

# Hematología y citología sanguínea en reptiles

## Hematology and blood cytology in reptiles

A. Martínez-Silvestre,<sup>1</sup> S. Lavín,<sup>2</sup> R. Cuenca<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Centro de Recuperación de Anfibios y Reptiles de Cataluña (CRARC) 08783 Masquefa

<sup>2</sup> Servei de Diagnòstic Hematològic. Facultat de Veterinària. UAB. Bellaterra.

### Resumen

Los reptiles son un grupo de animales cada vez más comunes en la consulta veterinaria. En estas especies, muchas herramientas diagnósticas están en fases descriptivas, entre ellas el diagnóstico hematológico y la citología sanguínea. Este artículo analiza las células sanguíneas descritas en reptiles: eritrocito, heterófilo, eosinófilo, basófilo, monocito, azurófilos y trombocito. También se expone la utilización de valores hematológicos como el hematocrito, recuentos totales, hemoglobina e índices eritrocitarios. Para todos estos valores, se discute su interpretación clínica en cuanto a las variaciones que sufren tanto fisiológica como patológicamente.



**Palabras clave:** Reptil, hematología, citología sanguínea, diagnóstico.  
**Keywords:** Reptile, hematology, blood cytology, diagnosis.

*Clin. Vet. Peq. Anim*, 2011, 31 (3): 131-141

## Introducción

La interpretación de la hematología y de la citología sanguínea en reptiles es una excelente herramienta diagnóstica en estas especies cada vez más comunes en la clínica de animales exóticos.

En el presente artículo se describen las principales células con sus características citológicas. También se detallan las técnicas de recuento y evaluación celular, así como la interpretación de las alteraciones fisiológicas y patológicas. De este modo, se ha intentado que el artículo ayude al clínico veterinario, citólogo o patólogo en el examen del frotis sanguíneo en las distintas especies de reptiles.

## Previo al análisis

La mayoría de los trabajos publicados hasta el momento utilizan la heparina de sodio o de litio como anticoagulante de elección en hematología de reptiles.<sup>1,2</sup> El EDTA puede causar lisis de los eritrocitos en algunas especies de tortugas.<sup>3</sup> Sin embargo, en algunas especies de reptiles como la iguana verde (*Iguana iguana*), o el dragón de agua chino (*Physignathus concincinus*), se puede utilizar el EDTA y se considera un buen anticoagulante, ya que no se observa lisis eritrocitaria, permite

una buena tinción y, por tanto, una mejor identificación celular respecto a las células expuestas a la heparina.<sup>4</sup>

El uso de citrato se desaconseja debido a que provoca cristalización de la hemoglobina y produce hemólisis.<sup>5</sup>

En tortugas africanas (*Malachochersus tornieri*) se ha probado la adición de albúmina bovina como estabilizante celular para evitar la eritrolisis del muestreo, dando buenos resultados y ajustando mejor los valores en recuentos y frotis.<sup>6</sup>

La heparina se usa en una concentración de 1-3 mg/ml.<sup>5</sup> Los inconvenientes de su uso incluyen el tinte azulado que da a la extensión de sangre al teñirla y la agregación que causa a los leucocitos y trombocitos, lo que afecta a los recuentos celulares.<sup>7</sup>

El lugar de venipunción y el método de recogida pueden afectar al valor hematocrito y a los recuentos totales. En los reptiles, los vasos linfáticos acompañan a los sanguíneos, lo que produce con frecuencia una contaminación linfática de la sangre durante la extracción.<sup>5</sup> Para evitarlo, los puntos de extracción con menor contaminación linfática son, en tortugas la vena yugular y el plexo braquial, en saurios la vena coccígea ventral y en serpientes la vena palatina o la punción intracardiaca.

\* Contacto: albertmarsil@hotmail.com

## Técnicas de recuento y evaluación celular

Las técnicas básicas de hematología, tanto en recuentos como en morfología, se aplican del mismo modo en los reptiles que en mamíferos, aunque existen algunas modificaciones destacables. Además, la morfología y la fragilidad osmótica de las células hemáticas varían en relación a la de los mamíferos.<sup>8</sup>

### Recuento celular

#### Contadores automáticos

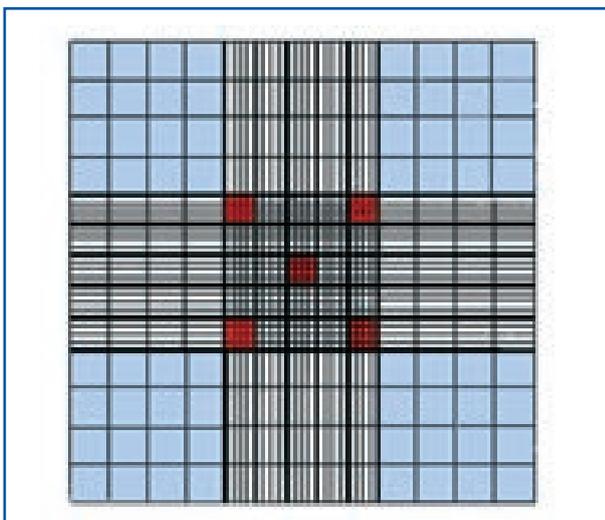
La presencia de eritrocitos y trombocitos nucleados en la sangre de los reptiles dificulta la interpretación de los resultados obtenidos con contadores automatizados. Estudios preliminares<sup>9</sup> indican que sería posible obtener un recuento leucocitario total fiable en reptiles, mediante el empleo de contadores como el *Cell Dyn 3500* y el uso del programa informático asociado para veterinaria, de la empresa Abbott Diagnostics, Abbott Park, IL. Sin embargo, incluso empleando analizadores de cierta complejidad, la variación que existe entre las diferentes especies de reptiles requiere que el operador modifique parámetros y realice estudios de validación para cada especie estudiada.

#### Recuentos manuales

##### Recuento de eritrocitos

Se puede determinar utilizando la cámara hemocitométrica de Neubauer (Cuadrícula central de 4 x 4 líneas) o la de Neubauer modificada (Cuadrícula central de 5 x 5 líneas), con la solución de Natt y Herrick<sup>5</sup> como diluyente, o bien empleando el sistema Unopette (Becton – Dickinson, Rutherford, NJ). (Tabla 1).

En ambos métodos se coloca una gota de la muestra diluida en una cámara de recuento y se deja sedimentar durante uno a cinco minutos antes de realizar el recuento. Se cuentan los cuatro cuadrados de las esquinas y el central de la cuadrícula central de la cámara (Fig. 1). El número total de eritrocitos por microlitro se calcula multiplicando el número de eritrocitos contados por 10.000.



**Figura 1.** Esquema de la cámara de Neubauer modificada. En rojo están resaltados los cuadros a utilizar en el recuento de eritrocitos.

##### Recuento de leucocitos

También requiere el uso de una cámara hemocitométrica como la de Neubauer modificada y el diluyente de Natt y Herrick. Este es el método de recuento preferido en aquellas especies de reptiles que tengan normalmente un mayor número de linfocitos circulantes que de heterófilos.

Una de sus principales desventajas es la dificultad de diferenciar los linfocitos de los trombocitos y los eritrocitos inmaduros. Algunos autores sugieren incluir los trombocitos y los eritrocitos inmaduros en el recuento diferencial leucocitario, realizado sobre la extensión de sangre, lo que permite la corrección del recuento en cámara.<sup>10</sup> El recuento total se puede ajustar tras obtener una estimación del número de trombocitos y eritrocitos inmaduros por leucocito, a partir de la extensión sanguínea. Para obtener los leucocitos/ $\mu$ l se tienen que contar los leucocitos presentes en los 9 campos mayores de la cámara de Neubauer, sumarle un 10 % y multiplicar el resultado por 200.

El segundo método de recuento es el método indirecto de Unopette (Tabla 1). La técnica de Unopette no da hasta el momento resultados mucho mejores que los realizados con el sistema de Natt y Herrick, y siempre son variables con la especie<sup>9</sup> (dependiendo si tiene mayor o menor porcentaje de eosinófilos con respecto a los linfocitos).

También se puede hacer una estimación del número de leucocitos sobre la extensión de sangre teñida. Para realizarla, se cuenta el número de leucocitos con el objetivo x40 en 10 campos; el valor medio se multiplica por 1000 y se obtiene una estimación del número de leucocitos/ $\mu$ l. Esta estimación permite, además, confirmar la exactitud del recuento leucocitario, realizado de forma manual.

