

Caracterización fenotípica y molecular de *Shewanella algae* aislada de tilapias (*Oreochromis niloticus*) de cultivo en Perú

Phenotypic and molecular characterization of *Shewanella algae* isolated from farmed tilapia (*Oreochromis niloticus*) in Peru

Verónica Sierralta Chichizola^{1,4*}, Egma Mayta Huatuco¹, Jorge León Quispe², Rubén Alfaro Aguilera³

RESUMEN

El objetivo del estudio fue aislar, caracterizar e identificar la bacteria *Shewanella algae* a partir de muestras de órganos internos de tilapias (*Oreochromis niloticus*) enfermas, las cuales estuvieron cultivadas con tecnología biofloc en Lima, Perú; además, se describieron los cambios histopatológicos provocados por el patógeno. Se muestrearon 85 tilapias que presentaron signos clínicos de enfermedad como exoftalmia, melanosis y nado errático. Se aislaron siete cepas bacterianas las cuales fueron caracterizadas a través de pruebas bioquímicas y confirmadas como *S. algae* mediante la técnica de PCR y secuenciamiento del gen RNAr 16S. Las cepas mostraron susceptibilidad antibiótica a florfenicol, ácido nalidíxico, gentamicina, flumequina, kanamicina y sulfatrimetoprim. Los hallazgos histopatológicos fueron hiperplasia interlamelar, epicarditis, miocarditis, enteritis, necrosis en estómago y congestión en diversos tejidos.

Palabras clave: tilapia, sistema biofloc, *Shewanella algae*, sensibilidad antibiótica, PCR, histopatología

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 Ecobiotech Lab S.A.C., La Libertad, Perú

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

* Autor para correspondencia: Verónica Sierralta Chichizola; vsieralta@lamolina.edu.pe

Recibido: 30 de enero de 2024

Aceptado para publicación: 1 de junio de 2024

Publicado: 28 de junio de 2024

©Los autores. Este artículo es publicado por la Rev Inv Vet Perú de la Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Este es un artículo de acceso abierto, distribuido bajo los términos de la licencia Creative Commons Atribución 4.0 Internacional (CC BY 4.0) [<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.es>] que permite el uso, distribución y reproducción en cualquier medio, siempre que la obra original sea debidamente citada de su fuente original

ABSTRACT

The aim of this study was to isolate, characterize and identify the *Shewanella algae* bacteria from internal organ samples of diseased tilapia (*Oreochromis niloticus*), which were cultivated using biofloc technology in Lima, Peru; In addition, the histopathological changes caused by the pathogen were described. In total, 85 tilapias were sampled that presented clinical signs of disease such as exophthalmia, melanosis and erratic swimming. Seven bacterial strains were isolated, which were characterized through biochemical tests and confirmed as *S. algae* using the PCR technique and sequencing of the 16S rRNA gene. The strains showed antibiotic susceptibility to florfenicol, nalidixic acid, gentamicin, flumequine, kanamycin and sulfamethoxazole trimethoprim. The histopathological findings were interlamellar hyperplasia, epicarditis, myocarditis, enteritis, necrosis in the stomach and congestion in various tissues.

Key words: tilapia, biofloc system, *Shewanella algae*, antibiotic sensitivity, PCR, histopathology

INTRODUCCIÓN

Shewanella algae se caracteriza por ser un bastón corto Gram negativo y motil (Holt *et al.*, 2005; Cai *et al.*, 2006), encontrándose ampliamente distribuido en ambientes de agua dulce y marinos. Es considerado un patógeno oportunista en humanos y animales acuáticos (Cai *et al.*, 2006; Zan *et al.*, 2022).

Se han producido mortalidades masivas causadas por la infección de *S. algae* en varias especies acuáticas como pos-larvas de abalón (*Haliotis diversicolor supertexta*), mejillón zebra (*Dreissena polymorpha*) (Cai *et al.*, 2006), corvina (*Scinenops ocellata*) (Chen *et al.*, 2003), lenguado rubio (*Cynoglossus semilaevis*) (Han *et al.*, 2017), ostra portuguesa (*Crassostrea angulata*), almeja (*Meretrix lusoria*), mejillón verde (*Perna viridis*), almeja común de manglar (*Geloina erosa*) (Tseng *et al.*, 2018), langostino blanco (*Penaeus vannamei*) (Cao *et al.*, 2018), perca gigante (*Lates calcarifer*) (Erfanmanesh *et al.*, 2019) y anguila americana (*Anguilla rostrata*) (Wang *et al.*, 2020).

