

Caracterización histológica y molecular de infección por *Edwardsiella anguillarum* en tilapia (*Oreochromis niloticus*) cultivada en sistema biofloc en Lima, Perú

Histological and molecular characterization of *Edwardsiella anguillarum* infection in tilapia (*Oreochromis niloticus*) cultivated in the biofloc system in Lima, Peru

Verónica Sierralta C.^{1,4,5}, Egma Mayta H.¹, Jorge León Q.², José Serna C.³, Christian Robles R.³, Rubén Alfaro A.³

RESUMEN

El objetivo del estudio fue aislar y caracterizar fenotípica y molecularmente al patógeno *Edwardsiella anguillarum*, así como determinar las lesiones anatómo-histopatológicas en tilapia (*Oreochromis niloticus*) cultivada con tecnología biofloc en la zona norte de Lima, Perú. Se trabajó con cinco cepas bacterianas aisladas y caracterizadas mediante técnicas bioquímicas convencionales y por el sistema API 20E. Se identificó *E. anguillarum* a partir de órganos internos mediante las técnicas bioquímica y molecular. Los signos clínicos externos más frecuentes fueron exoftalmia bilateral, eritema en aletas pectorales y alrededor del ano. Internamente se apreció nodulaciones blanquecinas en el corazón e hígado. El estudio histopatológico reveló necrosis en lamelas branquiales, bazo, intestino, riñón posterior y gónada, así como presencia de reacción inflamatoria de tipo granulomatosa en corazón, hígado, bazo, riñón y gónadas. Las cepas evaluadas presentaron metabolismo fermentativo de glucosa y positividad ante las pruebas de rojo de metilo, producción de sulfuro de hidrógeno, indol y ácido a partir de manitol. Los aislados fueron confirmados por la técnica de PCR y secuenciación del gen 16S ARNr. Todas las cepas presentaron sensibilidad a los antibióticos ácido nalidixico, florfenicol, gentamicina, kanamicina, flumequina, oxitetraciclina y sulfatrimetoprim.

Palabras clave: *Edwardsiella anguillarum*, PCR, biofloc, tilapia

¹ Laboratorio de Virología Clínica Molecular, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú

² Laboratorio de Ecología Microbiana, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú

³ Biodes laboratorios Soluciones Integrales S.R.L., Tumbes, Perú

⁴ Facultad de Pesquería, Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima, Perú

⁵ E-mail: vsierralta@lamolina.edu.pe

Recibido: 26 de noviembre de 2019

Aceptado para publicación: 25 septiembre de 2020

Publicado: 21 de diciembre de 2020

ABSTRACT

The aim of this study was to isolate and characterize phenotypically and molecularly the pathogen *Edwardsiella anguillarum*, as well as to determine the anatomohistopathological lesions in tilapia (*Oreochromis niloticus*) cultivated with biofloc technology in the northern area of Lima, Peru. Five isolated bacterial strains were isolated and characterized by conventional biochemical techniques and by the API 20E system. *E. anguillarum* was identified from internal organs using biochemical and molecular techniques. The most frequent external clinical signs were bilateral exophthalmia, erythema in the pectoral fins and around the anus. Internally, whitish nodules in the heart and liver were observed. The histopathological study revealed necrosis in the branchial lamellae, spleen, intestine, posterior kidney and gonad, as well as the presence of an inflammatory reaction of granulomatous type in the heart, liver, spleen, kidney and gonads. The strains showed fermentative glucose metabolism and positivity to methyl red, production of hydrogen sulphide, indole and acid production from mannitol. The isolates were confirmed by the PCR technique and sequencing of the 16S rRNA gene. All the strains showed sensitivity to the antibiotics nalidixic acid, florfenicol, gentamicin, kanamycin, flumequine, oxytetracycline and trimethoprim sulfamethoxazole.