##### Recuento de trombocitos

El recuento total de trombocitos también se realiza utilizando la cámara de Neubauer y el diluyente de Natt y Herrick, con una dilución de la sangre 1:200.

Su recuento se hace en la totalidad de la cuadrícula central, en ambos lados de la cámara. El número obtenido se ha de multiplicar por 1000, para obtener el número total de trombocitos por  $\mu$ l de sangre. Sin embargo, y debido a la dificultad de distinguir estas células de los linfocitos pequeños, a efectos prácticos se suele hacer una estimación sobre la extensión sanguínea, durante el recuento diferencial de leucocitos. En animales con hematocrito comprendido entre un 40 % y un 50%, se procede a contar el número de trombocitos en 5 campos y el resultado se multiplica por 3500. Si el hematocrito difiere de este margen se ha de aplicar un factor de corrección. De este modo se obtiene el número aproximado de trombocitos por  $\mu$ l. El número de trombocitos presentes en la sangre de reptiles sanos, varía entre 25 y 350 trombocitos por 100 leucocitos.<sup>5</sup>

### Valoración de la morfología celular

Se realiza sobre extensiones de sangre sin anticoagulante, secadas al aire y teñidas. Las tinciones utilizadas en descripciones científicas son las de tipo Romanowsky, como la de May-Grünwald Giemsa.<sup>7</sup> Estas consumen mucho tiempo, pero proporcionan una mejor diferenciación de los leucocitos, trombocitos y eritrocitos inmaduros. Alternativamente, en las

**Tabla 1. Comparación de las tinciones empleadas en los recuentos sanguíneos de reptiles**

	<b>Natt-Herrick</b>	<b>Unopette</b>
Fundamento	Solución basada en la combinación de tinción y diluyente (Metil-Violeta). Ideada inicialmente para recuentos en aves de corral.	Solución lisante (Oxalato) y colorante (Floxina B). Ideada inicialmente para recuentos de eosinófilos en mamíferos.
Materiales	Preparación de la solución. Uso de pipeta hematocitométrica. Dilución 1:200	Diluyente, vial y capilar en pack comercial. Dilución 1:200
Metodología	Llenar la pipeta hasta la marca 0,5 con la sangre y después aspirar diluyente hasta 101. Remover 1 minuto.	Solución inicial que lisa los glóbulos rojos. Posteriormente se tiñen los leucocitos y se cuentan.
Ventajas	Buena diferenciación en Recuento eritrocitario. Una misma pipeta para recuento de eritrocitos y leucocitos.	Más sencillo. Más exacto. Menor error de dilución.
Inconvenientes	Preparación más lenta. No fácil distinción de linfocitos y trombocitos en el recuento de Leucocitos.	Mayor tiempo de espera previo a la lectura. Menos fiable en reptiles con contaje alto en linfocitos. Mala diferenciación de la serie agranulocítica.

clínicas veterinarias se utilizan las tinciones rápidas (Diff-Quick, panóptico rápido). Sin embargo, no siempre proporcionan una diferenciación adecuada entre los diferentes leucocitos; además, los gránulos de los heterófilos tienden a unirse entre ellos, más con las tinciones rápidas, lo que hace difícil su evaluación.<sup>3</sup>

Independientemente de la tinción utilizada, la extensión de sangre debe realizarse sin anticoagulante e inmediatamente después de la extracción. De este modo se evita la presencia de artefactos, como las alteraciones en la morfología de los leucocitos y trombocitos, cambios en las propiedades tintoriales de los leucocitos, vacuolización de los monocitos o aumento en el tamaño de los linfocitos.<sup>11</sup>

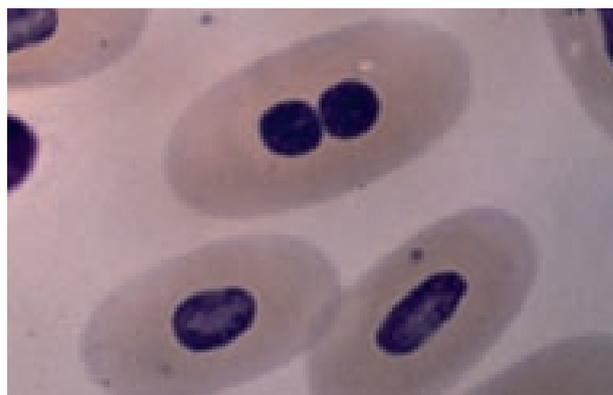
## Eritrocitos

### Número y morfología eritrocitaria

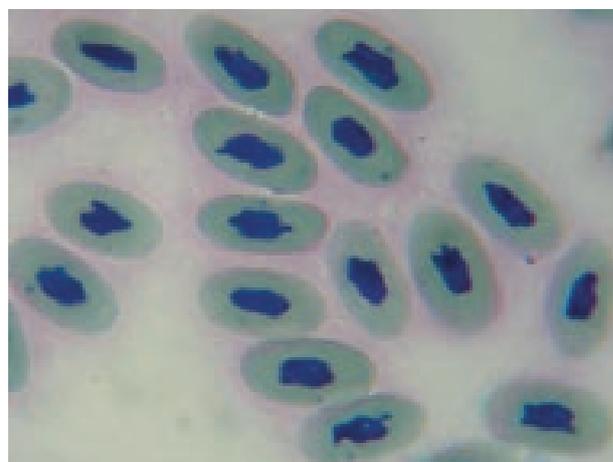
El número de eritrocitos en sangre periférica en los reptiles es inferior al de mamíferos y aves, siendo habitual que el recuento total en los lagartos sea superior al de las serpientes y tortugas.<sup>12</sup> Estos hallazgos indican una mayor capacidad en el transporte del oxígeno por parte de los eritrocitos de aves y mamíferos, comparado con los animales ectodermos como los reptiles. En general, los valores de referencia para los recuentos eritrocitarios oscilan desde 300.000 hasta 2.500.000 células / $\mu$ L, dependiendo de la especie<sup>12</sup> y del lugar de punción.<sup>13</sup> Como es habitual en otros parámetros fisiológicos de los reptiles, el recuento total de eritrocitos varía con las condiciones ambientales, el estado nutricional, el sexo (algunos machos tienen mayor número que las hembras) y la estación (más altos antes de la hibernación y más bajos justamente después).<sup>5,14</sup>

Los eritrocitos de los reptiles (Fig. 2) tienen una forma elíptica, con los extremos redondeados y el núcleo, de redondo a oval, colocado en posición central. El citoplasma tiene una textura uniforme y es eosinófilo. En reptiles sanos puede encontrarse algún eritrocito en mitosis, siendo un hallazgo anecdótico. La detección de morfología nuclear anómala, binucleación o actividad mitótica son indicativos de que el

animal tiene una respuesta regenerativa marcada ante una anemia, en el momento de salir de la hibernación o cuando los animales presentan una enfermedad inflamatoria importante o malnutrición (Fig. 3).



**Figura 2.** Eritrocitos normales en una *Python molurus*. Se aprecia un eritrocito binucleado. Tinción May Grünwald Giemsa. X 1000.



**Figura 3.** Morfología nuclear anómala en eritrocitos de Dragón Barbudo (*Pogona vitticeps*). Tinción May Grünwald Giemsa. X 400.

La presencia de formas diversas en la morfología eritrocitaria (poiquilocitos), se observa en un número bajo en individuos sanos; sin embargo, se ha asociado su presencia en número elevado a septicemia e infección crónica grave.<sup>15</sup> Se han descrito también inclusiones eritrocitarias en agamas acuáticas (*Physignatus lesuerii*) sanas.<sup>16</sup>

En ocasiones, se observan eritrocitos policromatófilos o eritrocitos inmaduros. Son células entre redondas a ligeramente irregulares, con un núcleo redondo grande y citoplasma basófilo. Parecen de menor tamaño al eritrocito maduro, debido probablemente a su forma esférica. Estas células son especialmente frecuentes en animales jóvenes, en animales en periodo de muda o en aquellos infectados por hemoparásitos.<sup>17</sup> El incremento de reticulocitos puede estar asociado con anemia regenerativa, si bien faltan estudios al respecto en estas especies. El grado de policromasia o reticulocitosis en reptiles sanos es generalmente bajo y representa menos del 1% de la población eritrocitaria. La razón puede ser que los reptiles tienen un recambio eritrocitario más lento comparado con los mamíferos debido a su vida media, que puede ser de hasta 800 días en algunas especies.<sup>15</sup>

#### **Incremento del número de eritrocitos**

Se ha observado un aumento del recuento eritrocitario como respuesta fisiológica a la migración marina en la tortuga boba *Caretta caretta*.<sup>18</sup>

En la tortuga *Mauremys leprosa* se han observado valores incrementados de recuento eritrocitario durante el otoño.<sup>19</sup> Estos valores se han interpretado como una respuesta adaptativa previa al invierno, que incrementa la capacidad oxigenadora sanguínea durante la hibernación.

