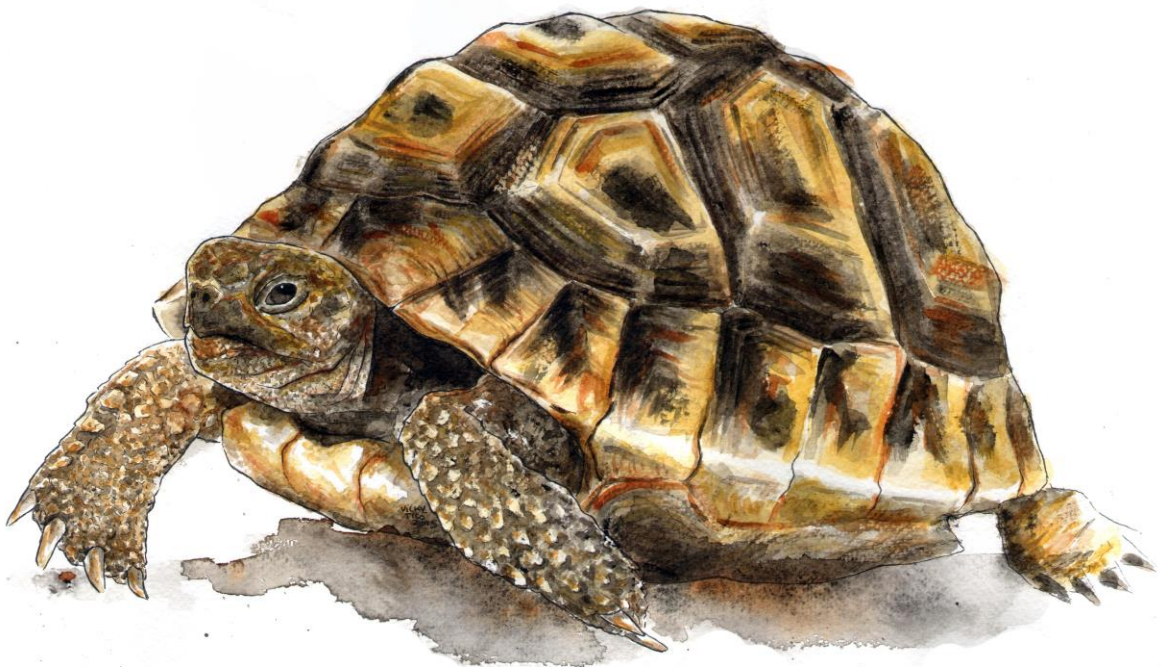


Jesús Muro Figueres

**ESTUDIO SANITARIO DE LAS TORTUGAS TERRESTRES
MEDITERRÁNEAS (GÉNERO *TESTUDO*) E
IMPLICACIONES PARA SU CONSERVACIÓN**



- VICKY TICO 2015 -

Directores:

**Santiago Lavín González
Josep Pastor Milán
Ignasi Marco Sánchez**

**Tesis Doctoral
Departament de Medicina i Cirurgia Animals
Facultat de Veterinària
Universitat Autònoma de Barcelona
2015**

**ESTUDIO SANITARIO DE LAS TORTUGAS TERRESTRES
MEDITERRÁNEAS (GÉNERO *TESTUDO*) E
IMPLICACIONES PARA SU CONSERVACIÓN**

Jesús Muro Figueres

Directores:

**Santiago Lavín González
Josep Pastor Milán
Ignasi Marco Sánchez**

**Tesis Doctoral
Departament de Medicina i Cirurgia Animals
Facultat de Veterinària
Universitat Autònoma de Barcelona
2015**

Los Doctores *SANTIAGO LAVÍN GONZÁLEZ*, *JOSEP PASTOR MILÁN* e *IGNASI MARCO SÁNCHEZ*, Catedrático de Universidad y Profesores Titulares del Área de conocimiento de Medicina y Cirugía Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Autònoma de Barcelona, respectivamente,

INFORMAN:

que la memoria titulada **“ESTUDIO SANITARIO DE LAS TORTUGAS TERRESTRES MEDITERRÁNEAS (GÉNERO TESTUDO) E IMPLICACIONES PARA SU CONSERVACIÓN”**, presentada por **JESÚS MURO FIGUERES** para la obtención del grado de **Doctor en Veterinaria** por la Universitat Autònoma de Barcelona, ha sido realizada bajo nuestra dirección y, considerándola satisfactoriamente finalizada, autorizamos su presentación para que sea juzgada por la comisión correspondiente.

Y para que conste a los efectos oportunos, firmamos el presente informe en Bellaterra, a 8 de octubre de 2015.

Firmado: Santiago Lavín González

Firmado: Josep Pastor Milán

Firmado: Ignasi Marco Sánchez

*A la Mare, que malgrat que ens va
deixar massa aviat, sempre ha estat
present en la meva vida*

“Debo decir que de muchacho sentía pasión por los mapas. Podía pasar horas enteras reclinado sobre Sudamérica, África o Australia, y perderme en los proyectos gloriosos de la exploración. En aquella época había en la tierra muchos espacios en blanco, y cuando veía uno en un mapa que me resultaba especialmente atractivo (aunque todos lo eran), solía poner un dedo encima y decir: Cuando crezca iré allí. Recuerdo que el Polo Norte era uno de esos espacios. Bueno, aún no he estado allí, y creo que ya no he de intentarlo. El hechizo se ha desvanecido. Otros lugares estaban esparcidos alrededor del ecuador, y en toda clase de latitudes sobre los dos hemisferios. He estado en algunos de ellos y ... bueno, no es el momento de hablar de eso. Pero había un espacio, el más grande, el más vacío por así decirlo, por el que sentía verdadera pasión”. Charlie Marlow.

Joseph Conrad. El corazón de las tinieblas.

Agradecimientos

Esta tesis doctoral tendría que haber visto la luz hace ya muchísimo tiempo. Circunstancias laborales y familiares fueron complicando las cosas y dilatando el tiempo hasta unos límites difícilmente explicables.

Por fin, después de más de 17 años desde su inicio verá la luz.

Un encuentro providencial con Santiago Lavín y Josep Pastor me llevó al primer estudio de la hematología en las tortugas mediterráneas. Posteriormente, y, a raíz de la aparición de los primeros brotes de rinitis en tortugas moras, se fraguó la idea de materializar todos los trabajos en una tesis doctoral.

Nada de todo esto habría sido posible, ya que soy un veterinario eminentemente clínico, sin el soporte todos los compañeros y amigos del SEFaS: Roser Velarde, Rafi Cuenca e Ignasi Marco.

A éste último le debo la finalización de la tesis. Tantas horas compartidas en Uganda dieron tiempo para muchas cosas, y entre ellas al empujón final que este trabajo necesitaba.

Toni Ramis siempre ha estado a mi lado en todas mis lagunas histopatológicas, corrigiendo los manuscritos y aportando la larga trayectoria que posee en este campo.

Albert Martínez-Silvestre, apasionado como yo de las tortugas, y después de un prolongado período de distanciamiento, se puso enseguida a colaborar, especialmente en el caso de la Mycobacteriosis.

El otro Albert, Canturri, al que también engañé para acompañarme en mi aventura africana, después de un período intenso con Toni Ramis, ha puesto su granito de arena.

No puedo olvidar a mis compañeros del Servei Veterinari del Departament d'Agricultura del Govern d'Andorra, que han soportado mis ausencias durante los inicios de la toma de muestras.

También debo agradecer a los compañeros/as de la Clínica Veterinària Prat de la Creu, especialmente a Celsa y Lupe, las cuales fueron imprescindibles en las extracciones sanguíneas, nada fáciles vista la dificultad de los pacientes y del extractor.

Vicky, siempre en mi lado derecho, ha corregido, paginado, soportado, los manuscritos, y ha dibujado la portada de la tesis.

Por último, y el orden no significa en absoluto menor agradecimiento, a Mercè, Laura i Marc, que son en el fondo el motivo de más orgullo para mí.

Índice

Resumen	1
Abstract.....	5
1. Introducción.....	9
2. Revisión bibliográfica	13
2.1. Características generales de la Tortugas terrestres ibéricas	15
2.1.1. Taxonomía y distribución geográfica.....	15
2.1.2. Datos biológicos de las dos especies objeto de estudio.....	19
2.1.3. Aspectos sanitarios aplicados a la conservación de las tortugas terrestres ibéricas.....	20
2.2. Hematología y bioquímica sanguínea de las tortugas terrestres.....	22
2.2.1. Obtención de muestras de sangre.....	22
2.2.2. Anticoagulantes	25
2.2.3. Hemograma	26
2.2.4. Bioquímica sanguínea	42
2.3. Herpesvirosis de las tortugas terrestres.....	70
2.4. Micobacteriosis de los reptiles	79
3. Objetivos	85
4. Estudios	89
4.1. ESTUDIO I: Effects of lithium heparin and tripotassium EDTA on hematologic values of Hermann’s tortoises (<i>Testudo hermanni</i>)	91
4.2. ESTUDIO II: Chronic rhinitis associated with herpesviral infection in captive spur- thighed tortoises from Spain	99

4.3. ESTUDIO III: Micobacteriosis atípica sistémica en tortuga mediterránea (<i>Testudo hermanni</i>).	111
5. Discusión general	135
6. Conclusiones	145
7. Bibliografía.....	149

Resumen

Las tortugas terrestres mediterráneas, tortuga mediterránea (*Testudo hermanni*) y tortuga mora (*Testudo graeca*), presentan problemáticas similares de conservación en España, si bien, la primera está más amenazada. Los programas de conservación, tanto *in-situ* como *ex-situ*, deben incluir una adecuada gestión sanitaria. Uno de los aspectos básicos es el establecimiento de los parámetros sanguíneos de referencia para la adecuada interpretación y evaluación del estado sanitario de cada especie. En el primer estudio, realizado en tortuga mediterránea occidental (*T. h. hermanni*), se valoró el efecto de dos anticoagulantes, heparina de litio y EDTA tripotásico, sobre los parámetros hematológicos. El recuento de eritrocitos, presentó diferencias remarcables, ya que el EDTA produce una hemólisis superior a la heparina. Además, se observó mayor agregación de leucocitos y trombocitos. Por tanto, la heparina de litio constituye el anticoagulante de elección para las muestras sanguíneas en estos quelonios. Los trombocitos se diferenciaron mejor con la tinción de May-Grunwald-Giemsa pero los gránulos de los heterófilos destacaron mejor con Diff-Quick.

Los procesos infecciosos bacterianos y víricos pueden comprometer la viabilidad de las poblaciones de tortugas cautivas y salvajes, y son un importante factor a tener en cuenta para la gestión de los centros de cría en cautividad y para la liberación de animales. Durante la década de los 90, las masivas importaciones de tortuga mora procedentes de Marruecos condujeron a elevadas mortalidades, no sólo de los animales importados, sino también de las tortugas ya existentes en diferentes centros y colecciones europeas, debido al llamado síndrome de la rinitis-glositis-estomatitis o "*Running Nose Syndrome*". En el segundo estudio se describe un brote de rinitis crónica asociada a un herpesvirus en una población cautiva de tortuga mora. Los signos clínicos más relevantes fueron rinitis seromucosa bilateral, estomatitis y glositis. Se realizó un estudio hematológico y bioquímico sanguíneo y se comparó con los datos obtenidos en animales sanos de tres poblaciones diferentes. Los animales enfermos mostraron heteropenia, linfocitosis, incremento en la actividad de la AST y aumento de la concentración de α -globulina. Algunos de ellos tenían anemia normocítica y normocrómica. Las lesiones se circunscribían al aparato respiratorio y a la cavidad oral, con marcada hiperplasia epitelial y presencia de infiltrado mixto inflamatorio en el epitelio de la mucosa oral, nasal y traqueal. La microscopía electrónica evidenció la

presencia de partículas virales intracitoplasmáticas e intranucleares que, por su tamaño, forma y patrón de distribución, se correspondían con un herpesvirus.

La cría en cautividad de especies en peligro de extinción supone unos riesgos sanitarios que las poblaciones salvajes no tienen. El estrés de la cautividad, las condiciones de hacinamiento, los errores en la gestión de la temperatura y humedad, pueden favorecer, como en el caso anterior, la aparición de enfermedades infecciosas. Las micobacteriosis son una de ellas, y por su potencial zoonótico merecen una especial atención. En el tercer estudio se describe un episodio de micobacteriosis sistémica atípica en tortuga mediterránea occidental en una población cautiva. Los síntomas aparecieron al final del período de hibernación, en forma de anorexia, embotamiento y letargia, junto a lesiones inflamatorias y edematosas en las extremidades y cola. Los animales afectados fueron eutanasiados. La mayoría de tortugas presentaron una marcada leucocitosis, con heteropenia, monocitosis y un gran número de células mononucleares, y cinco de ellas presentaban anemia. Se observó un incremento de AST, ALT, LDH y FA, disminución de los ácidos biliares e hiperproteinemia, con aumento de la fracción globulina y disminución de la fracción albúmina y del cociente A/G en dos animales. Un animal presentó hipoproteinemia con hipoalbuminemia. En los aspirados articulares se observaron numerosas células mononucleares con abundantes estructuras bacilares fagocitadas. Mediante una tinción de Ziehl-Neelsen se evidenció la presencia de estructuras bacterianas ácido-alcohol resistente. Las lesiones se localizaron en ovario, páncreas, pulmón, bazo, corazón, musculatura caudal, riñón e hígado. La tinción de Auramina fue positiva. El cultivo e identificación para micobacterias fue positivo, así como la secuenciación molecular, mediante la que se identificó *Mycobacterium nonchromogenicum*.

Los aspectos sanitarios en los reptiles están insuficientemente estudiados y valorados para la cría en cautividad y la conservación de las especies amenazadas. En este estudio se comprueba como la heparina de litio es el anticoagulante de elección para la toma de muestras sanguíneas en tortugas terrestres mediterráneas y como las infecciones por herpesvirus y micobacterias pueden comprometer la conservación *ex-situ* de estas especies.

Abstract

Mediterranean tortoises, Hermann's tortoise (*Testudo hermanni*) and spur-thighed tortoise (*Testudo graeca*) have similar conservation issues in Spain, although the first has disappeared from most of its original habitat and is more threatened. Both in-situ and ex-situ conservation programs should include adequate health management. One of the main aspects is the establishment of reference values for blood parameters for the proper interpretation and evaluation of the health status of each species. In the first study, conducted in the western Mediterranean tortoise (*T. h. hermanni*), the effect of two types of anticoagulants, heparin lithium and EDTA tripotassium, on hematological parameters was evaluated. Some parameters, such as red blood cell count, showed remarkable differences, since EDTA resulted in higher hemolysis than heparin. Furthermore, EDTA caused leukocyte and thrombocyte aggregation. Therefore, heparin lithium is considered as the anticoagulant of choice for blood samples of these chelonians. Thrombocytes were better stained with May-Grunwald- Giemsa than with Diff-Quick, although heterophile granules highlighted to a greater extent with the latter.

Infectious bacterial and viral diseases can compromise the viability of tortoise populations, both captive and wild, and are important factors to consider in the management of captive populations and for the release of animals, to reinforce wild populations and to reintroduce in habitats where they have disappeared. During the 90s, massive imports of spur-thighed tortoise from Morocco lead to a high mortality of them and also to mortality of local tortoises from different European centers and captive populations due to the "Running Nose Syndrome". In the second study, an outbreak of chronic rhinitis associated with a herpesvirus in a captive population of spur-thighed tortoise is described. The most relevant clinical findings were bilateral effusion rhinitis, accompanied by stomatitis and glossitis. An hematological and serum biochemical study was performed and compared with data from healthy animals from three different populations. Diseased animals showed heteropenia, lymphocytosis, increased AST activity and higher α -globulin concentration. Some tortoises showed normocytic and normochromic anemia. The lesions were confined to the respiratory tract and the oral cavity, with marked epithelial hyperplasia and presence of mixed inflammatory infiltrate in the epithelium of the oral, nasal and tracheal mucosa. Electron

microscopy revealed the presence of intracytoplasmic and intranuclear viral particles whose size, shape and distribution pattern corresponded to a herpesvirus.

Captive breeding of endangered species are more subjected to health risks than wild populations. The stress of captivity, overcrowding, and temperature and humidity conditions, may favor, as in the case of the above herpesvirus, the emergence of infectious diseases that in a natural environment would not be observed. Mycobacterioses are one of them and, as a potential zoonosis, it deserves special attention from those responsible for the captive tortoise collections. In the third study, an episode of systemic atypical mycobacteriosis in a captive population of Western Hermann's tortoise is described. The symptoms appeared at the end of the period of hibernation, in the form of anorexia, dullness and lethargy, with inflammatory and edematous lesions on the limbs and tail. Blood samples, joint taps and skin biopsies were performed. Lately, euthanasia of affected animals was performed. Most tortoises showed marked leukocytosis, with heteropenia, monocytosis and a large number of mononuclear cells, and five animals had anemia. An increase in the values of AST, ALT, LDH and FA was observed, but no increase of uric acid, despite the severe kidney lesions observed. Bile acids were remarkably low considering the severity of liver damage and two animals showed hyperproteinemia with increased globulin and decreased albumin and A/G ratio. Only one animal showed hypoproteinemia associated with hypoalbuminemia. In joint taps, mononuclear cells with phagocytosed bacillary structures were observed. Ziehl-Neelsen stain revealed the presence of acid-fast bacteria. Lesions were observed in ovaries, pancreas, lungs, spleen, heart, muscle, kidney and liver. Auramine staining was positive. Culture and identification were positive for mycobacteria and molecular sequencing led to the identification of *Mycobacterium nonchromogenicum*.

Health aspects in reptiles are insufficiently studied and assessed for captive breeding and conservation of threatened species. In this study, it was found that lithium heparin is the anticoagulant of choice for blood sampling in Mediterranean tortoises and infections such as those caused by herpesvirus and mycobacteria may compromise the ex-situ conservation of these species.

1. Introducción

Hasta bien entrada la década de los 70 las tortugas terrestres mediterráneas, tortuga mediterránea (*Testudo hermanni*) y tortuga mora (*Testudo graeca*), eran consideradas como animales de compañía exóticos, fáciles de mantener en un espacio exterior. Su masiva recolección con este fin, tanto en la Península Ibérica, como en las Islas Baleares, Marruecos y en la antigua Yugoslavia, supuso un grave declive en sus poblaciones. Las cifras indican el tremendo impacto que esta actividad debió de representar: Dumont (1979) estima que en 1971 se exportaron desde Yugoslavia alrededor de 400.000 ejemplares, y que entre 1967 y 1971, Inglaterra importó más de 164.000 ejemplares de tortuga mediterránea para su comercio interno de mascotas. Lambert (1979) señala que en 1974, 11.250 ejemplares fueron importados por Inglaterra procedentes de Yugoslavia, de los cuales un 82,81% moriría en el primer año de cautiverio (Blatt y Müller, 1979). A este hecho hubo que sumar la extensa destrucción del hábitat costero mediterráneo para su conversión en alojamientos turísticos, los extensos y repetitivos incendios forestales y el cambio de uso de la tierra (Merchán y Martínez-Silvestre, 1999). La prohibición de su recolección en Europa se vio consecuentemente seguida por importaciones masivas desde Marruecos o Túnez (Lambert, 1979). Estas importaciones tuvieron consecuencias catastróficas para las propias tortugas víctimas del comercio ilegal así como para las tortugas autóctonas. La aparición de la rinitis por herpesvirus diezmo las poblaciones importadas y tuvo gravísimas consecuencias para los ejemplares ya cautivos.

Las medidas de conservación adoptadas en España para las dos especies consideraban necesaria la protección in-situ y la conservación ex-situ, así como la prohibición de su importación. La conservación in-situ ha supuesto la creación de santuarios en diferentes puntos de la Península Ibérica y de las Islas Baleares. La conservación ex-situ se ha llevado a cabo mediante la creación de diferentes centros de recogida y rehabilitación de animales cautivos recuperados, así como la cría en cautividad para el fortalecimiento de las poblaciones salvajes y para la reintroducción mediante sueltas en nuevos hábitats idóneos para las especies (Delta del Ebro, Macizo del Garraf, Sierra del Montsant).

Los aspectos sanitarios relacionados con la conservación de la fauna salvaje no han sido tenidos en cuenta hasta hace pocos años. Más aún, aquellos relacionados con los

reptiles, todavía no se les ha dado la importancia que merecen. Por ello, los estudios sobre los aspectos sanitarios que puedan afectar a los resultados de la cría en cautividad así como a la supervivencia de los animales son necesarios también en estas especies.

En el presente trabajo, hemos evaluado la utilización de anticoagulantes para la obtención y manipulación de muestras hematológicas de las tortugas y hemos descrito minuciosamente dos procesos infecciosos, uno bacteriano y otro vírico, que pueden comprometer seriamente la viabilidad de las poblaciones cautivas de las dos especies de tortugas mediterráneas que habitan la Península Ibérica.

2. Revisión bibliográfica

2.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LAS TORTUGAS TERRESTRES IBÉRICAS

2.1.1. Taxonomía y distribución geográfica

La familia *Testudinidae* comprende 60 especies y 83 taxones. El Género *Testudo* incluye, según autores, cinco especies, dos de las cuales habitan en la Península Ibérica y Baleares. Son especies de tamaño mediano, caracterizadas por un caparazón bastante abombado, extremidades anteriores con cinco uñas, extremidades posteriores cilíndricas con cuatro uñas, cinco escudos vertebrales, cuatro pares costales, once pares marginales, un escudo cervical y uno supracaudal (divido en la tortuga mediterránea).

Tortuga mediterránea occidental (*Testudo hermanni hermanni*)

La tortuga mediterránea occidental está presente en el extremo occidental del área de distribución de la especie: sur de Francia, Italia, noreste de España y las islas de Mallorca y Menorca (España), Córcega (Francia), Cerdeña y Sicilia (Italia) (Fig. 1).

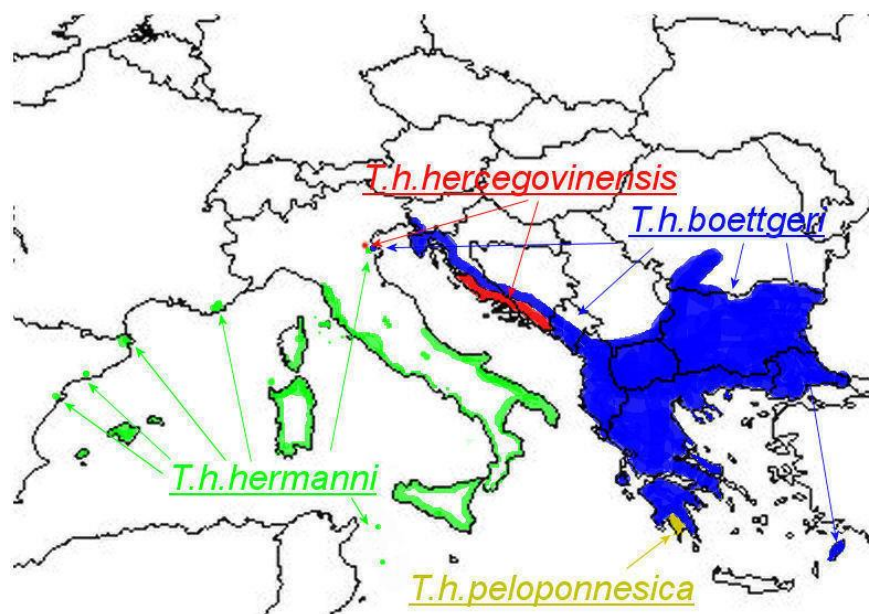


Figura 1. Distribución de las diferentes subespecies de tortuga mediterránea (https://es.wikipedia.org/wiki/Archivo:Areale_Testudo_hermannii.jpg).