A nivel mundial una de las especies acuícolas más cultivadas es la tilapia (*Oreochromis spp*), la cual fue introducida en 1970 al Perú (FAO, 2018; Baltazar, 2009). En la actualidad, el gran requerimiento de alimentos procedentes de ambientes marinos y continentales ha impulsado la intensificación de la tilapicultura, emergiendo la tecnología biofloc, encontrándose conformada por bacterias y otros microorganismos que optimizan la calidad del agua, proporcionan alimento complementario para los organismos cultivados y los resguardan de enfermedades (Mc Intosh *et al.*, 2000; Ray *et al.*, 2010).

El rápido crecimiento e incremento de la producción de tilapia ha generado la aparición de enfermedades causadas por bacterias patógenas como *Plesiomonas shigelloides*, *Edwardsiella tarda*, *Francisella noatunensis* y *Shewanella putrefaciens* (Soto *et al.*, 2010; Mateo *et al.*, 2011; Sierralta *et al.*, 2016; El-Barbary, 2017). Se dispone de pocos estudios de enfermedades bacterianas en Perú, por lo tanto, el propósito de realizar la presente investigación fue efectuar la caracterización fenotípica y molecular del patógeno *S. algae*, así como describir le-

siones histopatológicas en tilapias enfermas en un centro de cultivo ubicado en el departamento de Lima, Perú.

MATERIALES Y MÉTODOS

Localización, Peces y Muestras

El estudio se desarrolló en una piscigranja de sistema intensivo (6 kg/m³) con tecnología biofloc ubicada en el departamento de Lima, Perú, entre marzo de 2014 hasta octubre de 2015.

Se recolectaron 85 peces *O. niloticus* correspondientes a los estadios de alevín, juvenil y comercial que presentaron signos sugestivos de enfermedad como exoftalmia, heridas en aletas, melanosis y natación dificultosa. El tamaño de muestra se hizo siguiendo los lineamientos de Amos (1985) y de Blas *et al.* (2006). Los peces fueron sacrificados mediante decapitación y corte medular.

Se tomaron muestras de órganos internos (bazo y riñón anterior), las cuales fueron homogenizadas en solución salina estéril y cultivadas en agar tripticosa de soya (TSA) a 35 °C por 24 a 48 horas (Heil, 2009).

Se tomaron muestras adicionales de órganos externos e internos, preservados en formalina bufferada al 10% y procesadas para histopatología según la metodología propuesta por Luna (1968). Se efectuaron cortes de 5 µm de espesor, los cuales fueron montados en láminas porta objetos y coloreados con Hematoxilina y Eosina de Harris (HE).

Caracterización Fenotípica

La caracterización fenotípica se hizo mediante tinción Gram, citocromo oxidasa y motilidad. Además, mediante pruebas bioquímicas a través del sistema API 20E para bacterias entéricas (Biomériux, Francia), según instrucciones del fabricante, e incubación a 35 °C por 24 a 48 horas.

Sensibilidad Antibiótica

La susceptibilidad antimicrobiana de los aislados fue evaluada por el método Kirby-Bauer (NCCLS, 2015). Todas las cepas crecieron en agar TSA por 24 h a 35 °C. Se realizó la suspensión de las bacterias en solución salina estéril a una dilución equivalente al estándar de McFarland 0.5. Se diseminó la suspensión bacteriana en agar Mueller Hinton por duplicado y se adicionó los discos de sensibilidad antibiótica: florfenicol (30 µg), flumequina (30 µg), gentamicina (10 µg), kanamicina (30 µg), ácido nalidíxico (30 µg), oxitetraciclina (30 µg) y sulfametoxazol trimetoprim (25 µg). Se incubaron las placas a una temperatura de 30 °C por 24 h.