El incremento del volumen corpuscular medio, el tamaño eritrocitario y el recuento de eritrocitos se han relacionado significativamente con el tamaño en las tortugas marinas de los géneros *Caretta*, *Chelonia*, *Lepidochelys* y *Eretmochelys*.<sup>20</sup>

#### **Disminución del número de eritrocitos**

-Fisiológica: A parte de con la mencionada hemodilución, se ha descrito con la edad (disminuido en los juveniles), sexo (disminuido en las hembras) y según la estación (debido a la anorexia posthibernación).<sup>21</sup>

-Patológica: se describe una disminución en el recuento eritrocitario con la deshidratación, nutrición inadecuada, eritrolisis (autoinmune, por hemoparásitos, por hemorragia), enfermedad crónica, anemia no regenerativa y en enfermedad renal.<sup>10, 22</sup>

En algunas especies de reptiles, la hibernación también provoca cambios en los valores eritrocitarios. Así, y de forma general, los valores son más altos antes de la hibernación y más bajos inmediatamente después de ésta. Algunas especies, como los viperinos, no muestran diferencias entre los valores eritrocitarios pre y posthibernación.<sup>23</sup>

El diagnóstico de anemia se ha descrito vinculado a hemoparásitos y procesos neoplásicos en serpientes<sup>24-28</sup> así como a anemia hemolítica autoinmune o síndrome de inadaptación en saurios y tortugas.<sup>25, 27</sup> Sin embargo, se ha descrito que en iguanas puede darse una respuesta eritroide regenerativa no asociada a anemia en los procesos de mineralización de tejidos blandos.<sup>26</sup>

### **Valor hematocrito**

Se determina mediante el método estándar del microhematocrito, con una centrifugación a 12000 G, durante 5 minutos.

El color del plasma debe ser de claro a ligeramente amarillo; y debido a los pigmentos de la dieta, en los reptiles herbívoros, se puede observar un plasma de amarillo-anaranjado, o verde-amarillento en las serpientes.<sup>7</sup>

El valor hematocrito normal de la mayoría de reptiles varía entre el 15 y el 55%.<sup>5</sup> Valores superiores al 55% indican bien hemoconcentración o policitemia, mientras que un hematocrito inferior al 15% sugiere anemia, siempre que se descarte la hemodilución de la muestra por la presencia de linfa. Valores inferiores al 10 % indican la valoración de una transfusión sanguínea.

#### **Incremento del hematocrito**

-Fisiológico: Se ha visto asociado a la edad en tortugas marinas, teniendo mayor valor hematocrito en las adultas que en las jóvenes.<sup>29</sup> Parece ser que este hecho se debe a que las adultas pasan mucho más tiempo sumergidas.<sup>18</sup> Por su parte, se ha visto que en la tortuga de agua dulce *Mauremys leprosa*, los valores son más elevados en otoño.<sup>19</sup>

-Patológico: Se ha descrito asociado a la deshidratación. Ésta, unida a la anemia no regenerativa, puede dar falsa sensación de hematocrito normal en la enfermedad renal.<sup>22</sup>

Se ha observado que, en el caso de las iguanas verdes mantenidas en condiciones naturales exteriores, muestran en el hematocrito un rango ligeramente más amplio con respecto a las mantenidas en condiciones artificiales de terrario.<sup>30</sup>

### **Hemoglobina**

Se determina utilizando el método de la cianometahemoglobina, siempre tras una eliminación correcta de los núcleos de los glóbulos rojos por centrifugación previa a la lectura, puesto que la presencia de núcleos libres puede elevar de forma errónea el valor medido.<sup>31</sup> La concentración de hemoglobina de muchas especies de reptiles varía entre los 6 y 12 g/dl, aunque con frecuencia los valores son inferiores a 10 g/dl.

La estructura y función de la hemoglobina aparece homogénea entre las diferentes especies de reptiles. Sin embargo, los lagartos tienden a tener una afinidad por el oxígeno significativamente más alta que los quelonios.

La sangre de determinados reptiles contiene 2 ó más hemoglobinas, distinguibles por su peso molecular, carga de superficie y propiedades químicas.

Estas dos moléculas se han descrito en tortugas (*Chrysemys picta*, *Trachemys scripta*), lagartos (*Lacerta vivipara*) y serpientes (*Coluber constrictor*). Se hipotetiza que estas dos moléculas de hemoglobina existen en el mismo eritrocito, aunque su diferencia funcional puede deberse a la edad del eritrocito, como ocurre en los mamíferos.<sup>1,32</sup>

La hibernación provoca cambios en los valores eritrocitarios. Así, y de forma general, los valores son más altos antes de la hibernación y más bajos inmediatamente después de ésta

Aunque antiguamente se creía que los reptiles tenían cantidades elevadas de metahemoglobina, consideradas patológicas en los mamíferos, actualmente se considera que los valores son similares entre ambos grupos animales.

En la tortuga *Chrysemys picta*, cuando se mantiene a temperaturas bajas, equivalentes a las del invierno, la hemoglobina muestra una mayor afinidad por el oxígeno, incluso con un descenso simultáneo en el pH. Estos cambios observados en el transporte del oxígeno por la sangre, pueden facilitar la captación de oxígeno durante la inmersión invernal, permitiendo así la hibernación bajo el agua.<sup>33,34</sup> Por otro lado, se suelen observar valores elevados en otoño en la hemoglobina de la tortuga *Mauremys leprosa*.<sup>19</sup>

### Índices eritrocitarios

El volumen corpuscular medio (VCM), la concentración corpuscular media de hemoglobina (CCMH) y la hemoglobina corpuscular media (HCM), son índices que se pueden calcular, mediante el uso de las fórmulas estándar, una vez se han obtenido la concentración de hemoglobina, el valor hematocrito y el número total de eritrocitos.

Los eritrocitos maduros de los reptiles tienen un VCM superior al de los pájaros, peces y mamíferos. Los datos publicados para reptiles varían entre 160 a 950 fl. Las iguanas tienen el menor volumen corpuscular (170 a 300 fl), observándose un tamaño creciente en serpientes, galápagos, cocodrilos y tortugas respectivamente (500 a 540 fl).<sup>7,12</sup> Existe una relación inversa entre el tamaño de los eritrocitos y el número total de células circulantes; así, a medida que se incrementa el VCM, desciende el número de eritrocitos circulantes.

En los reptiles el promedio de la CCMH es de aproximadamente un 30 % (intervalo entre el 22 % y el 41 %).

Los índices eritrocitarios ayudan a valorar la respuesta medular ante una anemia. La respuesta regenerativa eritrocitaria en los reptiles parece ser más lenta que la observada en los mamíferos. En los reptiles con policromasia, existe una menor CCMH y un VCM disminuido. En mamíferos, normalmente el VCM aumenta durante la respuesta regenerativa, debido al mayor tamaño de sus reticulocitos. Sin embargo, las células policromatófilas de los reptiles son, generalmente, más pequeñas que sus eritrocitos adultos.

### Leucocitos

Usando el método de Natt y Herrick, los valores normales en el recuento de leucocitos oscilan entre 1000 y 5000 cel / $\mu$ L en cocodrilos, 4000 y 13000 cel / $\mu$ L en serpientes, 4000 y 33000 cel / $\mu$ L en tortugas de agua, 2000 y 18000 cel / $\mu$ L en tortugas de tierra y 6000 y 20000 cel / $\mu$ L en lagartos.

