

Hematologija gmazova



Maja Belić*, Romana Turk, Maja Lukač, Ines Veršec i Mirna Robić

Uvod

Porastom popularnosti gmazova kao kućnih ljubimaca, povećao se i njihov broj kao pacijenata u veterinarskim ambulantomama. U svrhu očuvanja zdravlja i dobrobiti ovih životinjskih vrsta potrebno je redovito provoditi zdravstvene preglede (Lukač i sur., 2015.a). Jedan od osnovnih parametara za procjenu zdravlja životinja, dijagnostiku bolesti i uspješnost terapije je određivanje krvnih parametara, odnosno procjena kompletne krvne slike (Poljičak-Milas, 2012.). U sisavaca se hematološki parametri određuju pomoću hematoloških analizatora u medicinskim laboratorijima ili ambulantomama i zahvaljujući automatiziranom postupku, obrada podataka je vrlo brza, a time i dobivanje željene informacije o hematološkom statusu organizma (Jakšić, 2009.).

U gmazova se procjena zdravstvenog stanja uglavnom provodila mikrobiološkom i parazitološkom pretragom obrisa kože, sluznica i tjelesnih izlučevina (Lukač i sur., 2013., 2015.b) iz razloga što je hematološka pretraga u gmazova složenija jer se obrada krvi ne može raditi pomoću komercijalnih hematoloških analizatora nego se većina parametara određuje ručno. Razlog tome je specifičnost i raznolikost u morfologiji i broju krvnih stanica između više od 8000 vrsta gmazova. Sve krvne stanice gmazova posjeduju jezgru što predstavlja problem u auto-

matskoj diferencijaciji stanica. Osim toga, krvna slika gmazova podložna je različitim unutarnjim (spol, dob, stanje hibernacije, doba parenja) i vanjskim (godišnje doba, temperatura, okoliš, prehrana, stres, mjesto vadenja krvi) čimbenicima pod čijim se utjecajem mijenja (Campbell i Ellis, 2007.). Unatoč sve većem broju literaturnih podataka o hematološkim i biokemijskim parametrima gmazova još uvijek su ti podatci za veliki broj vrsta iz ove porodice životinja nepotpuni.

Hematološkom pretragom najčešće se mogu ustanoviti poremećaji kao što su: anemije, upale, parazitemije i promjene hematopoetskog tkiva. Kompletna krvna slika gmazova obuhvaća crvenu i bijelu krvnu sliku. Crvenu krvnu sliku čine ukupan broj eritrocita, hematokrit, koncentracija hemoglobina i eritrocitne konstante, a bijelu ukupan broj leukocita, diferencijalna krvna slika te morfološka procjena krvnih stanica.

Vađenje krvi

Među različitim vrstama gmazova postoje velike varijacije u veličini, od male kornjače koja teži svega nekoliko grama do iguane koja teži nekoliko kilograma (pa i većih životinja kao što su npr. krokodili koje nalazimo u prirodi ili zoo vrtovima, a mogu težiti i do 700 kg). Ukupan volumen krvi u gmazova je

Dr. sc. Maja BELIĆ*, dr. med. vet., docentica, (dopisni autor, e-mail: mbelic@vef.hr), dr. sc. Romana TURK, dr. med. vet., izvanredna profesorica, dr. sc. Maja LUKAČ, dr. med. vet., viša asistentica, dr. sc. Mirna ROBIĆ, dr. med. vet., redovita profesorica, Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Hrvatska; Ines VERŠEC, dr. med. vet., Veterinarska ambulanta Fabela, Hrvatska

5-8% tjelesne mase, a kako ne bi naštetili životinji, najviše je dopušteno izvaditi 10% od ukupnog volumena krvi zdrave životinje. Primjerice, ako zmija teži 100 grama, ima ukupno 5-8 mL krvi, od čega možemo sigurno uzeti 10% što iznosi 0,5-0,8 mL krvi (Jenkins-Perez, 2012.).

Mjesto venepunkcije, antikoagulans te moguća uporaba anestetika određuje se za svaku vrstu, odnosno svaku životinju posebno. Kod svih gmazova limfne žile često prate krvne žile te je stoga najčešći problem prilikom vađenja krvi gmazova miješanje krvi s limfom jer se često dogodi da se uz krvnu probije i limfna žila. U tom slučaju na vrhu brizgalice pojavit će se bistra tekućina prije krvi. Kako limfa može utjecati na broj stanica u krvi, što rezultira smanjenim hematokritom, brojem eritrocita i leukocita te smanjenom koncentracijom hemoglobina, potrebno je postupak vađenja krvi ponoviti. Kao antikoagulans često se koristi litijum heparin jer EDTA koja je češći antikoagulans u hematologiji sisavaca uzrokuje hemolizu stanica u nekih vrsta gmazova, naročito kornjača (Sykes i Kalphake, 2008.).

Zmije

Najčešće mjesto venepunkcije u zmija je ventralna repna vena u području blizu kloake. (Slika 1.). Prilikom venepunkcije



Slika 1. Vađenje krvi iz ventralne repne vene zmije.
Izvor: arhiva Zavoda za patološku fiziologiju



Slika 2. Vađenje krvi iz dorzalne repne vene kornjače.

Izvor: arhiva Zavod za patološku fiziologiju

potrebno je kod mužjaka paziti da ne dođe do ozljede penisa ili mirisnih žlijezda. U malih zmija ili ako je potrebna veća količina krvi, krv se može vaditi i iz srca. U tom slučaju zmiju je potrebno kratko sedirati, a srce točno locirati Doppler ultrazvukom (Jenkins-Perez, 2012.).

Kornjače

Za kornjače je opisano nekoliko mogućih mjesta venepunkcije: jugularna vena, okcipitalni sinus, subvertebralni venozni sinus i dorzalna repna vena (Jenkins-Perez, 2012.). Prilikom vađenja krvi iz venoznih sinusa potrebno je paziti kako ne bi došlo do miješanja krvi s limfom, budući da na tim mjestima limfne i krvne žile čine zajednički splet. Najčešće se krv vadi upravo iz dorzalne repne vene (Slika 2.)