Key words: *Edwardsiella anguillarum*, PCR, biofloc, tilapia

INTRODUCCIÓN

El género *Edwardsiella* pertenece a la familia Enterobacteriaceae y se caracteriza por ser un bacilo corto, Gram negativo (Ewing *et al.*, 1965). Antes de 2013, este género se encontraba conformado únicamente por tres especies: *E. tarda*, *E. ictaluri* y *E. hoshinae*, las que constituían un grupo heterogéneo de bacterias que afectaban un amplio rango de hospedadores, tales como peces, reptiles, aves y mamíferos (Reichley *et al.*, 2017). Actualmente, el género *Edwardsiella* ha sido reclasificado en cinco especies, basada en información genómica y filogenética. Dichas especies involucran tres patógenos de peces (*E. piscicida*, *E. anguillarum* y *E. ictaluri*) y dos patógenos que le son inofensivos (*E. tarda* y *E. hoshinae*) (Leung *et al.*, 2019).

E. anguillarum es una bacteria facultativa intracelular, la cual ha recibido distintos nombres como *E. piscicida*-like sp, *E. piscicida* atípica y *E. tarda*, siendo original-

mente aislada de anguila (*Anguilla* spp) en China (Shao *et al.*, 2015) y reportada en otros peces como mero blanco (*Epinephelus aeneus*), ronco (*Haemulon sciurus*), lubina estriada (*Morone saxatilis*), pargo japonés (*Pagrus major*), besugo (*Pagellus bogaraveo*), dorada (*Sparus aurata*) y tilapia (*Oreochromis* sp) (Shao *et al.*, 2015; Buján *et al.*, 2018; Armwood *et al.*, 2019).

La tilapia (*Oreochromis* spp) es uno de los peces más cultivados a nivel mundial, siendo introducido en el Perú en 1970 (Baltazar, 2009; FAO, 2018). Actualmente, el incremento de la demanda por alimentos de origen acuático trae consigo la intensificación de las densidades en cultivos de esta especie, surgiendo la tecnología biofloc, la cual está constituida por bacterias y otros organismos (fitoplancton, rotíferos, ciliados, flagelados y copépodos) que mejoran la calidad del agua, proveen alimentación suplementaria a los organismos en cultivo y los protegen de enfermedades (McIntosh *et al.*, 2000; Ray *et al.*, 2010).

La rápida expansión e intensificación del cultivo de tilapia ha traído consigo la ocurrencia de enfermedades provocadas por los patógenos bacterianos: *E. tarda*, *Plesiomonas shigelloides* y *Francisella noatunensis* (Soto *et al.*, 2010; Mateo *et al.*, 2011; Sierralta *et al.*, 2016), así como la presencia del virus emergente de la tilapia lacustre (TiLV) (Eyngor *et al.*, 2014). Son escasos los estudios sobre patologías bacterianas en el Perú, por lo cual, en el presente trabajo se planteó como objetivo aislar y caracterizar fenotípica y molecularmente al patógeno *E. anguillarum* y analizar las lesiones histopatológicas provocadas en tilapias con signos de enfermedad en una piscigranja de la zona norte de Lima.

MATERIALES Y MÉTODOS

Lugar de Muestreo

El estudio se llevó a cabo en una piscigranja de sistema intensivo con cero recambio de agua y tecnología biofloc, localizada en la provincia de Huaura, departamento de Lima, Perú, durante los meses de marzo de 2014 a octubre de 2015.

Muestras y Aislamiento Bacteriano

Se colectaron 85 tilapias *O. niloticus*, variedad chitralada, de los estadios de alevinaje, crecimiento y comercial, con signos aparentes de enfermedad, tales como: exoftalmia, melanosis, erosión de las aletas y dificultad para la natación. El número de muestras fue obtenido empleando la metodología descrita por Amos (1985) y de Blas *et al.* (2006).

Los peces fueron sacrificados mediante la técnica del corte medular (American Fisheries Society, 2011) y se procedió a desinfectar la superficie de la piel con alcohol etílico 70%. Se tomaron diversas muestras para análisis histopatológico, además de un

«pool de órganos» (bazo y riñón anterior), que fue homogenizado en solución salina estéril (0.85% Na Cl). El homogenizado fue cultivado en placas con agar tripticasa de soya (TSA) y agar diferencial eosina azul de metileno (EMB) para enterobacterias, las cuales fueron incubadas a 35 °C durante 24-48 horas (Heil, 2009).

