

**MỘT SỐ KẾT QUẢ CHẨN ĐOÁN MÔ BỆNH HỌC VÀ PHÂN TÍCH
SIÊU CẤU TRÚC CỦA HỘI CHỨNG HOẠI TỬ GAN TUYỆT TRÊN TÔM
NUÔI Ở ĐỒNG BẰNG SÔNG CỬU LONG**
**HISTOPATHOLOGICAL AND ULTRASTRUCTURAL FINDINGS OF
HEPATOPANCREATITIC NECROSIS SYNDROME IN SHRIMP CULTURED IN
MEKONG DELTA**

Lê Hữu Tài, Nguyễn Văn Hào, Lê Hồng Phước
Viện Nghiên Cứu Nuôi Trồng Thủy Sản 2

SUMMARY

Hepatopancreatitis necrosis syndrome caused mass mortality in shrimp cultured in Mekong Delta. Clinical signs were lethargy and anorexia; hepatopancreata was soft and muddy or marked atrophy and leathery with black streaks. Histopathological diagnosis revealed two cases of necrosis corresponding to the two clinical signs. The first one was characterized by completely degraded cells and peeling on the innertube. There were no organic living pathogens and no common signs of change on the hepatopancreatic cells when observed under electron microscope. The second one was the sign of melanization, necrotizing inflammation around the hepatic duct with the appearance of numerous blood cells and the presence of Gram-negative bacilli.

Key words: Hepatopancreas, histopathology, necrosis, shrimp

TÓM TẮT

Hội chứng hoại tử gan tụy gây chết tôm hàng loạt trên tôm nuôi ở Đồng bằng sông Cửu Long. Dấu hiệu lâm sàng trên tôm mắc hội chứng là tôm lơ đờ, bỏ ăn và chết, cơ quan gan tụy của tôm bị mềm nhũn hoặc teo dai. Chẩn đoán mô bệnh học cho thấy hai trường hợp hoại tử tương ứng với hai dấu hiệu lâm sàng. Dấu hiệu hoại tử 1 là các tế bào ống gan bị thoái hoá hoàn toàn và bong tróc vào bên trong lòng ống, không tìm thấy sự hiện diện của các tác nhân gây bệnh hữu sinh. Không có dấu hiệu biến đổi đặc trưng trên tế bào quan tụy khi quan sát dưới kính hiển vi điện tử. Dấu hiệu hoại tử 2 là hiện tượng melanin hoá, viêm quanh các ống gan tụy với sự xuất hiện của vô số tế bào máu, tìm thấy sự hiện diện của dạng trực khuẩn Gram âm trong vùng hoại tử.

Từ khoá: gan tụy, hoại tử, mô bệnh học, tôm

MỞ ĐẦU

Đã có rất nhiều tài liệu trên thế giới công bố các bệnh liên quan đến gan tụy của tôm sú và tôm thẻ chân trắng. Nguyên nhân gây bệnh có thể là các tác nhân hữu sinh như virus, vi khuẩn và ký sinh trùng như: *Vibrio*, *Monodon Baculovirus*, *Parvovirus*, *Baculoviral Midgut Gland Necrosis*, *Microsporidia* và *Haplosporidia* (Lightner, 1996). Một trong những bệnh được quan tâm nghiên cứu nhiều nhất hiện nay là bệnh hoại tử gan tụy NHP vì khả năng gây chết tôm ở nhiều cấp độ khác nhau và đã xảy ra ở nhiều nơi trên thế giới (Frelier et al., 1992; Frelier et al., 1993; Loy và Frelier, 1996; Loy et al., 1996; Vincent và Lotz, 2005; Aranguren et al., 2006; del Río-Rodríguez et al., 2006; Ibarra-Gamez et al., 2007).

Bên cạnh các tác nhân truyền nhiễm các yếu tố môi trường do các hoạt động sinh hoạt và sản xuất của con người tạo ra có khả năng ảnh hưởng đến sức khỏe tôm nuôi. Các hoá chất trong xử lý, cải tạo ao trước khi nuôi; chăm sóc sức khỏe và dinh dưỡng cho tôm trong quá

trình nuôi cũng góp phần vào việc đưa vào ao nuôi các yếu tố bất lợi. Các loại kim loại nặng tồn lưu trong môi trường (Cadmium, Kẽm, Đồng), dư lượng thuốc diệt nấm, dư lượng thuốc diệt côn trùng, độc tố nấm trong thức ăn (Aflatoxin, Mycotoxin), độc tố tảo liên quan đến hiện tượng nở hoa (tảo lam, tảo khuê, tảo giáp), . . . cũng có khả năng làm suy thoái chức năng của cơ quan gan tụy. Tác động của các chất độc lên tổ chức gan tụy của các sinh vật thủy sản đã được nghiên cứu (Lightner et al., 1982; Doughtie và Rao, 1984; Förlin et al., 1986; Khangarot, 1992; Bautista, 1994, Lightner và ct.v, 1996; Bhavan và Geraldine, 2000).

Gần đây ở Đồng bằng sông Cửu Long, người ta đã phát hiện hội chứng hoại tử gan tụy trên tôm sú và tôm thẻ chân trắng. Hội chứng có diễn biến phức tạp và gây thiệt hại lớn cho người nuôi từ năm 2010 đến nay. Một số nghiên cứu bước đầu cho thấy có khả năng hội chứng hoại tử gan tụy là do một tác nhân mới. Do đó, nhóm nghiên cứu của Viện Nghiên Cứu Nuôi Trồng Thủy Sản 2 đã tiếp cận bằng phương pháp chẩn đoán mô bệnh học trên kính hiển vi quang học và phân tích siêu cấu trúc mô gan tụy bằng kính hiển vi điện tử truyền qua. Báo cáo này là kết quả bước đầu của các biến đổi trên cấu trúc mô gan tụy tôm mắc hội chứng này.