Identificación Molecular

Los aislados identificados bioquímicamente se analizaron molecularmente mediante la amplificación del gen RNAr 16S. El ADN fue extraído siguiendo la metodología propuesta por Gustincich *et al.* (1991) y adecuado para bacterias (Dulanto *et al.*, 2013). Se amplificó la región del gen RNAr 16S con el uso de cebadores universales para bacterias, 8F y 1510R (Weisburg *et al.*, 1991; Monsalud *et al.*, 2003), obteniéndose productos de 1500 pares de bases.

Se efectuó el análisis de PCR en 20 µl del volumen final de reacción. La mezcla se preparó utilizando 1.5 mM de MgCl₂, 0.2 mM de cada dNTPs (100 mM), 2 µl de buffer Taq 10X, 10 pmol de cada iniciador, 1 U de Taq ADN polimerasa y 2 µl de ADN bacteriano extraído. La amplificación se llevó a cabo en un termociclador, con una desnaturalización inicial de 94 °C por 5 min, continuando con 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 1 min, hibridación de 55 °C por 1 min y elongación de 72 °C por 2 min, concluyendo con la extensión final a 72 °C por 5 min. Los productos amplificados fueron evaluados en un gel de agarosa al 1% con buffer de migración TAE 1X. Las cadenas de los productos amplificados fueron remitidas a la

compañía Macrogen (Corea del Sur) con el cebador previamente utilizado en la PCR para la respectiva secuenciación.

El estudio filogenético se realizó con el software MEGA-X (Kumar *et al.*, 2018), en tanto que para la identificación de especies bacterianas se usaron las herramientas Nucleotide BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) y Ez Biocloud (Yoon *et al.*, 2017).

RESULTADOS

Signos clínicos

Los peces enfermos colectados eran parte de la fase de producción comercial. Entre los signos clínicos que se presentaron con mayor frecuencia se encuentran las aletas pectorales y poro urogenital eritematosos. En la evaluación de la cavidad abdominal se observó intestino congestivo, hemorragia gonadal y líquido ascítico.

Hallazgos histopatológicos

Se reconocieron lesiones de hiperplasia interlamelar; pericarditis focal con leve edema endotelial en aurícula y ventrículo (Figura 1A), y severa miocarditis focal. A nivel del estómago, separación del epitelio y necrosis focal de tejido glandular. En el hígado, capilares sinusoides ligeramente congestivos y en parénquima, necrosis licuefactiva (Figura 1B). En bazo y riñón anterior se visualizó congestión (Figura 1C) y edema. En intestino, severa reacción inflamatoria en lámina propia. En gónada se presentaron folículos gonadales severamente congestionados y necróticos.

Caracterización fenotípica

A partir de órganos internos de tilapia se logró aislar siete (n=7) cepas bacterianas presuntivas a *S. algae*. Las colonias fueron de color salmón, brillosas, de bordes regulares, convexas y de consistencia ligosa en agar TSA. Todos los aislados correspondieron a bastón corto (1-2 μ m de largo), Gram negativo,