Las colonias bacterianas fueron caracterizadas mediante pruebas de tipificación primaria (coloración Gram, citocromo oxidasa y motilidad en gota pendiente). Las colonias presuntivas fueron pasadas a ceparios con agar TSA y mantenidas en estado de pureza en los laboratorios de Ecología Microbiana y Virología Clínica Molecular de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima.

Análisis Histopatológico

De los peces analizados se obtuvieron muestras de branquias y órganos internos como corazón, estómago, hígado, bazo, intestino, ciegos pilóricos, páncreas, riñón anterior, posterior, gónada y músculo esquelético, las cuales fueron fijadas en solución de formaldehído al 10% (v/v) en buffer fosfato (pH 7.0) y procesadas utilizando la metodología propuesta por Luna (1968). Los tejidos fueron cortados a 5 µm de espesor, teñidos con Hematoxilina y Eosina de Harris (HE) y visualizados en un microscopio compuesto (Nikon, modelo Eclipse 90i).

Identificación de *E. anguillarum*

Se realizaron pruebas para la caracterización fenotípica y bioquímica de *E. anguillarum*, tales como citocromo oxidasa, fermentación y oxidación de glucosa, Voges Prokauer, citrato, rojo de metilo, indol, producción de sulfuro de hidrógeno, entre otras (Shao *et al.*, 2015). Además, se realizaron pruebas bioquímicas mediante el uso del sistema API 20E para enterobacterias (Biomériux, Francia), siguiendo las indicaciones del fabricante, para posteriormente incubarlas a 35 °C durante 24-48 h.

Identificación Molecular

Las cepas aisladas e identificadas bioquímicamente fueron analizadas molecularmente en la empresa Biodes Laboratorios Soluciones Integrales S.R.L. mediante amplificación del gen 16S ARNr. La extracción de ADN fue realizada por el método estándar CTAB-DTAB (Gustincich *et al.* 1991), adaptado para células bacterianas (Dulanto, 2013). Posteriormente, la región del gen 16S ARNr fue amplificada con los iniciadores universales para bacterias, 8F (5' AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG 3') y 1510R (5' GGC TAC CTT GTT ACG A 3') descritos por Weisburg (1991) y Monsalud *et al.* (2003) en estudios filogenéticos bacterianos, para la obtención de productos de aproximadamente 1500 pares de bases (pb).

El análisis de PCR fue realizado en 20 µl del volumen final de reacción en microtubos de 0.2 ml. Se preparó una mezcla usando 1.5 mM de MgCl₂, 2 µl de buffer Taq 10X, 0.2 mM de cada dNTPs (100 mM), 10 pmol de cada cebador, 2 µl de ADN bacteriano extraído y 1 U de Taq ADN polimerasa. El proceso de amplificación se realizó en un termociclador (Blue-Ray Biotech), iniciando con 94 °C durante 5 min, seguida de 30 ciclos de desnaturalización (94 °C durante 1 min), hibridación (55 °C durante 1 min) y elongación (72 °C durante 2 min), concluyendo con una extensión final de 5 min a 72 °C. Los productos de amplificación de la PCR fueron analizados en gel de agarosa al 1% con buffer de migración TAE 1X, coloreados en solución de bromuro de etidio y visualizados empleando un transiluminador UV. Para la secuenciación de ambas cadenas de los productos de amplificación, se remitió 10 µl de cada muestra a la empresa Macrogen (Corea), incluyendo 5 µl de cada cebador para el gen 16S ARNr.

Análisis Bioinformático

Las secuencias *forward* y *reverse* obtenidas de cada producto de la PCR fueron-

procesadas mediante el programa SeqMan II v. 5.03 (DNASTAR) para visualizar los cromatogramas y generar las secuencias consenso. Una vez obtenidas dichas secuencias se utilizó la herramienta Nucleotide BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) y Ez Biocloud (Yoon *et al.*, 2017) para verificar la identidad de las cepas bacterianas en estudio.