VẬT LIỆU, PHƯƠNG PHÁP VÀ BỐ TRÍ THÍ NGHIỆM

Nghiên cứu đã được tiến hành từ tháng 6/2011 đến tháng 9/2011 tại Viện Nghiên Cứu Nuôi Trồng Thủy Sản 2 và Viện Vệ Sinh Dịch tễ Trung Ương. Mẫu vật được thu thập từ các trang trại nuôi tôm theo mô hình nuôi thâm canh của Hiệp Hội Tôm Mỹ Thanh, huyện Trần Đề, tỉnh Sóc Trăng.

Phương pháp mô bệnh học

Mỗi ao nuôi được xem là 01 mẫu cho mỗi lần thu, mẫu vật được thu thập theo hai phương thức: mẫu định kỳ (10 ngày/ lần từ sau khi thả tôm 10 ngày) và mẫu ở những ao khi tôm có dấu hiệu bất thường. Mẫu vật đã được thu thập trong 8 đợt từ tháng 7 đến tháng 9/2011. Tổng cộng thu được 261 mẫu trên 92 ao tôm nuôi tại 07 trang trại.

Mẫu mô học được cố định bằng dung dịch Davidson's với tỷ lệ mẫu vật và hoá chất cố định là 1:10. Mẫu vật tại Phòng Thí Nghiệm Mô Bệnh Học – Trung Tâm QG Quan Trắc CBMT&PNDB Thủy Sản KV Nam Bộ - Viện Nghiên Cứu Nuôi Trồng Thủy Sản II được xử lý theo phương pháp mô học truyền thống qua các bước như ngâm tẩm paraffin, cắt lát mỏng từ 4-5µm và nhuộm tiêu bản bằng Hematoxylin và Eosin (H&E), Gram hoặc Giemsa. Tiêu bản được đọc dưới kính hiển vi quang học ở các độ phóng đại khác nhau để chẩn đoán biến đổi cấu trúc mô gan tụy và sự hiện diện của các loại mầm bệnh trong mô.

Phương pháp cắt lát siêu mỏng

Mẫu bệnh phẩm được cố định tại hiện trường bằng dung dịch Paraformaldehyde 2% trong dung dịch đệm Cocadylate 0.1M (pH 7.0) và được giữ lạnh ở khoảng 4°C trong suốt quá trình. Mẫu thu được qua các đợt được chọn lọc để phân tích dựa trên kết quả chẩn đoán mô bệnh học. Tổng cộng số mẫu được phân tích bằng phương pháp cắt lát siêu mỏng là 32 mẫu.

Mẫu vật được chuyển đến Phòng Kính Hiển Vi Điện Tử - Viện Vệ Sinh Dịch Tễ Trung Ương để phân tích. Mẫu vật được xử lý và qua quá trình kết tinh khối mô trong epoxy resin; cắt lát siêu mỏng ở mức từ 50-100nm và nhuộm bằng Uranyl Acetate; quan sát lát cắt bằng kính hiển vi điện tử ở các độ phóng đại khác nhau để xác định sự thay đổi vi cấu trúc tế bào và sự hiện diện của mầm bệnh.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Dấu hiệu lâm sàng

Quan sát tôm mắc hội chứng gan tụy, chúng tôi ghi nhận tôm lờ đờ, bỏ ăn và chết. Có nhiều trường hợp biến đổi về màu sắc và hình dạng của cơ quan gan tụy như gan sưng, nhũn, nhạt màu hoặc sậm màu, teo dai. Trường hợp bệnh kéo dài còn thấy sự xuất hiện của những tia mảnh màu nâu đen trên bề mặt gan.



Hình 1. Gan tụy teo, nhạt màu, dai



Hình 2. Gan tụy tôm sú nhạt màu



Hình 3. Gan tụy tôm thẻ chân trắng với màng bao trắng, dày.



Hình 4. Gan tụy tôm sú bệnh với màu sắc khác nhau.

Kết quả chẩn đoán bằng phương pháp Mô bệnh học và phương pháp cắt lát siêu mỏng.

Trên tiêu bản mô bệnh học nhuộm H&E, tôm mắc hội chứng có hai biến đổi đặc trưng trên mô gan tụy, chúng tôi gọi là hoại tử 1 và hoại tử 2.