Gušteri

Mjesto venepunkcije u guštera je ventralna repna vena do koje je moguće doći ubodom igle lateralno ili ventralno. Ako je potrebno, prije vađenja krvi, moguće je životinji staviti povez s vatom oko očiju uz lagani pritisak na očne jabučice kako bi se životinju umirilo bez uporabe kemijskih sredstava. U guštera koji imaju mogućnost repne autotomije, odnosno odbacivanja (amputacije) repa

kao obrambeni mehanizam, životinju je potrebno sedirati kako ne bi došlo do samoozljeđivanja (Sykes i Kalphake, 2008.).

Hematološka analiza

Nakon vađenja krvi potrebno je odmah napraviti krvne razmaze prije nego hemoparaziti napuste krvne stanice. Idealno je krvne razmaze raditi direktno iz krvi koja je još u brizgalici i nije pomiješana s antikoagulansom kako bi spriječili eventualno negativno djelovanje antikoagulansa na krvne stanice (npr. hemoliza). Krvne razmaze potrebno je dobro osušiti na zraku nakon čega ih se može obojati Wrightovim bojanjem (Weiss i Wardrop, 2010.).

Ostatak krvi se iz brizgalice premijesti u ependorfice s antikoagulansom. Određivanje krvnih parametara najbolje je napraviti što prije nakon vađenja krvi, jer stajanjem krvi dolazi do kvalitativnih i kvantitativnih promjena krvnih stanica što utječe na konačan nalaz krvne slike.

Hematokrit se određuje pomoću mikrocjevčica i mikrocentrifuge. Nakon centrifugiranja na čitaču se očita hematokrit i izražava u postotcima. Kod gmazova se hematokrit kreće od 20-40% što je niže nego u sisavaca i ptica i ukazuje na smanjeni kapacitet prijenosa kisika (Stacy i sur., 2011.).

Koncentracija hemoglobina najčešće se određuje spektrofotometrijskom metodom s cijanomethemoglobinskim reagensom. Prije mjerenja apsorbancije na spektrofotometru potrebno je krv koja je pomiješana s reagensom centrifugirati kako jezgre iz hemoliziranih eritrocita ne bi utjecale na optičku gustoću. Koncentracija hemoglobina u gmazova je vrlo često niska i kreće se ispod 10 g/dL (Campbell i Ellis, 2007.).

Broj eritrocita se u gmazova određuje manualnom metodom pomoću melanžera, Natt-Herrick-ove otopine i Neubauerove komorice u kojoj se broje

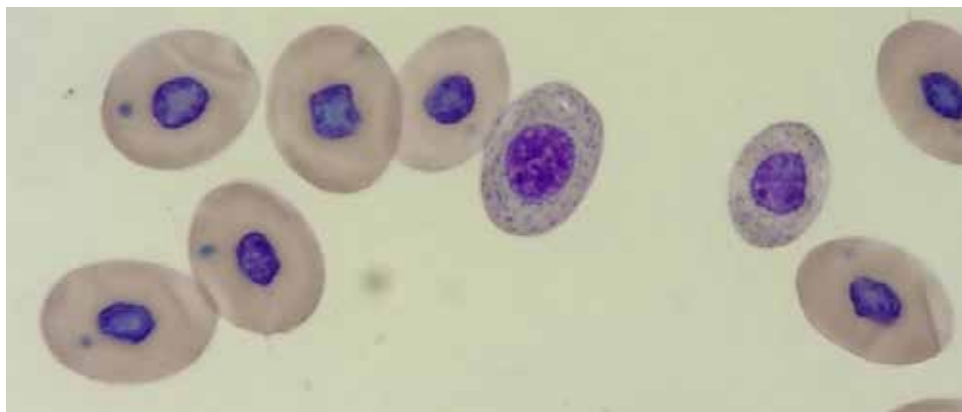
eritrociti pod mikroskopskim povećanjem 40 x (Weiss i Wardrop, 2010.).

Eritrocitne konstante, MCV (Engl. mean corpuscular volume, prosječan volumen eritrocita), MCH (Engl. mean corpuscular hemoglobin, prosječna količina hemoglobina u eritrocitima) i MCHC (Engl. mean corpuscular hemoglobin concentration, prosječna koncentracija hemoglobina u eritrocitima) izračunavamo pomoću formula iz prethodno opisanih parametara crvene krvne slike (Strik i sur., 2007.). Eritrocitnim konstantama dobivamo uvid u veličinu eritrocita i njihovu zasićenost hemoglobinom.

Broj leukocita može se odrediti pomoću nekoliko metoda (Campbell i Ellis, 2007., Strik i sur., 2007., Jenkins-Perez, 2012.). Svaka metoda ima svoje prednosti i nedostatke, a točnost rezultata ovisi o iskustvu citologa/hematologa.

Morfologija i funkcija krvnih stanica

Eritrociti. Zreli eritrociti gmazova su ovalne stanice koje u središtu sadrže ovalnu do okruglu jezgru nepravilnih rubova. Wrightovim bojanjem ove stanice se boje ružičasto-narančasto, a u jezgri je vidljiv gusti ljubičasti kromatin. Životni vijek eritrocita gmazova je 600-800 dana što je znatno više nego u sisavaca u kojih eritrociti žive u prosjeku 120 dana (Campbell i Ellis, 2007.). U krvi zdravih gmazova često se može naći i određeni postotak polikromatofila (manje od 3%) (Sykes i Klaphake, 2008.). U mladih morskih kornjača kao što je npr. glavata želva (*Caretta caretta*) nezrelih eritrocita može biti i do 26% (Basile i sur., 2012.). Za razliku od polikromatofila u sisavaca, u gmazova su ove stanice manje od zrelih eritrocita, okruglije su, boje se više bazofilno i imaju veću jezgru od zrelog eritrocta. Ove se stanice mogu vidjeti i u zdravih, mladih životinja te tijekom presvlačenja u zmija. U

