

Enfermedad de las manchas blancas

Síndrome de las manchas blancas

Autor: Jorge Cuéllar-Anjel

Última actualización:
Agosto de 2013



IOWA STATE UNIVERSITY*

College of Veterinary Medicine
Iowa State University
Ames, Iowa 50011
Phone: 515.294.7189
Fax: 515.294.8259
cfsph@iastate.edu
www.cfsph.iastate.edu



INSTITUTE FOR
INTERNATIONAL
COOPERATION IN
ANIMAL BIOLOGICS

Iowa State University
College of Veterinary Medicine
www.cfsph.iastate.edu/ICAB/

Importancia

Es una enfermedad producida por el **virus del síndrome de las manchas blancas (white spot syndrome virus - WSSV)**, y produce alta mortalidad en postlarvas y camarones juveniles (puede ser cercana al 100% en pocos días); es de curso agudo y se transmite de forma horizontal o vertical (zooplancton, agua contaminada, sedimentos del fondo de los estanques, canibalismo y predación). Las manifestaciones de la enfermedad suelen aparecer durante los primeros 30-50 días de cultivo en los estanques de producción.

El estrés es un factor fundamental en el desarrollo de la enfermedad, se ve una marcada relación entre la temperatura inferior a 27°C y la aparición de la enfermedad. Por encima de esta, los camarones infectados con el WSSV pueden permanecer como portadores asintomáticos.

Otros factores que producen estrés y que desencadenan la enfermedad en camarones infectados por el WSSV, son niveles bajos de oxígeno disuelto, valores extremos de pH, cambios súbitos de la calidad del agua, altos niveles de sólidos en suspensión, sustancias tóxicas en el agua, ablación unilateral de los pedúnculos oculares y el desove, entre otros.

Se ha determinado en algunos casos que la enfermedad de las manchas blancas está relacionada con presencia de bacterias oportunistas en la hemolinfa de los camarones (bacteremia). Esta condición sugiere que las toxinas liberadas por las bacterias cuando su cantidad es abundante dentro del camarón, lo predispone por estrés séptico a sufrir la enfermedad por el WSSV. La hipótesis de esta situación propone que dicha toxemia produce inmunosupresión y/o que se activa la replicación viral produciendo daños de tejidos y signos clínicos en 24 a 48 horas de la fase aguda de la bacteriosis.

Características del virus WSSV

- Familia Nimaviridae
- Baculovirus, con doble cadena de ADN
- Forma elíptica a cilíndrica
- Membrana trilaminar
- Viriones con tamaño de 100 a 300 nm
- Presenta un apéndice similar a un flagelo
- Su genoma aproximadamente es de 290 kbp
- En estaques de cultivo es viable en agua por doce días y en sedimento por tres
- Se inactiva después de 120 minutos a 50°C y de 1 minuto a 60°C
- Su ciclo de replicación se da en 20 horas a 25°C

Distribución geográfica

El virus del síndrome de las manchas blancas, apareció en 1992 en el noroeste de Asia y se dispersó rápidamente en la mayoría de los países cultivadores de camarón en Asia y el Indo Pacífico que incluyen China, Tailandia, Japón, Corea, Indonesia, Malasia Taiwán, Vietnam e India.

El primer caso confirmado de WSSV en occidente, se dio en 1995, Texas (EE.UU.), en una granja de cultivo de *Penaeus setiferus*, es posible que se haya debido a contaminación a través de una planta procesadora de camarón procedente de Asia.

En 1999 se reportó el WSSV en Panamá, Nicaragua, Honduras poco después apareció en los otros países de Centroamérica, México y llegó también a Colombia, Ecuador, Perú y Brasil. Se trataba de granjas de cultivo de *Litopenaeus vannamei*.

Especies afectadas

En los camarones de cultivo o en los silvestres, se han observado infecciones naturales en las siguientes especies: *P. monodon*, *P. japonicus*, *P. chinensis* (=orientalis), *P. indicus*, *P. merguensis*, *P. setiferus*, *L. stylirostris* y *L. vannamei*.

Sin embargo, en pruebas realizadas bajo condiciones de laboratorio, se observó que una cepa del virus WSSV originaria de Tailandia, fue altamente patogénica para: *P. vannamei*, *P. stylirostris*, *P. aztecus*, *P. duorarum*, y *P. setiferus*.