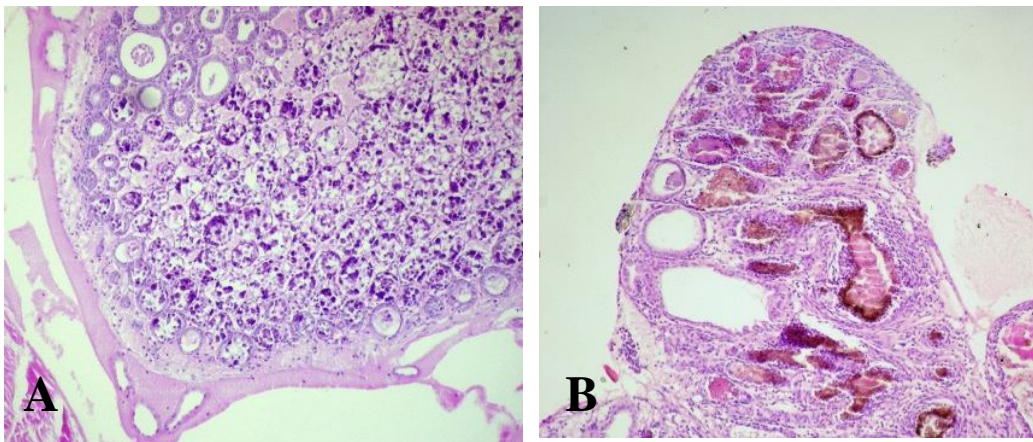
Tương ứng với dấu hiệu lâm sàng trên gan tụy là mềm nhão và nhạt màu, dấu hiệu hoại tử 1 có biểu hiện các tế bào của ống gan tụy bị thoái hoá, co lại, rơi vào trong lòng ống (hình 5A, 6A). Các tế bào bị thoái hoá này có thể bị hiện tượng tự huỷ do các enzyme nội bào. Xung quanh những ống gan tổn thương, tùy theo mức độ hoại tử cấp hay mãn có thấy xuất hiện các tế bào máu với mật độ khác nhau (Hình 6B). Ở một số vị trí trên lát cắt, có những ống gan bình thường nhưng bên trong lòng ống lại có những đám tế bào đã bị thoái hoá, có thể đó là do sự di chuyển từ vị trí hoại tử khác đến. Có những trường hợp, toàn bộ các tế bào hình thành nên cấu trúc ống gan tụy bị mất hoàn toàn chỉ còn lại bộ khung là các tế bào nền. Trong dạng thoái hoá 1, chúng tôi hoàn toàn không phát hiện có sự hiện diện của các loại mầm bệnh như virus, vi khuẩn hay ký sinh trùng ở khu vực có dấu hiệu hoại tử cũng như trên các mô bào xung quanh như dạ dày, ruột, tim và cơ (Hình 7).

Khác với hoại tử 1, trên tôm có dấu hiệu lâm sàng là gan teo, dai và sậm màu, cấu trúc ống gan hoàn toàn biến mất, số lượng các tế bào gan tụy giảm chỉ còn lại là sự hiện diện của vô số

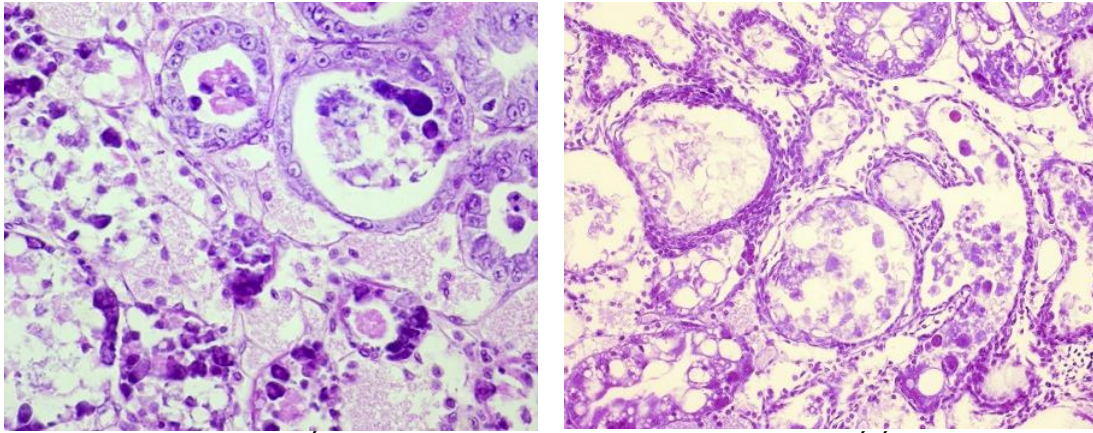
tế bào máu bao bọc xung quanh khối hoại tử. Bên trong khối hoại tử là các tế bào chết và vô số trực khuẩn Gram âm khi quan sát tiêu bản nhuộm bằng Giemsa và bằng phương pháp nhuộm Gram (Hình 8). Có hiện tượng melanin hoá xung quanh khu vực hoại tử này (Hình 5B). Do đó trên lâm sàng có thấy các tia đen trong khối gan tụy. Tùy vào mức độ, số lượng và kích thước các khối hoại tử này có thể thay đổi.

Dấu hiệu hoại tử 1 có thể đến trước trong diễn biến của hội chứng hoại tử gan tụy. Trên tôm có dấu hiệu hoại tử 1, tôm chết có dấu hiệu cấp tính và không do một nguyên nhân hữu sinh, chúng tôi thấy dấu hiệu hoại tử tràn lan trên phần lớn các ống gan tụy và sự xuất hiện của các tế bào máu ở khu vực hoại tử chưa nhiều. Đó có thể là do cơ thể tôm chưa đủ thời gian hoặc không có cơ chế để chống lại tác nhân gây hoại tử. Ở các trường hợp tôm có dấu hiệu mãn tính hơn và ao tôm có dấu hiệu phục hồi sau một đợt chết thì sự xuất hiện của các tế bào máu xung quanh vùng mô hoại tử nhiều hơn. Đó là do phản ứng của cơ thể tôm với sự tấn công của vi khuẩn hình thành nên dấu hiệu hoại tử 2. Nguồn gốc của vi khuẩn này từ môi trường nuôi hoặc lây từ những tôm đã bị nhiễm khuẩn trước đó. Bình thường, trong quần đàn tôm nuôi có một tỷ lệ tôm bị nhiễm khuẩn trên gan tụy nhưng vẫn phát triển ổn định do cường độ nhiễm thấp. Tuy nhiên khi sức khỏe tôm bị ảnh hưởng, các vi khuẩn này có cơ hội bùng phát và cộng hợp khả năng gây chết tôm.