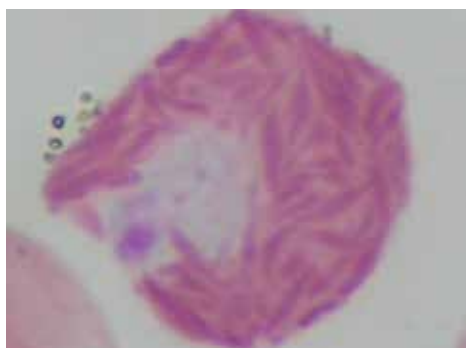


Slika 3. Zreli i nezreli eritrociti glavate želve (*Caretta caretta*)
Izvor: arhiva Zavoda za patološku fiziologiju

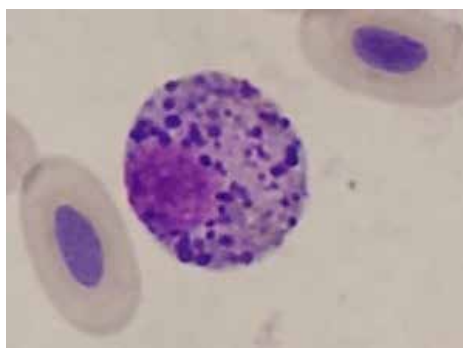
vodenih i poluvodenih kornjača često se u eritrocitima mogu uočiti okrugle bazofilne inkluzije koje su najčešće artefakti i nemaju kliničko značenje. (Slika 3.).

Leukociti gmazova dijele se na granulocite i agranulocite (ili mononuklearne stanice). Granulocite prema bojenju i obliku granula dijelimo na heterofile, eozinofile i bazofile, dok agranulocite dijelimo na monocite, limfocite i azurofile. Postoje brojne varijacije u različitim vrsta gmazova u broju leukocita, morfologiji granula te njihovoj koncentraciji u perifernoj krvi.

Heterofili su velike, okrugle stanice kojima je citoplazma ispunjena svjetlim ružičasto-narančastim granulama najčešće štapićastog oblika, slika 4. Jezgra heterofila varira u obliku i može biti okrugla, ovalna (najčešće u zmija i kornjača), ali i segmentirana (u guštera) (Claver, 2009.) Heterofili su funkcionalno najbližiji neutrofilima u sisavaca. Obavljaju fagocitozu bakterija i stranih tvari i imaju važnu ulogu u urođenoj imunosti. Najčešće su zastupljeni 30-45% od svih leukocita u perifernoj krvi, a u nekih vrsta kornjača i krokodila može ih biti i više od 50%.



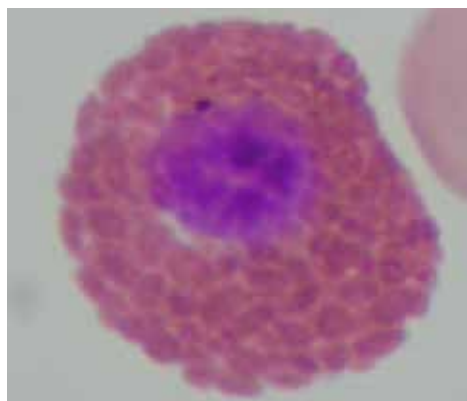
Slika 4. Heterofil čančare (*Testudo hermanni*).
Izvor: arhiva Zavoda za patološku fiziologiju



Slika 5. Toksični heterofil varana (*Varanus salvadori*)
Izvor: arhiva Zavoda za patološku fiziologiju

Tijekom upala, nekroza i bakterijskih infekcija u perifernoj krvi nalazimo toksične neutrofile, slika 5. Stupanj toksičnosti heterofila ovisi o težini bolesti. Toksični heterofili imaju bazofilnu citoplazmu, degranulaciju, a tijekom teških upala mogu se u citoplazmi naći vakuole, pleomorfne granule i jaka reznjevitost jezgre. Kao i u sisavaca, prisustvo nezrelih heterofila (skretanje u lijevo) je uglavnom povezano s upalom (Rovira, 2010.).

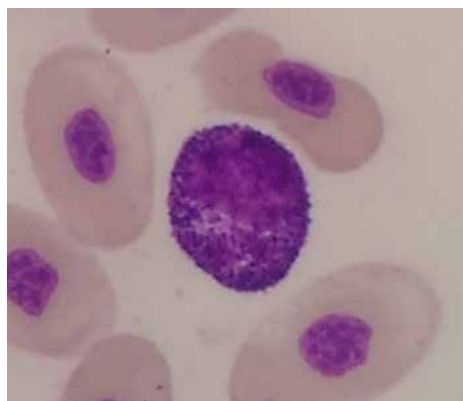
Eozinofili gmazova su morfološki i funkcionalno slični onima u sisavaca. To su okrugle srednje velike do velike stanice koje u citoplazmi imaju okrugle ružičaste granule. Granule se u nekih vrsta guštera boje plavo zeleno. Jezgra može biti smještena centralno ili ekscentrično, a oblikom varira od okrugle do ovalne i izdužene. Vrlo su rijetki u zmija, a neki autori smatraju da ih zmije niti nemaju, osim Kraljevske kobre (Stacy i sur., 2011., Parida i sur., 2014.). U perifernoj krvi eozinofili čine 7-20% ukupnih leukocita s time da ih gušteri imaju manje, a kornjače više. Smatra se da je funkcija eozinofila u gmazova slična onoj u sisavaca, jer je njihov povećan broj zamijećen kod parazitarnih invazija, ali i ostalih tipova antigene stimulacije. (Slika 6.).