#### Incremento en Recuento leucocitario

-Fisiológico: Se ha descrito un incremento natural con la edad en tortuga boba *Caretta caretta*.<sup>24</sup> También se ha visto un incremento significativo durante el invierno en víboras africanas (*Cerastes cerastes* y *Cerastes vipera*).<sup>35</sup>

-Patológico: Se ha observado en la enfermedad renal crónica.<sup>22</sup> De la misma manera, pueden afectar no sólo las enfermedades infecciosas o parasitarias, sino también el estrés o la exposición a toxinas ambientales o químicas.

#### Disminución en Recuento leucocitario

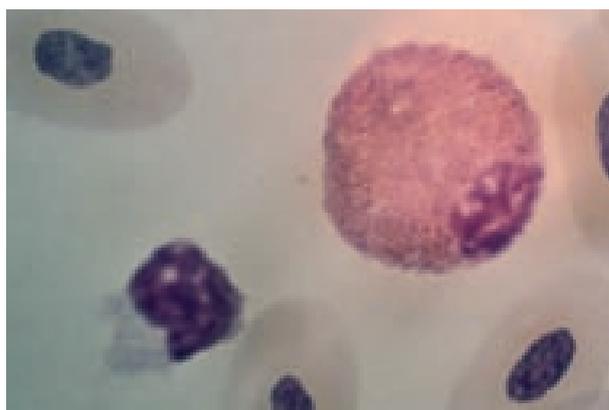
-Fisiológico: Se ha descrito en invierno en *Boa constrictor*.<sup>36</sup>

-Patológico: Se ha observado tras la administración de fenbendazol en la tortuga *T.hermanni*.<sup>37</sup>

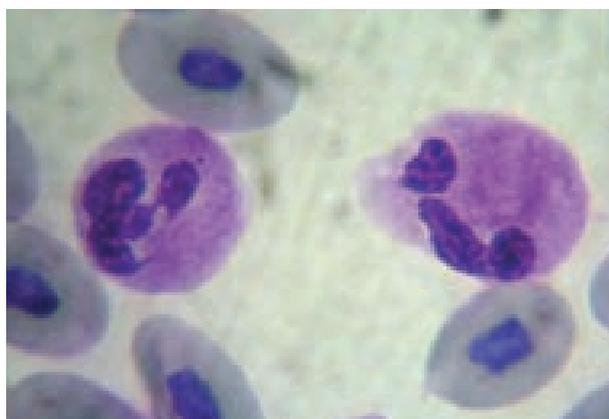
#### Recuento diferencial leucocitario

##### Heterófilo

A nivel funcional, es la célula equivalente al neutrófilo de los mamíferos y tiene una enorme variación morfológica en las distintas especies de reptiles. Son células redondeadas, grandes, y aunque el número y la forma de los gránulos varía con la especie (Figs. 4 y 5), por lo general, tienen los gránulos citoplasmáticos refringentes fusiformes, que se tiñen de color naranja brillante con las tinciones de Diff Quick o May-Grünwald Giemsa. En una misma célula pueden aparecer gránulos opacos y refringentes. El núcleo es excéntrico y de forma redondeada a oval. Algunas especies de lagartos, como las iguanas o los dragones barbudos, tienen heterófilos con el núcleo lobulado (Fig. 5). Su tamaño varía según la especie.<sup>38,39</sup> El número de heterófilos en el leucograma de reptiles sanos varía con la especie, pudiendo representar hasta más del 40% del recuento diferencial en algunas de ellas.<sup>12,38,40</sup>



**Figura 4.** Heterófilo de una pitón india (*Python molurus*). Se aprecia núcleo sin lobulaciones y gránulos citoplasmáticos con respuesta heterogénea a la tinción. Junto a él hay un linfocito. Tinción May Grünwald Giemsa. X 1000.



**Figura 5.** Heterófilos con núcleo lobulado en Dragón barbudo (*Pogona vitticeps*) Tinción May Grünwald Giemsa. X 1000.

En lagartos, serpientes y cocodrilos, se pueden observar heterófilos degranulados. Este fenómeno puede ser un artefacto del manejo de la muestra, del almacenaje prolongado en el anticoagulante, de una fijación inadecuada o bien ser parte del proceso de envejecimiento "in vivo" normal de estas células.<sup>15</sup>

#### Incremento de los heterófilos

-Fisiológico: Suele ser estacional (valores máximos en verano y más bajos durante la hibernación). También se ha observado una heterofilia como respuesta a la migración en la tortuga *Caretta caretta*.<sup>18</sup>

-Patológico: Los heterófilos, son principalmente células fagocitarias y por tanto, incrementos significativos en su recuento, se asocian con enfermedades inflamatorias, especialmente infecciosas o que supongan un daño tisular. Ello se ha descrito en la infección o inflamación hepática, renal, en la inflamación aguda hepática<sup>41</sup> o en la enfermedad renal aguda.<sup>22</sup>

Las causas no inflamatorias de la heterofilia también son el estrés (exceso de glucocorticoides) y la presencia de neoplasias. En sangre circulante pueden aparecer heterófilos anómalos, entre los que se incluyen los heterófilos inmaduros y las células tóxicas. Los primeros (normalmente mielocitos y metamielocitos), aparecen en la sangre de reptiles que tienen ciertas enfermedades que provocan una utilización periférica excesiva de los heterófilos maduros. Los heterófilos inmaduros tienen mayor grado de basofilia del citoplasma, el núcleo no lobulado, menor número de gránulos específicos que las células maduras y, en ocasiones, gránulos inmaduros (gránulos primarios). Su presencia en una sangre con heterofilia es indicativa de una enfermedad inflamatoria. Si la desviación a la izquierda se presenta junto con una heterofilia, es indicativa de una sobredemanda ante una respuesta inflamatoria asociada, probablemente, con una etiología infecciosa.

La presencia de heterófilos tóxicos denota una enfermedad inflamatoria asociada a la presencia de agentes infecciosos (Fig. 6). Dependiendo del grado de toxicidad se clasifican en una escala del +1 al +4: +1, indica aumento de basofilia citoplasmática; +2, indica, además, una ligera granulación anormal (degranulación parcial, gránulos con tendencia a



**Figura 6.** Heterófilo con granulación tóxica (+2) y lobulación en una tortuga mora (*Testudo graeca*) afectada con infección respiratoria. Tinción May Grünwald Giemsa. X 1000.

fusionarse o gránulos anómalos) o vacuolización; +3, indica cambios más graves, como una ligera cariorrexis o cariólisis; finalmente, +4, indica cambios muy marcados tanto en el núcleo como en el citoplasma. La lobulación nuclear, en especies de reptiles que normalmente no la poseen, indica una inflamación grave. Esto se observa en tortugas del género *Testudo*.<sup>42</sup>

#### Disminución de los heterófilos

Se ha observado asociada a infección viral<sup>38</sup> así como tras la administración de fenbendazol en la tortuga *Testudo hermanni*.<sup>32</sup>

#### Eosinófilos

Los eosinófilos de los reptiles son células grandes (11-17µm), redondas, con gránulos citoplasmáticos esféricos eosinofílicos (Fig. 7). En lagartos se observan de color magenta oscuro (Fig. 8.). El núcleo tiene una forma variable, desde redondo a ligeramente elongado; en algunas especies de reptiles puede ser bilobulado. Su tamaño varía con la especie; y así, las serpientes tienen los eosinófilos más grandes; y los lagartos, los más pequeños.<sup>39, 43-47</sup>

Por lo que respecta a su número, varía con la especie y los cambios estacionales. En general, los lagartos tienen pocos eosinófilos circulantes comparado con algunas especies de tortugas, donde pueden representar hasta un 20% de los leucocitos.

#### Incremento de eosinófilos

-Fisiológico: En algunas especies, el recuento de eosinófilos es normalmente más elevado durante la hibernación.<sup>35</sup> Además, también es relativamente normal encontrar un valor alto en las tortugas del género *Trachemys*.

