norma está parcialmente en concordancia con las recomendaciones del International Aquatic Animal Health Code. No existen normas internacionales equivalentes.

**6. Bibliografía**

- 6.1 Bell, T. y D.V. Lightner. 1988. "Handbook of Normal Penaeid Histology". Baton Rouge, Louisiana, USA.
- 6.2 Boonyaratpalin, S.K., Suparamattaya, J. Kasornchandra, S., Direkbusracom, U., Aekpanthanpong y C. Chantanachooklin. 1993. "Non Occluded Baculo like Virus, the Causative Agent of Yellow Head Disease in the Black Tiger Shrimp (Penaeus monodon)" Gyobo Kenkyu (Fish Pathology) 28: 103-109.
- 6.3 Brock, J.A. y M.K. Main. 1994. "A Guide to the Common Problems and Diseases of Cultured Penaeus vannamei". Pub. by the Oceanic Institute Makapu Point, Honolulu, Hawaii. 241 pp.
- 6.4 Browdy and J.S. Hopkins, editors. (1995) Swimming through troubled waters. Proceedings of the special session on shrimp farming. Aquaculture '95. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA.
- 6.5 Chamberlain, G. 1994. Taura Syndrome and China Collapse caused by new shrimp viruses. World Aquaculture 25(3) 22-25 pp.
- 6.6 Chang, P., Chen, L., Wang, C. 1998. The effect of ultraviolet irradiation, heat, pH, ozone, salinity and chemical disinfectants on the infectivity of white spot syndrome baculovirus. Aquaculture 166 (1998) 1-17.
- 6.7 Hasson K.W., Hasen J., Aubert, H., Redman R.M. y Lightner, D.V. 1997. A new RNA-friendly fixative for the preservation of penaeid shrimp samples for virological detection using cDNA genomic probes. Journal for Virological Methods 66: 227-236.
- 6.8 Joint Subcommittee on Aquaculture. "A Shrimp Virus Work Group. 1997. An Evaluation of Potential Shrimp Virus Impacts on Cultured Shrimp and Wild Shrimp Populations in the Gulf of Mexico and Southeastern U.S. Atlantic Coastal Waters". U.S. Government.