Sensibilidad Antibiótica

Las cepas aisladas fueron sometidas a pruebas de sensibilidad *in vitro* frente a distintos antibióticos según el método de difusión en agar, utilizando la técnica de Kirby-Bauer descrita por el *National Comitee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS, 2015). A partir de colonias bacterianas de 24 h de incubación, se preparó una suspensión bacteriana en suero fisiológico estéril (NaCl 0.85%) ajustada a una concentración equivalente a 0.5 de la escala McFarland (1.5x10⁸ células/ml). Dicha suspensión se sembró por duplicado en placas de agar Müeller Hinton. Posteriormente se aplicaron los sensidiscos con antimicrobianos: florfenicol (30 µg), flumequina (30 µg), gentamicina (10 µg), kanamicina (30 µg), oxitetraciclina (30 µg), sulfatrimetoprim (25 µg), ácido nalidíxico (30 µg) y se incubaron por 24 h a 30 °C.

RESULTADOS

Signos Clínicos

En 5 de los 85 peces se aisló el patógeno *E. anguillarum*. Los peces afectados correspondieron a la fase de producción comercial. La mayor frecuencia de signos externos fue la exoftalmia bilateral, eritema en aletas pectorales y alrededor del ano (Cuadro 1). Entre los signos internos se apreciaron nodulaciones blanquecinas en el corazón e hígado, así como congestión en intestino y gónadas.

Cuadro 1. Frecuencia de signos clínicos en tilapia (*Oreochromis niloticus*) infectadas con *Edwardsiella anguillarum* (n = 5)

Signo clínico	n
<i>Externos</i>	
Exoftalmia bilateral	3
Eritema debajo de la mandíbula	1
Eritema en el pecho	1
Eritema en aletas pectorales	3
Eritema en el vientre	2
Enrojecimiento alrededor del ano	3
Descarga sanguinolenta a través del ano	1
<i>Internos</i>	
Corazón con nodulaciones blanquecinas	1
Estómago congestionado	1
Hígado congestionado y con nodulaciones blanquecinas	4
Hígado congestionado	1
Vesícula biliar oscura e incrementada de tamaño	2
Intestino congestionado	2
Gónada congestionada	2
Ascitis	2

Hallazgos Histopatológicos

Se apreciaron lesiones asociadas con el aislamiento de *E. anguillarum* en los peces afectados como necrosis e hiperplasia focal de las lamelas branquiales secundarias; severa pericarditis (Figura 1A), con presencia de células granulo eosinofílicas y reacción inflamatoria a nivel de la aurícula y ventrículo

cardíaco. En el hígado se observó degeneración hidrópica y necrosis focal de hepatocitos, así como congestión de capilares sinusoides y reacción inflamatoria perivascular con células granulo eosinofílicas. En el bazo se encontró congestión leve y necrosis focal de tipo licuefactiva en parénquima y cápsula. Igualmente a nivel de tejido pancreático se halló necrosis.

En el intestino se observó necrosis focal de las vellosidades intestinales y la lámina propia levemente edematosa con presencia de células granulo eosinofílicas y bacterias. En el riñón anterior se halló congestión leve de vasos sanguíneos (Figura 1B) y necrosis focal de tejido hematopoyético, mientras que en el riñón posterior se observó necrosis focal de los túbulos renales.

A nivel de tejido gonadal se apreció severa necrosis y hemorragia. Además, se encontró necrosis de tipo caseosa formando granulomas en el ventrículo cardíaco, tejido hepático (Figura 1C), esplénico, renal y gonadal.

Caracterización de *E. anguillarum*

Se aislaron cinco cepas bacterianas presuntivas de *E. anguillarum* a partir de órganos internos. Las colonias presentaron color blanco cremoso, brillosas con bordes regulares y convexas en agar TSA. Asimismo, en agar EMB se visualizaron colonias de color ámbar, brillosas con bordes regulares y convexas. En la observación microscópica, se apreciaron bastones pequeños (2.44-2.57 µm de largo), Gram negativos y móviles. Las características bioquímicas de las cepas evaluadas mediante métodos convencionales fueron homogéneas, excepto la prueba de inositol (Cuadro 2).

Al emplear el Sistema API 20 E para la identificación de *E. anguillarum*, se obtuvo un aislado de *E. tarda* con alto porcentaje de identificación (99.1%) y 4 de *E. hoshinae* con baja discriminación (34.6%) (Cuadro 3), presentando diferencias bioquímicas en la prueba de inositol.