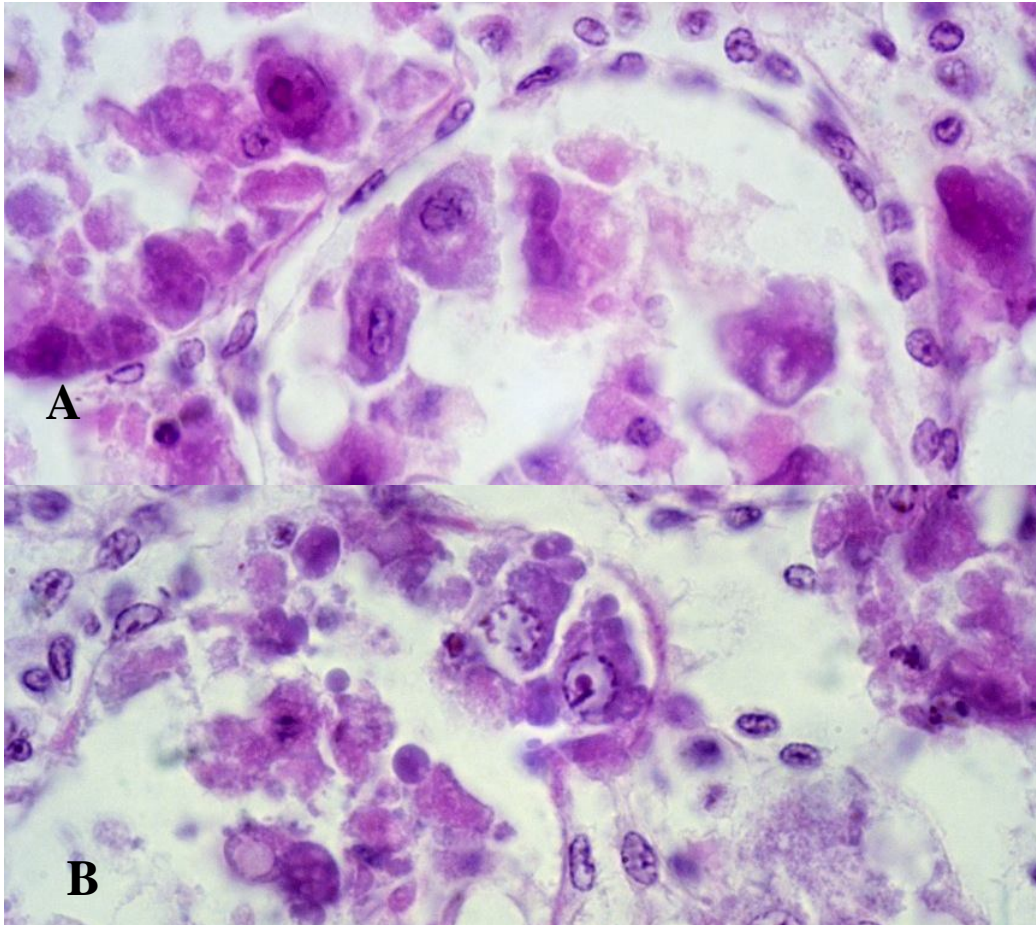
Khi quan sát các lát cắt siêu mỏng của mô gan tụy dưới kính hiển vi điện tử truyền qua, trong nhóm mẫu có dấu hiệu hoại tử 1 chúng tôi chỉ thấy xuất hiện một số cấu trúc lạ. Những cấu trúc này được tìm thấy trong nhân, tế bào chất và các bào quan như ty thể, thể Golgi và lưới nội chất. Chúng tôi hoàn toàn không thấy dấu hiệu của bất cứ nhóm virus, vi khuẩn hay ký sinh trùng nào hiện diện trên những lát cắt siêu mỏng của nhóm mẫu này. Các biến đổi này sẽ được trình bày chi tiết trong các hình minh họa (Hình 9, 10 và 11). Nhóm mẫu có dấu hiệu hoại tử 2 có dấu hiệu đặc trưng là sự hiện diện của dạng trực khuẩn bên trong vùng hoại tử (Hình 12).



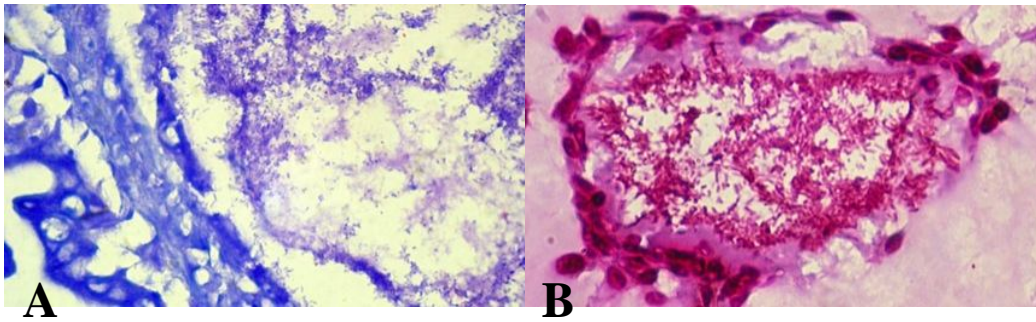
Hình 5. **A**-Dấu hiệu hoại tử 1 trên mô gan tụy với các ống gan đã hoàn toàn bị thoái hoá. (H&E, x100). **B**- Dấu hiệu hoại tử 2 trên mô gan tụy, toàn bộ tế bào gan biến mất thay vào đó là sự hiện diện của vô số tế bào máu bao quanh các vùng hoại tử cùng với hiện tượng melanin hoá (H&E, x100).