- 6.9 Kasornchandra, J., S. Boonyaratpalin and T. Itami. (1998). Detection of white-spot syndrome in cultured penaeid shrimp in Asia: Microscopic observation and polymerase chain reaction. *Aquaculture* 164: 243-251.
- 6.10 Kim, C.K., P.K. Kim, S.G. Sohn, D.S. Sim, M.A. Park, M.B. Hee, T.H. Lee, J.D. Lee, H.K. Jun and K.L. Jang. (1998). Development of polymerase chain reaction (PCR) procedure for the detection of baculovirus associated with white spot syndrome (WSBV) in penaeid shrimp. *Journal of Fish Diseases* 21: 11-27.
- 6.11 Lightner, D.V. (1992). Shrimp virus diseases: diagnosis, distribution and management. In: *Proceedings of the Special Session on Shrimp Farming*. World Aquaculture Society, Baton Rouge USA. 238-253 pp.
- 6.12 Lightner, D.V., T.A. Bell, R.M. Redman, L.L. Mohny, J.M. Natividad, A. Rukyani and A. Poemomo. (1992). A review of some major diseases of economic significance in penaeid prawns/shrimps of the Americas and Indopacific. In: *Diseases in Asian Aquaculture* I. M. Shariff, R.P. Subasingha & J.R. Arthur (eds), pp. 57-80. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, Philippines.
- 6.13 Lightner, D.V. 1996. "A handbook of Shrimp Pathology and Diagnostic Procedures for Disease of Cultured Penaeid Shrimp". World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA.
- 6.14 Lightner, V.D., K.W. Hasson, B.L. White and R.M. Redman. (1998). Experimental infection of western hemisphere penaeid shrimp with Asian white spot syndrome virus and Asian yellow head virus. *Journal of Aquatic Animal Health* 10: 271-281.
- 6.15 Lightner, V.D. y R.M. Redman. 1998. Shrimp disease and current diagnostic methods. *Aquaculture* 164: 201-220.
- 6.16 McVey, P.J. Ed. (1993). *CRC handbook of Mariculture 2<sup>nd</sup> Edition Volume 1. Crustacean Aquaculture*. CRC Press. Boca Ratón. Ann Arbor. London. Tokyo.
- 6.17 Ministerio de Agricultura, Dirección General Sectorial de Pesca y Acuicultura. Dirección de Fomento Pesquero. División de Acuicultura. 1989. Normas que rigen la importación de crustáceos del género *Penaeus* con fines de cultivo e investigación. Boletín informativo de Pesca y Agricultura No. 1. Caracas, Venezuela.
- 6.18 Nunan, L.M., B.T. Poulos y D.V. Lightner. 1998. The detection of White Spot Syndrome Virus (WSBV) and yellow head virus (YHV) in imported commodities shrimps. *Aquaculture*: 160: 19-30.
- 6.19 Norma Oficial Mexicana NOM-010-PESC-1993. Que establece los requisitos sanitarios para la importación de organismos acuáticos vivos en cualesquiera de sus fases de desarrollo, destinados a la acuicultura u ornato, en el territorio nacional, publicada en el *Diario Oficial de la Federación* el 16 de agosto de 1994.
- 6.20 Norma Oficial Mexicana NOM-011-PESC-1993. Para regular la aplicación de cuarentenas, a efecto de prevenir la introducción y dispersión de enfermedades certificables y notificables, en la importación de organismos acuáticos vivos en cualesquiera de sus fases de desarrollo, destinados a la acuicultura y ornato en los Estados Unidos Mexicanos, publicada en el *Diario Oficial de la Federación* el 16 de agosto de 1994.
- 6.21 Norma Oficial Mexicana NOM-002-PESC-1993. Para ordenar el aprovechamiento de las especies de camarón en aguas de jurisdicción federal de los Estados Unidos Mexicanos, publicada en el *Diario Oficial de la Federación* el 31 de diciembre de 1993.
- 6.22 OIE. 1999. *Diseases of crustaceans In: International Aquatic Animal Health Code*. OIE Diagnostic Manual for Aquatic Animal Diseases.
- 6.23 Park, J.H., Y.S. Lee, S. Lee and Y. Lee. (1998). An infectious viral disease of penaeid shrimp newly found in Korea. *Diseases of Aquatic Organisms*. 34: 71-75.
- 6.24 Qiong, W., White, L.B., Redman, M.R., Lightner, V.D. (1999). Per os challenge of *Litopenaeus vannamei* postlarvae and *Farfantepenaeus duorarum* juveniles with six geographic isolates of white spot syndrome virus. *Aquaculture* 170: 179-194.
- 6.25 Ray, M., Silcox, R., Gray, J., Buzan, D. and McKinney, Y. (1998). Exotic shrimp virus in Texas a history and status. Texas Parks and Wildlife Department. July 28 1998.

**6.26** Sandifer, P.A., C.L. Browdy, A.D. Stokes, J.S. Hopkins, J.V. Migliarese, A.F. Holland, D.M. Cupka, J.D. Whitaker and J.A. Quinn. (1996). Shrimp virus risk management: development of South Carolina Department of Natural Resources Regulatory Policies.

**6.27** Sudha, P.M., C.V. Mohan, K.M. Shankar and A. Hedge. (1998). Relationship between White Spot Syndrome Virus infection and clinical manifestation in Indian cultured penaeid shrimp. *Aquaculture* 167: 95-101.

**6.28** Wang, Ch., C.F. Lo, J.H. Leu, C.M. Chow, P.Y. Yeh, M.S. Su y G.H. Kow. 1995. "Purification and genomic analysis of Baculovirus Associated with White Spot Syndrome (WSBV) of *Penaeus monodon*". *Diseases in Aquatic Organisms*, 23: 239-242.

**7. Evaluación de la conformidad**

**7.1** La evaluación de la conformidad de la presente Norma se realizará por la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, a través de la Dirección General de Ordenamiento Pesquero y Acuicola, de la CONAPESCA, con el auxilio de terceros especialistas cuyo listado será proporcionado por la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación a través de la Dirección General de Ordenamiento Pesquero y Acuicola, de la CONAPESCA, a solicitud de los interesados, de conformidad con lo dispuesto en el artículo 74 de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización.

La Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, por conducto de la Dirección General de Ordenamiento Pesquero y Acuicola, de la CONAPESCA, verificando los resultados de las pruebas de laboratorio que realicen los terceros especialistas, expedirá el Certificado de Sanidad Acuicola para la movilización en el territorio nacional de los crustáceos acuáticos vivos que se cultiven y capturen en el mismo.

Esta evaluación se realizará mediante la verificación de los certificados de sanidad de origen para el caso de los crustáceos acuáticos introducidos, certificados de cocción para los crustáceos cocidos, certificados de zona de captura para las especies listadas en el Anexo 4 y el certificado de sanidad acuicola para la movilización de crustáceos acuáticos vivos en el territorio nacional.

**8. Observancia de esta Norma**

**8.1** La vigilancia del cumplimiento de la presente Norma Oficial Mexicana, corresponde a la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, por conducto de la Comisión Nacional de Acuicultura y Pesca (CONAPESCA) o del Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA) y a la Secretaría de Marina, en el ámbito de sus respectivas atribuciones. Las violaciones a las disposiciones contenidas en esta Norma se sancionarán en los términos establecidos en la Ley Federal de Metrología y Normalización y su Reglamento; la Ley de Pesca y su Reglamento, y demás disposiciones legales aplicables.

**8.2** La Secretaría podrá verificar en cualquier tiempo y lugar el cumplimiento de las disposiciones contenidas en la presente Norma.

**TRANSITORIOS**

**PRIMERO.** Provéase la publicación de esta Norma en el Diario Oficial de la Federación.

**SEGUNDO.** La presente Norma Oficial Mexicana entrará en vigor a los sesenta días posteriores al de su publicación en el Diario Oficial de la Federación.

México, Distrito Federal, a quince de enero de dos mil dos.- La Coordinadora General Jurídica de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, Lilia Isabel Ochoa Muñoz.- Rúbrica.

**ANEXO 1**

**TAMAÑO DE MUESTRA CON FINES DE CERTIFICACION Y DIAGNOSTICO  
DE LOS PATOGENOS CAUSALES DE ENFERMEDADES VIRALES  
EN CRUSTACEOS ACUATICOS**

**1. PARA CRUSTACEOS ACUATICOS VIVOS**

**Tabla 1.- Modificada de Amos (1985)\***

TAMAÑO POBLACION	TAMAÑO DE LA MUESTRA A UNA PREVALENCIA DE 2%
50	50
100	75
250	110
500	130
1,000	140
1,500	140
2,000	145
4,000	145
10,000	145
>/= 100,000	150

\* Lightner, D.V. 1996.

El envío al laboratorio de las muestras vivas o preservadas deberá realizarse en el menor tiempo posible. Estas deberán estar debidamente empacadas, asegurándose que los recipientes y cajas que las contienen, estén herméticamente cerradas.

Las muestras que con fines de certificación y diagnóstico se envíen a los laboratorios terceros especialistas que apruebe la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación por conducto de la Dirección General de Ordenamiento Pesquero y Acuicola, de la CONAPESCA, deberán ser preservadas de conformidad a la técnica de diagnóstico a ser utilizada.

**2. PARA QUISTES DE ARTEMIA (ARTEMIA SPP.).**

El tamaño de muestra para Artemia (*Artemia* spp.) deshidratada, de acuerdo al peso neto a envasar por contenedor, en un lote específico, será:

El tamaño de la muestra por lote, dependerá del número de unidades de latas, bolsas o cualquier otra presentación, cuyo contenido de Artemia deshidratada en cada una, sea desde menos de 1 libra (0.450 kg) hasta 20 libras (9 kg) de peso neto, se tomará conforme a la siguiente tabla:

**Tabla 2. Determinación de las unidades a muestrear con base en el número de latas o bolsas que conforman el lote**

Número de unidades de latas o bolsas por lote u otra presentación, con un contenido de Artemia por lote:	Unidades que deben conformar la muestra
De 1 a 1,800	3
De 1,801 a 12,000	6
De 12,001 a 24,000	13
De 24,001 a 48,000	21
De 48,001 a 72,000	29
De 72,001 a 108,000	36
De 108,001 a 168,000	48
De 168,001 a 240,000	60
De 240,001 o más	72

Tabla modificada con base en Regulations Governing Processed Fishery Products and U.S. Standards for Grades of Fishery Products, SOCFR Ch. II (10-1-91 Edition), para productos deshidratados.