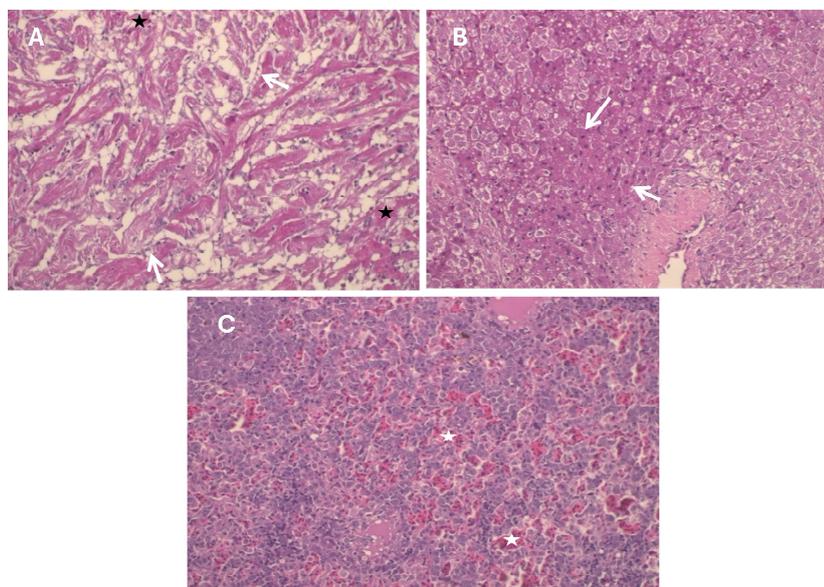


Figura 1. Cortes histológicos de tilapia (*Oreochromis niloticus*). A. Miocarditis (estrellas) con edema endotelial en ventrículo cardíaco (flechas). H&E. 400X. B. Tejido hepático con necrosis licuefactiva de hepatocitos (flechas). H&E. 40X. C. Riñón anterior con congestión (estrellas). H&E. 400X

Cuadro 1. Perfil bioquímico de *Shewanella algae* aislada a partir de tilapia (*O. niloticus*)

Reacción	n = 7
Beta galactosidasa	-
Arginina dehidrolasa	-
Lisina descarboxilasa	-
Ornitina descarboxilasa	-
Utilización de citrato	-
Producción de sulfuro de hidrógeno	+
Hidrólisis de ureasa	-
Triptófano desaminasa	-
Producción de indol	-
Producción de acetoina	-
Hidrólisis de gelatina	-
Asimilación de:	
Glucosa	-
Manitol	-
Inositol	-
Sorbitol	-
Ramnosa	-
Sacarosa	-
Melobiosa	-
Amigdalina	-
Arabinosa	-

+: reacción positiva, -: reacción negativa

motil y oxidasa positivo. Bioquímicamente, las cepas evaluadas mostraron reacción negativa para beta galactosidasa, lisina y ornitina descarboxilasa, arginina dehidrolasa, utilización de citrato, hidrólisis de ureasa, triptófano desaminasa, producción de indol, acetoina, hidrólisis de gelatina y asimilación de carbohidratos (Cuadro 1). Las cepas revelaron características bioquímicas homogéneas. Por otro lado, al utilizar el sistema API 20E para identificar *S. algae*, se obtuvieron siete aislados de *S. putrefaciens*, cuyo perfil numérico fue 400004 con buena identificación (89%).

Sensibilidad antibiótica

Los siete aislados de *S. algae* exhibieron sensibilidad a todos los antimicrobianos.

Seis fueron sensibles y uno mostró sensibilidad intermedia frente a oxitetraciclina (Cuadro 2).

Identificación molecular

Las secuencias del gen RNAr 16S de los siete aislados se compararon con la información de la base de datos del Genbank. Las secuencias mostraron identidades de 99 a 100% en función del BLAST y similitud a *S. algae* (ATCC 51192, N.º de accesoión NR_117771.1, cepa DW01 51192, N.º de accesoión NR_117770), Estas secuencias se incorporaron en la base de datos del Genbank (números de accesoión OQ826640 a OQ826646).

DISCUSIÓN

Especies del género *Shewanella*, familia Shewanellaceae (Ivanova *et al.*, 2004), son comúnmente consideradas como microorganismos de productos acuáticos (Derby y Hammer, 1931; Jorgenson y Hub, 1989) y patógenos oportunistas de animales acuáticos y humanos (Cai *et al.*, 2006).

Las dos especies más frecuentes de *Shewanella*, *S. algae* y *S. putrefaciens*, provocan infección en humanos y peces (Chen *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2013; Pékala *et al.*, 2014; Duan *et al.*, 2015). Cepas identificadas como *S. putrefaciens* han sido aisladas de numerosos casos clínicos; sin embargo, los aislados pueden haber sido identificados erróneamente y pueden pertenecer a *S. algae* (Vogel *et al.*, 1997).

En años recientes, brotes de enfermedad causados por el patógeno *S. algae* se han incrementado en animales acuáticos, tales como en la anguila americana (*Anguilla rostrata*) y langostino (*Penaeus vannamei*) (Cao *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2020), pudiendo ser el presente trabajo el primer aislamiento de esta especie de patógeno a partir de *Oreochromis niloticus*.