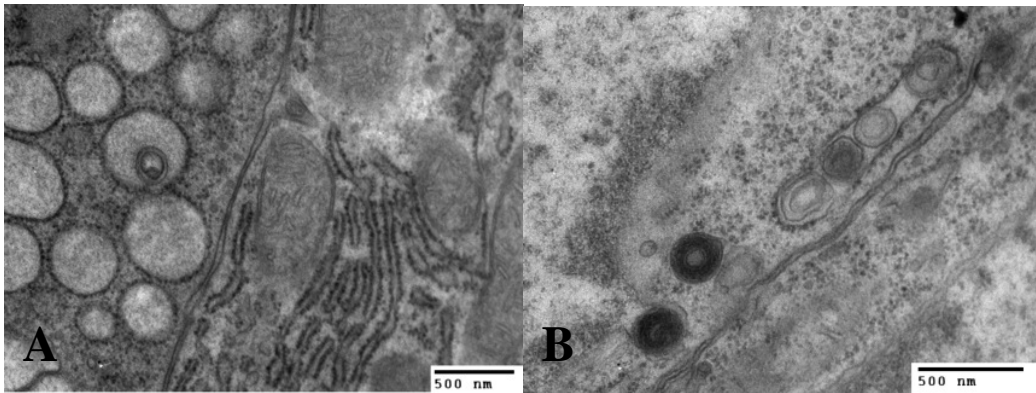
Hình 6. Mô gan tụy có dấu hiệu hoại tử 1: **A** - vùng bên trái còn một số ống gan tụy tương đối bình thường, bên phải là các ống gan hoàn toàn bị thoái hoá, có những mảnh tế bào hoặc do nhân tế bào có bắt màu tím sậm (H&E, x400). **B** - xung quanh một số ống gan bị thoái tử có sự xuất hiện của nhiều tế bào máu (H&E, x200).



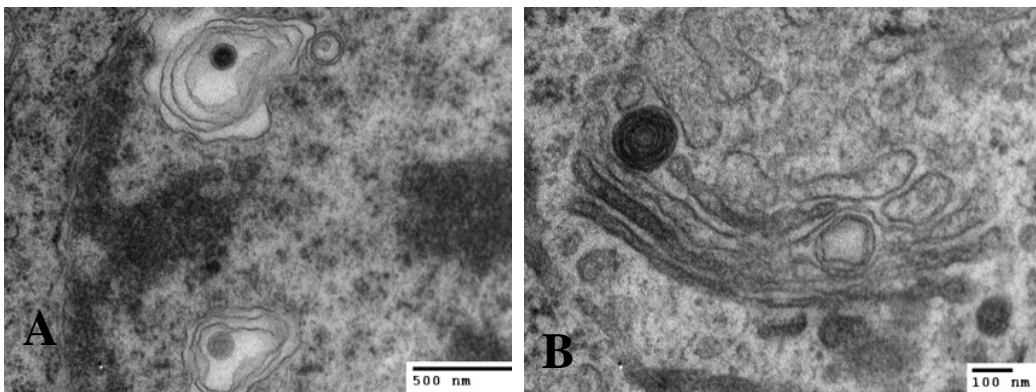
Hình 7. Mô gan tụy có dấu hiệu hoại tử 1 (A,B) - các tế bào gan tụy bị thoái hoá tạo thành các đám hỗn độn với nhiều hình thù khác nhau, một số tế bào có nhân và tế bào chất bắt màu thuốc nhuộm đậm hơn, không tìm thấy dấu hiệu của vi khuẩn hay ký sinh trùng. (H&E, x1000).



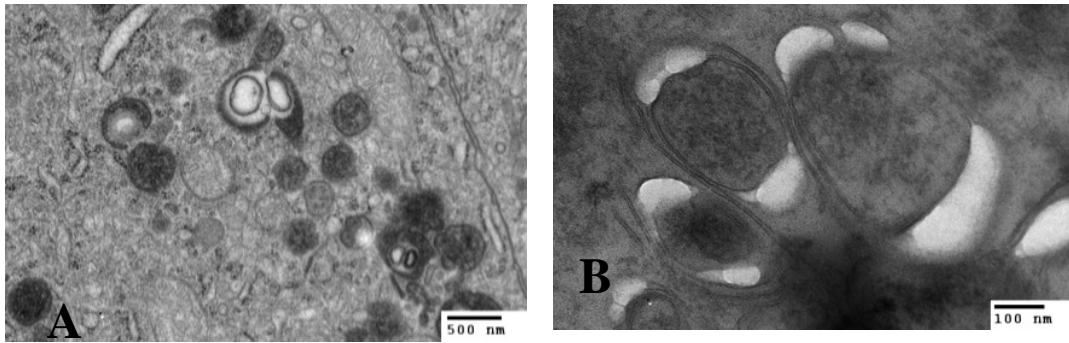
Hình 8. Dấu hiệu hoại tử 2 trên mô gan tụy, vô số trực khuẩn Gram âm bên trong vùng hoại tử, xung quanh là các tế bào máu. (A – nhuộm Giemsa, B – nhuộm Gram, x1000).