Enfermedad de las manchas blancas

No se ha observado resistencia natural significativa en ninguna de las especies de camarones penaeidos, aunque se han reportado familias de *P. vannamei* en Panamá que presentan supervivencias superiores ante el desafío experimental con el WSSV.

Principales fuentes de contaminación con el WSSV

Los principales factores de contaminación con el virus son:

- Camarones y postlarvas infectados con el WSSV
- Animales diferentes a los camarones portadores del virus
- Partículas virales diseminadas en el agua
- Productos procesados positivos al WSSV
- Aguas que son producto del proceso de camarón
- Equipos, vehículos, actividades humanas
- Crustáceos decápodos de aguas marinas o dulces

Signos clínicos

Cuando la enfermedad se manifiesta se presentan los siguientes signos clínicos:

- Anorexia (pérdida del apetito)
- Tracto intestinal vacío
- Alteración motora (sintomatología nerviosa)
- Cromatóforos expandidos (por los cuales en el camarón moribundo se presenta coloración rojiza, sin manchas blancas o con manchas muy suaves)
- Urópodos rojos
- Textura blanda (exoesqueleto y algunas veces músculo abdominal)
- Nado errático
- Pérdida del reflejo de huida
- Letargia
- La cutícula se desprende fácilmente
- Aparición de manchas blancas de hasta 2,0 mm de diámetro, se ven más por dentro del caparazón, posiblemente se deben a depósitos de sales de calcio y son las que le dan el nombre a la enfermedad
- Ante la aparición de estos signos en los cultivos de camarón se pueden esperar altas tasas de mortalidad acumulada, que pueden ser hasta del 100% entre los 3 y 10 días posteriores a la aparición de los primeros signos.

Ante la presencia de los signos clínicos descritos anteriormente, se deben fijar camarones para histopatología con solución fijadora de Davidson y como complemento, se pueden fijar muestras para PCR con el fin de confirmar la presencia genómica del virus. También se pueden someter muestras de campo (in situ) a pruebas rápidas de inmunocromatografía, comercialmente disponibles para el WSSV cuyos resultados se obtienen en 10 minutos; éstas son altamente específicas y su sensibilidad equivale a una PCR de un solo paso.

Diagnóstico

Clinico

Hay que pensar en camarones enfermos con el síndrome de la mancha blanca cuando se encuentran aletargados, con coloración rojiza o blanquecina, nadando muy lentamente o estando inmóviles en las orillas de los estanques de cultivo. Al tratar de capturarlos con la mano, no presentan resistencia por pérdida del reflejo de huida.

Al sacarlos del agua, los camarones afectados por el WSSV se sienten suaves al tacto y con el caparazón algo suave (debe estar rígido normalmente excepto durante la muda), su estómago e intestino se pueden observar vacíos (sin alimento) y los cromatóforos oscuros suelen estar expandidos. Ciertos camarones también presentan color rojo en los urópodos. Esporádicamente en camarones *L. vannamei* se pueden observar manchas blancas debajo del caparazón de la cabeza, al separarlo con una uña y mirándolo a contraluz con un fondo oscuro.

Diferencial

El diagnóstico diferencial del síndrome de la TSV incluye vibriosis sistémica, síndrome de la cabeza amarilla y síndrome de las manchas blancas (fase aguda). Así mismo, incluye otras posibles condiciones en las que se produzca anorexia y coloración rojiza como eventuales intoxicaciones de origen químico o biológico.

Análisis de laboratorio

La enfermedad de las manchas blancas se debe diagnosticar solamente a partir de camarones enfermos capturados en estanques (o cuerpos de agua) en los que se esté presentando mortalidad o, a menos, se estén observando camarones con signos clínicos sospechosos.

Para determinar si la causa de un brote de enfermedad es el WSSV, se deben fijar camarones enfermos en solución de Davidson para ser sometidos luego a estudio mediante histopatología. Esta aproximación diagnóstica es confirmatoria si se observan cuerpos de inclusión de Cowdry tipo "A" (intranucleares) en células del epitelio cuticular (principalmente en estómago), branquias, tejido hematopoyético, tejido conectivo y glándula antenal. Existe un parecido entre los cuerpos de inclusión por el WSSV y los producidos por el virus de la necrosis infecciosa hipodérmica y hematopoyética (IHHNV por sus siglas en inglés), por lo que se deben confirmar con hibridación in situ o por PCR. Cuando la enfermedad avanza, éstos son más grandes y basófilos.