Cuadro 2. Susceptibilidad antimicrobiana de aislados de *Shewanella algae* a partir de muestras de órganos de tilapia (*O. niloticus*)

Antibiótico	Sensible		Sensibilidad intermedia	
	Nº cepas positivas	Frecuencia (%)	Nº cepas positivas	Frecuencia (%)
Florfenicol (30 µg)	7	100	-	-
Flumequina (30 µg)	7	100	-	-
Gentamicina (10 µg)	7	100	-	-
Kanamicina (30 µg)	7	100	-	-
Sulfatrimetoprim (25 µg)	7	100	-	-
Ácido nalidíxico (30 µg)	7	100	-	-
Oxitetraciclina (30 µg)	6	86	1	14

Los signos clínicos hallados a la necropsia, tales como exoftalmia bilateral, aletas y poro urogenital eritematosos no han sido reportados en tilapia. Signos como ascitis y congestión intestinal, guardan similitud con lo hallado por Han *et al.* (2017) en lenguado rubio (*Cynoglossus semilaevis*). Cabe destacar que *S. algae* es un patógeno con diversos factores de virulencia, tales como habilidad de adhesión, secreción de citotoxinas, actividad enzimática y hemolítica (Chelsey *et al.*, 2019; Lee *et al.*, 2019). En la presente investigación, se visualizó el intestino con fluido sanguinolento y hemorragias gonadales causados por *S. algae*, lesiones que probablemente estén asociadas a la producción de estos factores de virulencia. Además, se encontró una severa reacción inflamatoria en la lámina propia y necrosis licuefactiva de las vellosidades intestinales, siendo similar a los hallazgos reportados por Han *et al.* (2017), quienes reportaron infiltración de células inflamatorias en la submucosa intestinal.

En cuanto a las características bioquímicas encontradas en las cepas de *S. algae* sobresale la positividad a la producción de sulfuro de hidrógeno, tal y como se menciona en la literatura (Holt *et al.*, 2005; Cai *et al.*, 2006, 2018; Han *et al.*, 2017). La bacteria evidenció reacción negativa a ornitina descarboxilasa e hidrólisis de gelatina en con-

cordancia con los hallazgos de Cai *et al.* (2006). Asimismo, los aislados no produjeron ácido a partir de manitol, inositol, sorbitol, ramnosa, sacarosa, melobiosa, amigdalina y arabinosa, lo cual guarda semejanza con otros reportes (Cai *et al.*, 2006, 2018; Wang *et al.*, 2020). Por otro lado, la no asimilación de glucosa difiere con los hallazgos de Cao *et al.* (2018) y Wang *et al.* (2020).

Las cepas fueron identificadas mediante el Sistema API 20E como *S. putrefaciens*. Cabe destacar, según Holt *et al.* (2005), que *S. algae* no se encuentra incorporada en el banco de datos de dicho sistema. Es así que la identificación bioquímica de *S. algae* fue confirmada mediante el secuenciamiento de la región del gen RNAr 16S, el cual fue usado por varios autores (Cai *et al.*, 2006; Erfanmanesh *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2020).

La susceptibilidad antibiótica de los aislados fue manifiesta a gentamicina, flumequina, kanamicina, ácido nalidixico y florfenicol, guardando similitud con lo descrito por diversos autores (Holt *et al.*, 2005; Cai *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2020). Asimismo, una de las cepas evaluadas mostró sensibilidad antibiótica intermedia a oxitetraciclina, tal y como lo refieren Han *et al.* (2017) y Erfanmanesh *et al.* (2019).

Por último, los adecuados niveles de susceptibilidad con los antibióticos evaluados se deberían a que en el centro de cultivo utilizado en el estudio no se usan antimicrobianos para tratar infecciones bacterianas, y de esta manera, se estaría evitando el desarrollo de resistencia antibiótica por parte de los patógenos (Lee *et al.*, 2011; Nadirah *et al.*, 2012).