Figura 2. Mapa de distribución de la tortuga mediterránea en España (Bertolero, 2010).

Las poblaciones españolas se encuentran en la mitad oriental de la isla de Mallorca y en Menorca. También en Cataluña, en el Alto Ampurdán, en el Parque Natural del Garraf y en las comarcas del Bajo Ebro y Montsiá (Parque Natural del Delta del Ebro y Parque Natural del Montsant) (Figs. 2 y 3).

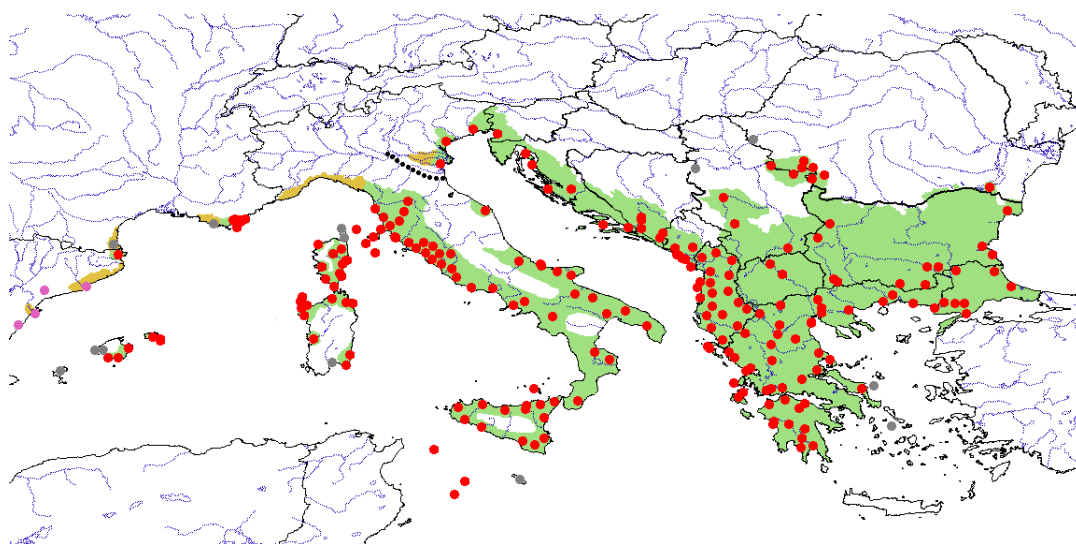


Figura 3. Distribución de la tortuga mediterránea. En rojo las poblaciones históricamente originales. En violeta, las poblaciones recientemente reintroducidas. En gris, citas prehistóricas, erróneas o procedentes de mascotas escapadas. La línea punteada delimita las poblaciones de la subespecie oriental (*T. h. boetgeri*) de la occidental (*T. h. hermanni*) (Bertolero et al., 2014).

Esta subespecie presenta un menor tamaño medio en relación a la subespecie oriental, el caparazón más abombado dorsalmente, la coloración de fondo más intensa y tendente al amarillo, manchas más oscuras y pronunciadas en la espalda y plastrón, además de un punto claro detrás y debajo de cada ojo. Presenta una uña en el ápice de la cola.

La tortuga mediterránea ocupa hábitats variados en función de su área de distribución al norte del Mediterráneo y en diversas islas, con preferencia por aquéllos caracterizados por la abundancia de vegetación densa en terrenos inclinados y expuestos al sol.

Su estatus de protección, según la lista roja de la IUCN, es de riesgo menor y casi amenazada, está incluida en el apéndice II del Convenio de Washington o CITES y se encuentra protegida en directivas y convenio europeos (Van Dijk *et al.*, 2014).

Tortuga mora (*Testudo graeca graeca*)

La tortuga mora es una de las cuatro subespecies reconocidas. Habita en el norte de África, desde la Península Cirenaica (Libia), hasta Túnez, Argelia y Marruecos; también se encuentra en las islas Baleares y en el sur de España (Figs. 4 y 5). Sánchez *et al.* (1986) señalan como enclave original de la especie en España la zona suroriental de la distribución actual en la Península Ibérica, en las provincias de Murcia y Almería. En las Islas Baleares se distribuye por el suroeste de la isla de Mallorca, además de Formentera. En la provincia de Huelva se localiza únicamente en el Parque Nacional de Doñana.



- | | | |
|-------------------------------------|----------------------------------|------------------------------------|
| 1 <i>Testudo graeca anamurensis</i> | 4 <i>Testudo graeca flowerii</i> | 7 <i>Testudo graeca nikolskii</i> |
| 2 <i>Testudo graeca antakyensis</i> | 5 <i>Testudo graeca graeca</i> | 8 <i>Testudo graeca terrestris</i> |
| 3 <i>Testudo graeca armeniaca</i> | 6 <i>Testudo graeca iberica</i> | 9 <i>Testudo graeca zarudnyi</i> |

Figura 4. Distribución de las subespecies de tortuga mora (www.testudines.org).

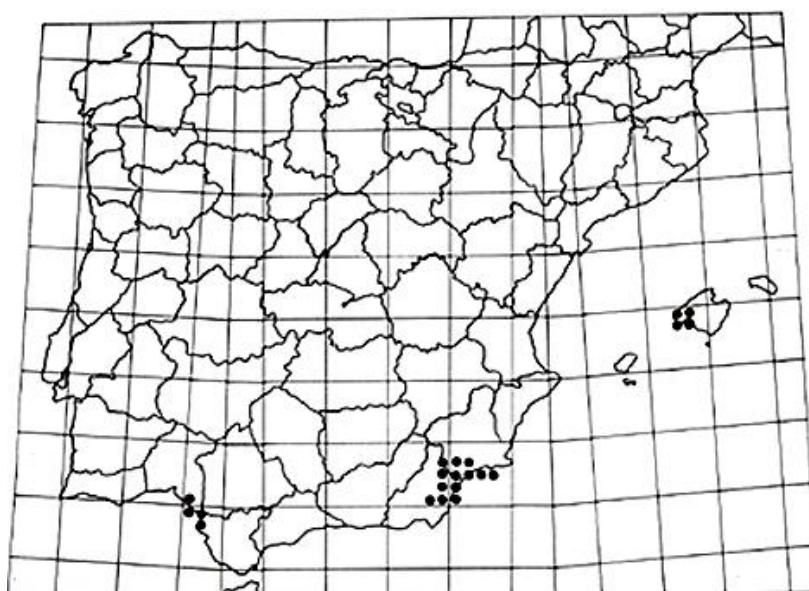


Figura 5. Distribución de la tortuga mora en España (Díaz-Paniagua y Andreu, 2005).

Tiene un tamaño pequeño (hasta 20 cm. de longitud), es menos abombada dorsalmente que las otras subespecies, su cabeza es de color oscuro y los extremos de los escudos

marginales posteriores están expandidos hacia fuera. Presenta un espolón córneo en la cara posterior de ambos muslos.

Ocupa una gran variedad de hábitats naturales, en general más despejados que la tortuga mediterránea, con un clima entre semiárido y árido, con una pluviosidad anual entre 200 y 500 mm.

Su estatus de protección es de vulnerable según la IUCN y también está incluida en el apéndice II del CITES (Van Dijk *et al.*, 2014).

2.1.2. Datos biológicos de las dos especies objeto de estudio

La tortuga mediterránea es una especie fundamentalmente herbívora: su dieta está compuesta en un 90% por especies de la Subfamilia *Apilioninae* (Familia *Leguminosidae*). En el sur de España se la ha observado alimentándose de los frutos de la chumbera (Género *Opuntia*), entre otros. En la Península Ibérica se mantiene activa desde marzo a noviembre (210 días al año), con máximos de actividad en abril y mayo, descendiendo en verano e incrementándose en septiembre.

El número de huevos suele estar entre 2 y 12, con dos a tres puestas anuales. El período de incubación dura unos tres meses. La determinación del sexo de los embriones muestra mayores porcentajes de hembras para temperaturas cercanas al límite superior del rango de temperaturas de incubación, y mayor de machos para valores cercanos al mínimo. Las tortugas recién eclosionadas están expuestas a enemigos naturales como las aves rapaces, córvidos, ratas, zorros y mustélidos. Los adultos pueden ser depredados por aves rapaces, ratas y pequeños carnívoros (además de perros).

La tortuga mora es una especie eminentemente vegetariana, aunque ocasionalmente puede consumir pequeñas cantidades de material animal, como son carroñas de vertebrados o insectos, sobre todo escarabajos (Géneros *Chrysomelidae* y *Curculionidae*). Las familias de plantas más consumidas son: Compuestas, Leguminosas,

Gramíneas, Pligonáceas, Liliáceas, Cariofiláceas y Ranunculáceas. En Murcia consumen los frutos del algarrobo y de las chumberas.

Las tortugas moras están activas principalmente en los días sin lluvia, con máximas térmicas entre 20-30°C y mínimas de 6,5-15°C. En el Parque Nacional de Doñana se han señalado dos períodos sin actividad: de julio a septiembre y de noviembre a febrero, mientras que la máxima actividad se produce entre finales de febrero y marzo.

El número de huevos por puesta oscila entre 1 y 7. El período de incubación se sitúa en torno a los cuatro meses y la eclosión de los huevos se produce en septiembre u octubre. Las temperaturas de incubación (dentro del rango para la especie) superiores a los 31°C determinan un mayor porcentaje de hembras, y por debajo de los 30°C, de machos.

2.1.3. Aspectos sanitarios aplicados a la conservación de las tortugas terrestres ibéricas

Hasta la década de los 70 del pasado siglo el estudio de las tortugas terrestres mediterráneas se circunscribía a trabajos relacionados con su fisiología en cuanto que poiquiloterms y su comparación con los trabajos realizados en mamíferos. Los primeros trabajos sobre hematología de las tortugas hacían únicamente referencia a la estructura de los diferentes elementos constituyentes de la sangre, comparándolos generalmente a los de los mamíferos. La mayoría de los trabajos se realizaban en unos pocos ejemplares cautivos ya que las tortugas terrestres eran consideradas animales de compañía más que especies de vida libre propiamente dicha. Se realizaron diversas monografías contemplando especies por separado, con descripciones de las diferentes células circulantes, observaciones referentes a los parásitos hemáticos, variaciones fisiológicas, hematopoyesis, etc. (Saint Girons, 1970, Lawrence, 1987).

Durante la década de los 80, a raíz de la aparición de los primeros brotes del llamado "*Running Nose Syndrome*" en Europa y de la "*Desert Tortoise Upper Respiratory Tract*

Disease” en Estados Unidos (Jacobson, 1994), surgió un masivo interés por el estudio de todos los diferentes campos que abarca la patología de los quelonios, incluida la biopatología.

Las tortugas terrestres mediterráneas, gracias a convenios nacionales y leyes internacionales, vieron cambiado su estatus de protección, pasando de ser consideradas mascotas a ser especies salvajes en peligro de extinción. A las causas de origen antropomórfico directo de rarefacción de las especies (recolección, incendios, destrucción y fragmentación del hábitat), había que sumar las causas infecciosas y parasitarias, en algunos casos también de origen antropomórfico por la realización de translocaciones, liberaciones por parte de particulares y mezcla de especies de diferentes orígenes en los centros de rehabilitación y de cría en cautividad (Andreani *et al.*, 2014).

La gestión de las especies amenazadas ha justificado que se invierta mucho más en investigación sobre patología de estas especies para evitar desastres ecológicos y prevenir extinciones localmente masivas (Marcus, 1971, Jacobson, 1994). Sin embargo, la descripción de enfermedades en la fauna reptiliana autóctona europea es un aspecto todavía poco contemplado en la bibliografía sobre conservación (Merchán y Martínez-Silvestre, 1999).

Una buena cuarentena y un estricto control sanitario de las tortugas terrestres recién adquiridas o llegadas a una instalación son la base para prevenir la aparición de brotes graves de enfermedad (Jacobson, 1994, Martínez-Silvestre y Soler, 1997). Complementariamente, la realización de necropsias de todos los animales que mueren en un grupo de reptiles cautivos permitirá el diagnóstico de enfermedades infecciosas que pueden afectar gravemente (Keymer, 1978, Redrobe, 1997). Los cultivos microbiológicos a partir de muestras obtenidas de animales muertos y vivos son también una herramienta imprescindible para conocer el alcance de la enfermedad, el agente causante y establecer un pronóstico (Needham, 1986, Orós *et al.*, 1996, Rosenthal y Mader, 1996). Finalmente, cabe destacar que en algunas enfermedades infecciosas, la eutanasia es el único método efectivo para su control (Pritchard, 1996).

2.2. HEMATOLOGÍA Y BIOQUÍMICA SANGUÍNEA DE LAS TORTUGAS TERRESTRES

Los parámetros hematológicos y bioquímicos sanguíneos son un aliado valioso e imprescindible en la evaluación del estado sanitario de los quelonios, ya que estas especies apenas presentan signos clínicos aparentes de enfermedad y son difíciles de explorar debido a la presencia del caparazón. Además, son animales altamente sensibles a los cambios climáticos y de su hábitat (Jacobson *et al.*, 1991, Raphael *et al.*, 1994, Dickinson *et al.*, 2002, Andreani *et al.*, 2014).

La obtención de unos valores de referencia para cada especie de tortuga precisa la estandarización de los métodos de obtención de las muestras, los cuales nos van a ser útiles tanto en la clínica de animales exóticos como en el manejo de poblaciones salvajes cautivas o en libertad (Muro *et al.*, 1994, Raphael *et al.*, 1994). De esta manera se garantiza la fiabilidad de los datos obtenidos y su comparación.

Al igual que para el resto de especies, para la interpretación de los valores hematológicos y bioquímicos sanguíneos obtenidos hay que tener en cuenta los factores intrínsecos, como la especie, sexo, edad, estado fisiológico y los factores extrínsecos, como la estación del año, temperatura, hábitat, dieta, estrés y método de obtención de la muestra (Lawrence y Hawkey, 1986, Gottdentker y Jacobson, 1995, Andreani *et al.*, 2014).

2.2.1. Obtención de muestras de sangre

La punción sanguínea no es fácil en los quelonios y existen diferentes opciones que presentan ventajas e inconvenientes.

Vena coccígea dorsal

Este vaso discurre a lo largo de la cara medio dorsal de los cuerpos de las vértebras caudales, protegido en parte por las apófisis espinosas dorsales. Para algunos autores es la vena de elección para las tortugas, especialmente para las pertenecientes al Género *Testudo* (Samour *et al.*, 1984, Marks y Citino, 1990, Göbel y Spörle, 1991, Jacobson,

1991, Muro *et al.*, 1994, Troiano y Silva, 1998, Murray, 2000, Knotkova *et al.*, 2002, Scope *et al.*, 2013) e incluso para algunas especies acuáticas (Oliveira-Júnior *et al.*, 2008). Se accede a ella a través de la línea media dorsal de la cola (Redrobe y McDonald, 1990). Se debe puncionar entre dos escamas, dándole a la aguja una orientación craneal y un ángulo no superior a 45° con respecto a la piel.

Debido a la presencia de vasos linfáticos discurrendo de forma paralela a esta vena, existe el riesgo de hemodilución, la cual se aprecia inmediatamente al inicio de la extracción por la entrada de un líquido semitransparente seguido de la sangre (López-Olvera *et al.*, 2003). En el caso de que esto ocurra los cambios observados serán: disminución de los valores del recuento de glóbulos rojos, valor hematocrito, concentración de hemoglobina, proteínas totales, ácido úrico, AST, ALP, calcio y fósforo. Por contra, hay un incremento en los valores del sodio (Gottdenker y Jacobson, 1995). Esta vía puede presentar una variabilidad del 20% para los parámetros hematológicos, excepto para el cloro (López-Olvera *et al.*, 2003).

Vena yugular

El acceso a esta vena es idéntico al que se realiza en los mamíferos. Debido a su mayor calibre, es preferible utilizar la vena yugular derecha (Gottdenker y Jacobson, 1995, Jenkins, 1996, Lloyd y Morris, 1999, Dickinson *et al.*, 2002, Yang *et al.*, 2014). Esta vena discurre en las tortugas a lo largo de la cara lateral del cuello. No es visible y por ello, su abordaje se realiza a ciegas, dirigiendo la aguja caudalmente a lo largo de una línea que discurre detrás del tímpano, con el cuello estirado el animal, mantenido en decúbito lateral. Una de las ventajas de la venipunción yugular es que se disminuyen las posibilidades de que la muestra se contamine con linfa, debido al tamaño de los vasos (Nardini *et al.*, 2013, Andreani *et al.*, 2014).

Arteria carótida

Presenta las mismas ventajas que la vena yugular, pero la desventaja es su más difícil acceso al ser más profunda respecto a la yugular (Oyewale *et al.*, 1998).

Espacio subcarapacial

Este espacio se halla localizado en el punto de unión entre las vértebras cervicales y los escudos cervicales del caparazón y está constituido por la unión de las venas intercostales comunes y la anastomosis cervical caudal de las dos venas yugulares. Esta ruta, aunque ciega, es particularmente útil en tortugas de pequeño tamaño y en aquellas cuya inmovilización resulta complicada. La contaminación linfática raramente ocurre (Hernández-Divers *et al.*, 2002, Hernández-Divers, 2006). Recientemente se ha cuestionado su uso debido a la aparición de paresia (temporal o permanente) de la cola y extremidades anteriores y/o posteriores (Innis *et al.*, 2010) tras el empleo de esta vía.

Vena braquial

La punción de esta vena también es ciega por lo que la muestra puede resultar contaminada por linfa debido al desarrollo de los vasos linfáticos de las extremidades anteriores en las tortugas (Ottaviani y Tazzi, 1977, Rosskopf, 1982, Avery y Vitt, 1984). Ha sido sugerida como vía de elección en la tortuga marginada (*Testudo marginata*), en la tortuga Birmana de montaña (*Manouira emys*) y en la tortuga radiada (*Geochelone radiata*) (Marks y Citino, 1990, Abu-Madi y Jacobson, 2003, López-Olvera *et al.*, 2003, Zaias *et al.*, 2006).

Plexo venoso postoccipital

Aunque utilizada inicialmente en las tortugas marinas y en las tortugas de agua dulce (Gottdenker y Jacobson, 1995, Hidalgo-Vila *et al.*, 2007), también se recomienda actualmente en las tortugas del Género *Testudo* (Andreani *et al.*, 2014). La muestra sanguínea se obtiene fácilmente a partir del plexo venoso que se localiza dorsalmente a las vértebras cervicales e inmediatamente posterior a la protuberancia occipital del cráneo. En las tortugas marinas, el seno venoso cervical dorsal que se origina a partir del plexo venoso postoccipital es el sitio de elección para la obtención de las muestras sanguíneas (Owens y Ruiz, 1980).

Vena coccígea lateral

Esta vena no se suele utilizar ya que fácilmente tiende a la hemodilución de la muestra por contaminación linfática (López-Olvera *et al.*, 2003).

Plexo venoso femoral, seno orbital y corte de uña

Estos vasos o métodos de obtención de sangre no se utilizan en la actualidad debido a la dificultad de acceso o debido a aspectos éticos, en el caso del corte de uña (Strik *et al.*, 2007).

El volumen de sangre en los reptiles representa entre un 5-8% de su peso total, en ml. Las muestras sanguíneas obtenidas nunca deben sobrepasar el 1% del peso total (Jacobson, 1993a), siendo recomendable el 0,5% del peso total vivo (Andreani *et al.*, 2014).

2.2.2. Anticoagulantes

El estudio del frotis sanguíneo debería realizarse a partir de la sangre obtenida sin anticoagulante, al igual que la determinación de los parámetros hematológicos (Campbell, 1996). Sin embargo, la dificultad en la obtención de la muestra en las tortugas, tanto por ser animales con vasos sanguíneos de difícil acceso, como por el hecho de no ser cooperativos, provoca que en la mayoría de las ocasiones la recogida sanguínea se realice con el uso de anticoagulantes. Hasta la fecha, los anticoagulantes utilizados en hematología de las tortugas han sido la heparina de litio y de sodio, la sal sódica o potásica del ácido etilén diamino tetra acético (EDTA) y el citrato sódico. El citrato se desaconseja debido a que provoca cristalización de la hemoglobina y altera la morfología de los eritrocitos y su número, al producir hemólisis (Frye, 1991).

El EDTA puede causar lisis de los eritrocitos en algunas especies de reptiles, especialmente en los quelonios (Campbell y Ellis, 2007, Knotkova *et al.*, 2002). La heparina, tanto de litio como de sodio, en una concentración de 1-3 mg/dl se considera una buena elección para su uso como anticoagulante en los reptiles (Frye, 1991). No se han observado diferencias significativas entre el uso de las dos sales (Bolten *et al.*, 1992). Los inconvenientes del uso de la heparina 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 (Hawkey y Dennet, 1989). Por ello, si se utiliza en

estudios de hematología de reptiles, la sangre se debe de procesar de inmediato para disminuir sus efectos en las células (Campbell, 2006).

La hemólisis debe evitarse siempre que sea posible puesto que, al igual que ocurre en otras especies, se han descrito alteraciones importantes en los recuentos celulares y en los parámetros bioquímicos (Benson *et al.*, 1999). La temperatura y la duración del almacenaje también pueden provocar alteraciones como son el incremento del potasio y la disminución del sodio, por ello se aconseja mantener las muestras a 4° C y proceder tan rápido como sea posible a la separación del suero o plasma del componente celular (Abou-Madi y Jacobson, 2003).

2.2.3. Hemograma

Si bien las técnicas básicas utilizadas en hematología de mamíferos también se aplican a las tortugas, la presencia de eritrocitos y trombocitos nucleados exigen algunas modificaciones. Asimismo, la morfología y la fragilidad osmótica de las células hemáticas de las tortugas varía en relación a la de los mamíferos (Troiano *et al.*, 2000).

ERITROCITOS

Recuento total

Se puede determinar por cualquiera de los métodos de recuento manual utilizando la cámara hemocitométrica de Newbauer o de Newbauer modificada, con la solución de Natt y Herrick (Natt y Herrick, 1952) como diluyente, o bien empleando el sistema Unopette (Becton-Dickinson, Ruthenford, New Jersey, USA). Este último sistema es más sencillo de realizar y más exacto, puesto que evita el error de dilución (1:200) al utilizar el diluyente, el capilar y el vial proporcionado por el fabricante.