Identificación Molecular

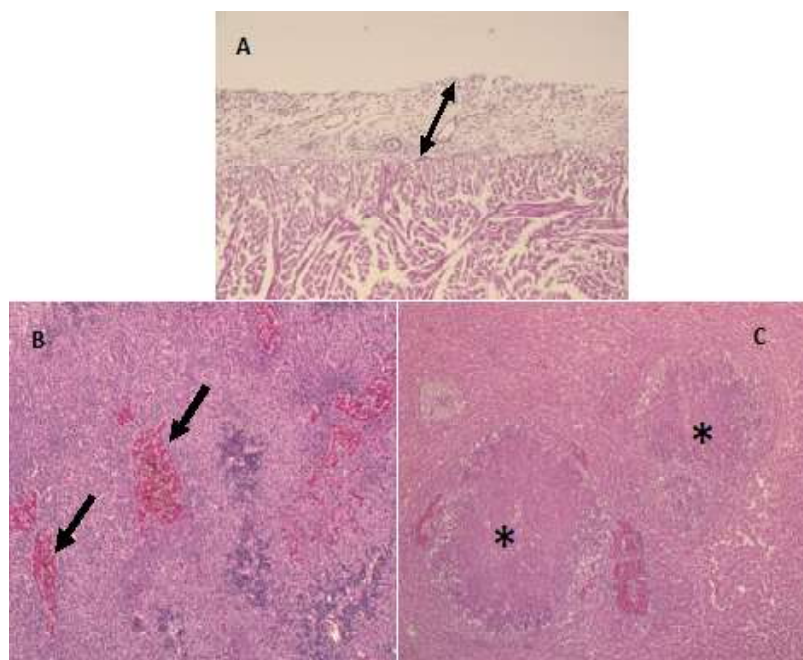


Figura 1. Lesiones histopatológicas producidas por *Edwardsiella anguillarum* en tilapia (*Oreochromis niloticus*): A. Marcada pericarditis a nivel del ventrículo cardíaco (flecha) (20X, HE); B. Riñón anterior con congestión focal de vasos sanguíneos (flechas) (20X, HE); C. Tejido hepático con granulomas (asteriscos) (10X, HE)

Utilizando la técnica de PCR con cebadores universales se obtuvieron los productos de amplificación de la región 16S ARNr de las cepas bacterianas de *E. anguillarum*, las cuales producen amplicones de 1500 pares de bases.

Las secuencias de las bacterias fueron comparadas con la base de datos del Genbank y se obtuvo el consenso de estas con identidades de 99.85 a 99.92% a partir del BLAST, siendo similares con *E. anguillarum* ET080813 (N.º de acceso en GenBank CP006664; Shao *et al.*, 2015). Las secuencias fueron incorporadas a la base de datos del Genbank con los números de acceso: MN658836, MN658837, MN658838, MN658839 y MN658840 (Cuadro 3).

Sensibilidad Antibiótica

En la prueba de sensibilidad a los antibióticos más frecuentemente usados en sanidad acuícola resultaron 100% sensibles al ácido nalidíxico, florfenicol, gentamicina, kanamicina, flumequina, oxitetraciclina y sulfatrimetoprim.

DISCUSIÓN

La mayoría de las tilapias en las cuales se aisló *E. anguillarum* mostraron signos clínicos como exoftalmia e internamente se visualizaron nodulaciones blanquecinas en el hígado, así como pericarditis, necrosis intestinal y reacción inflamatoria de tipo granulomatosa en bazo y riñón, guardando semejanza con lo descrito por Armwood *et al.* (2019). Por otra parte, en el hígado se visualizó degeneración hidrópica y necrosis

Cuadro 2. Características bioquímicas de *E. anguillarum* aisladas de cinco tilapias (*Oreochromis niloticus*) en una piscigranja al norte de Lima, Perú