Existen pruebas de campo basadas en inmunocromatografía y cuya sensibilidad equivale a una prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de un solo paso. Son altamente específicas y permiten detectar mediante colorimetría la presencia del virus WSSV en tejidos como los pleópodos (apéndices natatorios de los segmentos abdominales). Este kit comercial tiene el formato de una prueba de embarazo humano. Otras pruebas

Enfermedad de las manchas blancas

inmunodiagnósticas incluyen anticuerpos monoclonales, pero su aplicación comercial es menos frecuente.

Para la detección genómica del WSSV en tejidos de camarón, suelen ser utilizadas muestras de hemolinfa, branquias o pleópodos. Las herramientas moleculares que se pueden utilizar para estas pruebas diagnósticas incluyen hibridación *in situ*, hibridación Dot Blot y PCR (un paso, anidada (nested PCR), tiempo real, LAMP, etc.).

Toma de muestras para laboratorio

Histopatología. Para este tipo de técnica se requiere que los camarones capturados se encuentren visiblemente enfermos con presencia de los signos clínicos mencionados anteriormente) y que se encuentren vivos (aunque estén moribundos). Los animales enfermos seleccionados para histopatología, deben ser entre 5 y 10 por población (estanque o cuerpo de agua) y deben ser fijados mediante inyección con solución fijadora de Davidson-AFA (etanol absoluto: 33%, formaldehído: 22%, ácido acético glacial: 11.5% y agua destilada: 33.5%). La inyección debe incluir abundantemente el cefalotórax (cabeza) y especialmente el hepatopáncreas, así como el abdomen a lo largo y bajo la línea media lateral por lado y lado. Se deben luego sumergir en Davidson-AFA por 24, 48 ó 72 horas si son larvas o postlarvas, juveniles o preadultos o, adultos (reproductores), respectivamente. Pasado este tiempo, se debe reemplazar el Davison-AFA por etanol 70% hasta el procesamiento histológico. Si a la semana aún no son procesados, se recomienda cambiar el etanol 70% cada semana para evitar la acidificación de los tejidos. El proceso de fijación se debe hacer siempre utilizando guantes, lentes protectores y estando en un lugar abierto y bien ventilado para evitar inhalar estos gases. Este fijador puede ser carcinogénico por su contenido de formaldehído.

El proceso histológico de rutina para camarones incluye una fase de deshidratación de 12 horas, inclusión en parafina, cortes a 3 micras y tinción con Hematoxilina y Eosina, aunque existen otras técnicas de tinción que se utilizan para casos especiales en lo que se requiere observar cierto tipo de microorganismos o de depósitos minerales o tóxicos. El proceso completo de histopatología desde la fijación de los camarones hasta la lectura de láminas histológicas al microscopio y preparación del informe diagnóstico, puede tomar de 5 a 7 días bajo condiciones normales y con el protocolo de rutina.

Inmunocromatografía. Esta técnica se realiza con un kit comercial que trae incluidos los materiales y reactivos completos para la realización de la prueba. Se deben utilizar camarones que presenten signos clínicos sospechosos de la enfermedad de las manchas blancas, según fueron mencionados anteriormente. Los tejidos utilizados para esta prueba son pleópodos y según el tamaño del camarón se pueden tomar 2, 4 ó 6, incluso hasta los 10 cuando se trata de juveniles pequeños. En algunos casos se hace pool de pleópodos de 2 a 5 camarones, pues en ellos se requiere sólo saber si un estanque es positivo o no a la presencia del

WSSV. Los resultados toman 5 a 10 minutos y el montaje de la prueba no más de 10 minutos adicionales, para un total de unos 20 minutos en la prueba completa. Tiene la ventaja de no requerir equipos o elementos sofisticados de laboratorio (basta un par de tijeras o pinzas y agua corriente con jabón para su lavado) y de arrojar resultados confiables en muy poco tiempo, permitiendo una respuesta rápida por parte del equipo técnico de campo.