La solución de Natt y Herrick es una tinción basada en metil-violeta y se utiliza como una combinación de diluyente y tinción. Este método exige la preparación de la solución en primer lugar y el uso de una pipeta de dilución de glóbulos rojos. La dilución de la sangre también es 1:200 y se consigue llenando la pipeta hasta la marca 0.5 con la sangre y

después aspirando el diluyente hasta la marca 101. En ambos métodos, una gota de la muestra de sangre diluida se ha de colocar en una cámara de recuento y permitir que sedimente al menos durante cinco minutos, antes de realizar el recuento. Se han de contar los cuatro cuadrados de las esquinas y el central, de la cuadrícula central de la cámara. El número total de eritrocitos se calcula multiplicando el número de eritrocitos contados por 10.000.

Needham (1981), recomienda el uso de las técnicas desarrolladas para peces (Hawkins y Mawdesley-Thomas, 1972) o aves (Hodges, 1977) en el recuento de eritrocitos, leucocitos, valor hematocrito y determinación de la concentración de hemoglobina.

El número de eritrocitos en sangre periférica de las tortugas es inferior al de los mamíferos y aves, siendo el recuento total en los saurios superior al de los ofidios y quelonios (Sypek y Borysenko, 1988, Duguy, 1970). Este hallazgo indica una mayor capacidad en el transporte del oxígeno por parte de la sangre de aves y mamíferos, comparada con los animales ectotermos como son las tortugas (Hawkey *et al.*, 1991). En general, los valores de referencia para los recuentos eritrocitarios en las tortugas oscilan desde 500.000 hasta 3.000.000 células/ μL , dependiendo de las especie (Duguy, 1970, Mitruka y Rawnsley, 1981, Rosskopf, 1982, Taylor y Jacobson, 1982, Samour y Hawley, 1986, Jacobson, 1988, Jackson, 1991, Frye, 1994, Crawshaw, 1996, Raskin, 2000, Campbell, 2006) y del lugar de punción (López-Olvera *et al.*, 2003).

El recuento total de eritrocitos de los reptiles varía con las condiciones ambientales, el estado nutricional, el sexo (los machos de algunas especies tienen mayor número que las hembras [Yang *et al.*, 2014]) y la estación (los recuentos de eritrocitos son más altos antes de la hibernación y más bajos justo después) (Duguy, 1970, Saint Girons, 1970, Sypek y Borysenko, 1988, Frye, 1991).

Morfología

Los eritrocitos de las tortugas tienen una forma elíptica, con los extremos redondeados. El citoplasma tiene una textura uniforme y es eosinofílico (anaranjado-rosado) (Knotkova *et al.*, 2002, Andreani *et al.*, 2014). Por lo general, el núcleo, colocado en

posición central, suele ser de forma redonda (Alleman *et al.*, 1992, Garner *et al.*, 1996, Samour *et al.*, 1998), aunque en especies como la tortuga rusa (*Agrionemys horsfieldii*) tiene forma oval y contorno irregular, pareciéndose más a los eritrocitos maduros de las serpientes (Alleman *et al.*, 1999). La cromatina es densa, tiñéndose de púrpura oscura. En ocasiones, puede mostrar divisiones nucleares anómalas, binucleación o actividad mitótica (Hawkey y Dennet, 1989) cuando el animal tiene una respuesta regenerativa marcada ante una anemia, en el momento de salir de la hibernación y cuando los animales presentan una enfermedad inflamatoria importante o malnutrición.

La presencia de formas diversas en la morfología eritrocitaria (poiquilocitosis), raramente se observa en animales sanos; sin embargo, se ha especulado que puede ser frecuente en infecciones crónicas y septicemias (Frye, 1991). Se han descrito también inclusiones eritrocitarias en tortugas acuáticas (Work *et al.*, 1998) y en tortugas terrestres (Alleman *et al.*, 1992). Estas inclusiones pequeñas, únicas, redondeadas y basofílicas no tienen significación clínica conocida, siendo compatibles con organelas degeneradas.

En ocasiones se observan eritrocitos policromáticos o eritrocitos inmaduros. Son células redondas o ligeramente irregulares, con un núcleo redondo grande, que carece de la cromatina densa agregada de la célula adulta, y citoplasma basofílico. Parecen de menor tamaño que el eritrocito maduro, debido probablemente a su forma esférica. Estas células son especialmente frecuentes en animales jóvenes, en animales en período de muda o en aquellos infectados por hemoparásitos. 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 especie (Sypek y Borysenko, 1988, Frye, 1991).

El tamaño de los eritrocitos para la mayoría de las tortugas oscila entre 17.9 x 9.8 μm y 19.9 x 10.9 μm siendo, a excepción del tuatara (Género *Sphenodon*), los mayores dentro de la clase Reptilia (Frye, 1991). El ratio entre la longitud y anchura es de 1.7-2.1 (Saint Girons, 1970, 1991, Knotkova *et al.*, 2002, Tosonoglu *et al.*, 2005).

Valor hematocrito

Se determina mediante el método estándar del microhematocrito, con una centrifugación a 12000 G, durante 5 minutos. El valor hematocrito normal de las mayoría de las tortugas varía entre el 15 y el 37% (Duguy, 1970, Mitruka y Rawnsley, 1981, Rosskopf, 1982, Taylor y Jacobson, 1982, Wallach y Boever, 1983, Samour y Hawkey, 1986, Jacobson, 1988, Marks y Citino, 1990, Jackson, 1991, Frye, 1991, 1994, Crawshaw, 1996, Raskin, 2000, Campbell, 2006, Diethelm y Stein, 2006, Strik *et al.*, 2007, Mathes *et al.*, 2008, Andreani *et al.*, 2014). Los valores superiores al 50% indican una 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. El color del plasma debe ser claro o ligeramente amarillo, debido a los pigmentos de la dieta de las tortugas (Campbell, 2004).

Concentración de la hemoglobina

Se determina utilizando el método de la cinaometahemoglobina, tras una eliminación correcta de los núcleos libres de los glóbulos rojos por centrifugación previa a la lectura, puesto que su presencia puede elevar de forma errónea el valor medio. La concentración de hemoglobina de muchas especies de tortugas varía entre los 4 y los 11 g/dl (Duguy, 1970, Mitruka y Rawnsley, 1981, Rosskopf, 1982, Taylor y Jacobson, 1982, Wallach y Boever, 1983, Samour y Hawkey, 1986, Jacobson, 1988, Marks y Citino, 1990, Jackson, 1991, Frye, 1991, 1994, Crawshaw, 1996, Raskin, 2000, 2008, Frischie *et al.*, 2001, Seidel, 2003, Campbell, 2006, Diethelm y Stein, 2006, Strik *et al.*, 2007, Mathes *et al.*, 2008). En las tortugas terrestres mediterráneas los valores son con frecuencia inferiores a 7 g/dl (Jacobson, 1988, Jackson, 1991, Frye, 1994, López-Olvera *et al.*, 2003).

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 recuento total de eritrocitos.

El VCM es un índice del tamaño del eritrocito. Los eritrocitos maduros de los reptiles tienen un tamaño superior al de las aves, peces y mamíferos, aunque son más pequeños que los de la mayoría de anfibios. Los datos publicados para tortugas varían entre 71 a 1000 fl (Diethelm y Stein, 2006), siendo para la mayoría de las tortugas mediterráneas entre 300 y 600 fl (Jacobson, 1988, Jackson, 1991, Frye, 1994, López-Olvera *et al.*, 2003, Tosunoglu *et al.*, 2005). Existe una relación inversa entre el tamaño de los eritrocitos y el número total de células circulantes, de manera que a medida que se incrementa el VCM descende el número de eritrocitos circulantes (Duguy, 1970, Sypek y Borysenko, 1988).

La CCMH es un índice que informa de la cantidad de hemoglobina (g) que contienen 100 ml de eritrocitos; en las tortugas el intervalo oscila entre 19 y 40 g/dl (Duguy, 1970, Mitruka y Rawnsley, 1981, Rosskopf, 1982, Taylor y Jacobson, 1982, Wallach y Boever, 1983, Samour y Hawkey, 1986, Marks y Citino, 1990, Frye, 1991, Crawshaw, 1996, Raskin, 2000, 2008, Frische *et al.*, 2001, Seidel, 2003, Campbell, 2006, Diethelm y Stein, 2006, Strik *et al.*, 2007), siendo para las tortugas terrestres mediterráneas de 27 a 40 g/dl (Jacobson, 1988, Jackson, 1991, Frye, 1994, López-Olvera *et al.*, 2003, Tosunoglu *et al.*, 2005).

La hemoglobina corpuscular media (HCM) oscila en las tortugas entre 82 y 163 pg (Duguy, 1970, Mitruka y Rawnsley, 1981, Rosskopf, 1982, Taylor y Jacobson, 1982, Wallach y Boever, 1983, Samour y Hawley, 1986, Marks y Citino, 1990, Frye, 1991, Crawshaw, 1996, Raskin, 2000, 2008, Frische *et al.*, 2001, Seidel, 2003, Campbell, 2006, Diethelm y Stein, 2006, Strik *et al.*, 2007), siendo para las tortugas terrestres mediterráneas entre 82 y 147 pg (Jacobson, 1988, Jackson, 1991, Frye, 1994, López-Olvera *et al.*, 2003, Tosunoglu *et al.*, 2005).

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 (Sheeler y Barber, 1965). 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 en tamaño que sus eritrocitos adultos.

Variaciones de la serie roja

Establecer los intervalos de referencia para el recuento total de eritrocitos, hemoglobina y valor hematocrito en las tortugas no es fácil, puesto que se pueden producir diferentes adaptaciones fisiológicas, en respuesta a factores tanto intrínsecos como extrínsecos. Entre los primeros hay que incluir la especie, el sexo, la edad y el estado fisiológico de la tortuga. Entre los factores extrínsecos hay que tener en cuenta la estación, la temperatura, el hábitat, la dieta, la enfermedad, el estrés asociado a la cautividad y el lugar en el que se haya realizado la venipunción (Duguy, 1970, Saint Girons, 1970, Lawrence y Hawkey, 1986, Sypek y Borysenko, 1988, Frye, 1991, Gottdenker y Jacobson, 1995, Christopher *et al.*, 1999, López-Olvera *et al.*, 2003, Wilkinson, 2004).

En algunas especies de tortugas, la disparidad en los valores eritrocitarios se puede relacionar con el sexo, ya que los machos presentan valores superiores a los de las hembras (Anderson *et al.*, 1997, Oyewale *et al.*, 1998, Hidalgo-Vila *et al.*, 2007, Yang *et al.*, 2014). Andreani *et al.* (2014) citan para la tortuga mediterránea, valores del hematocrito y concentración de hemoglobina superiores en los machos, debido a la supuesta actividad de la testosterona, al igual que ocurre en la tortuga del desierto americana (*Gopherus agassizii*) (Oyewale *et al.*, 1998). Sin embargo, no siempre se encuentran diferencias significativas en todas las especies, con respecto a este parámetro (Taylor y Jacobson, 1982, Bolten y Bjorndal, 1992, Mayer *et al.*, 2005).

Los cambios estacionales, la condición física y la edad pueden afectar a los parámetros hematológicos de las tortugas. En algunas especies de tortugas, la hibernación provoca cambios en los valores eritrocitarios (Kaplan y Rueff, 1960) y así de forma general, los valores son más altos antes de la hibernación y más bajos inmediatamente después. En la tortuga de caja china (*Cuora flavomarginata*) se ha descrito un máximo de valores para estos parámetros durante el verano con un descenso para el invierno, siendo más acusado el contraste en las hembras (Yang *et al.*, 2014). Por el contrario, Dickinson *et al.* (2002), describieron incrementos en el valor hematocito y concentración de

hemoglobina durante la hibernación y durante los períodos secos en las tortugas del desierto, al igual que ocurre en la tortuga terrestre argentina (*Chelonoidis chilensis chilensis*) (Troiano y Silva, 1998) durante su hibernación. En la tortuga pintada (*Chrysemys picta*) se ha estudiado la influencia de las temperaturas frías y la inmersión bajo el agua en la hemoglobina, observándose que cuando los animales se mantenían a temperaturas bajas, equivalentes a las del invierno, la hemoglobina mostraba una desviación significativamente a la derecha y 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 (Maginniss *et al.*, 1983, Maginniss y Hitzig, 1987, Rucknagel y Braunitzer, 1988).

Los agentes estresantes crónicos (como la cautividad o sobrepoblación), el hábitat o la dieta inapropiada, afectan al hemograma, al igual que lo hacen, los agentes estresantes agudos como la captura, el manejo y la sujeción para realizar la venipunción (Wilkinson, 2004).

Las infecciones víricas han sido documentadas como causa moderada o grave de anemia (Herbst *et al.*, 2004) así como la exposición a ciertos tóxicos (Keller *et al.*, 2004). Otras causas descritas de anemia son las enfermedades renales y hepáticas crónicas, las neoplasias y el hipotiroidismo (Campbell, 2003).

El lugar donde se realiza la venipunción y el método de recogida pueden afectar al hemograma. Los vasos linfáticos de las tortugas acompañan a los vasos sanguíneos de la región caudal y en las extremidades posteriores, lo que produce con frecuencia una mezcla de sangre y linfa durante la extracción (Ottaviani y Tazzi, 1977, Crawshaw, 1996, López-Olvera *et al.*, 2003). La dilución subsiguiente de la muestra de sangre, afectará los resultados del hemograma, disminuyendo el hematocrito, la concentración de hemoglobina y el número total de eritrocitos y leucocitos (Gottdenker y Jacobson, 1995, López-Olvera *et al.*, 2003, Heard *et al.*, 2004).

LEUCOCITOS

Recuento total

La presencia de eritrocitos y trombocitos nucleados en la sangre de las tortugas impide el uso de contadores automatizados. Por lo tanto, el recuento total de leucocitos debe realizarse mediante métodos manuales directos, usando como diluyente la solución de Natt y Herrick (Costello, 1970, Robertson y Maxwell, 1990) y las cámaras hemocitométricas de Newbauer, la de Newbauer modificada o métodos semidirectos usando la floxina B como diluyente.

Aunque la precisión de los métodos directos es inferior a la deseable no dejan de ser relativamente prácticos y precisos, siempre y cuando se complementen con la estimación total del recuento de leucocitos a partir del frotis sanguíneo. La ventaja de la utilización de la solución de Natt y Herrick es que puede ser usada en el recuento total de eritrocitos, leucocitos y trombocitos. La desventaja recae en la dificultad de diferenciación de los linfocitos de los trombocitos y de los eritrocitos inmaduros. Por ello se considera el método de elección en aquellas especies que poseen un mayor número de linfocitos que de heterófilos. 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 (Wilkinson, 2004); 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. Otra de las desventajas de este método es la utilización de las pipetas de dilución manuales.

El método indirecto de recuento con una solución de floxina B (Eosinophil Unopette 5877, Becton Dickinson, Rutherford, New Jersey, USA) se emplea en especies con mayor número de heterófilos y eosinófilos, como las iguanas y algunas especies de tortugas (Campbell y Ellis, 2007, Strick *et al.*, 2007). Tiene como ventaja la facilidad de uso de viales y capilares, disponibles comercialmente y la estabilidad de la solución empleada. En un principio, este método se creó para determinar el número de

eosinófilos en la sangre de los mamíferos (Costello, 1970). En este método, el recuento diferencial leucocitario se utiliza para calcular el recuento total de leucocitos.

También, y de forma aproximada, 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 de 40 aumentos en 10 campos; el valor medio se multiplica por 1000 y se obtiene una estimación del número de leucocitos/ μL (Mader, 2000). Esta estimación permite además confirmar la exactitud del recuento leucocitario realizado de forma manual.

Los valores normales en el recuento de leucocitos en tortugas terrestres oscilan entre 2000 y 18000 cel / μL (Mader, 1996).

Recuento diferencial leucocitario

Se realiza sobre extensiones de sangre secadas al aire y teñidas. Las tinciones utilizadas normalmente son las de tipo Romanowsky, como la de Wright, Giemsa, Wright-Giemsa, Wright-Leishman o May-Grünwald; consumen más tiempo pero proporcionan una mejor diferenciación de los leucocitos, trombocitos y eritrocitos inmaduros (Alleman *et al.*, 1992, Muro *et al.*, 1994, Campbell, 1996, Leblanc *et al.*, 2000).

En las clínicas veterinarias, por su sencillez, se utilizan las tinciones rápidas (por ejemplo, Diff-Quick, panóptico rápido) que emplean una solución fijadora (metanol), una solución ácida (eosina) y una solución básica (azul de metileno). 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 (Muro *et al.*, 1994).

Independientemente de la tinción utilizada, la extensión de sangre debe realizarse inmediatamente después de la extracción para evitar la presencia de artefactos como las alteraciones en la morfología de los leucocitos y trombocitos, los cambios en las propiedades tintoriales de los leucocitos, la vacuolización de los monocitos o el aumento del tamaño de los linfocitos (Campbell, 1996, 1998).

Los diferentes tipos celulares leucocitarios que pueden identificarse en estas tinciones son los siguientes: granulocitos acidófilos (heterófilos y eosinófilos), granulocitos basofílicos (basófilos) y agranulocitos (monocitos, linfocitos y azurófilos).

Heterófilo

A nivel funcional, es la célula equivalente al neutrófilo de los mamíferos y tiene una enorme variación morfológica en las distintas especies de tortugas (Campbell, 1996). Son células redondeadas, grandes, y aunque el número y la forma de los gránulos varía con la especie, por lo general, tiene los gránulos citoplasmáticos refráctiles fusiformes, que se tiñen de color naranja brillante con las tinciones tipo Romanowsky. En una misma célula pueden aparecer gránulos opacos y refringentes. El núcleo es excéntrico, de forma redondeada a oval, con una cromatina densamente agregada (Mateo *et al.*, 1984, Alleman *et al.*, 1992, Dotson *et al.*, 1995, Campbell, 2006, Andreani *et al.*, 2014). El tamaño de los gránulos varía según la especie (10-23 μm) (Saint Girons, 1970).

El número de heterófilos en el leucograma de las tortugas sanas varía con la especie, pudiendo representar hasta más del 40% del recuento diferencial en algunas de ellas (Duguy, 1970, Sypek y Borysenko, 1988, Marks y Citino, 1990, Jacobson *et al.*, 1990, Wright y Skeba, 1992, Hidalgo-Vila *et al.*, 2007, Andreani *et al.*, 2014). Su número en reptiles y otros ectodermos viene influido también por factores estacionales, presentándose los valores más altos en el verano y los más bajos durante la hibernación (Duguy, 1970).

Los heterófilos, son principalmente células fagocitarias y por tanto, el incremento en su recuento se asocia con enfermedades inflamatorias, especialmente infecciosas, parasitarias o que supongan daño tisular (Duguy, 1970, Mateo *et al.*, 1984, Montali, 1988, Sypek y Borysenko, 1988, Azevedo y Lunardi, 2003). Las causas no inflamatorias de la heterofilia son el estrés (por aumento de los glucocorticoides) y la presencia de neoplasias.

En sangre circulante pueden aparecer heterófilos anómalos, entre los que se incluyen heterófilos inmaduros y células tóxicas. Los primeros (normalmente mielocitos y metamielocitos), aparecen en la sangre de animales que tienen ciertas patologías 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 es a la izquierda, es indicativa de una sobredemanda ante una respuesta inflamatoria asociada, probablemente, con una etiología infecciosa (Campbell y Ellis, 2007).

La presencia de heterófilos tóxicos denota una enfermedad inflamatoria asociada a la presencia de agentes infecciosos. Dependiendo del grado de toxicidad se clasifican en una escala del +1 al +4: +1, indica la presencia de una célula con aumento de basofilia citoplasmática; +2, indica además del hecho anterior, una ligera granulación anormal (degranulación parcial, gránulos con tendencia a fusionarse o gránulos anómalos) o vacuolización; +3, indica cambios en la célula más graves a los anteriores, pudiendo mostrar el núcleo 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 tortugas que normalmente no la poseen, indica un proceso inflamatorio grave (Campbell, 2006). En los Órdenes *Squamata* y *Cocodrilia* se pueden observar heterófilos degranulados. Este fenómeno puede ser un artefacto del manejo de la muestra, del almacenaje prolongado mediante el uso de anticoagulantes, de una fijación inadecuada o bien ser parte del proceso de envejecimiento normal de estas células (Alleman *et al.*, 1992).

Eosinófilos

Los eosinófilos de las tortugas son células grandes (11-17 μm), redondas, con gránulos citoplasmáticos esféricos eosinofílicos. El núcleo tiene una forma variable, desde redondo a ligeramente alargado; en algunas especies de tortugas puede ser lobulado. Su tamaño varía con la especie (Saint Girons, 1970).

Por lo que respecta a su número, también varía con la especie y los cambios estacionales. En general, las tortugas tienen un gran número de eosinófilos circulantes, pudiendo representar hasta el 20% de los leucocitos (Duguy, 1970, Sypek y Borisenko, 1988, Marks y Citino, 1990, Jacobson *et al.*, 1990, Wright y Skeba, 1992, Hidalgo-Vila *et al.*, 2007). En algunas especies, el recuento de eosinófilos es normalmente más elevado en invierno, durante la hibernación (Duguy, 1970). Su disminución se ha relacionado con la estivación. Se ha descrito una variación ligada al sexo en la tortuga amarilla china (*Cuora flavomarginata*), presentado los machos valores superiores a los de las hembras (Yang *et al.*, 2014). Los eosinófilos pueden estar asociados con infecciones parasitarias y la estimulación del sistema inmune (Mead y Borysenko, 1984).

Basófilos

Son normalmente células redondas, pequeñas, que contiene un número variable de gránulos citoplasmáticos metacromáticos basofílicos, que enmascaran con frecuencia el núcleo. Cuando éste es visible no tiene lóbulos. 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 especie: los lagartos tienen basófilos pequeños y los quelonios y cocodrilos tienen basófilos más grandes (Saint Girons, 1970).

Su función es probablemente similar a la de los basófilos de los mamíferos. El número de estas células, normalmente bajo (Hidalgo-Vila *et al.*, 2007), varía con la especie. Sin embargo, en algunas especies de quelonios como la tortuga del desierto pueden constituir hasta el 40% de los leucocitos (Duguy, 1970, Sypek y Borysendko, 1988, Marks y Citino, 1990, Jacobson *et al.*, 1990), si bien la razón de este hecho se desconoce (Mead *et al.*, 1983, Syperk *et al.*, 1984). El número de basófilos en las tortugas no parece variar de forma significativa con los cambios estacionales, como ocurre con otros granulocitos (Saint Girons, 1970). Pequeñas disminuciones en su número se han descrito en las tortugas del desierto durante la hibernación (Christopher *et al.*, 1999). Su incremento se ha relacionado con la presencia de infecciones parasitarias (por hemogregarinas y tripanosomiasis) e infecciones virales (Sypek y Borisenko, 1988).