-Patológico: Asociados con infecciones parasitarias y la estimulación del sistema inmune.<sup>21</sup> En referencia a los parásitos, se ha visto eosinofilia en enfermedad renal causada por trematodos en serpientes o *Hexamita* en tortugas.<sup>22</sup> En aligátor, se ha observado un incremento ligado a la presencia de sanguijuelas (*Placobdella*).<sup>48</sup> Sin embargo, la presencia de Hemogregarinas no se ha visto asociada a eosinofilia tanto en cocodrilos<sup>48</sup> como en tortugas.<sup>49</sup>

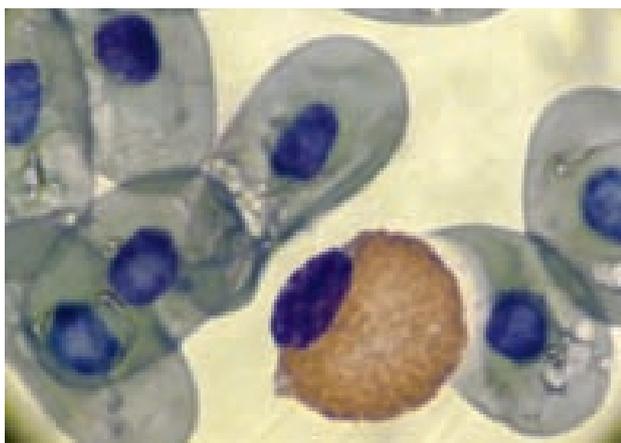
#### Disminución de eosinófilos

Su disminución se ha relacionado con la estivación. Además, se describe eosinopenia como respuesta fisiológica a la migración en la tortuga *Caretta caretta*.<sup>18</sup>

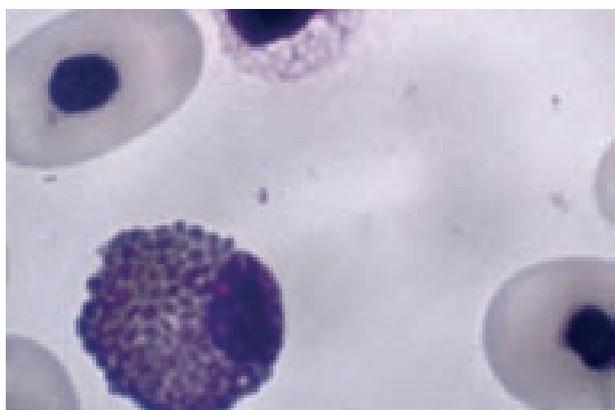
#### Basófilos

Son células redondas, pequeñas, que contienen un número variable de gránulos citoplasmáticos metacromáticos basofílicos, que enmascaran con frecuencia el núcleo (Fig. 9.). El tamaño de estas células varía entre las 7 y las 20 µm y al igual que ocurre con el resto de granulocitos, varía con

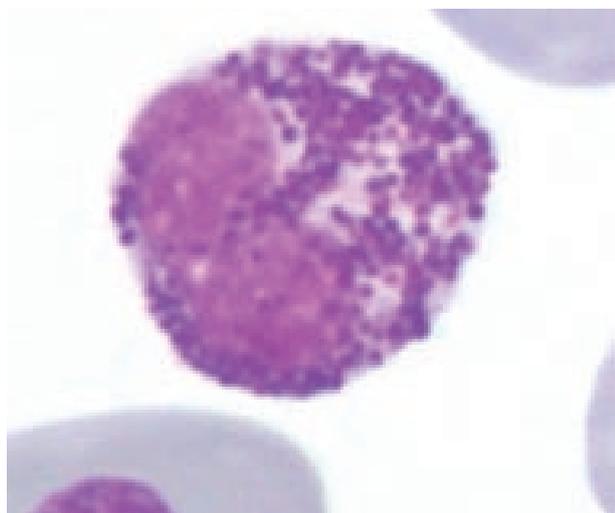
La eosinofilia se observa relacionada tanto a endo como ectoparásitos; sin embargo, la presencia de Hemogregarinas no se ha visto asociada a eosinofilia tanto en cocodrilos como en tortugas



**Figura 7.** Eosinófilo de un galápagos de Florida (*Trachemys*) Tinción May Grünwald Giemsa. X 1000.



**Figura 8.** Eosinófilo de una Iguana verde (*Iguana iguana*). Tinción May Grünwald Giemsa. X 1000.



**Figura 9.** Basófilo de un lagarto del género *Gallotia*. Tinción May Grünwald Giemsa. X 1000.

la especie: los lagartos tienen basófilos pequeños y los quelonios y cocodrilos tienen basófilos más grandes.

Su función es, probablemente, similar a la de los basófilos de los mamíferos. El número de estas células, normalmente bajo, varía con la especie. Sin embargo, en algunas especies de quelonios como la tortuga del desierto (*Gopherus agassii*

zii) pueden constituir hasta el 40% de los leucocitos, si bien la razón de este hecho se desconoce.<sup>30,50-52</sup> En la especie de tortuga acuática *Pseudemys ruiventris* es el tipo celular predominante en los recuentos leucocitarios.<sup>53</sup>

#### *Incremento de basófilos*

-Fisiológico: Es normal encontrar un valor alto en las tortugas *Trachemys* o *Chelidra serpentina*. El número de basófilos en los reptiles no parece variar con los cambios estacionales, como ocurre con otros granulocitos. Sin embargo, se ha descrito un incremento significativo durante el invierno en los viperinos africanos (*Cerastes cerastes* y *Cerastes vipera*).<sup>35</sup>

-Patológico: Se ha visto relacionado con la presencia de infecciones parasitarias (básicamente parásitos intestinales y ocasionalmente hemoparásitos) e infecciones virales.<sup>53</sup>

#### *Linfocitos*

Son células redondeadas, con citoplasma escaso, de moderado a débilmente basofílico y núcleo también de morfología circular y situado centralmente (Figs. 4 y 10). El citoplasma es homogéneo y generalmente carece de vacuolas y gránulos, aunque en algunos linfocitos se pueden encontrar algunos gránulos citoplasmáticos azurófilos con la tinción May-Grünwald Giemsa. Tienden a "amoldarse" alrededor de células adyacentes en la extensión de sangre. Pueden presentar pseudopodia en la periferia celular. Varían en tamaño desde pequeño (5 – 10  $\mu\text{m}$ ) a grande (15  $\mu\text{m}$ ).

Su número en los vertebrados inferiores también varía, llegando a superar el 80% del recuento diferencial en algunas especies. Muchas especies de reptiles sanas tienen un recuento mayor de linfocitos que de heterófilos.<sup>9</sup>

También varían con el sexo (las hembras de algunas especies pueden tener una concentración de linfocitos significativamente más grande que los machos de la misma especie), el estado nutricional (se produce un descenso asociado a la malnutrición), y la estación del año (su número disminuye en invierno y es más elevado en el verano). Incluso los reptiles tropicales que no hibernan, muestran un descenso de linfocitos en circulación durante el invierno.<sup>42,44,54-56</sup>

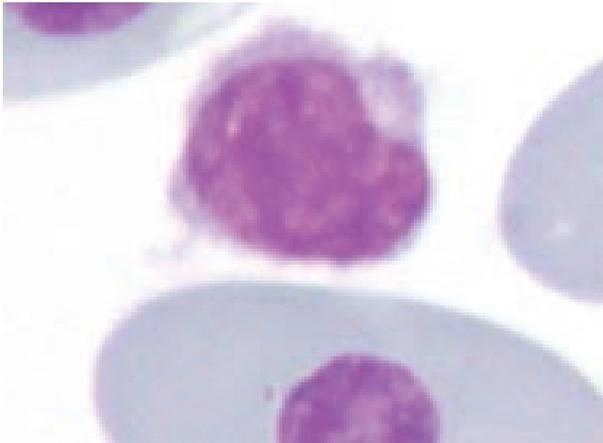
Los reptiles tienen los dos tipos principales de linfocitos (B y T) involucrados en la función inmunológica, pero a diferencia de los mamíferos y pájaros, las respuestas inmunológicas de los reptiles están muy influenciadas por el ambiente; de este modo, las bajas temperaturas pueden suprimir o inhibir la respuesta inmune.

#### *Incremento de linfocitos*

-Fisiológico: A parte de las variaciones fisiológicas observadas en función del sexo y de la especie, se han observado un incremento del valor de los linfocitos asociado a una edad mayor en tortugas marinas de la especie *Caretta caretta*.<sup>29</sup>

-Patológico: Se describe asociado a inflamación, infecciones parasitarias y víricas y neoplasia como la leucemia, así como a situaciones de cicatrización de heridas.