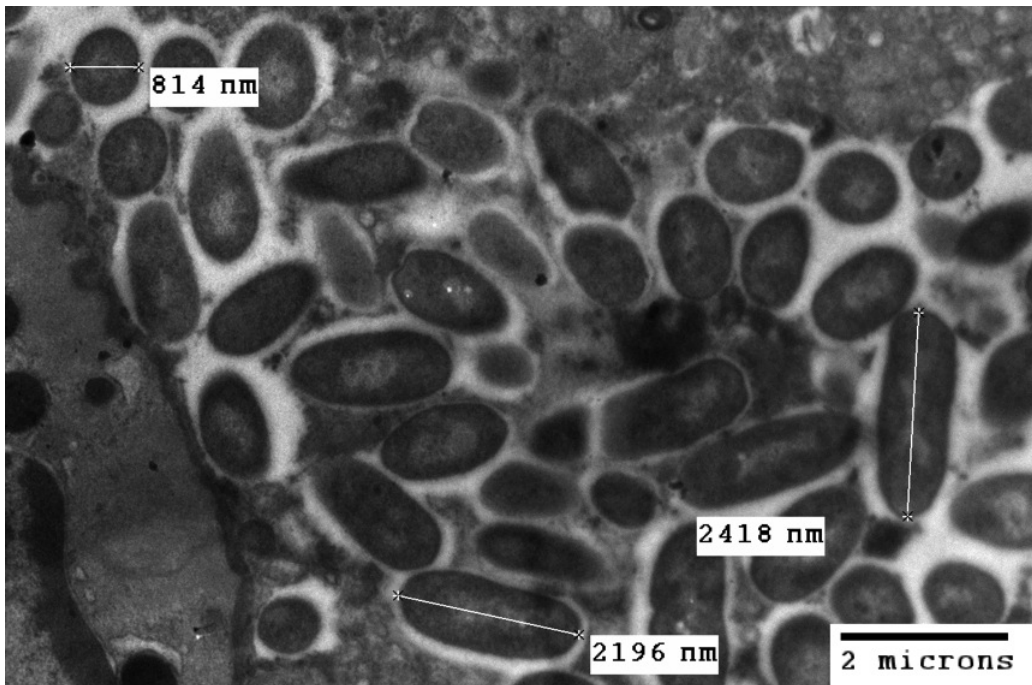
Hình 9. Cấu trúc bất thường có dạng cầu nhiều lớp bên trong lòng ống của lưới nội chất hạt và bên ngoài tế bào chất. Hình 18A góc bên trái, các ống của lưới nội chất hạt phình to hơn rất nhiều so với các ống ở góc bên phải. Hình 18B, có nhiều cấu trúc cầu trong cùng một lòng ống của lưới nội chất hạt.



Hình 10. Cấu trúc hình cầu nhiều lớp bao quanh nằm bên trong nhân tế bào (A) và trong tế bào chất gần thể Golgi (B).



Hình 11. A-Cấu trúc bất thường trong tế bào chất, các cấu trúc này có thành phần giống chất nhân của tế bào, có khả năng là những mảnh vỡ của nhân bị thoái hoá. B- Một xoang trong tế bào có chứa các cấu trúc bất thường có màng bao và rỗng hai đầu.



Hình 12. Mẫu gan tụy có dấu hiệu hoại tử 2 có sự hiện diện của dạng trực khuẩn.

Trên cơ sở các chẩn đoán mô bệnh học và phân tích siêu cấu trúc, chúng tôi nhận thấy tác nhân gây nên dấu hiệu hoại tử 1 của hội chứng hoại tử gan tụy không phải là tác nhân hữu sinh đã biết như virus, vi khuẩn hay ký sinh trùng. Các kết quả chẩn đoán bằng phương pháp sinh học phân tử dựa trên cơ sở các tác nhân đã biết cũng cho thấy hoàn toàn không có sự hiện diện của các tác nhân gây bệnh truyền nhiễm. Do đó có nhiều khả năng hội chứng này là do các tác nhân vô sinh như hoá chất hay độc tố gây nên. Dấu hiệu hoại tử 2 là dấu hiệu thứ phát do vi khuẩn gây nên khi sức khoẻ tôm đã bị suy yếu do tác nhân tiên phát chưa được biết. Những nghiên cứu về tác động của độc tố trên tôm hoặc các loài giáp xác đã được một số tác giả trên thế giới công bố những năm gần đây. Chúng tôi sẽ tiến hành so sánh và đánh giá kết quả nghiên cứu của chúng tôi với các kết quả nghiên cứu trước đây.

Những ảnh hưởng trên gan tụy của một số loài tôm nước ngọt do Aflatoxin (do các loại nấm *Aspergillus flavus* và *Aspergillus parasiticus*) đã được nghiên cứu (Lightner et al., 1982; Bautista, 1994). Trong nghiên cứu này, chúng tôi thấy tôm mắc hội chứng hoại tử gan tụy có hiện tượng co các ống gan, các không bào gần như biến mất hoàn toàn, tế bào co lại và có hiện tượng xâm nhập của tế bào máu. Tuy nhiên chúng tôi không thấy hiện tượng vỡ nhân

tế bào. Hiện tượng xơ hoá và melanin hoá thấy xuất hiện ở tôm có dấu hiệu hoại tử 2, là do tác động của vi khuẩn.