**3. PARA CRUSTACEOS ACUATICOS MUERTOS**

El tamaño de muestra para *Artemia* (*Artemia* spp.) congelada, por unidad de presentación, y el de crustáceos frescos congelados, empacados en marquetas de un peso neto determinado, se realizará conforme a lo siguiente:

El tamaño de la muestra por lote dependerá del número de unidades de marquetas o unidad de presentación, según corresponda, con un contenido de *Artemia* (*Artemia* spp.) en cada una, que vaya de menos de 1 libra (0.450 kg) hasta 20 libras (9 kg) de peso neto, y en el caso de camarón congelado, con un contenido por marqueta de más de 4 libras (1.8 kg) y hasta 100 libras (45 kg) de peso neto, según corresponda, se tomará conforme a la siguiente tabla:

**Tabla 3. Determinación de las unidades a muestrear con base en el número de unidades de presentación de *Artemia* (*Artemia* spp.) o de marquetas de crustáceos acuáticos muertos que conforman el lote**

Número de unidades por unidad de presentación de <i>Artemia</i> ( <i>Artemia</i> spp.) o de marquetas de crustáceos acuáticos muertos, según corresponda, por lote	Unidades que deben conformar la muestra
De 1 a 5,400	3
De 5,401 a 21,600	6
De 21,601 a 62,400	13
De 62,401 a 112,000	21
De 112,001 a 174,000	29
De 174,001 a 240,000	38
De 240,001 a 360,000	48
De 360,001 a 480,000	60
De 480,001 o más	72

Tabla modificada con base en Regulations Governing Processed Fishery Products and U.S. Standards for Grades of Fishery Products, SOCFR Ch. II (10-1-91 Edition), para productos congelados.

**ANEXO 2**

**MEDIDAS Y ACCIONES PROFILACTICAS**

La desinfección de instalaciones, materiales, equipos y vehículos, se llevará a cabo mediante la aplicación de químicos, utilizando concentraciones y tiempo suficiente de exposición para destruir los microorganismos nocivos. Antes de proceder con la desinfección, los utensilios, equipos y estructuras deberán ser limpiados perfectamente, sin usar detergentes ni jabones.

- 1.- Desinfectante de tuberías e instalaciones y equipos.

Cloro (hipoclorito de sodio).

Todas las tuberías y tanques se mantendrán completamente llenos con una solución de hipoclorito de sodio a razón de 50 mg/litro (= 50 partes por millón) y esperar por lo menos 30 minutos antes de eliminar la solución desinfectante.

- 2.- Para paredes interiores, contenedores, techo y vehículos.

Preparar una solución de hipoclorito de sodio a razón de 50 mg/l (=50 ppm), misma que será aplicada por aspersión sobre paredes y techo, asegurándose que estas superficies permanezcan húmedas con esta solución por un periodo mínimo de 30 minutos.

3.- Para ropa y utensilios.

Preparar suficiente solución que contenga 50 mg/l de hipoclorito de sodio, en la que deberán quedar perfectamente sumergidos estos artículos, por los 30 minutos que deben permanecer en ella

4.- Para pisos.

Se aplicará también una solución que contenga 50 mg/l de hipoclorito de sodio, misma que deberá cubrir el piso, cuando menos con un tirante de 5 cm de profundidad, el cual deberá mantenerse durante 30 minutos.

5.- Para aguas residuales provenientes de las instalaciones en que se mantengan ejemplares de langosta viva importada.