Slika 6. Eozinofil čančare [*Testudo hermanni*].
Izvor: arhiva Zavoda za patološku fiziologiju

Bazofili su u pravilu najmanji granulociti, no u nekih vrsta mogu biti veliki poput heterofila. U citoplazmi sadrže veliki broj malih, okruglih, tamno ljubičastih granula koje često prekrivaju jezgru koja je većinom smještena ekscentrično i uglavnom je okrugla. Tijekom vađenja i obrade krvi granule mogu degranulirati. Za razliku od sisavaca, gmazovi uglavnom imaju veliki broj bazofila. Ovisno o vrsti, bazofila u perifernoj krvi zdravih životinja može biti i do 40% od ukupnih leukocita. Iako im funkcija nije dobro poznata uočeno je da im se broj povećava tijekom hemoparazitskih i virusnih infekcija. Prilikom diferencijacije stanica potrebno je paziti da se bazofili ne zamijene s toksičnim heterofilima koji imaju bazofilne i okrugle granule (Sykes i Klaphake, 2008.). (Slika 7.).

Limfociti gmazova su vrlo slični onima u sisavaca. To su okrugle stanice koje variraju u veličini pa nalazimo velike, srednje i male limfocite. Jezgra je okrugla i nalazi se centralno u stanici ili blago ekscentrično, a citoplazma je bazofilna i oskudna u odnosu na jezgru. Prilikom diferencijacije leukocita potrebno je paziti kako se mali limfocit morfološki ne bi zamijenio za trombocit.



Slika 7. Bazofil mekokloplone kornjače [*Pelodiscus sinensis*].
Izvor: arhiva Zavoda za patološku fiziologiju



Slika 8. Mali limfocit crvenouhe kornjače (*Trachemys scripta elegans*)
Izvor: arhiva Zavoda za patološku fiziologiju

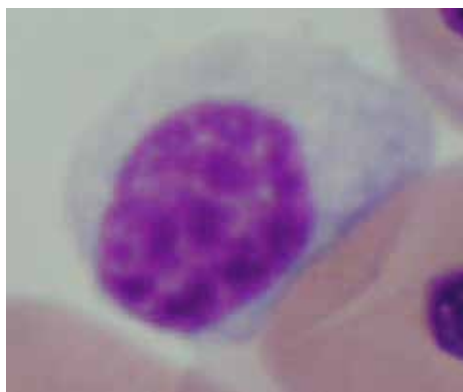
U stanjima koja izazivaju imunološki odgovor u perifernoj krvi povremeno možemo vidjeti velike limfocite, reaktivne limfocite i limfoblaste. Limfociti gmazova se kategoriziraju kao B- i T-limfociti koji izlučuju imunoglobuline i imaju ulogu u stanično posredovanoj imunosti. U većine gmazova limfociti su dominirajući leukociti čiji udio može biti čak i do 80%. Limfocitoza se javlja kod upala, infekcija, cijeljenja rana, parazitemija i virusnih bolesti, dok limfopenija može biti povezana s malnutricijom i većom količinom endogenih ili egzogenih kortikosteroida (Stacy i sur., 2011.). (Slika 8.).

Monociti su uglavnom velike stanice, okruglog ili ovalnog oblika s obilnom blijedo plavom citoplazmom i nepravilnom jezgrom. Reaktivni monociti često sadrže i vakuole, a može se vidjeti i fagocitirani materijal te fine eozinofilne ili azurofilne granule. Najčešće ih ima do 10% u ukupnom broju leukocita, mada neki gmazovi mogu imati i do 20% monocita. Nakon što izađu iz periferne cirkulacije i uđu u tkiva, monociti se razvijaju u makrofage. Povišen broj monocita u perifernoj krvi javlja se tijekom kronične stimulacije antigenom, kronične upale te bakterijskih i parazitaranih bolesti. Specifičnost kod gmazova je da se u perifernoj krvi mogu

uočiti monociti i makrofagi koji sadrže pigment melanin, lipidne vakuole ili eritrocite što se ne smije zamijeniti s intracelularnim organizmima (Canfield, 1998.). (Slika 9.).

Azurofili su krvne stanice specifične samo za gmazove. U krvi guštera, kornjača i krokodila nalazimo ih u manjem broju, dok su u zmija oni druge stanice po učestalosti u perifernoj krvi (Campbell i Ellis, 2007.). U zmija fiziološki može biti i do 35% azurofila od ukupnih leukocita. Morfološki i funkcionalno su slični i monocitima i granulocitima. To su okrugle stanice s blijedom plavičastosivom citoplazmom u kojoj se nalaze brojne sitne azurofilne do ljubičaste granule, a nekad i vakuole. Povišen broj azurofila u zmija je povezan najčešće s upalnim i infektivnim bolestima, naročito u akutnim fazama dok je u ostalih vrsta gmazova broj azurofila češće je povezan s kroničnim stanjima. (Slika 10.).

Trombociti Za razliku od trombocita sisavaca koji su citoplazmatski fragmenti megakariocita, trombociti gmazova su stanice s jezgrom koje potječu iz tromboblata u hematopoetskom tkivu. To su male, ovalne stanice s blijedo plavom citoplazmom u kojoj se mogu



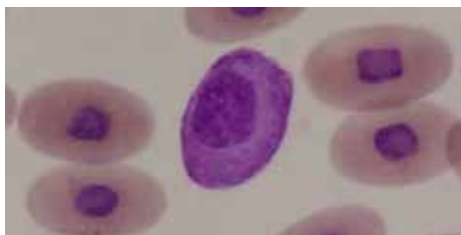
Slika 9. Monocit barske kornjače (*Emys orbicularis*).
Izvor: arhiva Zavoda za patološku fiziologiju

naći vrlo fine i sitne ružičaste granule. Jezgra je okrugla do ovalna i smještena centralno. Morfološki su slični malim limfocitima zbog čega se mora biti oprezan tijekom diferencijacije stanica. Trombociti su nešto manji od limfocita, ovalniji i imaju svjetliju citoplazmu, a kromatin u jezgri nije toliko zgusnut kao kod limfocita. Pomoć pri diferencijaciji može biti i svojstvo trombocita da se na preparatu nakupljaju u grozdove, a mogu imati i pseudopodije ili sadržavati vakuole u citoplazmi. Trombociti imaju ulogu u hemostazi i cijeljenju rana, a imaju i sposobnost fagocitoze pa u aktiviranom stanju mogu fagocitirati bakterije, hemosiderin i eritrocite (Stacy i sur., 2011.). Budući da se trombociti u hepariniziranoj krvi često grupiraju u nakupine nalik grozdovima nije moguće napraviti točnu procjenu njihovog broja. Osoba koja pregledava krvni razmaz može na temelju iskustva subjektivno procijeniti je li broj trombocita promijenjen.