Khi cho tôm thẻ chân trắng phơi nhiễm với thuốc diệt nấm trên cây trồng có thành phần là Belnomy, Lightner và ctv (1996) thấy tôm hấp hối có biểu hiện lơ đờ, đục cơ và sậm màu. Kiểm tra mô học của tôm bị ảnh hưởng cho thấy các thay đổi bệnh lý đặc biệt được giới hạn trong gan tụy. Các tổn thương quan trọng nhất bao gồm teo gan tụy, viêm, cụm melanin hóa, hoại tử và sự bong tróc của các tế bào biểu mô của ống gan tụy. Hiện tượng hoại tử và bong tróc tế bào biểu mô ống gan tụy thấy rất rõ trong nghiên cứu của chúng tôi. Trong thí nghiệm xem xét ảnh hưởng của thuốc diệt giáp xác có thành phần Cypermethrin trên gan tụy của hai loài tôm nước ngọt (*Macrobrachium borellii* và *Palaemonetes argentinus*) Collins (2010) nhận thấy có sự tương quan của nồng độ Cypermethrin và tỷ lệ tôm thí nghiệm chết sau 45 ngày cũng như mức độ phá hủy của mô gan tụy. Tác giả nhận thấy tỷ lệ chết có sự khác biệt rõ rệt giữa các lô tôm phơi nhiễm độc chất và lô đối chứng. Tế bào F (tế bào xơ) trong mô gan tụy tăng rõ rệt sau hai tuần phơi nhiễm. Trên tôm bị hội chứng hoại tử gan tụy, chúng tôi không phát hiện sự tăng tế bào xơ mà thấy nhóm tế bào này co lại, thường bắt màu sậm rất dễ nhận thấy trong khu vực hoại tử. Sự thoái hoá của nhóm tế bào này tạo nên những cấu trúc và hình dáng có thể gây nhầm lẫn với các dạng bào tử trùng trên gan tụy.

Manisseri và Menon (1995) kiểm tra siêu cấu trúc của các tế bào gan tụy của tôm *Metapenaeus dobsoni* khi tiếp xúc với môi trường có chứa đồng cho thấy các bào quan bao gồm cả lưới nội chất, ti thể và hạt nhân bị hủy hoại của các mức độ khác nhau. Trong nghiên cứu của chúng tôi, bên cạnh các bào quan như ty thể, thể Golgi, lưới nội chất hạt bị biến dạng, chúng tôi còn nhận thấy có nhiều cấu trúc bất thường dạng cầu có nhiều lớp trong nhân, tế bào chất và trong các bào quan. Nhân tế bào bị thoái hoá còn có những cấu trúc bất thường ở bên trong. Ngoài ra các cấu trúc vô định hình khác cũng thấy xuất hiện trong tế bào chất.

Nghiên cứu của Wu và đồng tác giả (2008) cho thấy kẽm và Cadmium tác động đến sự xâm nhập của tế bào máu, sự tách rời của các tế bào hoại tử và sự hình thành của ống gan tụy hoại tử. Trong số các loại tế bào khác nhau trong ống gan tụy, tế bào R (tế bào dự trữ) có nhiều không bào và xuất hiện những giọt lipid trong tế bào chất. Trong khi kết quả nghiên cứu của chúng tôi trên tôm bị hội chứng hoại tử gan tụy cho thấy sự không bào hoá và các giọt lipid trên mô gan tụy giảm rất nhiều so với tôm bình thường.

Một nghiên cứu có liên quan cũng đã kiểm tra ảnh hưởng của Chrom hóa trị sáu trên tôm cỏ, *Palaemonetes pugio* (Doughtie và Rao, 1984) cho thấy nhiều mức độ khác nhau của hiện tượng phì đại hạt nhân và sự hiện diện của thể vùi trong nhân tế bào. Trong nghiên cứu của chúng tôi, không thấy hiện tượng phì đại hạt nhân cũng như thể vùi trong nhân thay vào đó là các trường hợp nhân bị thoái hoá với các cấu trúc bất thường trong nhân. Hiện tượng thoái hoá tế bào chất có xuất hiện nhưng không có hiện tượng dày lên của màng quanh ống gan.

Theo Lightner (1996) bệnh Hemocytic Enteritis có ảnh hưởng đến đường tiêu hóa của tôm trong đó có mô gan tụy, nguyên nhân tiên phát là do bùng phát của một số loài tảo độc và vi khuẩn đóng vai trò thứ phát gây chết tôm. Tuy nhiên trong nghiên cứu này, chúng tôi nhận thấy không có mối liên hệ giữa hội chứng hoại tử gan tụy với hiện tượng nở hoa của tảo.

KẾT LUẬN

Hiện tượng tôm nuôi chết hàng loạt ở Đồng bằng sông Cửu Long thời gian gần đây là do hội chứng hoại tử gan tụy. Tác nhân tiên phát gây nên dấu hiệu hoại tử 1 có khả năng là