El agua utilizada deberá ser desinfectada antes de su descarga, de acuerdo al siguiente procedimiento:

En la estructura receptora de la descarga, se efectuará el tratamiento de desinfección, añadiendo hipoclorito de sodio en cantidad suficiente para obtener una concentración de 50 mg/l. Esta mezcla deberá tener una permanencia mínima de 30 minutos.

A continuación el agua clorinada será neutralizada, agregando 2.85 veces la cantidad de hipoclorito de sodio utilizado, expresada en gramos de tiosulfato de sodio, permaneciendo en estas condiciones durante 24 horas, a cuyo término, se procederá a descargar.

Este método de desinfección podrá ser llevado a cabo también con:

Yodo a 200 ppm de yodo libre. Para su neutralización se aplicará una cantidad de tiosulfato equivalente a 0.78 veces la cantidad de yodo expresada en gramos.

ANEXO 3

LISTADO DE MERCANCIAS SUJETAS AL CUMPLIMIENTO DE LO ESTABLECIDO EN LA NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-EM-001-PESC-2000

FRACCION ARANCELARIA	DESCRIPCION
0306.11.01	Langostas ( <i>Panulirus</i> spp., <i>Panulirus</i> spp., <i>Jasus</i> spp.).
0306.12.01	Bogavantes ( <i>Homarus</i> spp.).
0306.13.01	Camarones, langostinos y demás decápodos natantia.
0306.14.01	Cangrejos (excepto Macruros).
0306.19.99	Los demás, incluidos la harina, polvo y "pellets" de crustáceos, aptos para la alimentación humana.
0306.21.01	Langostas ( <i>Panulirus</i> spp., <i>Panulirus</i> spp., <i>Jasus</i> spp.).
0306.22.01	Bogavantes ( <i>Homarus</i> spp.).
0306.23.01	Reproductores y postlarvas de camarones peneidos y langostinos para acuicultura.
0306.23.99	Los demás.
0306.24.01	Cangrejos (excepto Macruros).
0306.29.99	Los demás, incluidos la harina, polvo y "pellets" de crustáceos, aptos para la alimentación humana.
0511.91.02	Quistes de artemia (incluso enlatados al vacío), poliquetos y krill para acuicultura. Unicamente: De crustáceos, no enlatados.

- 0511.91.99            Los demás.  
**Unicamente:** De crustáceos, no enlatados.
- 0511.99.99            Los demás.  
**Unicamente:** De crustáceos, no enlatados.
- 2301.20.01            Harina, polvo y "pellets", de pescado o de crustáceos, moluscos o demás invertebrados acuáticos.  
**Unicamente:** De crustáceos, no enlatados.

ANEXO 4  
 RELACION DE ESPECIES DE CRUSTACEOS ACUATICOS DE AGUAS FRIAS

Nombre común	Nombre científico
Camarón del noroeste "Shrimp from the northwest"	<i>Dichelopandalus leptocerus</i> <i>Pandalus borealis</i> <i>Pandalus montagui</i> <i>Pandalus propinquus</i> <i>Stiloandalus richardi</i>
Cangrejo de nieve o curtidor "Snow Crab" o "Tanner Crab"	<i>Chionocetes bairdii</i> <i>Chionocetes opilio</i> <i>Chionocetes angulatus</i> <i>Chionocetes tanneri</i>
Cangrejo Dungeness "Dungeness Crab"	<i>Cancer magister</i>
Cangrejo rey "King Crab"	<i>Paralithodes camtschaticus</i> <i>Paralithodes patypus</i> <i>Litodes aequispinus</i> <i>Litodes couesi</i>
Cangrejo Jonah "Jonah crab"	<i>Cancer borealis</i>
Cangrejo de roca "Rock crab"	<i>Cancer irroratus</i>
Cangrejo azul "Blue crab"	<i>Callinectes satilius</i>
Cangrejo verde costero "Shore green crab"	<i>Carcinus maenas</i>
Langosta Nueva Inglaterra o Maine "Maine o New England Lobster"	<i>Homarus homarus</i>
Langosta americana "American Lobster"	<i>Homarus americanus</i>