	Cepas				
	C01	C02	C03	C04	C05
Pruebas bioquímicas					
Citocromo oxidasa	-	-	-	-	-
O/F (glucosa)	F	F	F	F	F
Motilidad	+	+	+	+	+
Producción de indol	+	+	+	+	+
Producción de H ₂ S	+	+	+	+	+
Rojo de metilo	+	+	+	+	+
Voges Prokauer	-	-	-	-	-
Citrato	-	-	-	-	-
TSI	K/A	K/A	K/A	K/A	K/A
Producción de ácido					
Glucosa	+	+	+	+	+
Lactosa	-	-	-	-	-
Manitol	+	+	+	+	+
Inositol	+	-	-	-	-
Sorbitol	-	-	-	-	-

O: oxidativo, F: fermentativo, H₂S: sulfuro de hidrógeno, TSI: Agar hierro tres azúcares, K: alcalino, A: ácido

focal de hepatocitos y en el bazo y riñón se observó depleción focal de esplenocitos y linfocitos, respectivamente, lesiones que no han sido reportadas por otros autores.

Todos los aislados de *E. anguillarum* produjeron ácido a partir de manitol y arabinosa, lo cual coincide con lo referido por Shao *et al.* (2015), aunque los resultados referentes a la prueba de inositol difieren de lo reportado por dicho autor. Por otro lado, Reichley *et al.* (2017) comunicaron la producción de sulfuro de hidrógeno en el medio Hierro Tres Azúcares sin presencia de gas en cepas de este patógeno concordando con los hallazgos del presente estudio.

Al emplear el sistema miniaturizado API 20E se identificó correctamente el taxón *Edwardsiella*; sin embargo, a nivel de especie se tipificaron cuatro cepas como *E. hoshinae* con baja discriminación (34.6%) y un aislado como *E. tarda* (99.1% de confiabilidad), debido a que en la base de datos del sistema no se encuentra la bacteria *E. anguillarum*. En este sentido, Janda y Abbott (2002) indican que estos sistemas comerciales son relativamente constantes a lo largo del tiempo y a medida que aparecen nuevas especies, las pruebas fenotípicas metabólicas más apropiadas para su discriminación no se encuentran presentes.

Cuadro 3. Identificación de cepas de *E. anguillarum* aisladas de tilapia *Oreochromis niloticus* de una piscigranja del norte de Lima, Perú, mediante el Sistema API 20 E y la técnica molecular de PCR

Cepa	Identificación Sistema API 20E			Identificación molecular		
	Especie bacteriana	Perfil numérico	Porcentaje de identidad	Especie bacteriana	Porcentaje de identidad	N.º de accesión
C01	<i>E. tarda</i>	4544322	99.1	<i>E. anguillarum</i>	99.85	MN658836
C02	<i>E. hoshinae</i>	4544102	34.6	<i>E. anguillarum</i>	99.92	MN658837
C03	<i>E. hoshinae</i>	4544102	34.6	<i>E. anguillarum</i>	99.85	MN658838
C04	<i>E. hoshinae</i>	4544102	34.6	<i>E. anguillarum</i>	99.92	MN658839
C05	<i>E. hoshinae</i>	4544102	34.6	<i>E. anguillarum</i>	99.92	MN658840

La identificación del patógeno mediante el uso de técnicas moleculares concuerda con lo reportado por diversos autores (Reichley *et al.*, 2017; Buján *et al.*, 2018; Armwood *et al.*, 2019) en peces como cherna (*Epinephelus aeneus*), lubina estriada (*Morone saxatilis*), ronco catire (*Heamulon sciurus*), besugo (*Pagellus bogaraveo*), dorada (*Sparus aurata*), anguilla moteada gigante (*Anguilla marmorata*) y tilapia (*Oreochromis niloticus*).

Cabe destacar que los buenos niveles de sensibilidad alcanzados ante los antimicrobianos utilizados en el antibiograma se deben, probablemente, a que en la piscigranja evaluada no se utilizan antibióticos para tratar enfermedades bacterianas, por lo cual tales patógenos no han adquirido resistencia antibiótica, como ocurre en otras situaciones (Lee *et al.*, 2011; Nadirah *et al.*, 2012).

De acuerdo con lo reportado por Jeney (2017) sobre la adquisición de resistencia bacteriana en peces cultivados con tecnología biofloc, es posible que el sistema de manejo haya favorecido que no se presenten

brotes de enfermedad en la piscigranja, pese a que es un sistema intensivo que tiende a generar mayor estrés en los animales y, por ende, a mayor susceptibilidad a las enfermedades.