Linfocitos

Los leucocitos mononucleares de los reptiles incluyen los linfocitos y los monocitos. Estas células se asemejan a los mismos tipos celulares encontrados en la sangre periférica de los mamíferos. Los linfocitos son células redondeadas, con citoplasma escaso, de moderado a débilmente basofílico y núcleo también de morfología circular, situado centralmente, con cromatina densamente agregada (Andreani *et al.*, 2014). El citoplasma es homogéneo y generalmente carece de vacuolas y gránulos, aunque en algunos linfocitos se pueden encontrar algunos gránulos citoplasmáticos azurofílicos. Tienen a “amoldarse” alrededor de células adyacentes en la extensión de sangre. Pueden presentar pseudopodia en la periferia celular. Varían en tamaño desde pequeños (5-10 μm) a grandes (15 μm) (Saint Girons, 1970, Sypek y Borysenko, 1988).

Su número en los vertebrados inferiores varía con la especie. En algunas especies de tortugas pueden llegar a superar el 80% del recuento diferencial leucocitario (Sypek y Borysenko, 1988), mientras que en otras su número no llega a representar el 7% del recuento total leucocitario (Hidalgo-Vila *et al.*, 2007). Muchas especies de tortugas sanas tienen un recuento mayor de linfocitos que de heterófilos (Duguay, 1970, Harr *et al.*, 2001). 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 (Duguay, 1970, Sypek y Borysenko, 1988); el estado nutricional (se produce un descenso asociado a la malnutrición) y la enfermedad. Su número disminuye en invierno y es más elevado en el verano (Duguay, 1970, Sypek y Borysenko, 1988). Incluso las tortugas tropicales que no hibernan, muestran un descenso de linfocitos en circulación durante las estaciones más frías (Sypek y Borysenko, 1988).

Los reptiles tienen los dos tipos principales de linfocitos (B y T) involucrados en la función inmunológica, pero a diferencia de los mamíferos y aves, que son especies endotérmicas, la respuesta inmunológica de los reptiles, ectotérmicos, está muy influida por el ambiente; de este modo, las bajas temperaturas pueden suprimir o inhibir la respuesta inmune.

Los linfocitos suelen asociarse a situaciones de cicatrización de heridas, enfermedades inflamatorias e infecciones parasitarias y víricas, mientras que la linfopenia se produce de forma secundaria a la presencia de enfermedades asociadas con la inmunosupresión, el estrés y la malnutrición crónica. 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 antígeno sistémicos (Campbell y Ellis, 2007).

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). La cromatina nuclear es menos condensada y se tiñe de forma más rápida si se compara a la cromatina nuclear de los linfocitos. Su tamaño varía entre 8 y 20 μm (Sypek y Borysenko, 1988). 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 gránulos azurofílicos.

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 (Taylor y Kaplan, 1961, Taylor *et al.*, 1963, Duguy, 1970, Otis, 1973, Wood y Ebanks, 1984, Sypek y Borysenko, 1988, Marks y Citino, 1990, Wright y Skeba, 1992, , Hidalgo-Vila *et al.*, 2007, Andreani *et al.*, 2014). En los quelonios estudiados, la concentración de monocitos cambia poco con la estación, si se compara con otras células sanguíneas (Duguy, 1970). Sólo se ha descrito una variación ligada al sexo, presentando las hembras valores significativamente superiores a los machos (Yang *et al.*, 2014). La monocitosis sugiere la presencia de una enfermedad inflamatoria, especialmente de tipo granulomatosos (Work y Balazs, 1999, Cuadrado *et al.*, 2002, Campbell, 2004). En lagartos parasitados por *Karyolysus* sp. y en serpientes parasitadas por *Hepatozoon* sp. (Salakij *et al.*, 2002, Martínez-Silvestre *et al.*, 2001) se han descrito incrementos significativos en las cifras de monocitos (azurófilos), posiblemente relacionados con la respuesta inflamatoria frente a los parásitos.

Con frecuencia, los monocitos en sangre periférica muestran actividad fagocitaria. La eritro y leucofagocitosis por parte de estas células se puede asociar con anemia y la presencia de enfermedades infecciosas (Campbell y Ellis, 2007).

Azurófilos

Históricamente, la identificación y la clasificación de estas células ha estado rodeada de confusión. Se describieron por primera vez en la literatura científica hace aproximadamente un siglo. Pappenheim, en 1909, las denominó “granulocitos azurofílicos”. Inicialmente se describió como una célula de forma irregular, ligeramente más pequeña que el monocito (Frye, 1991). El núcleo no está segmentado y es de forma irregular (de oval a redondo). 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 azurofílicos mate, de varios tamaños (Garner *et al.*, 1996). En el citoplasma de estas células puede aparecer vacuolización y material fagocitado.

Esta célula es más común en el suborden de los ofidios que en los saurios o cocodrilianos (Campbell, 1996, Roskopf, 2000, Campbell y Ellis, 2007) y tan sólo se ve ocasionalmente en los quelonios (Wilkinson, 2004, Andreani *et al.*, 2014). En la literatura científica, esta célula ha sido clasificada en varias ocasiones como granulocito, neutrófilo o monocito (Frye, 1986, Alleman *et al.*, 1992, Garner *et al.*, 1996). Es una célula controvertida y de difícil clasificación, puesto que comparte rasgos morfológicos con el monocito y sin embargo, parece tener gránulos citoplasmáticos (Frye, 1991, Campbell, 1996, Roskopf, 2000). Los monocitos y los azurófilos se han descrito como células del mismo tipo según algunos autores (Le Blanc *et al.*, 2000, Oliveira-Júnior *et al.*, 2008) o de distinto tipo según otros (Ellman, 1997). Los azurófilos presentes en los quelonios se han denominado también neutrófilos (Frye, 1991) o azurófilos neutrofílicos (Wilkinson, 2004). Sin embargo, estas células son semejantes a nivel ultraestructural y citoquímico a los monocitos (Montali, 1988, Sypek y Borysenko, 1988, Hawkey y Dennet, 1989), aunque puede haber diferencias entre especies en las características citoquímicas de estas células. Campbell y Ellis (2007) indican que los azurófilos se deberían considerar como monocitos con gránulos azurofílicos y no como un tipo celular diferente; según estos autores, existe poca ventaja clínica en separar los azurófilos de los monocitos en el

recuento leucocitario diferencial y estas células podrían representar una forma inmadura del monocito.

Según Heard *et al.* (2004), los azurófilos son una población única en los ofidios. Representan una célula fagocítica similar en morfología al monocito, que puede desencadenar un daño oxidativo importante, similar al del neutrófilo en los mamíferos. La clasificación de azurófilo, para estos autores, se debería restringir a aquellas células monocitoides que se tiñen positivamente con la bencidina peroxidasa.

Variaciones de la serie blanca

Establecer los valores de referencia para el recuento total y diferencial leucocitario en los quelonios no es fácil, por las mismas razones expuestas anteriormente, en el apartado de variaciones de la serie roja. Factores intrínsecos como la especie, el sexo, la edad y el estado fisiológico del reptil, afectarán el leucograma, no sólo entre diferentes especies, sino también dentro del mismo Género. En consecuencia, las descripciones realizadas en tortugas del Género *Testudo* se ciñen a estudios hechos con animales mantenidos en cautividad y en condiciones homogéneas (Knotkova *et al.*, 2002, Tosunoglu *et al.*, 2005). Los factores extrínsecos incluyen la estación, la temperatura, el hábitat, la dieta, la enfermedad, el estrés asociado a la cautividad y el lugar de venipunción. El leucograma de la tortuga del desierto en libertad se relaciona con las diferencias estacionales y de pluviometría anual, la disponibilidad de alimento y el estado fisiológico (Dickinson *et al.*, 2002). El estrés, asociado con la cautividad puede afectar el leucograma de algunas especies de reptiles (Salakij *et al.*, 2002). De la misma manera, pueden afectar la enfermedad y las exposiciones a toxinas ambientales o químicas.

Trombocitos

El recuento total de trombocitos se puede realizar del mismo modo al mencionado para los eritrocitos y los leucocitos, utilizando la cámara de Neubauer y el diluyente de Natt y Herrick, preparando una dilución de la sangre 1:200. Su recuento se realiza 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 μl 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 μl (Raskin y Valenciao, 2000). El número de trombocitos presentes en la sangre de reptiles sanos, varía entre 25 y 350 trombocitos por μl (Sypek y Borysenko, 1988).

Los trombocitos son células pequeñas, elípticas o fusiformes que contienen un núcleo oval, localizado centralmente. La cromatina nuclear está muy condensada y se tiñe de color púrpura. El citoplasma no tiene color, hecho importante que los diferencia de los linfocitos pequeños maduros. En las extensiones de sangre, tienden a agregarse lo que hace más fácil su identificación. En algunos de ellos, pueden aparecer márgenes citoplasmáticos poco definidos, probablemente producto de la edad o debido a artefactos (Knotkova *et al.*, 2002). La función de los trombocitos es similar a la de las plaquetas de las aves y de los mamíferos, y juegan un papel activo en la formación del trombo, la coagulación sanguínea y la cicatrización de las heridas. Frye (1991) señaló el carácter pluripotencial según el cual, en condiciones de anemia, pueden adquirir capacidad de transportar oxígeno, cubriendo la demanda ocasionada por la pérdida eritrocitaria. Según el mismo autor, también parecen tener capacidad fagocitaria en determinadas condiciones y ante determinados agentes quimiotácticos. En ocasiones, pueden aparecer trombocitos anómalos, con núcleo polimórfico; se cree que su presencia está asociada a enfermedades inflamatorias graves (Hawkley y Dennet, 1989). La trombocitopenia se produce en los quelonios probablemente debido a una utilización periférica excesiva de los trombocitos o a un descenso en su producción.

2.2.4. Bioquímica sanguínea

La determinación de los parámetros bioquímicos sanguíneos se utiliza con frecuencia para comprobar el estado fisiológico y sanitario de los reptiles y, aunque hay publicados

datos en ciertas especies (Wallach y Boever, 1983, Mader *et al.*, 1985, Marks y Citino, 1990; Jacobson *et al.*, 1990, Wright y Skeba, 1992, Andreani *et al.*, 2014), por lo general, existe una carencia de estudios estandarizados, diseñados para clarificar el significado de los cambios encontrados; por ello, la bioquímica clínica en los reptiles no ha alcanzado el mismo grado de evaluación crítica que en los mamíferos.

La interpretación de los parámetros de bioquímica sanguínea en los quelonios es similar a la de los mamíferos. Sin embargo, hay que tener en cuenta que, puesto que los reptiles ejercen menos control que las aves y los mamíferos sobre los mecanismos homeostáticos, los intervalos de normalidad de los diferentes parámetros analizados son, por lo general, más amplios y están sujetos a una variación estacional importante (Samour *et al.*, 1986, Lawrence, 1987, Wilkinson, 2004). Además, muchos de los intervalos de referencia establecidos publicados, no han tenido en cuenta las condiciones ambientales y los parámetros fisiológicos del animal, como su estado nutricional, el sexo o la edad. A ello se suman otras fuentes adicionales de variación, en los valores de referencia publicados, como son los métodos de recogida de las muestras, su manejo y las técnicas de análisis bioquímico (Holz y Holz, 1994, Gottdenker y Jacobson, 1995, Crawshaw, 1996, Andreani *et al.*, 2014). Por todo ello, muchos veterinarios clínicos utilizan “niveles de decisión”, es decir, valores umbral, por encima o por debajo de los cuales se toma una decisión en respuesta al valor de un parámetro (Campbell y Ellis, 2007).

PROTEÍNAS Y FRACCIONES ELECTROFORÉTICAS

La concentración de proteínas plasmáticas totales en las tortugas sanas, varía por lo general entre 0.8 y 6.6 g/dl (Wallach y Boever, 1983, Marks y Citino, 1990, Frye, 1991, Bolten *et al.*, 1992, Stein, 1996, Dickinson *et al.*, 2002, Knotkova *et al.*, 2002, Gicking *et al.*, 2004, Mathes *et al.*, 2005). Los valores descritos concretamente para la tortuga mediterránea oscilan entre 2,2 y 5,5 g/dl (Andreani *et al.*, 2014). Hay autores que han descrito un incremento de la concentración total de proteínas durante la foliculogénesis debido al estímulo estrogénico necesario para la vitelogénesis. El retorno a los valores normales se produciría después de la ovulación (Campbell, 2004). Por el contrario, Scope

et al. (2013), no hallaron diferencias significativas relacionadas con el sexo y la estación en la tortuga mediterránea.

En general, los quelonios poseen unos valores superiores de albúmina y menores de globulinas, lo cual se traduce en un menor cociente A/G. La albúmina presenta incrementos postprandiales en las tortugas verdes (Anderson *et al.*, 2011). Así mismo, se han descrito valores máximos durante el mes de Julio para la tortuga mediterránea (Andreani *et al.*, 2014), asociados a mayores ingestas.

La hipoproteinemia en reptiles, con niveles inferiores a 3 g/dl, se asocia con problemas de malnutrición crónica, malabsorción, maladigestión (asociada a parasitismo intestinal), enteropatías con pérdida de proteínas, pérdida de sangre y enfermedad renal o hepática crónica. La hiperproteinemia se asocia con la deshidratación (Dickinson *et al.*, 2002) o a una elevación de la fracción globulínica, debida a enfermedad inflamatoria crónica.

Para la realización del fraccionamiento electroforético se prefiere el plasma al suero, ya que el primero contiene el fibrinógeno, el cual es un importante indicador de la inflamación. La electroforesis seriada es útil como ayuda al diagnóstico en la medicina de anfibios y reptiles, ya que los rápidos cambios que ocurren en el plasma de los animales nos permiten evaluar la respuesta al tratamiento (Gicking *et al.*, 2004). El fraccionamiento electroforético de las proteínas también puede ayudar a realizar un diagnóstico en animales con hiperglobulinemia (Gicking *et al.*, 2004, Colagar y Jafari, 2007). No obstante, no se han establecido los valores de normalidad en las diferentes especies (Andreani *et al.*, 2014) y por ello, la interpretación de la electroforesis como ayuda diagnóstica, no tiene por el momento, un valor real.

Dos son los obstáculos con los que nos encontramos en la realización e interpretación de la electroforesis proteica: 1) no hay un criterio definido para la identificación de las diferentes fracciones en los quelonios. 2) hay una gran variabilidad inter e intra-específica, potenciada por factores ambientales como son el hábitat, la estación del año y la dieta (Giménez *et al.*, 2010, Andreani *et al.*, 2014).

En las enfermedades infecciosas pueden estar incrementadas las fracciones α , β y γ . Las α -globulinas pueden aumentar cuando existe necrosis tisular y disminuir en enfermedades hepáticas, malnutrición y malabsorción (Campbell, 1996). En la tortuga mediterránea hay incrementos significativos de las α -globulinas (concretamente de la fracción α_2) durante el mes de Septiembre, justo antes de la hibernación, debido al papel de α_2 macroglobulina (α_2M) como atenuador de la coagulación intravascular, justo cuando disminuye la frecuencia cardíaca y aumenta la viscosidad sanguínea. Así mismo, su aumento podría ir también asociado al papel de las α_2 lipoproteínas en la regulación del aporte de triglicéridos a los órganos periféricos, lo cual es un indicativo del inicio de un metabolismo basado en los lípidos tal y como ocurre en los animales hibernantes (Andreani *et al.*, 2014).

FIBRINÓGENO

Se desconoce en detalle el valor diagnóstico de la determinación del fibrinógeno en los quelonios. Los valores normales oscilan entre 100 y 200 mg/dl. Un aumento por encima de estos valores se ha asociado con procesos inflamatorios. Se ha descrito una variación estacional en la tortuga del desierto (Scope *et al.*, 2013), con incremento de los valores durante el mes de Septiembre.

METABOLITOS

Glucosa

La concentración de glucosa plasmática en las tortugas sanas varía, por lo general, entre 35 y 100 mg/dl (Dawson, 1960, Dessauer, 1970, Roskopf, 1983, Frye, 1991, Wright y Skeba, 1992, Knotkova *et al.*, 2002, Mathes *et al.*, 2005, Andreani *et al.*, 2014). Sin embargo, está sometida a variaciones fisiológicas como son la especie, el estado nutricional y las condiciones ambientales (Coulson y Hernández, 1964, Stein, 1996, Campbell, 2006). Scope *et al.* (2013) hallaron en la tortuga mediterránea, un incremento de la glucemia a mitad del verano y valores superiores en los machos que en las hembras. Andreani *et al.* (2014), hallaron valores inferiores durante el mes de Septiembre, justo antes de la hibernación y una correlación negativa entre la concentración de glucosa y la edad de la tortuga.

Una elevación de la temperatura conduce a un descenso de este parámetro en el galápago europeo (*Emys orbicularis*) (Vlâdescu, 1964). Durante las inmersiones prolongadas, dos especies de tortugas de agua dulce, la tortuga de orejas rojas (*Pseudemys scripta*) y la tortuga pintada (*Chrysemys picta*), utilizan la glicólisis anaerobia como fuente de energía incrementándose de forma notoria sus niveles de glucosa en sangre (Daw *et al.*, 1967).

La hipoglucemia en quelonios se puede producir por la privación de alimento, la malnutrición, las dietas altas en proteínas, las hepatopatías graves, las septicemias y las endocrinopatías. Las situaciones de hiperglucemia en reptiles, son, con frecuencia, el resultado de una administración yatrogénica de glucocorticoides o por una diabetes mellitus; normalmente se relaciona más con problemas metabólicos, enfermedades sistémicas y variables fisiológicas. En quelonios se han descrito posibles casos de diabetes mellitus (Frye, 1991, 1999) en los que los animales presentaban hiperglucemia marcada y persistente así como glucosuria.

Ácido úrico

El riñón de las tortugas es incapaz de concentrar su orina puesto que su corteza renal contiene tan sólo simples nefronas con un sistema tubular desprovisto de asas de Henle. Los productos nitrogenados de desecho excretados por las tortugas incluyen cantidades variables de ácido úrico, urea y amoníaco, dependiendo de la especie y del entorno natural del animal. Las tortugas terrestres deben conservar agua y para hacerlo producen sustancias de desecho nitrogenado más insolubles, en forma de ácido úrico y sales de urato, que eliminan en estado semisólido. Las tortugas cuya vida transcurre en gran medida en el agua, excretan aproximadamente cantidades iguales de amoníaco y urea, mientras que aquellas con hábitos anfibios excretan más urea (Davies, 1981).

La detección a nivel de bioquímica sanguínea, de alteraciones relacionadas con enfermedad renal en los reptiles es más complicada que en los mamíferos, debido a las diferencias fisiológicas indicadas en los riñones de los primeros. El ácido úrico es el principal producto final del catabolismo de las proteínas, del nitrógeno no proteico y de las purinas. En los reptiles terrestres representa entre el 80 y el 90% del nitrógeno total

excretado por los riñones (Frye, 1991). Los reptiles carnívoros tienen mayor concentración de ácido úrico sanguíneo que los reptiles herbívoros y muestran una hiperuricemia postprandrial que alcanza su pico 24 horas después de la ingesta, casi duplicándose el nivel de ácido úrico (Frye, 1991).

La concentración normal de ácido úrico en la mayoría de los quelonios es inferior a 10 mg/dl (Roskopf, 1982, Wallach y Boever, 1983, Marks y Citino, 1990, Jacobson *et al.*, 1990, Wright y Skeba, 1992, Mathes *et al.*, 2005, Scope *et al.*, 2013, Andreani *et al.*, 2014), con valores inferiores en las hembras que en los machos (Andreani *et al.*, 2014). En animales sanos, los niveles son más elevados en el período post-hibernación, más bajos en el verano (Lawrence y Hawkey, 1986, Scope *et al.*, 2013) y con valores mínimos justo antes de la hibernación (Andreani *et al.*, 2014). En situaciones de disponibilidad hídrica restringida, se ha observado un incremento en los niveles de este parámetro (McArthur, 2001, Dickinson *et al.*, 2002).

El ácido úrico no es un indicador ni sensible ni específico de enfermedad renal en los quelonios (Campbell, 2006). Su concentración en un valor superior a 15 mg/dl se considera elevada y se asocia, normalmente, con enfermedad renal grave, ingestión reciente de una dieta con alto contenido proteico y gota visceral, si bien los túbulos renales de los reptiles son muy eficientes en la eliminación del ácido úrico de la sangre (Coulson y Hernández, 1964, Dantzler, 1967). Los niveles altos de calcio y proteína en la dieta y la hipervitaminosis D, provocan concentraciones elevadas de ácido úrico en sangre. Una causa potencial de falsa elevación del ácido úrico en sangre es la presencia de lipemia en la muestra (Mader, 1998). Por el contrario, la linfohematocritosis de la muestra sanguínea al realizar la venopunción, hace descender los resultados (López-Olvera *et al.*, 2003).

Nitrógeno Ureico en sangre (BUN)

Debido a que los quelonios son principalmente uricotélicos, la concentración normal del nitrógeno ureico en sangre es inferior a 10 mg/dl (Dawson, 1960, Dessauer, 1970, Roskopf, 1982, Wallach y Boever, 1983, Marks y Citino, 1990, Jacobson *et al.*, 1990, Wright y Skeba, 1992, Andreani *et al.*, 2014). En las tortugas terrestres, el valor tiende a

ser más alto, entre 30 y 100 mg/dl (Wallach y Boever, 1983, Frye, 1991, Bolten *et al.*, 1992) como mecanismo para elevar la osmolaridad del plasma y reducir así la pérdida de agua del organismo (Jacobson *et al.*, 1990). Se ha descrito una variación ligada al sexo (valores inferiores en las hembras) y a la época del año (valores superiores pre-hibernacionales) para la tortuga mediterránea (Andreani *et al.*, 2014).

Cuando hay una enfermedad renal importante, en una azotemia prerrenal y cuando el animal ingiere dietas altas de proteínas, se producen elevaciones del nitrógeno ureico. Debido a que el nitrógeno ureico se elimina por filtración glomerular, a diferencia del ácido úrico, que se elimina por secreción tubular, su valoración en sangre puede ser una prueba útil para determinar la azotemia prerrenal en algunas especies de reptiles. Sin embargo, el nitrógeno ureico sanguíneo no se considera, por lo general, una prueba fiable para el diagnóstico de la enfermedad renal en los reptiles (Campbell, 2006).

Creatinina

La concentración normal de creatinina en los quelonios es por lo general muy baja, inferior a 1 mg/dl (Taylor y Jacobson, 1982, Wallach y Boever, 1983, Jacobson *et al.*, 1990, Bolten *et al.*, 1992). No se considera un parámetro adecuado para el diagnóstico de una enfermedad renal en tortugas. Los niveles sanguíneos de creatinina en los quelonios, se pueden ver incrementados por una deshidratación grave y por enfermedad renal.