Pruebas moleculares. Tanto la hibridación Dot Blot como la PCR, requieren el uso de pleópodos o de hemolinfa para la detección genómica del WSSV. La técnica de Dot Blot usualmente requiere someter el tejido a maceración con un buffer de lisis, que rompe las células y expone el DNA viral quedando libre en la solución de extracción. La prueba inmunomolecular se realiza sobre una membrana de Nylon o de Nitrocelulosa y se fundamenta en la detección del genoma viral mediante una sonda genética específica, unida a una enzima marcada, que al final produce una reacción colorimétrica visible al ojo humano por su tono oscuro. La intensidad de la mancha oscura producida para cada muestra, refleja la carga viral contenida en la muestra: entre más oscura a mancha, mayor es la cantidad de genoma viral presente. Esta técnica suele ser montada en la tarde, dejando incubar toda la noche y revelando al día siguiente en la mañana, lo que significa tener resultados en aproximadamente 48 horas a partir de la remisión de las muestras al laboratorio.

La hibridación *in situ* equivale a una Dot Blot, pero realizada directamente sobre un corte histológico que no ha sido teñido y que se ha desparafinado previamente. Dicho corte debe corresponder a un camarón enfermo previamente fijado en Davidson-AFA según el protocolo normal para histología. Los resultados se dan en función de la reacción colorimétrica que se observa en las células en las que el virus está contenido y, como evidencia de ello, se pueden ver zonas pardas u oscuras (casi negras) indicando la existencia de genoma viral de WSSV. Este procedimiento completo puede tomar 48 a 72 horas, incluyendo la revisión de las láminas al microscopio y la preparación del reporte diagnóstico.

La técnica de PCR en cualquiera de sus formas (PCR (un paso, anidada (nested PCR), tiempo real, LAMP, etc.), puede utilizar cualquier tipo de tejido pero para el caso de WSSV se recomienda hemolinfa o pleópodos. En el caso de postlarvas, se utilizan 5 a 20 organismos enteros habiéndoles retirado cuidadosamente los ojos, ya que éstos interfieren con la PCR. Las muestras son sometidas a una fase de extracción del DNA y de este se toma una pequeña cantidad para preparar la solución de amplificación que además incluye los primers o iniciadores, entre otros reactivos. La fase de amplificación genómica se hace en un termociclador (aparato de PCR) y toma de 1 a 2 horas. El producto amplificado (amplicón) es migrado en un gel de agarosa mediante electroforesis por 20 a 30 minutos y las bandas de DNA son reveladas sobre una mesa con luz ultravioleta (UV), haciéndose éstas visibles debido a la

Enfermedad de las manchas blancas

presencia de Bromuro de Etidio en el propio gel. Son positivas las muestras en las que aparezca una banda y se considera “no detectado” el virus en las que no tengan una banda formada. El proceso completo puede tardar entre 4 y 8 horas si se trabaja de manera exclusiva e ininterrumpida. Usualmente en los laboratorios se obtienen resultados a las 48 horas de remitir las muestras. Esta técnica requiere instalaciones, equipos y reactivos sofisticados, así como personal calificado y bien adiestrado.

Medidas recomendadas ante la sospecha de la enfermedad de las manchas blancas

Notificación a las autoridades

La enfermedad de las manchas blancas es una enfermedad de camarones penaeidos que debe ser notificada ante la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE, por sus siglas en francés). Los requisitos para la notificación de la enfermedad a las naciones miembro de la OIE y las pautas de importación/exportación pueden consultarse en el Código Sanitario para los Animales Acuáticos de la OIE [<http://www.oie.int/es/normas-internacionales/codigo-acuatico/acceso-en-linea/>]. Los veterinarios que detecten un caso de enfermedad de las manchas blancas deben seguir las pautas nacionales y/o locales para la notificación y las pruebas de diagnóstico correspondientes. Sin embargo, se debe recalcar que esta es una enfermedad catalogada como *endémica* en las Américas, donde está ampliamente distribuida en los países productores de camarón de cultivo.

Medidas de control para la enfermedad de las manchas blancas

Luego de que el WSSV se ha introducido a un país, no se deben comprar nauplios o postlarvas en laboratorios que podrían estar o que están infectados por este virus. Es probable que el yodo y el agua de lavado puedan retirar y destruir el virus cuando se usa en huevos, nauplios y postlarvas de camarón infectados. Es esencial que este proceso sea consistente. Las granjas deben mantener buenas medidas de bioseguridad y examinar cada lote de animales antes de su compra y siembra en los estanques.