CONCLUSIONES

- Se identificó molecularmente cepas de *Edwardsiella anguillarum* a partir de bazo y riñón anterior de tilapias (*Oreochromis niloticus*) con signos clínicos de enfermedad, procedentes de una piscigranja en la zona norte de Lima, Perú.
- El daño tisular asociado con *E. anguillarum* fue la presencia de reacción de tipo granulomatosa en órganos internos.

Agradecimientos

Los autores agradecen a los Blgos. Ronald Tarazona, Adrián Quintana y Diego Márquez por su apoyo técnico-logístico durante el desarrollo del estudio.

LITERATURA CITADA

1. **American Fisheries Society. 2011.** Suggested procedures for the detection and identification of certain finfish and shellfish pathogens. USA: American Fisheries Society.
2. **Amos KH. 1985.** Procedures for the detection and identification of certain fish pathogens. 3rd ed. Oregon: American Fisheries Society. 114 p.
3. **Armwood AR, Camus AC, López-Porrás A, Ware C, Griffin MJ, Soto E. 2019.** Pathologic changes in cultured Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) associated with an outbreak of *Edwardsiella anguillarum*. J Fish Dis 42: 1463-1469. doi: 10.1111/jfd.13058
4. **Baltazar PM. 2009.** Situación actual de la tilapia en el Perú. En: Segunda Jornada de Actualización en Tilapia. México.
5. **Buján N, Mohammed H, Balboa S, Romalde JL, Toranzo AE, Arias CR, Magariños B. 2018.** Genetic studies to re affiliate *Edwardsiella tarda* fish isolates to *Edwardsiella piscicida* and *Edwardsiella anguillarum* species. Syst Appl Microbiol 41: 30-37. doi: 10.1016/j.syapm.2017.09.004
6. **De Blas I, Ruiz-Zarzuola I, Vallejo A. 2006.** WinEpi: Working in epidemiology. An online epidemiological tool. In: XI International Symposium on Veterinary Epidemiology and Economics. Zaragoza, España.
7. **Dulanto GJ, León QJ, Alfaro AR. 2013.** Identificación rápida de especies del género *Vibrio* asociadas con el cultivo de «langostino blanco» *Litopennaeus vannamei* por amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA). Tesis de Biólogo. Lima: Univ. Nacional Mayor de San Marcos. 109 p.
8. **Ewing WH, Mcwhorter AC, Escobar MR, Lubin A. 1965.** *Edwardsiella*, a new genus of *Enterobacteriaceae* based on a new species, *E. tarda*. Int J Syst Evol Micr 15: 33-38. doi: 10.1099/00207713-15-1-33
9. **Eyngor M, Zamostiano R, Kembou Tsofack JE, Berkowitz A, Bercovier H, Tinman S, Lev M, et al. 2014.** Identification of a novel RNA virus lethal to tilapia. J Clin Microbiol 52: 4137-4146. doi: 10.1128/JCM.00827-14
10. **[FAO] Food and Agricultural Organization of the United Nations. 2018.** The state of the world fisheries and aquaculture 2018 – Meeting the sustainable development goals. Rome: FAO. 210 p.
11. **Gustincich S, Manfiolett G, Del Sal G, Schneider C, Carnici P. 1991.** A fast method for high quality genomic DNA extraction from whole human blood. BioTechniques 11: 298-302.
12. **Heil N. 2009.** National Wild Fish Health Survey – Laboratory procedures manual. 5th ed. USA: U.S. Fish and Wildlife Service. 409 p.
13. **Janda JM, Abbott SL. 2002.** Bacterial identification for publication: when is enough enough? J Clin Microbiol 40: 1887-1891. doi: 10.1128/jcm.40.6.1887-1891.2002
14. **Jeney G 2017.** Fish diseases: prevention and control strategies. UK: Academic Press. 264 p.
15. **Lee SW, Najiah M, Chuah TS, Noor Azhar MS, Wendy W, Nadira M, Mohd EA. 2011.** Antibigram and plasmid profiling from *Edwardsiella tarda* isolated from freshwater fish in east Coast Malaysia. Sustain Sci Manag 6: 19-27.
16. **Leung KY, Wang Q, Yang Z, Siame BA. 2019.** *Edwardsiella piscicida*: a versatile emerging pathogen of fish. Virulence 10: 555-567. doi:10.1080/21505594.2019.1621648
17. **Luna LG 1968.** Manual of histologic staining methods of the armed forces institute of pathology. 3rd ed. New York: Mc Graw-Hill. 258 p.
18. **Mateo E, Castro T, Sierralta V. 2011.** Enfermedad bacteriana de tipo granulomatosa en tilapia cultivada en jaulas flotantes. En: III Congreso Nacional de Acuicultura. Perú.