CONCLUSIONES

- Se identificó molecularmente la bacteria *Shewanella algae* en tilapia de fase de producción comercial en peces que presentaron signos clínicos de enfermedad.
- Todas las cepas de *S. algae* fueron sensibles a seis de los siete antibióticos evaluados.
- Se encontraron lesiones histopatológicas en branquias, corazón, estómago, hígado, bazo, intestino y gónadas.

Agradecimientos

Los autores agradecen a los Blgos. Adrián Quintana, Ronald Tarazona y Diego Márquez por el valioso apoyo brindado para la realización del presente estudio.

LITERATURA CITADA

1. **Amos KH. 1985.** Procedures for the detection and identification of certain fish pathogens. 3rd ed. Oregon, USA: American Fisheries Society. 114 p.
2. **Baltazar PM. 2009.** Situación actual de la tilapia en el Perú. En: Segunda Jornada de Actualización en Tilapia. México.
3. **Cai J, Chen H, Thompson KD, Li C. 2006.** Isolation and identification of *Shewanella alga* and its pathogenic effects on postlarvae of abalone *Haliotis diversicolor* supertexta. J Fish Dis 29: 505-508. doi: 10.1111/j.1365-2761.-2006.00732.x
4. **Cao H, Chen S, Lu L, An J. 2018.** *Shewanella algae*: an emerging pathogen of black spot disease in freshwater-cultured white leg shrimp (*Penaeus vannamei*). Isr J Aquacult - Bamid 70: 1-7. doi: 10.46989/001c.20952
5. **Chelsey AB, Pandit RT, Hilary AB. 2019.** *Shewanella algae* keratitis. Indian J Ophthalmol 67: 148-150. doi: 10.4103/ijo.IJO_617_18
6. **Chen C, Hu C, Chen X, Zhang L. 2003.** Identification and characterization of *Shewanella algae* as a novel pathogen of ulcer disease of fish *Scinenops ocellata*. J Oceanol Limnol Sin 34: 1-8.
7. **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.
8. **Derby HA, Hammer BW. 1931.** Bacteriology of butter. IV. Bacteriological studies of surface taint butter. Iowa Agricultural Experimental Station Research Bulletin 145: 387-416.
9. **Duan M, Wang D, Wang J, Xiao X, Han L, Zhang F. 2015.** A case report of intracranial infection caused by *Shewanella putrefaciens*. Neurol Sci 36: 625-629. doi: 10.1007/s10072-014-1956-5
10. **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, Perú: Univ. Nacional Mayor de San Marcos. 96 p.
11. **El-Barbary M. 2017.** First recording of *Shewanella putrefaciens* in cultured *Oreochromis niloticus* and its identification by 16Sr RNA in Egypt. Egypt J Aquat Res 43: 101-107. doi: 10.1016/j.ejar.2017.01.002
12. **Erfanmanesh A, Beikzadeh B, Aziz Mohseni F, Nikaein D, Mohajerfar T. 2019.** Ulcerative dermatitis in barra-