Pigmentos biliares

La biliverdina es el principal producto de degradación del catabolismo de la hemoglobina en los reptiles debido a la inexistencia de la enzima biliverdín reductasa, requerida para producir bilirrubina (Bissell, 1986). La biliverdina parece ser menos tóxica para los tejidos, comparada con la bilirrubina y su concentración en el plasma. En algunas especies de lagartos, puede ser superior a los 1000 $\mu\text{mol/L}$ (Austin y Jessing, 1994). Cuando se acumula biliverdina en el plasma de las tortugas, éste se vuelve verde y normalmente es un hallazgo que indica la presencia de una enfermedad hepatobiliar. La detección de la biliverdina podría ser un valioso instrumento diagnóstico, pero hasta la fecha no existió un método diagnóstico disponible (Divers, 2000).

Ácidos biliares

Los ácidos biliares son útiles para comprobar la funcionalidad hepática, tanto en aves (Carpenter *et al.*, 1996) como en mamíferos (Kaneko *et al.*, 2008). Sin embargo no se han estudiado en la mayoría de los reptiles y, actualmente, su aplicación está por determinar en estas especies. Puesto que los principales ácidos biliares varían con el orden taxonómico del reptil, debe existir una preocupación sobre la aplicación universal de un único ensayo para todos los reptiles (Skozylas, 1978). Estudios recientes (Scope *et al.*, 2013) indican que en la tortuga mediterránea el valor basal de los ácidos biliares para los machos es de 11 $\mu\text{mol/l}$ y de 4 $\mu\text{mol/l}$ para las hembras durante el período estival. Esta diferencia podía ser debida a la mayor o más continuada ingesta de alimentos por parte de los machos, aunque en los galápagos de orejas rojas (*Trachemys scripta*) no se ha observado una elevación post-prandial (Knotkova *et al.*, 2008). En otras especies, como la tortuga radiada no se han observado diferencias significativas entre machos y hembras, siendo los valores basales 12.7 $\mu\text{mol/L}$ para los machos y 4.5 $\mu\text{mol/L}$ para las hembras (Zaias *et al.*, 2006).

Triglicéridos y colesterol

Se ha descrito en tortuga mediterránea y mora un descenso de los valores de triglicéridos en las fases de prehibernación y al final de la gravidez (Lawrence, 1987, Divers, 2000), así como un incremento durante el periodo de reproducción en el galápagos europeo (Tosunoglu *et al.*, 2011). Se han observado niveles altos de colesterol total en tortugas mediterráneas y moras grávidas durante el mes de agosto (época de oviposición) (Lawrence, 1987) y en tortugas de Florida durante la vitelogénesis (Taylor y Jacobson, 1987, O'Connor *et al.*, 1994, Rostal *et al.*, 1994). Las hembras de la tortuga amarilla china (*Cuora flavomarginata*) presentan valores de triglicéridos, colesterol y calcio superiores a los machos (Yang *et al.*, 2014) al igual que las hembras de tortuga del desierto (Dickinson *et al.*, 2002) y de tortuga radiada (Zaias *et al.*, 2006). Los valores de colesterol están directamente correlacionados con la vitamina E, por lo que se puede considerar un buen indicador indirecto de ella.

ENZIMAS

En general, las alteraciones en la actividad enzimática se interpretan de la misma manera que en los mamíferos domésticos y las aves, a pesar de los pocos estudios realizados sobre el significado de los cambios en su actividad en los reptiles.

Aspartato aminotransferasa (AST)

No se considera una enzima órgano específica ya que está presente en todos los tejidos corporales (Wetzel y Wagner, 1998). La mayor actividad se localiza en el hígado y músculo. Por lo general, la actividad de la AST sérica o plasmática en tortugas sanas es inferior a 250 U/L, siendo de 18-628 U/L para la tortuga mediterránea (Andreani *et al.*, 2014). Actividades superiores a esta cifra sugieren daño hepático o muscular (Christopher, 1999). En la valoración del daño muscular hay que asociarla a la valoración de la CK. En enfermedades generalizadas como septicemias o endotoxemias, se puede producir un aumento sanguíneo de la actividad de la AST, asociado a la necrosis celular. También se han observado incrementos significativos, no vinculados a enfermedades, como los producidos tras inyecciones múltiples o tras luchas primaverales en machos de tortugas del desierto (*Gopherus* spp) (Dickinson *et al.*, 2002), mediterráneas (Scope *et al.*, 2013, Andreani *et al.*, 2014) y asiáticas (Yang *et al.*, 2014).

Alanina aminotransferasa (ALT)

La ALT plasmática, igual que la AST, no es una enzima órgano específica en reptiles, aunque se observa una actividad elevada a nivel renal en tortugas (Ramsay y Dotson, 1995). Los valores normales de ALT en suero o plasma de las tortugas suelen ser inferiores a 20 U/L y entre 1-16 U/L para la tortuga mediterránea (Andreani *et al.*, 2014). La ALT normalmente, no forma parte del perfil rutinario de bioquímica sanguínea en reptiles debido a que el hígado de varias de estas especies carece de un nivel significativo de su actividad (Wagner y Wetzel, 1999). De este modo, un aumento de su actividad en reptiles, pueden no ser tan fiables en la detección de la enfermedad hepatobiliar (Andreani *et al.*, 2014), como los incrementos en plasma de la actividad de la AST o de la LDH.

Gamma glutamil transferasa (YGT)

Esta enzima del tracto biliar se encuentra en muy baja concentración en los reptiles (Ramsay y Dotson, 1995, Wagner y Wetzel, 1999), por lo que presenta poco interés en estas especies.

Lactato deshidrogenasa (LDH)

La lactato deshidrogenasa es una enzima con una distribución tisular amplia en los quelonios; aparece en el hígado, riñón, músculo esquelético y cardíaco y, en menor cantidad en el intestino. En los reptiles, niveles plasmáticos superiores a 700 U/L se asocian a estomatitis, obstrucción intestinal, prolapso cloacal, colitis séptica o fallo renal. Incrementos en la actividad plasmática superiores a 1000 UI/L se pueden asociar con daño hepático, muscular esquelético o cardíaco (Campbell, 2006). La hemólisis puede llevar a un incremento artefactual (Rosskopf, 1982). En los quelonios se han descrito elevaciones significativas tras venipunciones traumáticas y tras lesiones tisulares inespecíficas (McArthur *et al.*, 2001).

Fosfatasa alcalina (FA)

Esta enzima está ampliamente distribuida en los órganos de los reptiles y por tanto tampoco su actividad sérica o plasmática es específica de ningún órgano (Andreani *et al.*, 2014). Los valores normales son variables y dependientes de la especie, siendo entre 90-695 U/L para la tortuga mediterránea (Andreani *et al.*, 2014), los cuales describen una correlación negativa entre la actividad de la FA y la edad. Aunque existe poca información concerniente a la interpretación de las actividades elevadas de la fosfatasa alcalina en los reptiles se puede considerar que su aumento puede deberse a una actividad osteoblástica aumentada o a una enfermedad hepatobiliar (Campbell, 2006). La actividad sanguínea de esta enzima es más alta en los animales jóvenes, en crecimiento, respecto a los animales adultos. Asimismo, en la tortuga del desierto se ha descrito un incremento de actividad durante los meses de julio y agosto y una disminución durante el mes de abril (Scope *et al.*, 2013). Este incremento estival podría estar asociado al mayor metabolismo óseo por la mayor exposición a las radiaciones ultravioletas. En los mamíferos, la hipovitaminosis D puede causar un aumento de la actividad plasmática de esta enzima (Lian *et al.*, 1987). En reptiles se ha descrito un

incremento asociado a períodos de inmadurez (animales subadultos en especies de rápido crecimiento) así como a estasis folicular en hembras con problemas reproductivos crónicos (McArthur *et al.*, 2001).

Creatin quinasa (CK)

La CK se considera generalmente una enzima músculo específica y es usada para determinar el daño muscular (Wetzel y Wagner, 1998). En los reptiles que oponen resistencia a la extracción de sangre o bien en aquellos que sufren convulsiones, los niveles de esta enzima se elevan. También se produce un aumento cuando se produce un daño en las células musculares bien por un traumatismo, por inyecciones de fármacos irritantes (enrofloxacino, carprofeno) o fluidos y, en las infecciones sistémicas que afectan al músculo esquelético o cardíaco. También se produce un aumento en la sangre recogida por una venipunción traumática y en situaciones de estrés (Wagner y Wetzel, 1999, Wilinon, 2004). La determinación de la actividad plasmática o sérica de la CK es particularmente útil junto con la determinación de la AST y LDH, para el diagnóstico de la enfermedad hepatobiliar y para descartar la existencia de daño muscular esquelético simultáneo (Campbell, 1996).

ELECTROLITOS Y EQUILIBRIO ÁCIDO-BASE

El consumo de agua de los quelonios viene determinado por la especie, la dieta y las condiciones ambientales, principalmente por la temperatura y la humedad. Así, por ejemplo, las tortugas de las zonas desérticas necesitan menos agua que aquellas de zonas húmedas y templadas. Una forma de conservar agua en los quelonios es eliminar los productos de desecho nitrogenados en forma de ácido úrico y sales de urato, que se excretan en forma semisólida (Frye, 1991). En los reptiles, la osmolaridad es relativamente elevada en serpientes, lagartos y tortugas marinas, y menor en tortugas de agua dulce (Sánchez-Migallon *et al.*, 2007). La osmolaridad de la sangre de los cocodrilos y de las tortugas de agua dulce es, en la mayoría de ocasiones, igual o ligeramente inferior a la de la sangre humana, aproximadamente 290 mOs/l.

En los reptiles, los iones sodio, cloro y bicarbonato suponen más del 85% de los componentes osmóticamente activos del plasma. El cloro y el bicarbonato aportan del

80 al 90% de los aniones. Los valores sanguíneos de sodio y potasio varían en función de la especie, dieta, condiciones ambientales, como son la temperatura y la altitud, de las condiciones fisiológicas, como son la hibernación, ayuno, gestación, estrés y de la condición física y medicaciones administradas (Brobst, 1986, Samour *et al.*, 1986, Campbell, 1996, Abou-Madi y Jacobson, 2003). Están sometidos a cambios en función del tipo de muestra obtenida (con o sin anticoagulante) y del tiempo transcurrido entre la extracción de la muestra y su posterior análisis. La temperatura de mantenimiento de la muestra también influye en estas variaciones (Abou-Madi y Jacobson, 2003), traduciéndose en un descenso en los valores del sodio y en un incremento en los del potasio.

Los valores de sodio plasmático en las tortugas terrestres y de agua dulce oscilan entre 120 y 150 mEq/l y entre 150 y 170mEq/l en las tortugas marinas (Holz y Holz, 1994). La hiponatremia se presenta como resultado de una pérdida excesiva de sodio, asociada a problemas gastrointestinales (diarrea) o renales (Telford, 2000). La hiponatremia iatrogénica se puede producir con la sobrehidratación de la tortuga con fluidos intravenosos o intracelómicos, pobres en sodio. La hipernatremia se produce por una deshidratación, bien provocada por una ingesta inadecuada de agua, bien por una pérdida excesiva o por un exceso de sal en la dieta. La elevación del sodio se ha observado también en la enfermedad renal debido a la vasoconstricción provocada por mediación del sistema renina angiotensina (McArthur, 2001).

La concentración de potasio en el plasma de la mayoría de tortugas varía entre 2 y 6 mEq/l (Stein, 1996). Los valores de potasio sufren sólo alteraciones mínimas durante la alimentación, los cambios de temperatura, el estrés osmótico y otros episodios del ciclo de vida de las tortugas, que alteran drásticamente el equilibrio electrolítico. En los quelonios, es probable que las situaciones de hipopotasemia se generen por una ingesta alimentaria inadecuada de potasio o por pérdida excesiva del mismo (diarrea). La hipopotasemia también se puede asociar a una situación de alcalosis grave. La hiperpotasemia en las tortugas se ha asociado a enfermedad o fallo renal (McArthur, 2001), si bien casi siempre en fases terminales de la enfermedad (Nevarez *et al.*, 2002).

La hiperpotasemia asociada a la hiperfosfatemia, indica normalmente una lisis eritrocitaria.

El cloro es el principal anión en la sangre y, junto con el sodio, representa el principal componente osmóticamente activo del plasma en los reptiles. Los valores de cloro normales en suero o plasma de las tortugas varía entre especies, pero suelen oscilar entre 100 y 110 mEq/L (Coulson y Hernández, 1971, Stein, 1996). La hipercloremia se asocia con deshidratación, fallo renal o patologías de las glándulas de la sal en especies marinas. Las situaciones de hipocloremia son poco frecuentes y sugieren o bien una pérdida de iones de cloro o bien sobrehidratación con fluidos pobres en iones de cloro (Mitchell, 2009). La concentración de cloro en sangre proporciona poca información de utilidad clínica (Campbell, 2006).

En las tortugas, el bicarbonato es generalmente elevado, constituyendo aproximadamente un tercio del total de aniones, mientras que en otros reptiles contribuye sólo del 10 al 15% (Dessauer, 1970).

El pH sanguíneo normal de las tortugas varía entre 7.5 y 7.7, a una temperatura entre 23°C y 25°C (Davies, 1981). El pH sanguíneo de los reptiles es lábil y cambia con las fluctuaciones de temperatura: un incremento en la temperatura o una situación de estrés puede causar el que el pH sanguíneo descienda. Es probable que los sistemas tampón que regulan el pH sanguíneo en los reptiles sean los mismos que en los mamíferos, siendo el más importante el bicarbonato/ácido carbónico, debido a la rapidez con la que los pulmones pueden eliminar dióxido de carbono tras su conversión, a partir del ácido carbónico.

El desequilibrio aniónico o “anion gap” es la diferencia entre los cationes y aniones medidos, y se utiliza para valorar la presencia de una acidosis metabólica (Meyer *et al.*, 1992). Se calcula empleando la siguiente fórmula: $\text{Anion gap} = (\text{Na} + \text{K}) - (\text{Cl} + \text{HCO}_3)$. El valor normal en los reptiles oscila entre 10-27 mEq/L, un rango más amplio que en los mamíferos (12-18 mEq/L). En la acidosis láctica asociada con el shock, la anoxia y la actividad muscular excesiva, se produce un aumento en el desequilibrio aniónico; la

uremia, los metabolitos del etilén glicol y la toxicidad por salicilatos, también generan una elevación. En animales sanos, los niveles son más altos en el período post-hibernación y más bajos en el verano (Stein, 1996).

MINERALES

Calcio y Fósforo

En los reptiles, el metabolismo del calcio y los niveles de calcio ionizado en el plasma están mediados por la paratohormona, la calcitonina, y la vitamina D3 (Dubewar, 1979, Gibbons, 2001). El papel principal de la paratohormona es el de mantener los niveles de calcio sanguíneos normales, mediante su acción en el huesos (movilización del calcio óseo), riñones (aumento de su reabsorción) y mucosa intestinal (aumento de su reabsorción). Aunque el papel exacto de la calcitonina en los reptiles se desconoce, probablemente tenga la función fisiológicamente opuesta a la de la paratohormona: el aumento de calcio sanguíneo estimula la liberación de calcitonina que inhibe la reabsorción de calcio del hueso. La forma activa de la vitamina D3 estimula la absorción del calcio y fósforo a partir de la mucosa intestinal. En los reptiles diurnos la exposición a la radiación ultravioleta es imprescindible para el metabolismo normal mediante la producción fotoquímica de la forma activa de vitamina D3 (Adkins *et al.*, 2003).

Los niveles de calcio séricos normales para las tortugas, varían entre las especies dependiendo del estado fisiológico, oscilando entre 8 y 11 mg/dl (Stein, 1996). La hipercalcemia en las tortugas, se considera con concentraciones de calcio plasmático superiores a 20 mg/dl. En los quelonios cautivos son frecuentes las hipercalcemias iatrogénicas (valores de calcio sérico mayores a 40 mg/dl), como resultado de dietas con excesiva cantidad de calcio y vitamina D₃ (Frye y Centofanti, 1991). Otras situaciones, aunque poco frecuentes en los quelonios, son el hiperparatiroidismo primario o la enfermedad ósea osteolítica. Es importante tener en cuenta que cuando la muestra sanguínea está lipémica se produce una elevación artefactual de los niveles de calcio (Mader y Klaasen, 1998).

Los valores sanguíneos de proteínas, calcio y magnesio pueden aumentar antes de la producción de huevos en las tortugas, en respuesta a la actividad estrogénica y reproductiva (Andreani *et al.*, 2014). El calcio sanguíneo aumenta de forma significativa (de dos a cuatro veces) en las tortugas hembras que exhiben una foliculogénesis activa, donde debido a la actividad estrogénica incrementada, se produce una movilización de este elemento (Dessauer, 1970). McArthur *et al.*, (2001) señalan una hipercalcemia vitelogénica en hembras de tortugas, entre los meses de marzo y julio.

La hipocalcemia, en la mayoría de tortugas, se produce cuando la concentración de calcio plasmático es inferior a 8 mg/dl. Esta situación se puede producir cuando existen deficiencias en la alimentación de Ca y vitamina D₃, cuando existe una cantidad excesiva de fósforo en la dieta, o en las situaciones de alcalosis, hipoalbuminemia o hipoparatiroidismo. Las dietas exclusivamente carnívoras suelen ser deficientes en calcio y contienen un exceso de fósforo. Además la carencia de una exposición apropiada a la luz ultravioleta, predispone a las tortugas a la hipocalcemia. Las tortugas carnívoras, alimentadas con dietas cárnicas, deficientes en calcio, desarrollan fácilmente hipocalcemia, asociada a desequilibrios nutricionales en calcio y fósforo (Campbell, 2006).

Por lo que respecta al fósforo, la mayoría de los quelonios tienen niveles séricos o plasmáticos normales entre 1-5 mg/dl (Stein, 1996). Las situaciones que provocan una hiperfosfatemia incluyen, una cantidad excesiva de fósforo en la dieta, la hipervitaminosis D₃ y la enfermedad renal. Otras causas, poco frecuentes, incluyen los traumatismos graves y enfermedades osteolíticas (Kaphalek, 2001). Si existe hiperfosfatemia cabe la posibilidad de que se haya producido una hemólisis en la muestra, permitiendo así que el fósforo se haya liberado a partir de los eritrocitos. La situación de hipofosfatemia en quelonios puede producirse por anorexia, inanición o deficiencia nutricional de fósforo. En las tortugas, una relación Ca:P menor a 1 sugiere enfermedad renal. Las tortugas jóvenes en crecimiento pueden tener niveles más altos de fósforo sanguíneo que los adultos (Mader, 1996).

En las tablas 1 a 15 aparecen reflejados los valores de los parámetros hematológicos y de bioquímica sanguínea de tortugas terrestres filogenéticamente y ambientalmente próximas a las especies de nuestro trabajo.

Tabla 1. Parámetros hematológicos en tortuga del desierto (*Gopherus agassizii*) (Roskopf, 1982, Gottdenker y Jacobson, 1995).

Parámetro	Rango	Media
Eritrocitos (10^6 /ml)	1.2-3.0	-
Hemoglobina (g/dl)	6.9-7.7	-
Valor hematocrito (%)	23-37	-
VCM (fl)	377-607	-
HCM (pg)	113-126	-
CHCM (g/dl)	19-34	-
Leucocitos (10^3 /ml)	6.6-8.9	-
Heterófilos (%)	35-60	-
Linfocitos (%)	25-50	-
Monocitos (%)	0-4	-
Eosinófilos (%)	0.4	-
Basófilos (%)	2-15	-

Tabla 2. Parámetros bioquímicos en tortuga del desierto (*Gopherus agassizii*) (Roskopf, 1982, Gottdenker y Jacobson, 1995).

Parámetro	Rango	Media
Proteínas totales (g/dl)	1.2-7.7	3.7
Albúmina (g/dl)	0.4-3.00	1.1
Globulina (g/dl)	1.2-4.7	2.2
Bilirrubina total (mg/dl)	0.00-0.2	0.1
Glucosa (mg/dl)	55.00-128.00	75.00
Colesterol (mg/dl)	69.00-89.00	74.00
Ácido úrico (mg/dl)	2.2-9.2	-
Urea (mg/dl)	30.00-62.00	46.00
Creatinina (mg/dl)	0.12-0.14	0.13
AST (U/l)	47.00-70.00	59.00
ALT (U/l)	3.80-8.30	6.1
AP (U/l)	29.00-35.00	32.00
LDH (U/l)	25.00-250.00	-
CK (U/l)	52.00-6945.00	2079.00
Sodio (mEq/l)	130.00-157.00	-
Potasio (mEq/l)	2.2-6.6	-
Cloro (mEq/l)	109.00-112.00	110.00
Magnesio (mEq/l)	1.8-2.4	2.1
Calcio total (mg/dl)	9.6-10.30	10.00
Fósforo (mg/dl)	1.2-13.5	4.2

Tabla 3. Parámetros hematológicos en tortuga del desierto (*Gopherus agassizii*) (Diethelm, G. y Stein, G., 2006).

Parámetro	Rango	Media
Eritrocitos (10^6 /ml)	0.4-1.3	0.9
Hemoglobina (g/dl)	6.4-17.00	10.9
Valor hematocrito (%)	13-48	28
VCM (fl)	201-575	384
HCM (pg)	91-165	133
CHCM (g/dl)	27-62	36
Leucocitos (10^3 /ml)	0.6-27	7.2
Heterófilos (%)	-	-
Linfocitos (%)	-	-
Monocitos (%)	-	-
Eosinófilos (%)	-	-
Basófilos (%)	-	-

Tabla 4. Parámetros bioquímicos en tortuga del desierto (*Gopherus agassizii*) (Diethelm, G. y Stein, G., 2006).

Parámetro	Rango	Media
Proteínas totales (g/dl)	2.3-7.00	4.00
Albúmina (g/dl)	1.3-2.00	1.6
Globulina (g/dl)	1.4-2.97	1.6
Bilirrubina total (mg/dl)	0.00-2.6	0.4
Glucosa (mg/dl)	54.00-277.00	139.00
Colesterol (mg/dl)	58.00-394.00	147.00
Ácido úrico (mg/dl)	2.1-10.5	5.1
Urea (mg/dl)	0.00-62.00	2.00
Creatinina (mg/dl)	0.1-0.5	0.3
AST (U/l)	34.00-401.00	114.00
ALT (U/l)	0.00-47.00	9.00
AP (U/l)	12.00-63.00	38.00
LDH (U/l)	258.00-1980.00	1114.00
CK (U/l)	103.00-6205.00	1228.00
Sodio (mEq/l)	121.00-155.00	139
Potasio (mEq/l)	3.6-1.6	5.5
Cloro (mEq/)	93.00-121.00	108.00
Magnesio (mEq/l)	1.8-2.4	2.1
Calcio total (mg/dl)	6.6-19.20	11.8
Fósforo (mg/dl)	1.5-7.8.5	3.9

Tabla 5. Parámetros hematológicos en tortuga estrellada (*Geochelone elegans*) (Diethelm, G. y Stein, G., 2006).