La presencia de linfocitos reactivos, con un volumen citoplasmático aumentado y mayor grado de basofilia citoplasmática, sugiere una estimulación del sistema inmune por la presencia de antígenos sistémicos.<sup>9,57</sup>



**Figura 10.** Linfocito de un lagarto del género *Gallotia*. Tinción May Grünwald Giemsa. X 1000.

Citológicamente, la presencia de mitosis, anisocariosis y anisocitosis está principalmente relacionada con una respuesta inflamatoria o sepsis y no necesariamente con neoplasia linfoproliferativa.<sup>58</sup>

#### Disminución de linfocitos

Se produce de forma secundaria a la presencia de enfermedades asociadas con la inmunosupresión, el estrés y la malnutrición crónica.<sup>9,57,59</sup>

#### Monocitos

Son los leucocitos de mayor tamaño que se encuentran en la sangre periférica.

La morfología celular varía desde redonda a ameboide, y su núcleo es pleomórfico (redondo, oval, lobulado) y normalmente indentado (Figs. 11 y 12). Su tamaño varía entre 8 y 20  $\mu\text{m}$ . El citoplasma de esta célula se tiñe de color azul-grisáceo y puede contener vacuolas o gránulos eosinofílicos semejantes a partículas de polvo, o bien azurófilo.

Los monocitos aparecen en pequeño número en la sangre de los vertebrados inferiores y suelen representar entre un 0 y un 10% del diferencial leucocitario.<sup>60-62</sup>

De los reptiles estudiados, la concentración de monocitos cambia poco con la variación estacional si se compara con otras células sanguíneas.

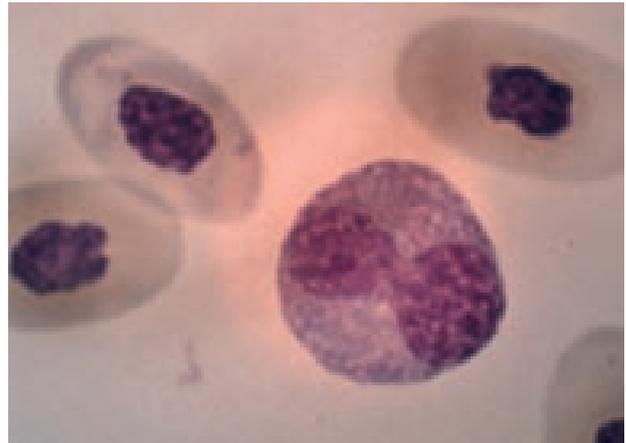
#### Incremento de monocitos

-Fisiológico: Se ha observado un incremento hibernal en la serpiente *Boa constrictor*, así como en ejemplares de edad avanzada en la tortuga marina *Caretta caretta*.<sup>22</sup>

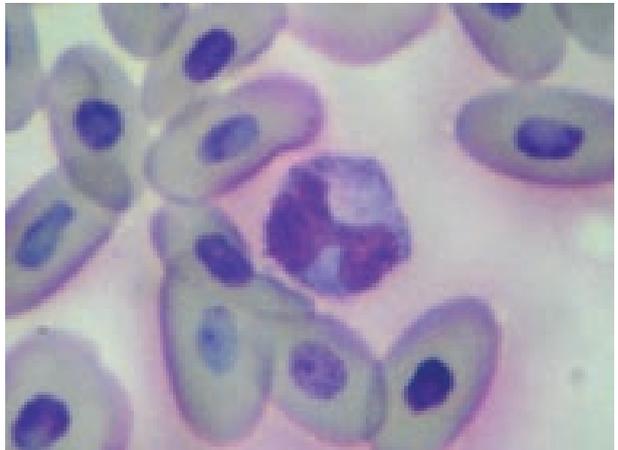
-Patológico: Asociado a enfermedad inflamatoria, como la estomatitis y nefritis crónica, así como la hepatitis granulomatosa. Con frecuencia, los monocitos en sangre periférica muestran actividad fagocitaria. La eritro y la leucofagocitosis por parte de estas células se puede asociar con anemia y la presencia de enfermedades infecciosas.<sup>9,41</sup>

#### Azurófilos

La identificación y clasificación de esta célula ha estado rodeada de confusión. Se describió por primera vez en la



**Figura 11.** Monocito de una iguana verde (*Iguana iguana*). Tinción May Grünwald Giemsa. X 1000.



**Figura 12.** Monocito de un lagarto del género *Lacerta*. Tinción May Grünwald Giemsa. X 1000.

literatura científica hace aproximadamente un siglo. Desde entonces se la ha denominado granulocito azurófilo, granulocito neutrófilo o monocito. Los escasos azurófilos presentes en quelonios se han denominado también neutrófilos o azurófilos neutrofilicos.<sup>10</sup> Se trata de una célula de forma irregular, ligeramente más pequeña en tamaño que el monocito.<sup>5</sup> El núcleo es no segmentado y de redondo a oval de forma irregular (Fig. 13). El citoplasma es basofílico y más oscuro que el del monocito, de color azul a lavanda. En este citoplasma están presentes un número pequeño de gránulos azurófilos mate, de varios tamaños. En el citoplasma de estas células puede aparecer vacuolización y material fagocitado.

Los monocitos y los azurófilos se han descrito como células del mismo tipo según algunos autores<sup>63</sup> o de distinto tipo según otros.<sup>10,51</sup>

Esta célula es más común en el suborden de las serpientes que en los lagartos o crocodilianos<sup>12,15,47</sup> y tan sólo se ve ocasionalmente en quelonios.<sup>10</sup>

En el momento actual, hay consenso en que los azurófilos se confirman como población única en las serpientes. Representan una célula fagocítica similar en morfología al monocito, que puede desencadenar un

daño oxidativo importante, similar al del neutrófilo de los mamíferos.<sup>60</sup>

#### *Incremento de los azurófilos*

-Patológico: Se ha descrito asociado a inflamación e infección, así como a parasitismo. En lagartos parasitados con el hemoprotozo *Karyolysus*<sup>17</sup> y en serpientes con *Hepatozoon*<sup>60</sup> se ha descrito azurofilia, posiblemente relacionada con la respuesta inflamatoria frente a los parásitos.

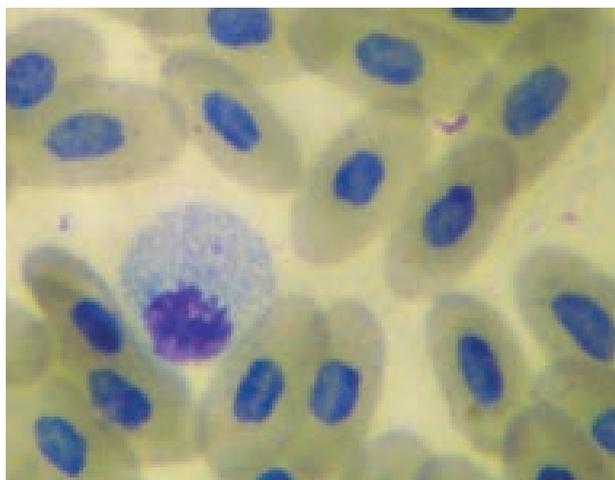
#### **Trombocitos**

Los trombocitos son células pequeñas, elípticas o fusiformes que contienen un núcleo oval y central. El citoplasma es casi transparente, hecho importante que los diferencia de los linfocitos pequeños. Normalmente tienden a agregarse, lo que hace más fácil su identificación (Fig. 14.). En algunos de ellos, pueden aparecer márgenes citoplasmáticos poco definidos (Fig. 15) típicos en serpientes aunque probablemente sean producto de la edad o también artefactos.<sup>64</sup>

Los trombocitos juegan un papel activo en la formación del trombo, la coagulación sanguínea y la cicatrización de las heridas. Se ha señalado su carácter pluripotencial; según el cual, en condiciones de anemia, pueden adquirir capacidad de transportar oxígeno, cubriendo la demanda ocasionada por la pérdida eritrocitaria.<sup>5</sup> Asimismo, también parecen tener capacidad fagocitaria en determinadas condiciones y ante determinados agentes quimiotácticos.<sup>5</sup>