các hoá chất hoặc độ ô nhiễm trong môi trường ao nuôi. Sự nhiễm khuẩn gây nên dấu hiệu hoại tử thứ phát hay hoại tử dạng 2.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Alonso-Rodriguez R., Paez-Osuna F. (2003). *Nutrients, phytoplankton and harmful algal blooms in shrimp ponds: A review with special reference to the situation in the Gulf of California*. *Aquaculture*, **219** (1-4): 317-336.
- Aranguren L.F., Brinez B., Aragon L., Platz C., Caraballo X., Suarez A., Salazar M. (2006). *Necrotizing hepatopancreatitis (NHP) infected Penaeus vannamei female brood- stock: effect on reproductive parameters, nauplii and larvae quality*. *Aquaculture* **258**, 337–343.
- Bautista M.N., Lavilla-Pitogo C.R., Subosa P.F. (1994). *Aflatoxin B1 contamination of shrimp feeds and its effect on growth and hepatopancreas of pre-adult Penaeus monodon*. *J. Sci Food Agric* **65**, 5–11.
- Bhavan P.S., Geraldine P. (2000). *Histopathology of the hepatopancreas and gills of the prawn Macrobrachium malcolmsonii exposed to endosulfan*. *Aquat Toxicol* **50**, 331–339.
- Bryan G.W. (1976). *Heavy metal contamination in the sea*. In: Johnston, R. (Ed.), *Marine Pollution*. Academic Press, New York, USA, pp. 185–302.
- Collins P. (2010). *Environmental stress upon hepatopancreatic cells of freshwater prawns (Decapoda: Caridea) from the floodplain of Paraná River*. *Natural Science* **2**: 748-759.
- Corsin F., Turnbull F. J., Mohan V. C., Hao V. N., Phi T. T., Phuoc L. H., Tinh N. T. N. and Morgan K. L. (2001). *Risk factors associated with white spot syndrome virus infection in a Vietnamese rice-shrimp farming system*. *Dis Aquat Organ* **47**: 1-12.
- Del Río-Rodríguez R.E., Soto-Rodríguez S., Lara-Flores M., Cu-Escamilla A.D., Gomez-Solano M.I. (2006). *A necrotizing hepatopancreatitis (NHP) outbreak in a shrimp farm in Campeche, Mexico: a first case report*. *Aquaculture* **255**, 606–609.
- Doughtie D.G., Rao K.R. (1984). *Histopathological and ultrastructural changes in the antennal gland, midgut, hepatopancreas, and gill of grass shrimp following exposure to hexavalent chromium*. *J Inver Pathol* **43**, 89–108.
- Förlin L., Haux C., Karlsson-Norrgren L., Runn P., Larsson A. (1986). *Biotransformation enzyme activities and histopathology in rainbow trout, Salmo gairdneri, treated with cadmium*. *Aquat Toxicol* **8**, 51–64.
- Frelier P.F., Sis R. F., Bell T. A., Lewis D. H. (1992). *Microscopic and ultrastructural studies of necrotizing hepatopancreatitis in Pacific white shrimp (Penaeus vannamei) cultured in Texas*. *Vet Pathol* **29**: 269-27.
- Frelier P.F., Loy J.K., Kruppenbach B. (1993). *Transmission of necrotizing hepatopancreatitis in Penaeus vannamei*. *J Invertebr Pathol* **61**, 44–48.
- Galindo-Reyes J.G., Venezia L.D., Lazcano-Alvarez G., Rivas-Mendoza H. (2000). *Enzymatic and osmoregulative alterations in white shrimp Litopenaeus vannamei exposed to pesticides*. *Chemosphere* **40**, 233–237.
- Ibarra-Gamez J.C., Galaviz-Silva L., Molina-Garza Z.J. (2007). *Distribution of necrotizing hepatopancreatitis bacterium (NHPB) in cultured white shrimp, Litopenaeus vannamei, from Mexico*. *Ciencias Marinas* **33**, 1–9.
- Khargarot B.S. (1992). *Copper-induced hepatic ultrastructural alterations in the snake-headed fish, Channa punctatus*. *Ecotoxicol Environ Saf* **23**, 82–293.

- Lightner D.V (1996). *A Handbook of Pathology and Diagnostic Procedures for Diseases of Penaeid Shrimp*. Tucson, AZ: Department of Veterinary Science, University of Arizona.
- Lightner D.V., Redman R.M., Price R.L., Wiseman M.O. (1982). *Histopathology of aflatoxicosis in the marine shrimp Penaeus stylirostris and P. vannamei*. J Inver Pathol **40**, 279–291.
- Lightner D.V., Hasson K.W., White B.L., Redman R.M. (1996). *Chronic toxicity and histopathological studies with Benlate, a commercial grade of benomyl, in Penaeus vannamei (Crustacea: Decapoda)*. Aquat Toxicol **34**, 105–118.
- Loy J.K. and Frelter P.F. (1996). *Specific, nonradioactive detection of the NHP bacterium in Penaeus vannamei by in situ hybridization*. J Vet Diagnostic Investigation. **8**: 324-331.
- Loy J.K., Dewhirst F.E., Weber W., Frelter P.F., Garbar T.L., Tasca S.I., Templeton J.W. (1996). *Molecular phylogeny and in situ detection of the etiologic agent of necrotizing hepatopancreatitis in shrimp*. Appl Environ Microb **62**, 3439–3445.
- Manisseri M.K., Menon N.R. (1995). *Copper-induced damage to the hepatopancreas of the penaeid shrimp Metapenaeus dobsoni an ultrastructural study*. Dis Aquat Organ **22**: 51-57.
- Vincent A.G. and Lotz J.M. (2005). *Time course of necrotizing hepatopancreatitis (NHP) in experimentally infected Litopenaeus vannamei and quantification of NHP-bacterium using real-time PCR*. Dis Aquat Organ **67**: 163-169.
- Vogt G. (1990). *Pathology of midgut gland-cells of Penaeus monodon post-larvae after Leucaena leucocephala feeding*. Dis Aquat Organ **9**, 45–61.
- Wu J.P., Chen H.C. (2004). *Effects of cadmium and zinc on oxygen consumption, ammonium excretion, and osmoregulation of white shrimp (Litopenaeus vannamei)*. Chemosphere **57**, 1591–1598.
- Wu J.P., Chen H. C., Huang D. J. (2008). *Histopathological and biochemical evidence of hepatopancreatic toxicity caused by cadmium and zinc in the white shrimp, Litopenaeus vannamei*. Chemosphere **73** (2008) 1019–1026.