- mundi due to coinfection with *Streptococcus iniae* and *Shewanella algae*. Dis Aquat Organ 134: 89-97. doi: 10.3354/dao03363
13. [FAO] **Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2018.** The state of the world fisheries and aquaculture 2018 - Meeting the sustainable development goals. Rome: FAO. 210 p.
 14. **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.
 15. **Han Z, Sun J, Lv A, Sung Y, Shi H, Hu X, Xing K. 2017.** Isolation, identification and characterization of *Shewanella algae* from reared tongue sole, *Cynoglossus semilaevis* Günther. Aquacult 468: 356-362. doi: 10.1016/j.aquaculture.2016.10.038
 16. **Heil N. 2009.** National Wild Fish Health Survey - Laboratory procedures manual. U.S. Fish and Wildlife Service, Warm Springs, Washington, WA.
 17. **Holt HM, Gahrn-Hansen B, Bruun B. 2005.** *Shewanella algae* and *Shewanella putrefaciens*: clinical and microbiological characteristics. Clin Microbiol Infect 11: 347-352. doi: 10.1111/j.1469-0691.2005.01108.x
 18. **Ivanova EP, Flavier S, Christen R. 2004.** Phylogenetic relationships among marine Alteromonas-like proteobacteria: emended description of the family Alteromonadaceae and proposal of Pseudoalteromonadaceae fam. nov., Colwelliaceae fam. nov., Shewanellaceae fam. nov., Moritellaceae fam. nov., Ferrimonadaceae fam. nov., Idiomarinaceae fam. nov. and Psychromonadaceae fam. nov. Int J Syst Evol Microbiol 54: 1773-1788. doi: 10.1099/ijs.0.02997-0
 19. **Jorgenson BR, Hub HH. 1989.** Growth and activity of *Shewanella putrefaciens* isolated from spoiling fish. Int J Food Microbiol 9: 51-62. doi: 10.1016/0168-1605(89)90037-8
 20. **Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K. 2018.** MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. Mol Biol Evol 35: 1547-1549. doi: 10.1093/molbev/msy096
 21. **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. J Sustain Sci Manag 6: 19-27.
 22. **Lee Y, Tung K, Cheng J. 2019.** Genomic characterization of carbapenem-resistant *Shewanella algae* isolated from Asian hard clam (*Meretrix lusoria*). Aquacult 50: 300-304. doi: 10.1016/j.aquaculture.2018.10.028
 23. **Liu PY, Lin CF, Tung KC, Shyu, CL, Wu MJ, Liu JW, Chang CS, et al. 2013.** Clinical and microbiological features of *Shewanella* bacteremia in patients with hepatobiliary disease. J Intern Med 272: 431-438. doi: 10.1111/j.1365-2796.2012.04152.x
 24. **Luna LG. 1968.** Manual of histologic staining methods of the armed forces institute of pathology. New York, USA: Mc Graw-Hill. 258 p.
 25. **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.
 26. **Mc Intosh 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. Aquac Eng 21: 215-227. doi: 10.1016/S0144-8609(99)00030-8
 27. **Monsalud RG, Maybanua FO, Tapay LM, Hedreyda CT, Olympia MS, Migo VP, Kurahashi M, Yokota A. 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

28. **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
29. **[NCCLS] National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2015.** Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. Approved standard M02-A12. [Internet]. Disponible en: https://clsi.org/media/1631/m02a12_sample.pdf
30. **Pêkala A, Kozińska A, PaŹdzior E, G³owacka H. 2014.** Phenotypical and genotypical characterization of *Shewanella putrefaciens*, strains isolated from diseased freshwater fish. J Fish Dis 38: 283-293. doi: 10.1111/jfd.12231
31. **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. Aquacult 299: 89-98. doi: 10.1016/j.aquaculture.-2009.11.021
32. **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
33. **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
34. **Tseng SY, Liu PY, Lee YH, Wu ZY, Huang CC, Cheng CC, Tung KC. 2018.** The pathogenicity of *Shewanella algae* and ability to tolerate a wide range of temperatures and salinities. Can J Infect Dis Med Microbiol 2018: 1-9. doi: 10.1155/2018/6976897
35. **Vogel BF, Jørgensen K, Christensen H, Olsen JE, Gram L. 1997.** Differentiation of *Shewanella putrefaciens* and *Shewanella alga* on the basis of whole-cell protein profiles, ribotyping, phenotypic characterization, and 16S rRNA gene sequence analysis. Appl Environ Microbiol 63: 2189-2199. doi: 10.1128/aem.63.6.2189-2199.1997
36. **Wang H, Gu Y, Chen J, Cao H. 2020.** *Shewanella algae*: an emerging causative agent for ulcer disease in freshwater-farmed American eel *Anguilla rostrata*. Isr J Aquacult - Bamid 72: 1-12. doi: 10.46989/001c.21953
37. **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
38. **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 6: 1613-1617. doi: 10.1099/ijsem.-0.001755
39. **Zan Z, Han Z, Hou Y, Zhang Y, Sun J. 2022.** Development of a loop-mediated isothermal amplification method for detection of *Shewanella algae* in fish. Aquaculture Reports 26: 101292. doi: 10.1016/j.aqrep.2022.101292