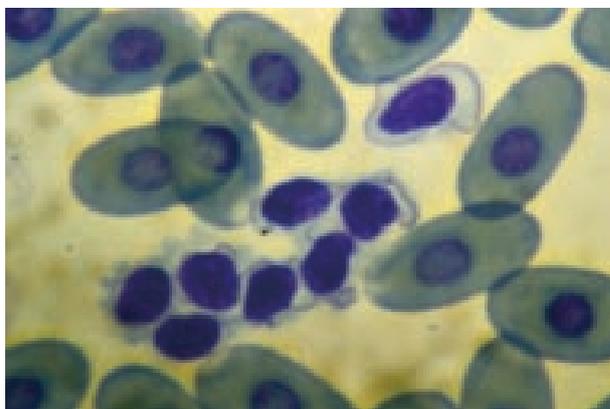
#### *Disminución de trombocitos*

-Fisiológico: Se ha descrito en invierno en la serpiente *Boa constrictor*.<sup>36</sup>

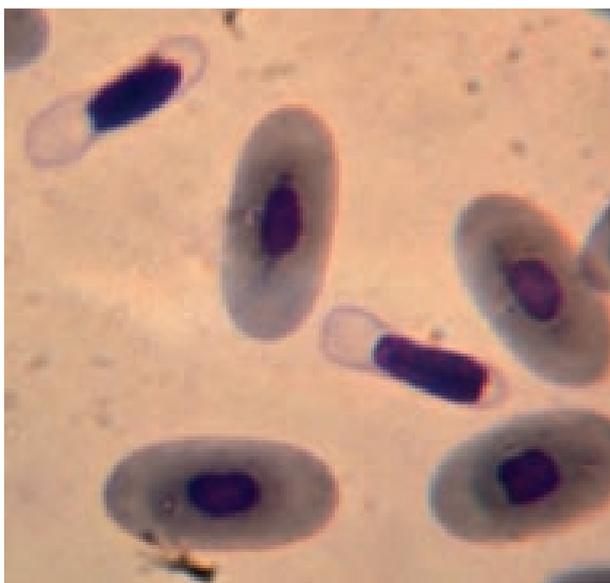


**Figura 13.** Azurófilo de un lagarto del género *Lacerta*. Tinción May Grünwald Giemsa. X 1000.

Las trombocitopenias se producen en los reptiles probablemente debidas a una utilización periférica excesiva de los trombocitos o a un descenso en su producción. En ocasiones, pueden aparecer trombocitos anómalos, con núcleo polimórfico; se cree que su presencia está asociada a enfermedades inflamatorias graves.



**Figura 14.** Agregado trombocitario en una tortuga mediterránea (*Testudo hermanni*). Tinción May Grünwald Giemsa. X 1000.



**Figura 15.** Trombocitos característicos de una pitón reticulada (*Python reticulatus*). Tinción May Grünwald Giemsa. X 1000.

## **Agradecimientos**

Los autores agradecen la ayuda aportada, tanto en la recopilación bibliográfica como casuística y fotográfica a Ignasi Marco, Gonzalo Otero, Joaquim Soler y Lola Cano.

## Summary

Reptiles are a group of animals ever more common in veterinary practice. In these species, many diagnostic tools are in descriptive stages, including diagnostic blood cytology or hematology. This article analyzes blood cells described in reptiles: erythrocytes, heterophiles, eosinophiles, monocytes, azurophiles and thrombocytes. It also shows the use of routine hematologic values as packed cell volume, total counts, hemoglobin and red blood cell indices. For all these values, we discuss its clinical interpretation related to physiological and pathological conditions.

## Bibliografía

- Sykes JM, Klaphake E: Reptile hematology. *Vet Clin of North America: Exotic Anim Pract* 2008; 11, 481-500.
- Lawrence K: An introduction to haematology and blood chemistry of the reptilia. En: Towson y Lawrence (Ed): *Reptiles: breeding, behaviour and veterinary aspects*. London. *British Herpetological Society*. 1985, 99-110.
- Muro J, Cuenca R, Pastor J, Viñas L, Lavín S: Effects of lithium heparin and tripotassium EDTA on hematologic values of Hermann's tortoises (*Testudo hermanni*). *J Zoo Wildl Med* 1998; 29, 40-44.
- Hanley ChS, Hernandez-Divers SJ, Latimer KS, Bush S: Comparison of dipotassium EDTA and lithium heparin on hematologic values in the green iguana (*Iguana iguana*). *Proceedings A R A V* 2003; 20, 30.
- Frye FL: Biomedical and Surgical Aspects of Captive Reptile Husbandry. Malabar, Florida, Krieger Publishing, 1991; 2 vol.
- Myers DA, Mitchell MA, Fleming G et al: Determining the value of bovine albumin as a blood cell stabilizer for pancake tortoise, *Malacochersus tornieri*, blood smears. *J Herpet Med Surg* 2009; 18: 95-99.
- Campbell T: Interpretation of the reptilian blood profile. *Exotic Pet Practice* 1998; 3, 33-36.
- Troiano JC, Vidal JC, Uriarte E et al: Osmotic fragility and erythrocyte size in *Iguana iguana* (Sauria- iguanidae) in captivity. *J Comp Hem* 2000; 22, 14-18.
- Strik NI, Alleman AR, Harr KE: Circulating inflammatory cells. En: Jacobson ER (ed): *Infectious Diseases and Pathology of Reptiles: Color Atlas and Text*, Cabo Raton, Florida, CRC Press, 2007; 167-218.
- Wilkinson R: Clinical Pathology. En: McArthur S, Wilkinson R, Meyer J (ed): *Medicine and Surgery of Tortoises and Turtles*, Iowa, Blackwell Publishing Ltd, 2004; 141-187.
- Perpiñán D, Hernandez-Divers SM, McBride M, Hernandez-Divers SJ: Comparison of three different techniques to produce blood smears from green iguanas, *Iguana iguana*. *J Herpet Med Surg* 2006; 16: 99-101.
- Raskin RE: Reptile complete blood count. En: Fudge AM (ed): *Laboratory medicine: Avian and exotic pets*, Philadelphia, Saunders Company, 2000; 193-197.
- Lopez-Olvera JR, Montañé J, Marco I et al: Effect of venipuncture site on hematologic and serum biochemical parameters in marginated tortoise (*Testudo marginata*). *J Wildl Dis* 2003; 30: 830-836.
- Frye FL: Herpetological haematology. *Congreso Nacional de AVEPA* 1998; 33, 25.
- Martínez-Silvestre A: Hematología y bioquímica sanguínea en tres especies de lagartos gigantes de las islas canarias (género *Gallotia*). 1-215. 2011. Facultad de Veterinaria. Tesis Doctoral. Universitat Autònoma de Barcelona.
- Clark P, Johnstone AC, Ellison R, Goold M: Inclusions in the erythrocytes of eastern water dragons (*Physignathus lesuerii*). *Aust Vet J* 2001; 79, 61-62.
- Martínez-Silvestre A, Mateo JA, Silveira LS, Bannert B: Presencia de protozoos intraeritrocitarios en el lagarto gigante de La Gomera (*Gallotia simonyi gomera*). *Bol Asoc Herpetol Esp* 2001; 12, 90-92.
- Stamper MA, Harms CA, Epperly SP et al: Relationship between barnacle epibiotic load and hematologic parameters in loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*), a comparison between migratory and residential animals in Pamlico Sound, North Carolina. *J Zoo Wildl Med* 2005; 36: 635-641.
- Pagés T, Peinado VI, Viscor G: seasonal changes in hematology and blood chemistry of the fresh water turtle *Mauremys caspica leprosa*. *Comp Biochem Physiol* 1992; 103 A: 275-278.
- Frair W: Sea turtle red blood cells parameters correlated with carapace lengths. *Comp Biochem Physiol* 1977; 56 A, 467-472.
- McArthur SDJ, Wilkinson RJ, Barrows MG: Tortoises and turtles. *Manual of Exotic Pets BSAVA* 2001; 4, 208-222.
- Selleri P, Hernandez-Divers SJ: Renal diseases of reptiles. *Vet Clin of North America: Exotic Anim Pract* 2006; 9, 161-174.
- Dutton CJ, Taylor P: A comparison between pre- and post hibernation morphology, hematology, and blood chemistry in viperid snakes. *J Zoo Wildl Med* 2003; 34: 53-58.
- Barry Heath K: Fatal parasitic anemia in a green vine snake. *Vet Med/Small Animl Clinician* 1983; July, 1095-1096.
- Boyer TH: Autoimmune hemolytic anemia in a parson's chameleon, *Calumna parsonii parsonii*. *Proceedings A R A V* 2002; 9, 81-84.
- Garner M: Regenerative erythroid response without anemia in Iguanidae: Associated with soft tissue mineralization. *Proceedings A R A V* 2001; 8, 213-216.
- Lewbart GA, Lewbart GA, harpe N, Dombrowski D, Stoskopf MK: Preliminary assessment of a visual scoring system for identifying and quantifying anemia in male eastern box turtles (*Terrapene carolina carolina*). *Proceedings A R A V* 2008; 15, 66-67.
- Schilliger L, Selleri P, Frye FL: Lymphoblastic lymphoma and leukemic blood profile in a red-tail boa (*Boa constrictor constrictor*) with concurrent inclusion body disease. *J Vet Diagn Invest* 2011; 23, 159-162.
- Kakioe Y, Sakaoka K, Kakioe F et al: Successive changes of hematologic characteristics and plasma chemistry values of juvenile loggerhead turtles (*Caretta caretta*). *J Zoo Wildl Med* 2007; 38: 77-84.
- Nevarez JG, Mitchell MA, Le Blanc C, Graham P: Determination of plasma biochemistries, ionized calcium, vitamin D3, and hematocrit values in captive green iguanas (*Iguana iguana*) from El Salvador. *Proceedings A R A V* 2002; 9, 87-94.
- Seidel ME: Hemoglobin variation and comments on systematic relationship in the turtle family Emydidae. *Copeia* 2003; 4, 1118-1121.
- Gelli D, Morgante M, Ferrari V et al: Hematologic, serum biochemical, and serum electrophoretic patterns in loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*). *Proceedings A R A V* 2004; 11, 149-152.
- Maginniss LA, Tapper SS, Miller LS: Effect of chronic cold and submergence on blood oxygen transport in the turtle, *Chrysemys picta*. *Respir Physiol* 1983; 53: 15-29.
- Maginniss LA, Ekulund SA, Ultsch GR: Blood oxygen transport in common map turtles during simulated hibernation. *Physiol Biochem Zool* 2004; 77: 232-241.
- Al-Badry KS, Nuzhy S: Hematological and biochemical parameters in active and hibernating sand vipers. *Comp Biochem Physiol* 1983; 74 A: 137-141.
- Machado C, Silva LFN, Ramos PRR, Takahira R: Seasonal influence on hematologic values and haemoglobin electrophoresis in Brazilian *Boa constrictor amarali*. *J Zoo Wildl Med* 2006; 37: 487-491.
- Neiffer DL, Lydick D, Burks K, Doherty D: Hematologic and plasma biochemical changes associated with fenbendazole administration in Hermann's tortoises (*Testudo hermanni*). *J Zoo Wildl Med* 2005; 36: 661-672.
- Alleman AR, Jacobson ER, Raskin RE: Morphologic and cytochemical characteristics of blood cells from the desert tortoise (*Gopherus agassizii*). *Am J Vet Research* 1992; 53, 1645-1651.
- LeBlanc CJ, Heatley JJ, Mack EB: A review of the morphology of lizard leukocytes with a discussion of the clinical differentiation of bearded dragon, *Pogona vitticeps*, leukocytes. *J Herpet Med Surg* 2000; 10(2), 27-30.
- Pace J, Mader DR: A comparison of the morphological differences in the reptilian heterophil. *Proceedings A R A V* 2002; 9, 113-114.