Čimbenici koji utječu na hemogram

Postoje brojni čimbenici koji utječu na broj i morfologiju krvnih stanica. Neki od čimbenika vezani su za samu osobitost jedinke i vrste kojoj pripada (npr. spol, dob, reproduktivni status i sl.) i nazivaju se unutarnji čimbenici. Na njih je nemoguće utjecati pa je od velike koristi da osoba koja interpretira krvne nalaze bude upoznata s njima kako ne bi došlo do pogrešne interpretacije.

U nekih odraslih vrsta krokodila ustanovljeno je da imaju viši broj eritrocita i znatno niži postotak limfocita u odnosu na mlade životinje (Stacy i Whitaker, 2000.) S druge strane u mladim glavatih želvi uočen je viši postotak limfocita i niži postotak heterofila u perifernoj krvi u odnosu na odrasle životinje (Kakizoe i sur., 2007.). Što se tiče spola, u nekih vrsta kornjača



Slika 10. Azurofil pitona (*Morelia spilota harrisoni*).

Izvor: arhiva Zavoda za patološku fiziologiju

uočene su više vrijednosti parametara crvene krvne slike u mužjaka u odnosu na ženke (Christopher i sur., 1999., Zaias i sur., 2006.). Vanjski čimbenici su: godišnje doba, temperatura zraka, dostupnost i vrsta hrane, hibernacija, zatočeništvo i stres. Općenito je u većine gmazova uočen povećani broj eritrocita nakon hibernacije (u proljeće) nego prije hibernacije (u jesen) (Machado i sur., 2006.). Zabilježen je i veći broj heterofila, a ljeti manji broj eozinofila u odnosu na period hibernacije, dok je postotak limfocita bio niži tijekom zimskog perioda nego u ljetnim mjesecima (Frye, 1991., Perpiñan i sur., 2006., Strik i sur., 2007.). Stres, kao jedan od čimbenika koji utječu na krvnu sliku dovodi u gmazova do povećanja hematokrita i koncentracije hemoglobina (Franklin i sur., 2003.).

Poremećaji u krvnoj slici

Anemije

Pri intepretaciji crvene krvne slike i dijagnozi anemije u gmazova potreban je oprez i dobro poznavanje fiziologije i hematologije ovih životinja. Neki gmazovi imaju fiziološki nizak hematokrit (16-21%) kao npr. pitoni (Johnson i Benson, 1996.), a klinički znaci koji bi ukazivali na anemiju često mogu biti prikriveni. Primjer za to su sluznice koje su u većine gmazova pigmentirane, blijede ili zamučene čak i kod zdravih životinja, a većina gmazova koji boluju

od neke bolesti u pravilu su letargični bez obzira na uzrok.

Anemija u gmazova može biti regenerativna i neregenerativna. Regenerativna anemija najčešće nastaje kao posljedica krvarenja i/ili hemolize, dok neregenerativna nastaje zbog smanjene produkcije eritrocita u hematopetskom tkivu. Anemije zbog krvarenja nastaju najčešće zbog parazita koji sišu krv (krpelji, grinje, pijavice) i traumatskih ozljeda (npr. ugriz druge životinje, pad s visine, progutana udica u probavnom sustavu itd.). Hemolitičke anemije prozročene su uglavnom hemoparazitima te bakterijama i toksinima koji imaju hemolitičko djelovanje. Regenerativni odgovor očituje se u krvi bazofilnom punktacijom, dvostrukom jezgrom, povećanom anizocitozom i anizokariozom te povećanim brojem mitotičkih oblika. Međutim, sve navedeno može se javiti i poslije hibernacije, kod malnutricije, gladovanja, trovanja, septicemije i teških upalnih bolesti, a posljedica je neregenerativna anemija. Povećan broj retikulocita i ranijih nezrelih stadija eritrocita ukazuje na regenerativni odgovor isto kao i smanjenje vrijednosti MCV i MCHC. Neregenerativna anemija se u gmazova javlja tijekom kroničnih bolesti i to je ujedno najčešći oblik anemije u gmazova. Najčešće zabilježene bolesti koje prati neregenerativna anemija su kronične degenerativne ili upalne bolesti jetre, bubrega, slezene i pluća, zatim gastrointestinalne bolesti, nepravilno držanje životinje, izgladnjivanje i hematopoetske neoplazme (Saggese, 2009.).