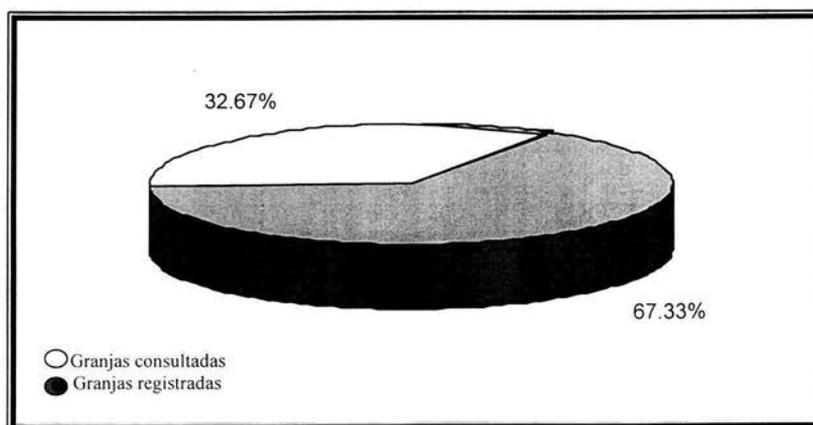
## ANEXO II

### RESULTADOS DEL TRABAJO DE CAMPO ( RECOLECTA DE SUBPRODUCTOS)

Durante la búsqueda de una granja positiva a WSSV se obtuvo información importante de los brotes presentados por mancha blanca en los estados de Sonora y Sinaloa, y aunque no fue un objetivo de este trabajo, la información obtenida se presenta a continuación.

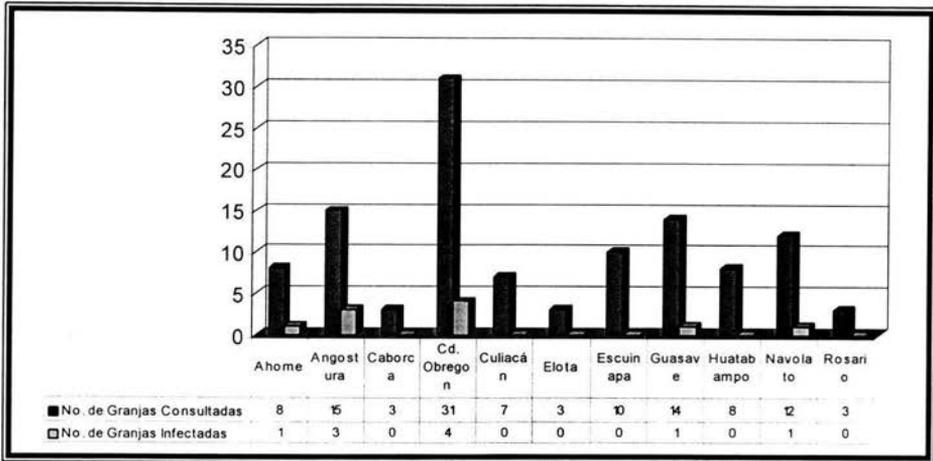
La información para la identificación de las granjas fue proporcionada por instituciones que desarrollan programas de seguimiento, monitoreo y diagnóstico, pertenecientes a la Red Nacional de Laboratorios como el CRIP en Mazatlán Sinaloa, el ITSON en Cd. Obregón Sonora, el CIBNOR en Guaymas Sonora y a una serie de técnicos, productores y personas relacionadas con la acuicultura de camarón)

Los estados consultados durante la realización de este proyecto fueron Sonora y Sinaloa, los cuales se eligieron por tener mayor porcentaje de granjas de cultivo de camarón y por los reportes hechos con anterioridad (Hernández, 1999) de presentar diagnóstico positivo a WSSV. Para la identificación de las granjas se consultó a una serie de personas, técnicos, investigadores e instituciones, relacionadas con la acuicultura de camarón.