41. Simpson M: Hepatic Lipidosis in a Black-Headed Python (*Aspidites melanocephalus*). *Vet Clin of North America: Exotic Anim Pract* 2006; 9, 589-598.
42. Kassab A, Shousha S, Fargani A: Morphology of Blood Cells, Liver and Spleen of the Desert Tortoise (*Testudo graeca*). *The open anatomy Journal* 2009; 1, 1-10.
43. McArthur S: Emerging viral-associated diseases of chelonians in the united kingdom. *Proceedings A R A V* 2001; 8, 103-115.
44. Alleman AR, Jacobson ER, Raskin RE: Morphologic, cytochemical staining, and ultrastructural characteristics of blood cells from eastern diamondback rattlesnakes (*Crotalus adamanteus*). *Am J Vet Research* 1999; 60, 507-513.
45. Casal AB, Orós J: Morphologic and cytochemical characteristics of blood cells of juvenile loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*). *Research in Vet Science* 2007; 82, 158-165.
46. Martínez-Silvestre A, Lavín S, Marco I et al: Hematology and plasma chemistry of captive *Testudo marginata*. *Proceedings of the International Congress on Testudo Genus* 2001; 3, 187-189.
47. Martínez-Silvestre A, Marco I, Rodríguez-Domínguez MA, Lavín S, Cuenca R: Morphology, cytochemical staining, and ultrastructural characteristics of the blood cells of the giant lizard of El Hierro (*Gallotia simonyi*). *Research in Vet Science* 2005; 78, 127-134.
48. Glassman A, Holbrook TW, Bennett CE: Correlation of leech infestation and eosinophilia in Alligators. *J Parasitol* 1979; 65: 323-324.
49. Lawrence K, Hawkey CM: Haemogregarine infection in long term captive Mediterranean tortoises. *Vet Rec* 1985; 117, 129-130.
50. Christopher MM, Berry KH, Wallis IR et al: Reference intervals and physiologic alterations in hematologic and biochemical values of free-ranging desert tortoises in the Mojave desert. *J Wild Dis* 1999; 35, 212-238.
51. Ellman MM: Hematology and plasma chemistry of the inland Bearded Dragon, *Pogona vitticeps*. *Bulletin of the Association of Reptilian and Amphibian Veterinarians* 1997; 7, 10-12.
52. Fisse A, Draud M, Raphael B, Melkonian K: Differential leukocyte counts of critically endangered grand cayman blue iguanas, *Cyclura nubila lewisi*. *J Herpet Med Surg* 2004; 14: 19-21.
53. Innis ChJ, Tlustý M, Wunn D: Hematologic and plasma biochemical analysis of juvenile head-started northern red-bellied cooters (*Pseudemys rubriventris*). *J Zoo Wildl Med* 2007; 38: 425-432.
54. Dickinson VM, Jarchow J, Trueblood MH: Hematology and plasma biochemistry reference range values for free-ranging desert tortoises in Arizona. *J Wild Dis* 2002; 38, 143-153.
55. Lamirande EW, Bratthauer AD, Fischer DC, Nichols DK: Reference hematologic and plasma chemistry values of brown tree snakes (*Boiga irregularis*). *J Zoo Wildl Med* 1999; 30, 516-520.
56. LeBlanc CJ: Clinical differentiation of Chinese water dragon, *Physignatus spp.* Leukocytes. *J Herpet Med Surg* 2001; 11(3), 31-33.
57. Silverstone AM, Garner M, Wojcieszyn JW, Guillermo Couto C, Raskin RE: Acute lymphoblastic leukemia in a diamondback terrapin, *Malaclemys terrapin*. *J Herpet Med Surg* 2007; 17: 92-99.
58. Origi FC: Reptile immunology. En: Jacobson ER (ed): *Infectious Diseases and Pathology of Reptiles: Color Atlas and Text*, Florida, CRC Press, 2007; 131-167.
59. Jacobson ER, Gaskin JM, Brown C et al: Chronic upper respiratory tract disease of free-ranging desert tortoises (*Xerobates agassizi*). *J Wild Dis* 1991; 27: 296-316.
60. Salakij Ch, Salakij J, Apibal S et al: Hematology, morphology, cytochemical staining, and ultrastructural characteristics of blood cells in King cobras (*Ophiophagus hannah*). *Vet Clin Path* 2002; 31, 116-126.
61. Tucunduva M, Borelli P, Silva JRMC: Experimental study of induced inflammation in the Brazilian boa (*Boa constrictor constrictor*). *J Comp Path* 2001; 125, 174-181.
62. Watson J: Diagnostic procedures: Hematology. En: Ackerman L (ed): *The biology, husbandry, and health care of reptiles*, New Jersey, TFH, 1998; 703-713.
63. Alleman R, Jacobson ER, Raskin RE: Morphologic, cytochemical staining, and ultrastructural characteristics of blood cells from eastern diamondback rattlesnakes (*Crotalus adamanteus*). *Am J Vet Res* 1999; 60, 507-514.
64. Knotkova Z, Doubek J, Knotek Z, Hájková P: Blood cell morphology and plasma biochemistry in Russian tortoises (*Agryonemys horsfieldii*). *Acta Vet BRNO* 2002; 71, 191-198.