Upale i inkluzije

Upalni odgovor u gmazova je pod utjecajem različitih unutarnjih i vanjskih čimbenika, u prvom redu temperaturom, godišnjim dobima i hormonalnim učinkom (Tucunduva i sur., 2001.). Viša temperatura okoliša stimulira imunološki odgovor

životinje i može rezultirati ranijom rezolucijom upale (Strik i sur., 2007.). Glavni uzrok leukocitoze u gmazova su upalna stanja koja se javljaju tijekom bakterijskih i parazitarnih zaraznih bolesti, oštećenja tkiva i nekroze (Strik i sur., 2007., Sykes i Klaphake, 2008.). U pravilu se uvijek javlja heterofilija koja je kod bakterijske infekcije uvijek praćena skretanjem ulijevo i toksičnim promjenama heterofila. Uz to se često javljaju monocitoza i azurofilija. Ako je infekcija vrlo jaka u konačnici može rezultirati heteropenijom s toksičnim skretanjem u lijevo. Teška heteropenija zabilježena je u čančara nakon administracije fenbendazola (Neiffer i sur., 2005.). Upala u gmazova često rezultira stvaranjem granuloma koji se sastoji od gusto posloženih nekrotičnih heterofila u centru te monocita, makrofaga i multinuklearnih gigantskih stanica na periferiji (Tucunduva i sur., 2001.). Ako su prisutni limfociti i plazma stanice, oni ukazuju na kronicitet lezije.

U zmija je azurofilija sa ili bez toksičnog skretanja ulijevo često povezana s upalnim ili заразним (najčešće bakterijskim) bolestima, naročito u aktunoj fazi. U ostalih vrsta gmazova azurofilija je češće prisutna u kroničnim stanjima (Jacobson i sur., 1997.).

Virusne infekcije su česte u gmazova, a neke se mogu dijagnosticirati promatranjem karakterističnih virusnih inkluzija u citoplazmi krvnih stanica. Pritom se mora paziti da se virusne inkluzije ne zamijene s kristalima hemoglobina, artefaktima prilikom bojanja razmaza, fagocitiranim komadićima, hemosiderinom ili melaninskim granulama (Allender i sur., 2006., Stacy i sur., 2011.).

Inclusion Body disease (IBD) je bolest zmija, najčešće udavki, kod koje se u limfocitima nalaze karakteristične citoplazmatske inkluzije (Strik i sur.,

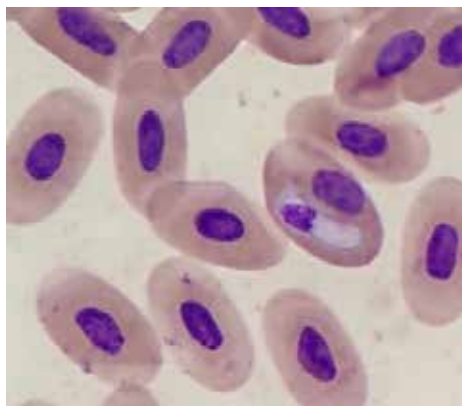
2007.). Smatra se da je prouzročio retrovirus, ali buduća istraživanja to tek trebaju potvrditi. Bolest se karakterizira limfocitozom i već spomenutim intracitoplazmatskim inkluzijama u limfocitima, rijede u trombocitima i bazofilima. Inkluzije su glatke, homogene, blijedo plavičaste i često ispunjavaju citoplazmu, a mogu pomaknuti jezgru. Osim u limfocitima inkluzije IBD-a nalazimo i u ostalim stanicama kao npr. neuronima i glija stanicama središnjeg živčanog sustava, epitelnim stanicama sluznice probavnog trakta, hepatocitima, renalnim tubularno epitelnim stanicama i gušterači (Jacobson i sur., 2001.).

Inkluzije kod infekcije Iridovirusom uočene su u krvnim stanicama zmija, guštera i kornjača (Allender i sur., 2006., Wellenhan i sur., 2008.). Morfologija ovih inkluzija varira u različitim vrstama gmazova. Iako je infekcija patogena za životinje, zabilježeni su nalazi inkluzija u cirkulirajućim eritrocitima bez vidljivog štetnog učinka (Daly i sur., 1980.). U zmija se ovaj virus naziva zmijski eritrocitni virus (Engl. snake erythrocyte virus (SEV)) i uvijek je povezan s jakom anemijom (Alves de Matos i sur., 2002., Wellenhan i sur., 2008.).

Hemoparaziti

Većina hemoparazita u gmazova nije patogena i često se mogu uočiti u zdravih životinja koje žive u prirodi. Patogeni hemoparaziti izazivaju hemolitičku anemiju naročito kad je jedan od okidača za nastanak bolesti stres.

Hemogregarini (Slika 11.) su morfološki slični krvni paraziti iz četiri različita roda. Nalazimo ih u većini vrsta gmazova, ali ih ne možemo difrencirati samo na osnovi morfoloških svojstava. Gametocite hemogregarina se jednostavno mogu identificirati u citoplazmi eritrocita. To su duguljasti organizmi s blijedo plavom citoplazmom i centralno okruglo do ovalnom jezgrom koji se



Slika 11. Hemogregarinski parazit (*Hemogregarina* sp.) u varana (*Varanus salvadori*).

Izvor: arhiva Zavoda za patološku fiziologiju

najčešće smještaju oko jezgre eritrocita i često je pomiču u stranu. Općenito se hemogregarini ne smatraju patogenim, ali u neprirodnom i stranom domaćinu mogu izazvati značajan imunološki odgovor.

U gmazova je opisano više od 90 vrsta i podvrsta *Plasmodiuma*. Gametociste *Plasmodiuma* su vrlo slične onima od hemogregarina, s razlikom što većina malaričnih parazita sadrži refraktilne, zlatno-smeđe granule. Većina *Plasmodia* u gmazova nije patogeno mada su u nekim slučajevima zabilježene teške anemije (Stacy i sur., 2011.). Trypanosome su ekstracelularne protozoe, bičaši, koji u gmazova uzrokuju doživotnu kliničku infekciju, ali rijetko kad kliničku bolest.

Zaključak

Da bismo napravili dobru hematološku analizu gmazova, nužno je poznavati ručne metode obrade krvi, morfologiju krvnih stanica i utjecaj različitih čimbenika na određivanje krvne parametre.