Parámetro	Rango	Media
Eritrocitos (10^6 /ml)	0.3-0.7	0.5
Hemoglobina (g/dl)	6.0-8.5	7.6
Valor hematocrito (%)	12-34	22
VCM (fl)	354-475	409
HCM (pg)	122-163	135
CHCM (g/dl)	26-35	31
Leucocitos (10^3 /ml)	0.8-61	12
Heterófilos (%)	-	-
Linfocitos (%)	-	-
Monocitos (%)	-	-
Eosinófilos (%)	-	-
Basófilos (%)	-	-

Tabla 6. Parámetros bioquímicos en tortuga estrellada (*Geochelone elegans*) (Diethelm, G. y Stein, G., 2006).

Parámetro	Rango	Media
Proteínas totales (g/dl)	3.00-6.00	4.6
Albúmina (g/dl)	0.2-3.1	1.5
Globulina (g/dl)	2.3-4.2	3.1
Bilirrubina total (mg/dl)	0.00-0.2	0.1
Glucosa (mg/dl)	54.00-277.00	139.00
Colesterol (mg/dl)	77.00-257.00	127.00
Ácido úrico (mg/dl)	1.00-8.1	3.00
Urea (mg/dl)	0.00-11.00	4.00
Creatinina (mg/dl)	0.20-0.50	0.30
AST (U/l)	12.00-296.00	96.00
ALT (U/l)	0.00-30.00	13.00
AP (U/l)	38.00-379.00	173.00
LDH (U/)	402.00-1512.00	667.00
CK (U/l)	52.00-6945.00	2079.00
Sodio (mEq/l)	122.00-150.00	131
Potasio (mEq/l)	3.9-6.1	5.2
Cloro (mEq/l)	90.00-118.00	105.00
Magnesio (mEq/l)	1.8-2.4	2.1
Calcio total (mg/dl)	5.4-22.00	11.6
Fósforo (mg/dl)	2.2-5.7	3.8

Tabla 7. Parámetros hematológicos en tortuga marginata (*Testudo marginata*) (López-Olvera *et al.*, 2003).

Parámetro	Rango	Media
Eritrocitos ($10^{12}/\text{ml}$)	0.20-0.49	0.34
Hemoglobina (g/l)	19-58	37.3
Valor hematocrito (l/l)	0.06-0.22	0.14
VCM (fl)	300-566.6	397.1
HCM (pg)	82.9-146.7	107.4
CHCM (g/dl)	22.4-31.7	26.8
Leucocitos ($\times 10^9/\text{l}$)	0.70-4-20	2.77
Heterófilos ($\times 10^9/\text{l}$)	0.37-1.85	0.88
Linfocitos ($\times 10^9/\text{l}$)	0.31-2.90	1.50
Monocitos($\times 10^9/\text{l}$)	0.00-0.084	0.02
Eosinófilos ($\times 10^9/\text{l}$)	0.00-0.76	0.29-

Tabla 8. Parámetros bioquímicos en tortuga marginada (*Testudo marginata*) (López-Olvera *et al.*, 2003).

Parámetro	Rango	Media
Proteínas totales (g/l)	8.0-32.0	20.3
Glucosa (mmol/l)	2.44-4.83	3.42
Triglicéridos (mmol/l)	0.35-2.00	1.20
Ácido úrico (mmol/l)	4.76-114.20	70.19
Urea (mmol/l)	0.33-2.00	0.92
Creatinina (mmol/l)	0.00-26.52	8.84
AST (U/l)	25-83	38.8
ALT (U/l)	5-17	8.0
AP (U/l)	53-164	94.5
LDH (U/l)	31-431	186.0
CK (mmol/l)	10-112	41.8
Sodio (mmol/)	136-147	140.3
Calcio total (mmol/l)	1.90-3.67	2.56
Fósforo (mmol/l)	0.84-2.87	1.54

Tabla 9. Parámetros bioquímicos en tortuga mora (*Testudo graeca*) (Mathes *et al.*, 2005).

Parámetro	Rango	Media
Proteínas totales (g/dl)	0.23-4.44	3.25
Glucosa (mg/dl)	13.00-234.00	86.87
Colesterol (mmol/l)	64.00-330.00	153.80
Ácido úrico (mg/dl)	0.41-3.11	1.21
Urea (mg/dl)	4.00-33.00	16.87
AST (U/l)	1.00-138.00	33.07
ALT (U/l)	0.00-4.00	1.67
AP (U/l)	54.00-1104.00	1.67
GLDH (U/l)	0.40-5.50	1.61
CK (mmol/l)	6.00-2023.00	271.73
Sodio (mmol/l)	125.80-137.10	132.38
Potasio (mmol/l)	2.77-5.64	3.92
Calcio total (mmol/l)	0.73-3.74	2.94
Fósforo (mmol/l)	0.62-3.27	1.08

Tabla 10. Parámetros hematológicos en tortuga mediterránea (*Testudo hermanni*) (Andreani *et al.*, 2014).

Parámetro	Rango	Media
Hemoglobina (g/dl)	4.1-13.5	8.4
Valor hematocrito (%)	11-40	23

Tabla 11. Parámetros bioquímicos en tortuga mediterránea (*Testudo hermanni*) (Andreani *et al.*, 2014).

Parámetro	Rango	Media
Proteínas totales (g/dl)	2.4-6.1	4
Albumina (g/dl)	0.8-2.6	1.6
Cociente A/G	0.42-0.89	0.64
Glucosa (mg/dl)	15-120	73
Triglicéridos (mmol/l)	0.35-2.00	1.20
Ácido úrico (mg/dl)	0-5.2	2.72
Urea (mg/dl)	0-11.1	5.59
Creatinina (mg/dl)	0.03-0.27	0.17
AST (U/l)	0-359	134
ALT (U/l)	1-12.5	4
AP (U/l)	122-606	368
LDH (U/l)	0-800	476
CK (U/l)	0-732	284
Sodio (mmol/l)	116-143	130
Potasio (mmol/l)	3.5-7.7	5.8
Cloro (mmol/l)	92-111	101
Calcio total (mg/dl)	4.8-20.5	14.7
Fósforo (mg/dl)	0.6-5.5	3.4

Tabla 12. Parámetros hematológicos en tortuga de Florida (*Gopherus polyphemus*) (Taylor y Jacobson, 1981).

Parámetro	Rango	Media
Eritrocitos ($10^{12}/l$)	0.24-0.91	0.54
Hemoglobina (g/dl)	4.2-8.6	6.4
Valor hematocrito (%)	15-30	23
VCM (fl)	-	-
HCM (pg)	-	-
CHCM (g/dl)	-	-
Leucocitos ($10^3/ml$)	10-22	-
Heterófilos (%)	10-57	-
Linfocitos (%)	32-79	-
Monocitos (%)	3-13	7
Eosinófilos (%)	-	-
Basófilos (%)	2-11	6

Tabla 13. Parámetros bioquímicos en tortuga de Florida (*Gopherus polyphemus*) (Taylor y Jacobson, 1981).

Parámetro	Rango	Media
Proteínas totales (g/dl)	1.3-4.6	3.1
Albúmina (g/dl)	0.5-2.6	1.5
Bilirrubina total (mg/dl)	0.00-0.1	0.02
Glucosa (mg/dl)	55.00-128.00	75.00
Colesterol (mg/dl)	19.00-150.00	76.00
Ácido úrico (mg/dl)	0.9-8.5	3.5
Urea (mg/dl)	1.00-130.00	30.00
Creatinina (mg/dl)	0.1-0.4	0.3
AST (U/l)	57.00-392.00	136.00
ALT (U/l)	2.00-57.00	15.0
AP (U/l)	11.00-71.00	39.00
LDH (U/l)	18.00-909.00	273
CK (U/l)	32.00-628.00	160.00
Sodio (mEq/l)	127.80-148.00	138.00
Potasio (mEq/l)	2.9-7.0	5.00
Cloro (mEq/l)	35.00-128.00	102.00
Magnesio (mEq/l)	3.3-4.8	4.1
Calcio total (mg/dl)	10.0-14.00	12.00
Fósforo (mg/dl)	1.00-3.1	2.1

Tabla 14. Parámetros hematológicos en tortuga rusa (*Agrionemys horsfieldii*) (Knotkova *et al.*, 2002).

Parámetro	Rango	Media
Heterófilos (%)	0.130-0.456	0.372
Linfocitos (%)	0.361	0.756
Monocitos (%)	0.001-0.021	0.012
Eosinófilos (%)	0.020-0.059	0.048
Basófilos (%)	0.020-0.076	0.050
Azurófilos (%)	0.033-0.120	0.051

Tabla 15. Parámetros bioquímicos en tortuga rusa (*Agrionemys horsfieldii*) (Knotkova *et al.*, 2002).

Parámetro	Rango	Media
Proteínas totales (g/l)	24.3-68.5	45.1
Glucosa (mmol/l)	8.9-12.0	11.4
Colesterol (mmol/l)	3.0-6.5	4.0
Ácido úrico ($\mu\text{mol/l}$)	37.6-150.0	95.0
AST ($\mu\text{kat/l}$)	0.5-1.6	1.1
ALT ($\mu\text{kat/l}$)	0.5-1.2	0.8
ALP ($\mu\text{kat/l}$)	1.8-7.2	4.5
Na (mmol/l)	139.0-145.0	143.0
K (mmol/l)	2.0-4.2	3.8
Ca (mmol/l)	1.7-2.9	2.5-
P (mmol/l)	0.7-1.9	1.4

2.3. HERPESVIROSIS DE LAS TORTUGAS TERRESTRES

Los herpesvirus son virus ADN, con un tamaño de alrededor 200 nm. Están formados por una membrana glicoproteica y una cápside icosaédrica, que contiene el ADN vírico lineal, de doble cadena. Históricamente, estas características morfológicas se han utilizado para asignar a un virus como perteneciente a la familia *Herpesviridae*. Sin embargo, durante las dos últimas décadas la secuenciación molecular del genoma vírico ha mejorado notablemente su clasificación. En la actualidad, en los mamíferos se han establecido tres subfamilias: *Alpha-*, *Beta-* y *Gammaherpesviridae*. Los herpesvirus tienen tendencia, dependiendo de la cepa del virus y de la especie animal afectada, a infectar el tejido linfático, las células epiteliales y el tejido nervioso, pudiendo causar lesiones neoplásicas, hemorrágicas y necróticas. Las infecciones por herpesvirus están asociadas a la formación de cuerpos de inclusión intranucleares. Estos cuerpos de inclusión representan áreas donde se acumulan fragmentos lesionados del núcleo celular. La mayoría de los herpesvirus son hospedador-específicos, pero algunos de ellos pueden infectar, ya sea de forma natural o experimentalmente, a varias especies diferentes. En general, estos virus causan infecciones latentes, subclínicas o de cierta gravedad en sus hospedadores naturales. Sin embargo, ocasionalmente aparecen brotes de enfermedad graves, que pueden producir cierta mortalidad, en especial cuando un nuevo herpesvirus entra en contacto con un nuevo huésped (Ritchie, 1995, Posthaus *et al.*, 1997). Han sido descritos como causantes de enfermedad en diferentes especies de todo el reino animal, desde mamíferos, aves, reptiles, anfibios, peces y hasta invertebrados (Roizman *et al.*, 1992, Davison, 2002). En lo que a los reptiles se refiere se les ha asociado a procesos en diferentes especies de ofidios, saurios y quelonios (Wellehan *et al.*, 2003). Todos los herpesvirus de los quelonios pertenecen a la subfamilia *Alphaherpesviridae* (VanDevanter *et al.*, 1996, Quackenbush *et al.*, 1998, Une *et al.*, 2000, Stacy *et al.*, 2008). Se ha propuesto el Género *Chelonivirus* para incluir el grupo de herpesvirus que afecta a los quelonios (Stacy *et al.*, 2008, Bicknese *et al.*, 2010).

EPIZOTIOLOGIA

Desde 1975 (Rebbel *et al.*, 1975), los herpesvirus han sido reconocidos como agentes patógenos para los quelonios, incluyendo los galápagos, las tortugas marinas y las tortugas terrestres. Su distribución es mundial, con casos descritos en América, Europa y Sudáfrica (Heldstab y Bestetti, 1982, Cooper *et al.*, 1988, Oettle *et al.*, 1990, Drury *et al.*, 1998, Marschang *et al.*, 1998). Harper *et al.*, (1982) fueron los primeros en describir una partícula compatible con un herpesvirus asociada a una lesión en la región orofaríngea de una tortuga de Florida (*Gopherus polyphemus*) que había permanecido en cautividad desde su nacimiento. Desde esta primera cita, los herpesvirus se han asociado procesos respiratorios, hepáticos, gastrointestinales y nerviosos en diferentes especies de tortugas. No hay relación entre la aparición del proceso y la edad de los animales, ya que puede afectar tanto a animales jóvenes como a los adultos. De hecho, se ha citado un proceso infeccioso respiratorio asociado a herpesvirus en una tortuga del desierto de 60 años (Harper *et al.*, 1982).

En las tortugas terrestres se han descrito tres grandes epizootias por herpesvirus (Jacobson *et al.*, 1985, Une *et al.*, 1999), llegando en uno de los casos a una morbilidad del 50% (Lange *et al.*, 1989). Frost y Schmidt (1997) determinaron, mediante el test de la seroneutralización, prevalencias de 18.5 al 65,2% en siete especies de tortugas. Diferentes estudios han evidenciado, mediante técnicas moleculares (PCR), la infección por herpesvirus en las diferentes especies de tortugas, con prevalencias que oscilan entre el 0,3% y el 25% (Mathes *et al.*, 2001, Soares *et al.*, 2004, Salinas *et al.*, 2011), estando mayormente asociados a enfermedad y en tortugas en régimen de cautividad. Se considera que en la actualidad, las herpesvirosis representan una de las enfermedades más amenazantes para la supervivencia de las tortugas mantenidas en cautividad (Une *et al.*, 2000). En ocasiones, se han descrito mortalidades de hasta el 100% de los animales (Drury, 1998, Drury *et al.*, 1999).

En las tortugas terrestres, al igual que en el resto de los grupos taxonómicos, los herpesvirus muestran una elevada especificidad de hospedador. La susceptibilidad a la infección varía según el Género de tortugas e incluso entre individuos de una misma especie. Por ejemplo, en un transporte mixto, compuesto por tortugas argentinas

(*Chelonoidis* [*Geochelone*] *chilensis*) y tortugas de patas rojas (*Geochelone carbonaria*), estas últimas no resultaron afectadas por la infección mientras que las primeras lo fueron con consecuencias letales (Jacobson *et al.*, 1985). Se desconoce si las tortugas de patas rojas poseen una resistencia natural al herpesvirus que causó la enfermedad en las tortugas argentinas o si fueron infectadas de forma subclínica. En otra población mixta de tortugas, formada por tortugas afganas (*Agrionemys* [*Testudo*] *horsfieldii*), tortugas mediterráneas, tortugas moras y tortugas de patas rojas, sólo las primeras resultaron afectadas, muriendo de forma aguda (Jacobson *et al.*, 1982).

Basándose en la aparente susceptibilidad de los hospedadores, algunos de los herpesvirus aislados en quelonios (*Chelonid herpesviruses*, CHHVs) han sido clasificados como:

- ChHV-1 ("Grey-patch disease virus"). Provocan lesiones cutáneas en las tortugas verdes (*Chelonia mydas*) (Rebell *et al.*, 1975).
- ChHV-2 ("Pacific Pond Turtle virus"). Asociado a necrosis hepática en el galápagos occidental (*Clemmys marmorata*) (Frye *et al.*, 1977).
- ChHV-3 ("Painted Turtle virus"). Asociado a necrosis hepática en la tortuga pintada (*Chrysemys picta*) y en la falsa tortuga mapa (*Graptemys pseudogeographica*) (Cox *et al.*, 1980, Jacobson *et al.*, 1982).
- ChHV-4 ("Argentine Tortoise virus"). Provoca estomatitis necrosante en las tortugas argentinas (Jacobson *et al.*, 1985).

Mediante técnicas PCR y de secuenciación molecular se ha realizado otra clasificación, con cuatro genotipos de herpesvirus de tortugas (TeHV):

- TeHV1. Tortuga afgana (*Agrionemys* [*Testudo*] *horsfieldii*), tortuga packake (*Malacochersus tornieri*), tortuga mora, tortuga griega (*Testudo ibera*) (Une *et al.*, 2000, Murakami *et al.*, 2001, Stöhr y Marschang, 2010, Salinas *et al.*, 2011).
- TeHV2. Tortuga del desierto californiana, tortuga afgana (*Agrionemys* [*Testudo*] *horsfieldii*), tortuga mora, tortuga griega (*Testudo ibera*) (Johnson *et al.*, 2005, Bicknese *et al.*, 2010, Salinas *et al.*, 2011).
- TeHV3. Tortuga afgana (Marschang *et al.*, 2006, Bicknese *et al.*, 2010).
- TeHV4. Bowsprit tortoise (*Chersina angulata*). (Bicknese *et al.*, 2010).

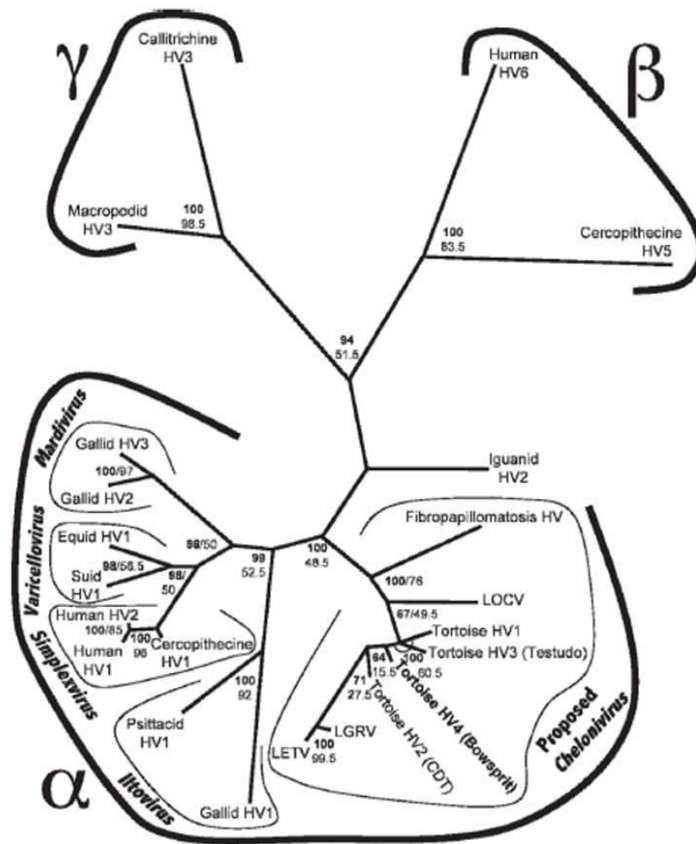


Figura 6. Árbol filogenético de los herpesvirus animales y humanos (Bicknese *et al.*, 2010).

TRANSMISIÓN

La mayoría de los herpesvirus se transmiten de forma directa desde un individuo susceptible a otro. Las tortugas con signos respiratorios excretan grandes cantidades de partículas virales a través de sus secreciones respiratorias. Aquellas con enfermedad gastrointestinal o hepática las excretan a través de la saliva o bien con sus heces (Harper *et al.*, 1982, Jacobson *et al.*, 1985., Cooper *et al.*, 1988). En la mayoría de los casos descritos en las tortugas la vía de transmisión es la horizontal, aunque el hallazgo de partículas virales en el epitelio testicular (Müller *et al.*, 1990, Origgi *et al.*, 2000) sugiere la posible existencia de una transmisión vertical.

Los herpesvirus suelen inducir enfermedades latentes con períodos de excreción viral provocados por factores estresantes como la malnutrición, las enfermedades

concomitantes, las variaciones térmicas (por exceso o por defecto), la actividad sexual dentro de una colonia y la introducción de nuevos animales. La excreción viral no se asocia necesariamente con la aparición de signos clínicos. En aquellas especies que hibernan (tortuga mediterránea, tortuga mora y tortuga rusa o afgana) la enfermedad suele estar asociada con el final de la hibernación, en la primavera. Incluso se ha descrito que algunas especies, como la tortuga mora, pueden ser un reservorio de diferentes cepas de herpesvirus (Drury *et al.*, 1999, Teifke *et al.*, 2000).

La transmisión de los herpesvirus también puede estar influenciada por las condiciones higiénicas del terrario (la mala calidad del aire y del agua, la acumulación de excrementos), la densidad y diversidad de especies mantenidas, la distancia entre los diferentes terrarios, la condición sanitaria de los especímenes mantenidos en cautividad y las cepas del virus.

SÍNTOMAS, LESIONES MACROSCÓPICAS Y MICROSCÓPICAS

Algunos autores consideran la estomatitis por herpesvirus como la causa más importante de enfermedad del tracto digestivo superior en las tortugas (Heldstab y Bestetti, 1976). Las tortugas afectadas presentan letargia, anorexia, regurgitación, descarga nasal y ocular serosa-mucopurulenta bilateral, faringitis, glositis, neumonía y abscesos faríngeos (Harper *et al.*, 1982, Cooper *et al.*, 1988, Jacobson, 1994). La ataxia está presente en las tortugas con afectación del sistema nervoso central (Heldstab y Bestetti, 1976).

Los cambios patológicos observados en las tortugas infectadas varían en función de la cepa de herpesvirus implicada, de la especie de tortuga y del individuo. Con frecuencia se observan lesiones ulcerativas en la mucosa respiratoria y gastrointestinal, estomatitis y glositis necrosante con presencia de placas diftéricas. Otras lesiones que pueden aparecer son bronquitis necrosante, neumonía acompañada de enfisema, enteritis y hepatomegalia, y con menor frecuencia hepatitis, degeneración grasa del hígado y atrofia del tejido adiposo (Pettan-Brewer *et al.*, 1996, Marschang, 1999). Aquellas cercanas a la glotis causan disnea grave, especialmente cuando se produce una infección secundaria bacteriana o fúngica (Schumacher, 1997, Origgi *et al.*, 2000).

En la tortuga mediterránea suele presentarse glositis, estomatitis, enteritis y meningoencefalitis (Lange *et al.*, 1989, Müller *et al.*, 1990). En la tortuga rusa o afgana suelen ser estomatitis y enteritis (Lange *et al.*, 1989). Las tortugas del desierto americanas suelen exhibir estomatitis, faringitis, traqueítis y neumonía (Harper *et al.*, 1982, Johnson *et al.*, 2005). La estomatitis es la lesión más frecuente en las tortugas argentinas, siendo también descrita en la tortuga de patas amarillas y en la tortuga leopardo (*Stigmochelys pardalis*) (Marschang *et al.*, 1998, Drury *et al.*, 1999). En la tortuga mora suele presentarse estomatitis y encefalitis, aunque también se pueden producir episodios de rinitis seromucosa afectando a grandes poblaciones (Jacobson *et al.*, 1985, 1986, Martínez-Silvestre y Mateu, 1997, Martínez-Silvestre *et al.*, 1999). Estos brotes formaron parte de una serie de episodios graves de rinitis que fueron descritos en Europa durante la década de los 90. En la mayoría de los casos, el brote aparecía tras la introducción de nuevos animales en colecciones que incluían diferentes especies de tortugas. Se sospecha que la tortuga mora fue la especie portadora asintomática del herpesvirus, siendo las otras especies las afectadas y en muchos casos las que sucumbían a la infección viral.