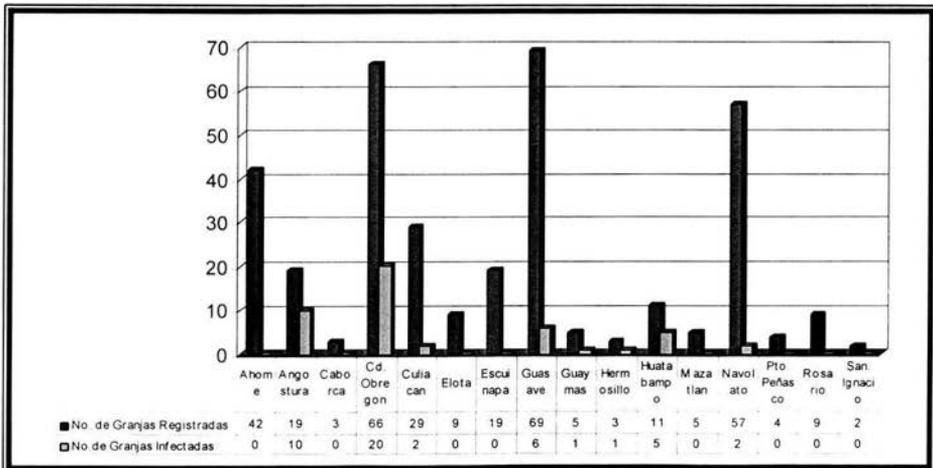
**Figura 1.** Porcentaje de granjas consultadas (115) de un total de 352 registradas en los estados de Sonora y Sinaloa

La consulta realizada en los estados de Sonora y Sinaloa se realizó en 115 granjas de las 352 registradas en este ciclo de cultivo (2001). En la figura 1 se observa que se consultó aproximadamente 1/3 de todas las granjas registradas en estos estados.



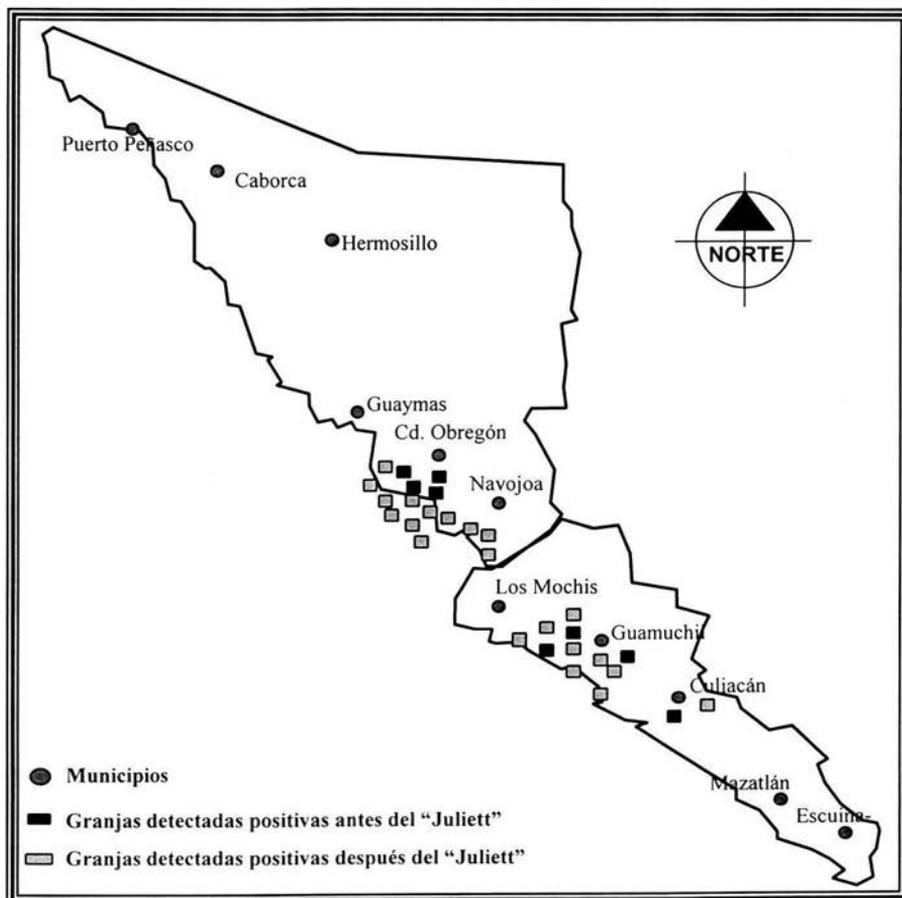
**Figura 2.** Granjas detectadas positivas a WSSV antes de la presencia del huracán Juliett (Abril-Julio 2001).