Uz sve navedeno i s obzirom na raznolikost između velikog broja vrsta

gmazova, određivanje i procjena krvne slike gmazova u rutinskoj veterinarskoj kliničkoj praksi za sada još nije ustaljena. Iako je do sada istražen velik broj različitih vrsta gmazova kojima su određene referentne vrijednosti hematoloških i biokemijskih parametara još uvijek su na ovom području potrebna daljnja istraživanja kako bi se što brže, jednostavnije i efikasnije obradila krv gmazova, dobili pouzdani rezultati te nakon toga točno interpretirali nalazi.

Sažetak

Hematologija gmazova je područje koje se u posljednjih nekoliko desetljeća počelo razvijati i istraživati zbog sve većeg broja gmazova koji se drže kao kućni ljubimci, a time su i češći pacijenti u veterinarskim ambulancama. Izrada krvne slike gmazova je postupak koji se za sada još ne radi u kliničkoj veterinarskoj praksi, ali upoznavanjem hematologije i načinima određivanja hematoloških parametara u gmazova otvara se mogućnost i veterinarima male prakse da rutinski odrede hemogram gmazova. Svi se hematološki parametri određuju ručno pa je za dobivanje kompletne krvne slike, osim stručnosti i iskustva osobe koja izrađuje hemogram, potrebna i odgovarajuća laboratorijska oprema i reagensi. Sve krvne stanice gmazova imaju jezgru pa je tijekom diferencijacije stanica potreban oprez kako ne bi došlo do zamjene pojedinih vrsta stanica. Na broj i morfologiju krvnih stanica gmazova utječu brojni vanjski i unutarnji čimbenici koje treba imati na umu tijekom interpretacije dobivenih nalaza. Promjena broja i morfologije krvnih stanica tijekom različitih bolesti i patoloških stanja javlja se ovisno o vrsti gmazova, težini i dužini trajanja bolesti.

Ključne riječi: gmazovi, hematologija, promjene u hemogramu

Literatura

- ALLENDER, M. C., M. M. FRY, A. R. IRIZARRY, L. CRAIG, A. J. JOHNSON and M. JONES (2006): Intracytoplasmic inclusions in circulating leukocytes from an eastern box turtle (*Terrapene carolina carolina*) with iridoviral infection. *J. Wildl. Dis.* 42, 677-684.
- ALVES DE MATOS, A. P., I. PAPERNA and E. CRESPO (2002): Experimental infection of lacertids with lizard erythrocytic viruses. *Intervirology* 45, 150-159.
- BASILE, F., A. DI SANTI, L. FERRETTI, F. BENTIVEGNA and A. PICA (2012): Hematology of the Mediterranean population of sea turtle (*Caretta caretta*): comparison of blood values in wild and captive, juvenile and adult animals. *Comp. Clin. Pathol.* 21, 1401-1406.
- CAMPBELL, T. and C. ELLIS (2007): Avian and exotic animal hematology and cytology. Ames, Iowa: Blackwell.
- CANFIELD, P. J. (1998): Comparative cell morphology in the peripheral blood film from exotic and native animals. *Aust. Vet. J.* 76, 793-800.
- CHRISTOPHER, M. M., K. H. BERRY, I. R. WALLIS, K. A. NAGY, B. T. HENEN and C. C. PETERSON (1999): Reference intervals and physiologic alterations in hematologic and biochemical values of free-ranging desert tortoises in the Mojave desert. *J. Wildl. Dis.* 35, 212-238.
- CLAVER, J. A. (2009): Comparative morphology, development, and function of blood cells in nonmammalian vertebrates. *J. Exot. Pet Med.* 18, 87-97.
- DALY, J. J., M. MAYHUE, J. H. MENNA and C. H. CALHOUN (1980): Virus-like particles associated with *Pirhemocytion* inclusion bodies in the erythrocytes of a water snake, *Nerodia erythrogaster flavigaster*. *J. Parasitol.* 66, 82-87.
- FRANKLIN, C. E., B. M. DAVIS, S. K. PEUCKER, H. STEPHENSON, R. MAYER, J. WHITTIER, J. LEVER and G. C. GRIGG (2003): Comparison of stress induced by manual restraint and immobilisation in the estuarine crocodile, *Crocodylus porosus*. *J. Exp. Zool.* 298, 86-92.
- FRYE, F. L. (1991): Hematology as applied to clinical reptile medicine. In: Frye, F. L.: Biomedical and surgical aspects of captive reptile husbandry. Krieger Publishing Co.
- JACOBSON, E. R., H. P. ADAMS, T. W. GEISBERT, S. J. TUCKER, B. J. HALL and B. L. HOMER (1997): Pulmonary lesions in experimental ophidian paramyxovirus pneumonia of Aruba island rattlesnakes, *Crotalus unicolor*. *Vet. Pathol.* 34, 450-459.
- JACOBSON, E. R., J. ORÓS, S. J. TUCKER, D. P. POLLOCK, K. L. KELLEY, R. J. MUNN, B. A. LOCK, A. MERGIA and J. K. YAMAMOTO (2001): Partial characterization of retroviruses from boid snakes with inclusion body disease. *Am. J. Vet. Res.* 62, 217-224.
- JAKŠIĆ, B. (2009): Klinička važnost novih parametara krvnih stanica. *Biochem. Med.* 19, 38-39.