Se deben utilizar pruebas de diagnóstico, sensibles y confiables para la detección y seguimiento del WSSV. Éstas suelen ser tecnologías basadas en DNA, tales como la PCR y la hibridación in situ (ISH).

Es importante comprar postlarvas que han sido analizadas por PCR luego de que han pasado y superado la prueba de estrés. Esta consiste en someter un pequeño grupo de animales a cambios bruscos de salinidad, pasando de 32 ppt a 0 ppt súbitamente y devolverlos luego de unos minutos nuevamente a salinidad de 32 ppt, determinando luego % de supervivencia. Se debe comenzar sembrando postlarvas en la granja con ninguna o con una muy baja carga viral.

Aunque se sabe que el uso de formalina ayuda a eliminar las postlarvas más débiles, las granjas nunca deben

sembrar postlarvas que se sabe son portadoras del virus WSSV. Se ha observado que en *P. japonicus* el virus no muestra patogenicidad sino hasta después del estadio Pl-6, lo cual hace esencial que se haga un examen en etapas posteriores.

Se debe reducir al mínimo el estrés en el camarón siempre que sea posible. Para ello, se recomienda lo siguiente:

- Aumentar el tiempo de aclimatación antes de la siembra
- Utilizar inmunostimulantes no específicos (NSIS) y dietas fortificadas con minerales y vitaminas para aumentar la tolerancia al estrés
- Adquirir y sembrar postlarvas durante las épocas del año en las que se sabe que no van a experimentar fuertes tensiones derivadas de los cambios bruscos de temperatura y salinidad
- Utilizar dietas de buena calidad y continuar con el uso de NSIS durante todo el ciclo de producción
- Realizar ciclos de producción con densidades bajas de cultivo
- Vigilar y controlar vectores que llevan el WSSV a los estanques de cultivo
- Someter a pruebas de PCR muestras de fito y zooplancton del estanque antes de la siembra, para detectar presencia del WSSV. Se debe evitar la siembra en estanques positivos al virus.

Existen condiciones que no se pueden controlar en cuanto a la enfermedad de las manchas blancas se refiere. Uno de los principales problemas que enfrentan los productores de camarón durante el cultivo, son las fluctuaciones bruscas del clima que se presentan durante la estación lluviosa. Los cambios abruptos en la temperatura y la salinidad se han asociado con la aparición de muchos brotes de la enfermedad. En la medida en la que la enfermedad se desplaza de una zona a otra, la carga viral aumentará en el medio ambiente circundante de la granja, hasta el punto en el que el virus esté siempre presente en el entorno. Lo ideal sería eliminar todos los camarones enfermos una vez que se confirme el WSSV, para evitar la acumulación de altas cargas virales en el medio ambiente. Infortunadamente este procedimiento no es práctico. La cosecha del camarón suele realizarse a toda costa, incluso si los camarones son demasiado pequeños como para conseguir un mercado que pague al menos sus costos de producción. En lo posible, se deben reducir las pérdidas y minimizar la propagación del virus dentro y entre las granjas.

Salud pública

Los humanos no son propensos a contraer el virus de las manchas blancas.

Recursos en internet

Enfermedad de las manchas blancas

http://web.oie.int/esp/normes/fmanual/pdf_es/2.3.2_Enfermedad_de_las_manchas_blancas.pdf

<http://www.uca.edu.ni/encuentro/images/stories/2012/pdf/75e/75e2a.pdf>

<http://www.fao.org/docrep/009/a0086s/A0086S08.htm>

<http://148.206.53.231/UAMI11039.PDF>http://www.panoramaacuicola.com/articulos_y_entrevistas/2011/05/03/enfermedades_virales_en_camaronescultivados_en_el_hemisferio_oesteuna_resena.html

http://www.conacyt.gob.mx/comunicacion/revista/244/Articulos/Virus_gran_amenaza/VirusCamaron2.html

<http://ballast-outreach-ucsgep.ucdavis.edu/files/136960.pdf>

<https://docs.google.com/viewer?a=v&pid=gmail&attid=0.1&thid=13feaed014754aa7&mt=application/vnd.openxmlformats-officedocument.wordprocessing>