Histológicamente, las infecciones por herpesvirus producen necrosis epitelial difusa, con infiltrado mixto inflamatorio y bacteriano, particularmente bacterias gram negativas (Harper *et al.*, 1982, Jacobson *et al.*, 1985, Cooper *et al.*, 1988, Jacobson, 1991). Suelen ir acompañadas por la presencia de cuerpos de inclusión eosinofílicos de gran tamaño en las células epiteliales degeneradas de la lengua, mucosa palatina, esófago, estómago, intestinos, cloaca, hígado, páncreas, tráquea, bronquios, alveolos, células endoteliales, glomérulos, neuronas y células gliales (Frye *et al.*, 1977, Cox *et al.*, 1980, Harper *et al.*, 1982, Jacobson *et al.*, 1982, Jacobson, 1985, Cooper *et al.*, 1988, Jacobson, 1991, Posthaus *et al.*, 1997, Drury *et al.*, 1998, Marschang *et al.*, 1998, Origgi *et al.*, 2000). Las extensas lesiones orales pueden tener más relación con la liberación de componentes citotóxicos por parte de las células inflamatorias o por las alteraciones vasculares.

Se han descrito también lesiones linfoproliferativas en el hígado y bazo (Drury *et al.*, 1998, McArthur, 1998, Drury *et al.*, 1999). Al igual a lo descrito en el hombre y en otras especies animales, se ha observado en las tortugas un importante neurotropismo en las

infecciones por herpesvirus (Origgi *et al.*, 2004). Müller *et al.* (1990) también describió en las tortugas un marcado endoteliotropismo, con resultado de una vasculitis necrotizante generalizada, con la aparición de trombos y hemorragias (Origgi *et al.*, 2004). Este endoteliotropismo ha sido también descrito como característico de los alfaherpesvirus, los cuales incluyen los herpesvirus-1 equinos, herpesvirus-1 bovinos y los herpesvirus caninos (Kennedy y Müller, 1993).

En la infección del epitelio respiratorio de las tortugas no se detecta la formación de células sincitiales multinucleadas, tal y como ocurre en los herpesvirus-1 bovinos y en la laringotraqueitis aviar viral (*Alpharherpesviridae*). La presencia de cuerpos de inclusión intranucleares en el epitelio glandular de la lengua sin reacción inflamatoria o destrucción de las glándulas linguales es similar a las lesiones provocadas por los cytomegalovirus porcinos (*Betaherpesviridae*). La infección de las glándulas linguales provoca la excreción viral mediante la saliva en los animales con infección latente o aguda, lo cual explicaría la detección positiva de herpesvirus a partir de hisopos faríngeos en animales sin síntomas de estomatitis (Origgi *et al.*, 2004).

DIAGNÓSTICO

Inicialmente, el diagnóstico puede llevarse a cabo mediante la observación de los cuerpos de inclusión intranucleares por microscopía óptica de secciones tisulares teñidas con hematoxilina/eosina. Se puede observar en los siguientes órganos: lengua, tráquea, bronquios, alveolos, hepatocitos, células epiteliales intestinales, células endoteliales de los capilares, glomérulos renales, neuronas y células de la glía de la médula oblonga y diencéfalo (Jacobson *et al.*, 1985). Sin embargo, el hallazgo de estos cuerpos de inclusión por sí solo no permite un diagnóstico definitivo de la infección por herpesvirus y es necesaria la confirmación mediante otras técnicas.

Igual que ocurre en la infección por herpesvirus en los mamíferos, la transmisión de los viriones se produce por contacto directo célula-célula, sin afectación del espacio extracelular, hecho que los protege frente a los anticuerpos circulantes. Los herpesvirus usan este mecanismo para mantener infecciones que persisten en el tiempo aun cuando el huésped haya creado anticuerpos frente al virus.

Las tortugas que sobreviven a una infección por herpesvirus muestran niveles detectables de anticuerpos neutralizantes, que puede persistir durante varios meses. Se ha detectado en aves, aunque no en reptiles, que hay un incremento en los niveles de anticuerpos neutralizantes durante la excreción del virus (Hitchner y Calnek, 1980, Gaskin, 1989). Los anticuerpos neutralizantes no protegen a las tortugas frente a una reinfección o frente a una reactivación de las mismas, pero sí pueden ser suficientes para evitar la muerte de los animales y facilitar su recuperación clínica. La detección de los anticuerpos neutralizantes y su cuantificación permiten determinar la exposición previa de las tortugas a los herpesvirus (Origgi *et al.*, 2004). La simple detección de anticuerpos neutralizantes en una única muestra sólo indica que ha habido una infección; en cambio, el hallazgo de un incremento de los niveles en dos muestras separadas por 8 o 12 semanas indica una infección activa.

La determinación de los anticuerpos neutralizantes sólo la realizan unos pocos laboratorios de investigación europeos, debido a su laboriosidad, el prolongado período de tiempo para la obtención de un resultado final (10 a 14 días) y a la ausencia de aislados víricos de referencia. Los anticuerpos neutralizantes son tan específicos que se puede dar el caso que aquellos anticuerpos producidos contra una determinada cepa, no neutralicen la cepa de referencia utilizada por un laboratorio (Marschang *et al.*, 2001).

Se ha desarrollado para su uso en tortugas un test ELISA con una elevada sensibilidad y especificidad (Origgi y Jacobson, 1999, Jacobson, 2000, Origgi *et al.*, 2000). Puede ser usado para monitorizar la exposición frente a los herpesvirus de poblaciones de tortugas cautivas o salvajes (Origgi *et al.*, 2001). Ofrece la ventaja de su simplicidad, rapidez de ejecución (1 día) y puede detectar la seroconversión antes que el test de la seroneutralización, ya que la seroconversión frente a los herpesvirus necesita unas 4-7 semanas para ser detectada mediante un ELISA y de 2 a 5 semanas más para ser detectada mediante la seroneutralización. Debido a esto los anticuerpos no son detectables en las primeras fases de la infección. De todas maneras, el antígeno está presente y puede ser detectado mediante técnicas inmunológicas.

El test de la inmunoperoxidasa directa (DIP) se ha desarrollado para el diagnóstico de la infecciones por herpesvirus en tortugas cautivas o en estado salvaje mediante la detección de antígenos específicos en tejidos fijados en formalina e incluidos en bloques de parafina (Origgi *et al.*, 2003). El test de la inmunoperoxidasa indirecta (IIP) sirve tanto para determinar la exposición como la infección por los herpesvirus, ya que detecta la presencia de anticuerpos en el plasma de la tortugas o bien el antígeno en los tejidos. Puede ser usado para complementar o reemplazar la seroneutralización y el test ELISA. Ambas técnicas tienen más versatilidad que la SN y el ELISA, ya que pueden determinar tanto los anticuerpos como los antígenos, y las dos pueden ser usadas en el diagnóstico antemortem (usando plasma o biopsias) y postmortem (mediante muestras histológicas). El principal inconveniente es la subjetividad en la interpretación de los resultados.

El aislamiento vírico puede llevarse a cabo en células TH-1 a partir de material fresco procedente de animales vivos (Kabish y Frost, 1994). Es difícil de realizar por la dificultad de obtener material fresco (animales vivos) y en el mantenimiento de las poblaciones necesarias de cultivos celulares (Marschang *et al.*, 2001).

Para la identificación del virus, se pueden llevar a cabo varias técnicas moleculares, como la PCR a partir de secreciones, excreciones y biopsias. Constituye una técnica altamente sensible y específica (VanDevanter *et al.*, 1996). Murakami *et al.*, (2001) desarrollaron una PCR específica que permite no solo la detección de la infección por herpesvirus, sino también la detección de los portadores asintomáticos y las infecciones latentes. También se han desarrollado técnicas de hibridación *in-situ* para la detección de herpesvirus en muestras de tejidos de tortugas enfermas (Teifke *et al.*, 2000), que detectan el ADN vírico incluso cuando no se detectan cuerpos de inclusión mediante la observación macroscópica en hematoxilina/eosina: Origgi *et al.* (2004) infectaron experimentalmente 5 tortugas moras con herpesvirus Americano Washington State (HV 1976) y Europeo (HV 4295/7R). Ninguna de las tortugas murió, si bien desarrollaron los signos y las lesiones característicos de la infección. No pudieron identificar el virus en las tortugas inoculadas, debido posiblemente al retraso en la recolección del exudado nasal y faríngeo (cuando ya se habían desarrollado los anticuerpos neutralizantes). Una de las

tortugas infectas no desarrolló anticuerpos neutralizantes, aunque se detectó herpesvirus por secuenciación genómica en dos de sus órganos. Curiosamente, esta tortuga resultó ser negativa por PCR en muestras de encéfalo. A diferencia de lo descrito en la literatura referente a una alta mortalidad debida a la infección natural, ningún animal murió. La inmunidad celular podría haber desarrollado un papel importante en la protección frente a la infección, al igual que ocurre en otras especies animales y en el hombre.

Para la caracterización genética de los herpesvirus aislados de las tortugas se han utilizado técnicas de restricción de endonucleasas (Marschang *et al.*, 1997), aunque actualmente todas las clasificaciones se basan en técnicas de PCR y de secuenciación molecular (Une *et al.*, 2000, Murakami *et al.*, 2001, Johnson *et al.*, 2005, Marschang *et al.*, 2006, Bicknese *et al.*, 2010, Stöhr y Marschang, 2010).

2.4. MICOBACTERIOSIS DE LOS REPTILES

El género *Mycobacterium* pertenece a la Familia *Mycobacteriaceae* y comprende alrededor de 150 especies, todas ellas mostrando las mismas características morfológicas: Gram positivas, aerobias, inmóviles (excepto *M. marinum*), no esporuladas, ácido-alcohol resistentes y oportunistas. Su patogenicidad difiere significativamente según la especie.

Por motivos prácticos el género *Mycobacterium* se ha dividido en dos grupos: (1) Complejo *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC), el cual incluye *M. tuberculosis*, agente causal de la tuberculosis en humanos y animales, *M. bovis*, agente etiológico de la tuberculosis bovina, *M. caprae*, especie próxima a *M. bovis*, y al igual que ella causante de tuberculosis en los animales, *M. africanum*, afectando a la especie humana, *M. microti*, que afecta a los topillos y a otros roedores europeos (Clifton-Hadley, 2001), *M. canetti* y *M. pinnipedii* y (2) Micobacterias no tuberculosas (MOTT) o "*non-tuberculos mycobacteria*" (NTM), que comprende: *M. avium* complex y las micobacterias atípicas (Rastogi *et al.*, 2001, Gavier-Widén *et al.*, 2012).

Alrededor de 32 especies y subespecies de micobacterias pueden causar enfermedad en los seres humanos, animales domésticos y animales salvajes. En la mayoría de los casos estas enfermedades son contagiosas, causando infecciones de tipo crónico y mostrando una gran variedad de hospedadores. Los tres grupos implicados en la mayoría de los procesos infecciosos son: *Mycobacterium leprae*, *Mycobacterium avium* complex y *Mycobacterium tuberculosis* complex.

El complejo *Mycobacterium avium* comprende: *M. avium* y *M. intracellulare*. *Mycobacterium avium* incluye las siguientes especies de importancia veterinaria: *M. avium* subsp. *avium*, *M. avium* subsp. *hominissuis*, *M. avium* subsp. *paratuberculosis* y *M. avium* subsp. *sylvaticum* (Gavier-Widén *et al.*, 2012). La primera de ellas, causante de la tuberculosis aviar, es ubiquista. La enfermedad es generalmente diagnosticada en aves salvajes que viven en estrecha relación con los humanos y con aves salvajes mantenidas en cautividad (Friend, 1999). Se supone que la principal ruta de transmisión es la exposición a medios contaminados (agua, comida, tierra). La tuberculosis aviar es avirulenta en los humanos, a menos que estos estén inmunodeprimidos. Los mamíferos salvajes están expuestos a la infección, pero las formas clínicas son raras, a excepción del visón, de varias especies de ratones, cerdos y primates (Friend, 1999, Williams, 2001). *M. a. sylvaticum* ocasiona un proceso similar a la tuberculosis aviar. El organismo es ubiquista y puede provocar enfermedad en aves (especialmente en palomas) y en mamíferos (Williams, 2001). Raramente ocasiona enfermedad clínica en los animales salvajes. *M. a. paratuberculosis* ocasiona la paratuberculosis o enfermedad de John, que afecta por igual animales domésticos (incluido el reno y el ciervo común) y rumiantes salvajes (incluidos los camélidos). Se ha diagnosticado de forma ocasional en conejos y primates (Williams, 2001).

Las micobacterias no tuberculosas (MOTT) son de presencia ubiquista en el medio ambiente. Son aisladas frecuentemente en el agua, en el suelo y en las plantas (Ebani *et al.*, 2012, Holz y Barker, 2012, Skoric *et al.*, 2012). Antes de su secuenciación genómica, Runyon (1970) desarrolló una clasificación para las micobacterias no tuberculosas basada en la velocidad de crecimiento de las colonias y en su pigmentación. El crecimiento podía ser lento (>7 días) o rápido (<7 días). El Grupo I de Runyon consistía

en micobacterias fotocromógenas de crecimiento lento y que formaban pigmento en la luz después de haber crecido en la oscuridad. El Grupo II lo formaban micobacterias scotocromógenas de crecimiento lento que formaban pigmento tanto en la oscuridad como bajo la luz. El Grupo III lo formaban micobacterias no fotocromógenas de crecimiento lento (no formaban pigmento ni en la luz ni en la oscuridad). El Grupo IV eran micobacterias de crecimiento rápido. La mayoría de las micobacterias aisladas en los reptiles forman parte de los grupo I y IV (Brownstein, 1978). Las micobacterias de crecimiento lento y rápido difieren también en su susceptibilidad a los antimicrobianos y en las patologías que inducen en los humanos (Tortolli, 2009).

La micobacteriosis es una infección esporádica en las colecciones de reptiles bien manejadas (Brownstein, 1978, 1984), representando una incidencia anual del 0,1-0,5% del total de patologías infecciosas de los reptiles, lo cual sugiere una resistencia natural de los reptiles a estos patógenos oportunistas. Parece ser que hay una relación de comensal en la mayoría de las situaciones, debido a que la mayoría de las micobacterias que afectan a los reptiles son organismos ubiquistas y a la baja prevalencia de la infección, pudiendo haber una predisposición a padecer la enfermedad por parte de los animales activamente infectados.

La especie más comúnmente aislada en los reptiles es *M. marinum*, seguida de *M. chelonae* y *M. thamnophaeos*. Se han descrito asimismo *M. haemophilum*, *M. kansasii*, *M. agri*, *M. confluentis*, *M. hiberniae*, *M. neoaurum* y *M. nonchromogenicum* (Jacobson, 2007).

M. marinum es ubiquista, saprofítica y fotocromogénica de crecimiento lento (Grupo I de Runyon) y potencialmente patogénica para una amplia variedad de poquiloterms. Griffith (1939) la aisló en el 71% (20 de 28 casos) de micobacteriosis en el Zoo de Londres entre 1924 y 1933. *M. marinum* ha sido aislada o cultivada a partir de granulomas hepáticos y esplénicos en una tortuga de cuello largo (*Chelodina longicollis*) (Schilger *et al.*, 1991), a partir del pulmón de una tortuga boba (*Caretta caretta*) con un nódulo pulmonar (Leong *et al*, 1989) y a partir de diferentes órganos de una tortuga carey (*Eretmochelys imbricata*) con granulomas viscerales (Posthaus, 1997). También ha

sido aislada a partir de las lesiones cutáneas de un grupo de lagartos espinosos egipcios (*Uromastyx aegypticus*) mantenidos en un acuario destinado inicialmente a peces (Morales y Dunker, 2001) y en un dragón barbudo con enfermedad sistémica (Girling y Fraser, 2007).

M. thamnopheos y *M. chelonae* (Grupo IV de Runyon) son, comparadas con *M. marinum*, aisladas con menor frecuencia. *M. thamnopheos* ha sido identificada en una boa constrictor con granulomas hepáticos (Kiel, 1977) y en una culebra rayada (*Thamnophis* spp.) (Aronson, 1929). *M. chelonae* ha sido aislada a partir de una articulación del codo y un nódulo cutáneo, pulmón, hígado, riñón, bazo y pericardio de una tortuga marina de Kemp's con osteoartritis (Greer *et al.*, 2003). *M. chelonae* se aisló también en una boa constrictor con lesiones orales ulcerativas y proliferativas y granulomas paratraqueales, pulmonares y hepáticos (Quesenberry *et al.*, 1986). *M. kansaii*, ha sido identificado en una tortuga china de caparazón blando (*Pelodiscus sinensis*) mantenida en cautividad (Orós *et al.*, 2003) con lesiones en el caparazón y nódulos pulmonares. *M. intracellulare* en una hembra de dragón de Komodo (Skoric *et al.*, 2012) y *M. haemophilum* y *M. marinum* en el pulmón de una pitón real (*Python regius*) con granulomas pulmonares (Hernández-Divers y Sheares, 2002).

En la mayoría de los casos las micobacterias se han identificado a partir de tejidos, sin procederse a su cultivo ni a la identificación de la especie. Tal es el caso de los granulomas pulmonares en una tortuga boba (Friedamn, 1903), en las lesiones del caparazón y pulmonares de una tortuga africana de caparazón blando (*Trionys triunguis*) (Besse, 1949), en una tortuga de Hilaire (*Phrynos hilari hilarii*) con lesiones cutáneas, en bazo, hígado y pulmón (Rhodin y Anver, 1977), en el pulmón de dos tortugas de un total de 104 necropsiadas (Glazebrook, 1990), en los granulomas del corazón, hígado y pulmón de una pitón reticulada (*Python reticulates*), en las lesiones orales necrótico-proliferativas de una víbora ratonera (*Elaphe obsoleta lindheimerii*) (Olson y Woodard, 1974) y en el en el subcutis de cocodrilos con múltiples granulomas caseosos (Ariel *et al.*, 1997).

Soldati *et al.*, (2004), en un estudio retrospectivo de las lesiones granulomatosas encontradas en 90 reptiles necropsiados en la Universidad de Zurich entre 1990 y 1991, encontró, mediante el empleo de la PCR y de la secuenciación genómica, 23 casos positivos (25,6%) para *Mycobacterium*, con 9 identificaciones correspondientes a *M. agri*, *M. chelonae*, *M. confluentis*, *M. haemophilum*, *M. hiberniae*, *M. neoaurum* y *M. nonchromogenicum*. Todas las micobacterias pertenecían al complejo no-tuberculosas. Los autores concluyeron que el diagnóstico de MOTT se debe tener en cuenta siempre que haya una inflamación granulomatosa. Ebani *et al.* (2013), hallaron una prevalencia del 16,59% a partir de las heces de reptiles aparentemente sanos. Todas ellas (*M. chelonae*, *M. fortuitum* y *M. peregrinum*) eran pertenecientes a las de crecimiento rápido (grupo 4).

Las micobacteriosis de los reptiles suelen presentarse con signos de enfermedad crónica, aunque se han descrito casos de episodios agudos. A no ser que presenten afectación cutánea, los animales con enfermedad sistémica presentan síntomas inespecíficos, como son la pérdida de peso, la letargia y la anorexia. La disnea está presente en aquellos con afectación pulmonar. Los nódulos cutáneos o las lesiones ulcerativas cutáneas son fácilmente biopsiables, pudiéndose demostrarla presencia de organismos alcohol-resistentes a partir de frotis o de muestras histológicas.

En las micobacteriosis agudas hay una proliferación extracelular de organismos alcohol-resistentes asociada a necrosis caseosa y a un infiltrado de heterófilos y macrófagos. La presencia de fibroblastos es mínima. En las micobacteriosis crónicas es típica la inflamación granulomatosa con el desarrollo de granulomas. Los granulomas pueden ser masas compactas de macrófagos conteniendo bacilos alcohol-resistentes o estructuras más complejas conteniendo un centro caseoso, envuelto por una gran número de bacilos (Brownstein, 1984).

En general se cree que las infecciones por micobacterias se contraen por ingestión de material o alimentos contaminados y por lesiones en los tegumentos (Morales y Dunker, 2001). En el caso de un dragón barbudo con micobacteriosis sistémica (Girling y Fraser, 2007) se cree que fue la ruta oral después de consumir peces contaminados, potenciado

por una temperatura ambiente subóptima. En el caso de una hembra de dragón de Komodo (Skoric *et al.*, 2012) el origen de la contaminación estaba en el sustrato del terrario y la vía de infección fueron las lesiones cutáneas causadas por el macho durante el período de apareamiento. Greer *et al.*, 2003, también sugieren como vía de entrada de las bacterias la contaminación ocurrida durante la introducción de un microchip identificativo.

Algunas especies de micobacterias son patógenos oportunistas y pueden afectar reptiles mantenidos en condiciones subóptimas lo que conduce a una disminución de la capacidad de respuesta inmunológica y favorece la infección por parte de los patógenos oportunistas (Soldati *et al.*, 2004). El contacto con ambientes contaminados puede ser ocasionalmente responsable de la infección en humanos y animales, especialmente en aquellos inmunosuprimidos, siendo los factores de riesgo el estrés, la malnutrición y las enfermedades de tipo crónico. Son más frecuentes en los reptiles cautivos.

Las posibilidades de tratamiento de las micobacteriosis en los reptiles son escasas, limitándose al empleo de la isoniazida, ethambutol, rifampicina o amikacina (Hoop, 1997, Greer *et al.*, 2003). Greer (2003) utilizó amikacina en una tortuga marina con osteoartritis, siendo ésta posteriormente eutanasiada debido a la falta de respuesta al tratamiento y al mal pronóstico del proceso. Se debería considerar siempre la eutanasia de los animales que presenten enfermedad micobacteriana sistémica, debido al potencial zoonótico de la infección (Marschang y Chitty 2004) y a la dificultad de alcanzar la curación tanto en los animales como en los humanos (Greer *et al.* 2003, Paré

3. Objetivos

El objetivo general de este trabajo es el estudio de diversos aspectos sanitarios de las tortugas terrestres mediterráneas: la evaluación de la conservación de las muestras sanguíneas y el estudio de enfermedades que pueden tener un impacto negativo en poblaciones cautivas.

Los objetivos específicos planteados para conseguir este propósito son los siguientes:

1. Determinar el anticoagulante de elección para la obtención y manipulación de muestras hematológicas en las tortugas terrestres mediterráneas.
2. Demostrar la implicación de los herpesvirus en el complejo rinitis-estomatitis-glositis de las tortugas terrestres mediterráneas.
3. Determinar la implicación de micobacterias atípicas en los procesos granulomatosos de las tortugas terrestres mediterráneas.