En la grafica 2 se observa el numero de granjas consultadas por municipio, en los estados de Sonora y Sinaloa, en donde se observa que en cinco municipios ya se habían detectado granjas infectadas con WSSV. El mayor numero de granjas infectadas se detecto en Cd. Obregón , siendo este, el lugar donde se monitorearon mas granjas.



**Figura 3.** Granjas detectadas positivas a WSSV después de la presencia del huracán Juliett (Septiembre 2001)

Después de la presencia del huracán Juliett en Septiembre del 2001, creció el numero de granjas infectadas, la Figura 3 muestra los municipios que presentaron granjas infectadas, siendo Cd. Obregón y Angostura los lugares que presentaron mayor numero de granjas infectadas .



**Figura 4.** Detección de WSSV antes y después de la aparición del huracán Juliett en Sonora v Sinaloa

Los municipios en donde se detectaron granjas positivas a WSSV, después de presentarse el huracán Juliett, se presentan en la figura 4, en donde se aprecia que el sur de Sonora y el norte de Sinaloa, se encuentran los municipios mas afectados por causa de este fenómeno natural.

Durante el trabajo de campo, en el monitoreo de las granjas, se obtuvo el número total de granjas registradas hasta el 2001 en los estados de Sonora y Sinaloa, de la base de datos de la Dirección General de Investigación en Acuicultura. En la Figura 1, se muestra el porcentaje de las granjas que se consultaron, lo que representa el 32.67% de todas las registradas hasta el 2001 en los dos estados, monitoreando aproximadamente un tercio de todas las granjas dentro de estos estados. En la Figura 1 se presenta el número de granjas consultadas por municipio, y se observa que realmente fueron pocas comparadas con el total registrado en cada municipio, esto se debe a que es difícil contactar directamente con los encargados de las mismas, ya que se pierde fácilmente la información registrada de las granjas existentes, dado que puede ocurrir que estas cambian de propietario, se rentan, dejan de operar o tienen una infraestructura muy baja, lo que ocasiona dificultad para encontrar a la persona indicada.

Durante la búsqueda de una granja positiva a WSSV se encontró que había granjas a las cuales se les detectó positivo a WSSV desde el primer mes de iniciado el cultivo, lo cual se debe a que la postlarva se encontraba infectada con este patógeno, fue el caso de una en el municipio de Guasave, otras cuatro en Cd. Obregón, y otras en Navolato y Angostura (Figura 2).

Es bien conocido que los fenómenos naturales como el efecto del Niño, las tormentas y huracanes que se presentan dentro de una zona, traen consigo una serie de cambios físico-químicos en los estanques de cultivo que de alguna manera u otra afectan la producción en acuicultura. Por mencionar algunos efectos, Páez (2001) comenta que el oxígeno disuelto se considera como una variable crítica de calidad de agua, las bajas concentraciones derivan una serie de eventos químicos como el incremento de toxicidad de sustancias. Un evento que marcó mucho la presencia de WSSV en granjas fue la aparición del Huracán Juliett, varios estudios mencionan que si se somete a un estrés al camarón, existe mayor probabilidad de que le afecte el virus de la mancha blanca, y durante estos días en que se presentó el huracán fue propicia la variación de salinidad, concentración de oxígeno disuelto y temperatura en los estanques, lo que pudo causar estrés en el camarón y ocasionar un brote masivo del virus, por contaminación de otras granjas detectadas positivas con anterioridad.

En la Figura 4 se puede observar que en algunos municipios hubo mayor incidencia del virus después de la presencia del huracán Juliett, en varios casos se tuvo que cosechar de emergencia por la alta mortandad de camarón que se presentó en los estanques, en la mayoría de estos se detectó positivos a WSSV después de la aparición de la tormenta.

Dentro de los resultados sobre el monitoreo realizado en estos dos estados, se observa que la región sur de Sonora y norte de Sinaloa son quienes presentaron mayor incidencia de este patógeno durante el 2001.