<http://www.thefishsite.com/articles/110/control-and-management-of-the-white-spot-syndrome-virus-wssv>

<http://www.oie.int/es/normas-internacionales/codigo-acuatico/acceso-en-linea/>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2855118/>

http://www.lib.noaa.gov/retiredsites/japan/aquaculture/proceedings/report32/oseko_corrected.pdf

<http://www.oie.int/es/normas-internacionales/manual-acuatico/acceso-en-linea/>

Referencias

- Chang PS, Lo CF, Wang YC, Kou GH, 1996. Identification of white spot syndrome virus associated baculovirus (WSBV) target organs in the shrimp *P. monodon* by in situ hybridization. *Disease of Aquatic Organisms*, 27: 131-139.
- Cuéllar-Anjel, J., R. Chamorro y K. Klimpel. 2007. Efecto de un bloqueador viral en la sobrevivencia en camarones *Litopenaeus vannamei* infectados experimentalmente con el virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV) bajo condiciones controladas. Libro de resúmenes del VIII Simposio Internacional de Camarón de Cultivo y Exhibición Comercial. León, Nicaragua.
- Cuéllar-Anjel, J. 2008. Técnicas de diagnóstico para enfermedades en camarones. *En: Morales, V. y J. Cuéllar-Anjel (eds.). 2008. Guía Técnica de Patología e Inmunología de Camarones. Programa CYTED Red II-D Vannamei, Panamá, Rep. de Panamá. pp. 258.*
- Cuéllar-Anjel, J., M. Corteel, L. Galli, V. Alday-Sanz and K.W. Hasson. 2010. Principal Shrimp Infectious Diseases, Diagnosis and Management. *In: The Shrimp Book*, ed. Victoria Alday-Sanz, Nottingham University Press, U.K. ISBN 978-1-904761-59-4. pp. 930.
- Cuéllar-Anjel, J., B. White-Noble, P. Schofield, R. Chamorro and D.V. Lightner. 2012. Report of significant WSSV-resistance in the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, from a Panamanian breeding program. *Aquaculture*, Vol. 368-369, pp. 36-39; doi:10.1016/j.aquaculture.2012.08.048.

Durand SV, Lightner DV, Redman RM, Bonami, JR, 1997.

Ultrastructure and morphogenesis of white spot syndrome baculovirus (WSSV). *Disease of Aquatic Organisms*, 29: 205-211.

Flegel TW, 2006. Detection of major penaeid shrimp viruses in Asia, a historical perspective with emphasis on Thailand. *Aquaculture*, 258: 1-33.

Hasson KW, Fan Y, Reiningen T, Vennti J, Varner PW, 2006. White-spot syndrome virus (WSSV) introduction into the Gulf of Mexico and Texas freshwater systems through imported, frozen bait-shrimp. *Disease of Aquatic Organisms*, 71: 91-100.

Kou GH, Peng SE, Chiu YL, Lo CF (1998) Tissue distribution of white spot syndrome virus (WSSV) in shrimp and crabs. In Flegel TW (ed) *Advances in shrimp biotechnology*. National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Bangkok.

Lightner DV, 1996. A handbook of shrimp pathology and diagnostic procedures for diseases of cultured penaeid shrimp. The World Aquaculture Society, Baton Rouge Louisiana, USA, 305 pp.

Lightner DV, Redman RM, Poulos BT, Nunan LM, Mari JL, Hasson KW, 1997. Risk of spread of penaeid shrimp viruses in the Americas by the international movement of live and frozen shrimp. *Reviews of Science & Technology – Office International des Epizooties*, 16: 146-160.

Lo CF, Leu JH, Ho CH, Chen CH, Peng SE, Chen YT, et al., 1996. Detection of baculovirus associated with white spot syndrome (WSBV) in penaeid shrimps using polymerase chain reaction. *Disease of Aquatic Organisms*, 25: 133-141.

Morales, V. y J. Cuéllar-Anjel (eds.). 2008. *Guía Técnica de Patología e Inmunología de Camarones. Programa CYTED Red II-D Vannamei, Panamá, Rep. de Panamá. ISBN 978-9962-661-02-3. pp. 258.*