19. **McIntosh D, Samocha TM, Jones ER, Lawrence AL, McKee DA, Horowitz S, Horowitz A. 2000.** The effect of a bacterial supplement on the high-density culturing of *Litopenaeus vannamei* with low-protein diet in outdoor tank system and no water exchange. *Aquacult Eng* 21: 215-227. doi: 10.1016/S0144-8609(99)00030-8
20. **Monsalud RG, Maybanua FO, Tapay LM, Hedreya CT, Olympia MS, Migo VP, Kurahashi M, et al. 2003.** Identification of pathogenic and non-pathogenic *Vibrio* strains from shrimp farms in the Philippines. *J Gen Appl Microbiol* 49: 309-314. doi: 10.2323/jgam.49.309
21. **Nadirah M, Ruhil HH, Jalal KC, Najiah M. 2012.** Occurrence of *Plesiomonas shigelloides* in cultured red hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus*) from tropical rivers, east coast Malaysia. *Pak J Biol Sci* 15: 600-603. doi: 10.3923/pjbs.2012.600.603
22. **[NCCLS] National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2015.** Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. Approved standard M02-A12. [Internet]. Available in: https://clsi.org/media/1631/m02a12_sample.pdf
23. **Ray AJ, Lewis BL, Browdy CL, Leffler JW. 2010.** Suspended solids removal to improve shrimp (*Litopenaeus vannamei*) production and an evaluation of a plant-based feed in minimal-exchange, superintensive culture systems. *Aquaculture* 299: 89-98. doi: 10.1016/j.aquaculture.2009.11.021
24. **Reichley SR, Ware C, Steadman J, Gaunt PS, García JC, LaFrentz BR, Tachil A, et al. 2017.** Comparative phenotypic and genotypic analysis of *Edwardsiella* isolates from different hosts and geographic origins, with emphasis on isolates formerly classified as *E. tarda*, and evaluation of diagnostic methods. *J Clin Microbiol* 55: 3466-3491. doi: 10.1128/JCM.00970-17
25. **Shao S, Lai Q, Liu Q, Wu H, Xiao J, Shao Z, Wang Q, Zhang Y. 2015.** Phylogenomics characterization of a highly virulent *Edwardsiella* strain ET080813T encoding two distinct T3SS and three T6SS gene clusters: propose a novel species as *Edwardsiella anguillarum* sp. nov. *Syst Appl Microbiol* 38: 36-47. doi: 10.1016/j.syapm.2014.10.008
26. **Sierralta V, Huatuco E, León J. 2016.** Primer registro de *Plesiomonas shigelloides* como patógeno oportunista de tilapia *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) en una piscigranja de Lima, Perú. *Rev Inv Vet Perú* 27: 565-572. doi: 10.15381/rivep.v27i3.11996
27. **Soto K, Bowles K, Fernandez D, Hawke JP. 2010.** Development of a real time PCR assay for identification and quantification of the fish pathogen *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis*. *Dis Aquat Organ* 89: 199-207. doi: 10.3354/dao02204
28. **Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ. 1991.** 16S Ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J Bacteriol* 173: 697-703. doi: 10.1128/jb.173.2.697-703.1991
29. **Yoon SH, Ha SM, Kwon S, Lim J, Kim Y, Seo H, Chun J. 2017.** Introducing EzBioCloud: a taxonomically united database of 16S rRNA and whole genome assemblies. *Int J Syst Evol Micr* 67: 1613-1617. doi: 10.1099/ijsem.-0.001755