14. JENKINS-PEREZ, J. (2012): Hematologic evaluation of reptiles: A diagnostic mainstay. *Veterinary technician* 1-8.
15. JOHNSON, J. H. and P. A. BENSON (1996): Laboratory reference values for a group of captive Ball Pythons (*Python regius*). *Am. J. Vet. Res.* 57, 1304-1307.
16. KAKIZOE, Y., F. SAKAOKA, F. KAKIZOE, M. YOSHII, H. NAKAMURA, Y. KANO and I. UCHIDA (2007): Successive changes of hematologic characteristics and plasma chemistry values of juvenile loggerhead turtles (*Caretta caretta*). *J. Zoo. Wildl. Med.* 38, 77-84.
17. LUKAČ, M., D. HORVATEK TOMIĆ and E. PRUKNER-RADOVČIĆ (2013): Findings of *Devriesea agamarum* associated infections in spiny-tailed lizards (*Uromastix* sp.) in Croatia. *J. Zoo. Wildl. Med.* 44, 430-434.
18. LUKAČ, M., D. HORVATEK TOMIĆ, I. CIZELJ, N. MAŠALA, M. BELIĆ, J. HABUŠ, F. MARTINKOVIĆ, I. ŠTIMAC, N. TURK and E. PRUKNER-RADOVČIĆ (2015a): Screening of selected pathogens and general health status of freshwater turtles (*Trachemys* sp.) introduced to Croatia. International Conference on Diseases of Zoo and Wild Animals (Barcelona, 13-16 May 2015). Proceedings. Barcelona, Spain (165).
19. LUKAČ, M., K. PEDERSEN and E. PRUKNER-RADOVČIĆ (2015b): Prevalence of *Salmonella* in Captive reptiles from Croatia. *J. Zoo. Wildl. Med.* 46, 234-240.
20. MACHADO, C. C., L. F. N. SILVA, P. R. R. RAMOS and R. K. TAKAHIRA (2006): Seasonal influence on hematologic values and hemoglobin electrophoresis in Brazilian Boa constrictor amarali. *J. Zoo. Wildl. Med.* 37, 487-491.
21. NEIFFER, D. L., D. LYDICK, K. BURKS and D. DOHETRY (2005): Hematologic and plasma biochemical changes associated with fenbendazole administration in Hermann's tortoises (*Testudo hermanni*). *J. Zoo. Wildl. Med.* 36, 661-672.
22. PARIDA, S. P., S. K. DUTTA and A. PAL (2014): Hematology and plasma biochemistry of wild-caught Indian cobra *Naja naja*. *J. Venom. Anim. Toxins. Incl. Trop. Dis.* 20, <http://dx.doi.org/10.1186/1678-9199-20-14>.
23. PERPIÑAN, D., S. M. HERNANDEZ-DIVERS, M. McBRIDE and S. J. HERNANDEZ-DIVERS (2006): Comparison of three different techniques to produce blood smears from green iguanas, *Iguana iguana*. *J. Herpetol. Med. Surg.* 16, 99-101.
24. POLJIČAK-MILAS, N. (2012): Uvod u hematološke pretrage, web predavanje; file:///D:/My%20Documents/Downloads/uvod_u_hematoloske_pretrage%20(3).pdf
25. ROVIRA, A. R. I. (2010): Hematology of reptiles. In: Weiss, D. J., K. J. Wardrop (eds.): *Schalm's veterinary hematology*. Wiley-Blackwell, Iowa (1004-1011).
26. SAGGESE, M. D. (2009): Clinical Approach to the Anemic Reptile. *J. Exot. Pet Med.* 18, 98-111.
27. STACY, B. A. and N. WHITAKER (2000): Hematology and blood chemistry of captive mugger crocodiles (*Crocodylus palustris*). *J. Zoo. Wildl. Med.* 31, 339-347.
28. STACY, N., A. R. ALLEMAN and K. SAYLER (2011): Diagnostic hematology of reptiles. *Clin. Lab. Med.* 31, 87-108.
29. STRIK, N. I., A. R. ALLEMAN and K. E. HARR (2007): Circulating inflammatory cells. In: Jacobson, E. R. (ed.): *Infectious diseases and pathology of reptiles: color atlas and text*. CRC Press (167-218).
30. SYKES, J. M. and E. KLAPHAKE (2008): Reptile hematology. *Vet. Clin. North. Am. Exot. Anim. Pract.* 11, 481-500.
31. TUCUNDUVA, M., P. BORELLI and J. R. SILVA (2001): Experimental study of induced inflammation in the Brazilian Boa (*Boa constrictor constrictor*). *J. Comp. Pathol.* 125, 174-181.
32. WEISS, D. J. and K. J. WARDROP (2010): *Schalm's veterinary hematology*. Wiley-Blackwell.
33. WELLEHAN, J. F. X. JR., N. I. STRIK, B. A. STACY, A. CHILDRESS, E. R. JACOBSON and S. R. TELFORD (2008): Characterization of an erythrocytic virus in the family Iridoviridae from a peninsula ribbon snake (*Thamnophis sauritus sackerii*). *Vet. Microbiol.* 131, 115-122.
34. ZAIAS, J., T. NORTON, A. FICKEL, J. SPRATT, N. H. ALTMAN and C. CRAY (2006): Biochemical and hematologic values for 18 clinically healthy radiated tortoises (*Geochelone radiata*) on St Catherines Island, Georgia. *Vet. Clin. Pathol.* 35, 321-325.

Reptile haematology

Maja BELIĆ, DVM, PhD, Assistant Professor, Romana TURK, DVM, PhD, Associate Professor, Maja LUKAČ, DVM, PhD, Senior Assistant, Mirna ROBIĆ, DVM, PhD, Full Professor, Faculty of Veterinary Medicine University of Zagreb, Croatia; Ines VERŠEC, DVM, Veterinary Ambulance Fabela, Croatia

Reptile haematology has begun developing in recent decades with the

increase in the number of reptiles held as household pets and presenting as veterinary

patients. Although complete blood count is not presently a routine test in clinical veterinary practice, getting to know the haematology and the means of determining haematological parameters in reptiles will enable small animal practitioners to develop this test as a standard and routine laboratory test. All haematological parameters are to be performed manually, therefore adequate laboratory equipment, chemical reagents and expertise and experience of the veterinarian is mandatory. All reptile blood cells contain

a nucleus, so caution is needed in the determination of blood cell types. The number and morphology of blood cells in reptiles is influenced by numerous external and internal factors, which need to be considered during the interpretation of results. Changes in the number and morphology of blood cells during disease and pathological conditions depend on species, body mass and duration of the disease.

Key words: *reptiles, hematology, hemogram changes*