4. Estudios

4.1. ESTUDIO I

**Effects of lithium heparin and tripotassium
EDTA on hematologic values of Hermann's
tortoises (*Testudo hermanni*)**

EFFECTS OF LITHIUM HEPARIN AND TRIPOTASSIUM EDTA ON HEMATOLOGIC VALUES OF HERMANN'S TORTOISES (*TESTUDO HERMANNI*)

Jesus Muro, D.V.M., Rafaela Cuenca, D.V.M., Ph.D., Josep Pastor, D.V.M., Ph.D., Luis Vinas, D.V.M., Ph.D., and Santiago Lavin, D.V.M., Ph.D.

Abstract: In an effort to define the effect(s) of lithium heparin and tripotassium EDTA on various hematologic parameters in *Testudo hermanni*, we collected blood samples from 29 clinically healthy adult individuals of both sexes. Portions of each blood sample were transferred to tubes containing either lithium heparin or tripotassium EDTA. The following determinations were made on samples of blood from each anticoagulant: red and white cell counts, packed cell volume, hemoglobin concentration, red cell indices, and differential white cell counts. Due to hemolysis, hematocrits could not be determined from blood samples in EDTA. Further, red blood cell counts were lower in the EDTA samples than in the heparin samples, again due to hemolysis associated with EDTA. However, EDTA did not appear to interfere with hemoglobin determinations. Heparin blood samples provided more optimal blood smears than did EDTA samples, thus differential leucocyte counts were determined only from smears taken from heparin blood samples. Further, thrombocyte and leucocyte aggregation was not observed with heparin use. Thus, heparin is considered the anticoagulant of choice in chelonians for determining red blood cell counts, erythrocyte indices, and hematocrits. When May–Grunwald–Giemsa stain was compared with Diff-Quick, thrombocytes could be more easily differentiated from lymphocytes using the May–Brunwald–Giemsa stain. Heterophil granules seemed to coalesce more when Diff-Quick was used. Eosinophils, basophils, and monocytes were similar in appearance with both staining methods.

Key words: *Testudo hermanni*, hematology values, lithium heparin, tripotassium EDTA, *Chelonia*.

INTRODUCTION

Terrestrial turtles are relatively sedentary, thus making early recognition of disease more difficult. Furthermore, when clinical signs are present, they may be very subtle and/or nonspecific. Hematology in such situations can be a useful aid to diagnosis. The reliability of the hematologic results obtained in chelonians depends on the choice of anticoagulant used. Until recently, the anticoagulant used was based on the clinician's preference, parameters to be studied, and the time elapsed between sampling and analysis.

Anticoagulants most frequently used with chelonian blood have been sodium, lithium, or ammonium heparin; disodium, dipotassium, or tripotassium (K_3) ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA); sodium citrate; or oxalate.¹⁴ EDTA has been used to obtain hematologic reference values.^{1,2,22,33} The concentration of EDTA differed among authors.^{19,32} Some recommended using 5–9 mg/ml,^{12,19} whereas others used 1 mg/ml EDTA.³² EDTA solutions lacking calcium ions have been reported to cause hemolysis of red blood cells of chelonians,^{8,13,16,21} whereas other reports have suggested that the hemolysis is due to an osmotic effect of

the anticoagulant.¹² Because of the difficulties encountered when using EDTA, heparin has been recommended as the anticoagulant of choice.^{4,16,17,31} Heparin appears to preserve the cellular morphology of blood¹⁰ although it has been reported to interfere with the Romanowsky stains and to promote the aggregation of thrombocytes and leucocytes.¹³

The objective of our study was to define and describe the effect of lithium heparin and K_3 EDTA on different hematologic parameters in *Testudo hermanni*.

MATERIAL AND METHODS

Blood samples were collected from 29 clinically healthy adult Hermann's tortoises (*Testudo hermanni*) of both sexes. The tortoises were long-term captives, living outdoors in semifree conditions. The animals were from three different populations. Samples were obtained at the end of April in all three populations to minimize the effects of season and endocrine influences on hematologic results.^{6,9,20,25} The tortoises were manually restrained and blood samples were collected from the dorsal coccygeal vein^{28,31} with 26-gauge needles and 1-ml syringes. One-half-milliliter samples were transferred to lithium heparin-containing microtainer tubes and to K_3 EDTA-containing microtainer tubes (Microtainer Brand Tubes, Becton Dickinson and Co., New Jersey, USA). The tubes were manually inverted several times to avoid clot formation. He-

From the Veterinary, Clinica Veterinaria Prat de la Creu, Andorra la Vella, Andorra, Spain (Muro); and the Department of Veterinary Medicine, Facultad de Veterinaria, Universidad Autonoma de Barcelona, Spain (Cuenca, Pastor, Vinas, Lavin).

Table 1. Hematology values (mean \pm 1 SD) of *Testudo hermanni* obtained with two anticoagulants.

Parameters	n	Heparin	K ₃ EDTA
RBC ($\times 10^6/\mu\text{l}$)	26	0.49 \pm 0.17	0.38 \pm 0.13*
HGB (g/dl)	16	6.88 \pm 1.51	6.89 \pm 1.35
MCH (pg)	16	123.83 \pm 27.96	129.59 \pm 24.25
WBC ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	26	6.88 \pm 2.64	7.33 \pm 2.79

* Statistically significant difference ($P < 0.01$).

matologic determinations were made within 6 hr of collection.

Red and white blood cell counts (RBCs and WBCs, respectively) were measured in a Neubauer hemocytometer chamber (Rudolf Brand GMBH & Co., Wertheim, Germany) with Natt and Herrick's solution²⁴ at 1/100 dilution for both cell counts. The erythrocytes were counted in the four corner squares and the center square (each square 0.04 mm²) of the center 1 mm². The number of red cells counted was multiplied by five to obtain a count per microliter. For the WBC, the whole 1-mm² square was counted and the result multiplied by 1,000 to obtain a count per microliter. The packed cell volume (PCV) was determined by using a microhematocrit centrifuge (9,072 g for 5 min). The cyanomethemoglobin method was used to measure the hemoglobin (HGB) concentration.⁷ Samples were centrifuged to remove the cell debris and the nuclei of lysed red cells prior to reading the turbidity in a photometer (4010 Photometer, Boehringer Mannheim, Hamburg, Germany).⁵ Two smears were made for each blood sample. One smear was stained with a commercial stain, Diff-Quick (Química Clínica Aplicada S. A., Amposta, Tarragona, Spain). The second smear was stained with a Romanovsky stain (May-Grunwald-Giemsa).

Fifty red blood cells from each smear were measured with an ocular micrometer. The surface areas (A) of the red cells and nucleus were calculated according to the formula: $A = (\pi) \cdot a \cdot b$, a and b being the longest and shortest ratios, respectively. Cytoplasmic and nuclear ratios were calculated by dividing their respective lengths by widths. Area ratio was calculated by dividing cell area by nucleus area.

Percentage of leukocytes was determined by observation of 100 leucocytes under the microscope on the best 10 heparinized blood smears from 10 different animals.

Because we could not collect enough blood from all animals at the same time to make all of the determinations, we had to compare the two

anticoagulants in only 26 (RBC and WBC) and 16 (HGB and MCH) tortoises. Paired *t*-tests were used to compare heparin and K₃EDTA blood for RBC, WBC, HGB, PCV, and red cell indices. Analysis of variance for repeated measures was used to compare the erythrocyte dimensions and surface area of the blood obtained with the two anticoagulants and stained by the two methods noted above.

RESULTS AND DISCUSSION

The hematologic findings obtained from clinically normal adult *Testudo hermanni* with two different anticoagulants are listed in Tables 1–4. The hematocrit could not be determined in EDTA blood samples because of the hemolysis encountered when this anticoagulant was used. In our study, RBCs with EDTA should be interpreted with caution because some erythrocytes were lysed. Statistically significant differences were found in RBCs between blood samples obtained with EDTA and those obtained with heparin as the anticoagulant ($P < 0.01$). EDTA may cause hemolysis of the blood of chelonians and some other reptiles.^{8,13,16} The most likely cause of the observed hemolysis may be the lack of calcium ions or an osmotic effect induced by this anticoagulant.^{12,21} EDTA does not appear to interfere with hemoglobin determination.

RBCs, hematocrit values, and HGB concentration values obtained in the lithium heparin samples were lower than those reported in *Testudo hermanni*,^{15,26} slightly below those published in *Gopherus agassizii*,¹⁸ and similar to those described in *Testudo graeca*^{9,10,20} and in *Gopherus polyphemus*.³³

The major differences between our results and those obtained by other authors²⁶ in *Testudo hermanni* can be attributed to different counting methods used in their study and the fact that their blood samples were obtained during hibernation, during which RBC, PCV, and HGB values are considerably higher than in other seasonal periods.^{9,23}

Mean corpuscular hemoglobin (MCH) and mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC)

Table 2. Erythrocyte dimensions and surface area (mean \pm 1 SD) of *Testudo hermanni*.^a

Stain:	May-Grünwald-Giemsa		Diff-Quick		
	Anticoagulant:	Heparin	K ₃ EDTA	Heparin	K ₃ EDTA
Cell length (μm)		18.12 \pm 0.86	18.26 \pm 1.18	18.38 \pm 0.62	18.21 \pm 1.15
Cell width (μm)		10.50 \pm 0.63	12.22 \pm 0.80	10.87 \pm 1.03	12.07 \pm 0.95
Cell ratio		1.73 \pm 0.92	1.51 \pm 0.14	1.71 \pm 0.14	1.52 \pm 0.13
Cell area (μm^2)		150.23 \pm 14.66	175.43 \pm 17.54	157.15 \pm 16.75	173.81 \pm 19.35
Nucleus length (μm)		6.10 \pm 10.61	6.11 \pm 0.68	6.28 \pm 0.61	6.51 \pm 0.39
Nucleus width (μm)		4.22 \pm 0.58	5.20 \pm 0.64	4.47 \pm 0.49	5.26 \pm 0.53
Nucleus ratio		1.47 \pm 0.16	1.19 \pm 0.70	1.41 \pm 0.13	1.25 \pm 0.11
Nucleus area (μm^2)		20.42 \pm 4.15	24.22 \pm 7.73	22.17 \pm 4.10	23.74 \pm 9.64
Ratio cell/nucleus area		7.50 \pm 1.46	7.14 \pm 1.51	7.23 \pm 0.98	6.49 \pm 0.61

^a No significant difference was observed between anticoagulants or stains.

values reported for *Gopherus agassizii* are within the range of our values; however, the mean corpuscular volume (MCV) was lower.¹⁸ There were no significant statistical differences observed in erythrocyte dimensions with regard to the staining method or anticoagulant used. The values for red cell length and width in our work were lower than those reported by other authors.²⁶ However, our results were in the same range as those reported for *Testudo graeca*.^{10,30}

Total leucocyte counts appear to be particularly variable in reptiles. Some of the variation seems to be geographic^{9,27} or seasonal.^{9,20} Our values were higher than those reported in *Gopherus agassizii*¹⁸ and *Testudo graeca* and *Testudo hermanni*²⁰ but similar to those described in *Chelodina longicollis*.¹¹ Differential leucocyte counts were determined only in heparin blood samples because K₃EDTA did not produce optimal blood smears for differential counts.

The relative leucocyte count was essentially similar to the values reported for *Gopherus agassizii*,¹⁸ *Chelodina longicollis*,²⁹ and *Testudo graeca* and *Testudo hermanni*.²⁰ The relative eosinophil count was significantly higher than the values reported in other species of chelonians.^{18,33} The relative baso-

phil count was lower than that described in *Gopherus agassizii*,¹⁸ and *Mauromys leprosa*.¹² Although some authors point out that basophils are easily identified, we found that in some instances metachromatic granules were so dense they gave the appearance of a free nucleus from an unidentifiable cell.

Lymphocyte values higher than those obtained in our study have been reported in *Gopherus polyphemus*.³³ This difference could be due to the fact that lymphocytes can easily be confused with either thrombocytes or basophilic erythroblasts, and they can vary on a seasonal basis. Our lymphocyte values agree with those reported in *Testudo graeca* and *Testudo hermanni* in which blood was drawn in the same month.²⁰

Morphologic cell changes were observed with the two different stains in our study. Thrombocytes were more easily differentiated from lymphocytes with the May-Grünwald-Giemsa stain. The granules in heterophils were more often coalesced when Diff-Quick was used and occurred less frequently with May-Grünwald-Giemsa.²³ Eosinophils were similar in appearance with both stains; however, the nucleus and cytoplasmic

Table 3. Differential leucocyte percentages ($n = 10$; mean \pm 1 SD).

	Heparin	
	May-Grünwald-Giemsa	Diff-Quick
Lymphocyte	22.1 \pm 10.42	22.9 \pm 10.86
Monocyte	3.7 \pm 2.54	2.3 \pm 2.26
Heterophil	50.3 \pm 14.35	46.9 \pm 9.84
Eosinophil	21.0 \pm 16.26	25.5 \pm 14.25
Basophil	2.5 \pm 2.12	1.5 \pm 0.85

Table 4. Hematologic parameters (mean \pm 1 SD) from 29 *Testudo hermanni* determined from heparinized blood samples.

Parameter	Heparin
RBC ($\times 10^6/\mu\text{l}$)	0.49 \pm 0.18
HCT (%)	24.44 \pm 8.99
HGB (g/dl)	6.14 \pm 1.93
MCV (fl)	514.8 \pm 168.2
MCH (pg)	122.64 \pm 26.82
MCHC (g/dl)	26.32 \pm 6.24
WBC ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	7.24 \pm 3.59

granules stained only moderately with the Diff-Quick stain. We observed no important morphologic differences between basophils and monocytes with the two different stains.

In conclusion, K_2EDTA is a poor choice of anticoagulant for chelonian species because it decreases the PCV and erythrocyte count due to its tendency to cause hemolysis and did not produce smears adequate for a differential count. Heparinized samples resulted in less clustering of thrombocytes and leukocytes, and smears made from heparinized blood samples stained better than smears from EDTA samples. Differentiation of thrombocytes from lymphocytes and heterophils from eosinophils was much easier when the May-Grunwald-Giemsa stain was used. We agree with those authors who have reported that heparin is the anticoagulant of choice for hematologic determinations in chelonians.^{3,13,16}

LITERATURE CITED

- Alleman, A. R., E. R. Jacobson, and R. E. Raskin. 1992. Morphologic and cytochemical characteristics of blood cells from desert tortoise (*Gopherus agassizii*). *Am. J. Vet. Res.* 53: 1645–1651.
- Bolten, A. B., and K. Bjorndal. 1992. Blood profiles for a wild population of green turtles (*Chelonia mydas*) in the southern Bahamas: size-specific and sex-specific relationship. *J. Wildl. Dis.* 28: 407–413.
- Bolten, A. B., E. R. Jacobson, and K. A. Bjorndal. 1992. Effects of anticoagulant and autoanalyzer on blood biochemical values of loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*). *Am. J. Vet. Res.* 53: 2224–2227.
- Bourdeau, P. 1989. *Pathologie des tortues*. Point Vet. 21: 52.
- Campbell, T. W. 1988. *Avian Hematology and Cytology*. Iowa State Univ. Press, Ames, Iowa.
- Cheylan, M. 1989. *Biologie et Ecologie de la tortue d'Hermann*. Ecole Pratique des Hautes études, Montpellier, France.
- Dein, F. J. 1984. *Laboratory Manual of Avian Hematology*. E. Northport, Association of Avian Veterinarians, New York, New York.
- Dessauer, H. C. 1970. Blood chemistry of reptiles: physiological and evolutionary aspects. *In: Gans, C. and T. S. Parsons (eds.). Biology of the Reptilia*, vol. 3. Academic Press, New York, New York, Pp. 1–72.
- Duguy, R. 1970. Numbers of blood cells and their variation. *In: Gans, C. and T. S. Parsons (eds.). Biology of the Reptilia*, vol. 3. Academic Press, New York, New York. Pp. 73–109.
- Frye, F. L. 1991. Haematology as applied to clinical reptile medicine. *In: Reptile Care. An Atlas of Diseases and Treatment*, vol. 1. T.F.H. Publications Inc., Neptune City, New Jersey. Pp. 211–277.
- Haigh, S. A. 1991. Characterization of the Blood Cells and the Establishment of Haematological and Biochemical Reference Intervals for the Eastern Long-neck Tortoise (*Chelodina longicollis*). Thesis, Univ. Sydney, Sydney, Australia.
- Hattingh, J., and E. M. Smith. 1976. Anticoagulants for avian and reptilian blood: heparin and EDTA. *Pelügers Arch.* 363: 267–269.
- Hawkey, C. M., and T. B. Dennet. 1989. *A Colour Atlas of Comparative Veterinary Haematology*. Wolfe Medical Publications Ltd., London, UK.
- Horne, F., and Ch. Findeisen. 1977. Aspects of fasting metabolism in the desert tortoise *Gopherus berlandieri*. *Comp. Biochem. Physiol.* 58: 21–26.
- Jackson, O. F. 1991. Chelonians. *In: Beynon, P. H., and J. E. Cooper (eds.). Manual of Exotic Pets*. B.S.A.V.A., Cheltenham, UK. P. 232.
- Jacobson, E. R. 1987. Reptiles. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* 17: 1203–1225.
- Jacobson, E. R. 1992. Laboratory investigations. *In: Beynon, P. H. (ed.). Manual of Reptiles*. B.S.A.V.A., Cheltenham, UK. Pp. 50–53.
- Jacobson, E. R., J. M. Gaskin, M. B. Brown, R. K. Harris, C. H. Gardiner, J. L. LaPointe, H. P. Adams, and C. Reggiardo. 1991. Chronic upper respiratory tract disease in free-ranging desert tortoises (*Xerobates agassizii*). *J. Wildl. Dis.* 27: 296–316.
- Lawrence, K. 1985. *An Introduction to Haematology and Blood Chemistry of the Reptilia*. Reptiles, British Herpetological Society, London, UK.
- Lawrence, K., and C. Hawkey. 1986. Seasonal variations in haematological data from Mediterranean tortoises (*Testudo graeca* and *Testudo hermanni* in captivity. *Res. Vet. Sci.* 40: 225–230.
- Lyman, R. A. 1945. The anti-hemolytic function of calcium in the blood of the snapping turtle (*Chelydra serpentina*). *J. Cell. Comp. Physiol.* 25: 65–73.
- Marks, S. K., and S. B. Citino. 1990. Hematology and serum chemistry of the radiated tortoise (*Testudo radiata*). *J. Zoo Wildl. Med.* 21: 342–344.
- McCracken, H. 1993. *Reptilian Haematology and Blood Chemistry. Clinical Pathology*. The J. D. Stewart Memorial Refresher Course for Veterinarians. Proceedings 207, Univ. Sydney, Sydney, Australia.
- Natt, M. P., and C. A. Herrick. 1952. A new blood diluent for counting the erythrocytes and leucocytes of the chicken. *Poult. Sci.* 31: 735–738.
- Pages, T., V. Peinado, and J. Palomeque. 1992. Seasonal changes in hematology and blood chemistry of the freshwater turtle *Mauremys caspica leprosa*. *Comp. Biochem. Physiol.* 103: 275–278.
- Palomeque, J., P. Sese, and J. Planas. Respiratory properties of the blood of turtles. *Comp. Biochem. Physiol.* 57: 479–482.
- Pienaar, U. V. 1962. *Hematology of Some South African Reptiles*. Witwatersrand Univ. Press, Johannesburg, South Africa.
- Richter, A. G., J. Olsen, K. Fletcher, K. Benirschke, and M. Bogart. 1977. Techniques for collecting blood from Galapagos tortoises and box turtles. *Vet. Med. Small Anim. Clin.* 72: 1376–1378.
- Roskopf, W. J. 1982. Normal hemogram and

blood chemistry values for California desert tortoises. *Vet. Med. Small Anim. Clin.* 77: 85–87.

30. Saint Girons, M. 1970. Morphology of the circulating blood cells. *In: Gans, C., and T. S. Parsons (eds.). Biology of the Reptilia, vol. 3.* Academic Press, New York, New York. Pp. 73–91.

31. Samour, H. J., D. Risley, T. March, B. Savage, O. Nieva, and D. M. Jones. 1984. Blood sampling techniques in reptiles. *Vet. Rec.* 114: 472–476.

32. Stephens, G., and J. S. Creekmore. 1983. Blood collection by cardiac puncture in conscious turtles. *Copeia* 2: 522–523.

33. Taylor, R. W., and E. R. Jacobson. 1982. Hematology and serum chemistry of the Gopher tortoise, *Gopherus polyphemus*. *Comp. Biochem. Physiol.* 72: 425–428.

Received for publication 2 August 1995.

4.2. ESTUDIO II

Chronic rhinitis associated with herpesviral infection in captive spur-thighed tortoises from Spain

CHRONIC RHINITIS ASSOCIATED WITH HERPESVIRAL INFECTION IN CAPTIVE SPUR-THIGHED TORTOISES FROM SPAIN

J. Muro,¹ A. Ramis,² J. Pastor,² R. Velarde,² J. Tarres,² and S. Lavin^{2,3}

¹ Clínica Veterinaria Prat de la Creu, c/Prat de la Creu, 24, bloc H, Andorra la Vella, Principality of Andorra, Spain

² Department of Animal Pathology and Animal Science, School of Veterinary Medicine, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193. Bellaterra, Barcelona, Spain.

³ Corresponding author (e-mail: IVPP4@cc.uab.es)

ABSTRACT: An epidemic of chronic rhinitis in a population of 50 captive spur-thighed tortoises (*Testudo graeca graeca*) from Palafrugell (Girona, Spain) is described, in which eight animals died and 12 were euthanatized to perform necropsies and post-mortem studies. The main clinical sign was a bilateral, seromucous rhinitis often accompanied by stomatitis and glossitis. Hematology and serum biochemistry were performed in 33 of the 50 ill animals and in 29 healthy tortoises from three disease-free populations. Lymphocyte count, aspartate aminotransferase (AST) activity, and α -globulin levels were significantly higher in the animals from the sick population. The heterophil count was significantly lower in the sick animals. Some of the diseased tortoises also showed a normocytic-normochromic anemia. Lesions were restricted to the respiratory system and oral cavity. Marked epithelial hyperplasia and presence of a severe mixed inflammatory infiltrate in the epithelium of the oral, nasal, and tracheal mucosae were observed. Electron microscopy demonstrated the presence of intracytoplasmic and intranuclear viral particles of the size, shape, and distribution pattern typical of a herpesvirus.

Key words: Chronic rhinitis, epidemic, herpesviral infection, spur-thighed tortoise, *Testudo graeca graeca*.

INTRODUCTION

Spur-thighed (*Testudo graeca graeca*) and Hermann's (*Testudo hermanni hermanni*) tortoises are the two species that live in the Iberian Peninsula. Their natural distribution was originally in Northern Africa (from Morocco to Libya) and Southern Spain (National Park of Doñana-Huelva, Southern Murcia and Northern Almería, Spain) (Stubbs, 1989). Some colonies also were introduced in Sardinia, Sicily, Malta and continental Italy. Spur-thighed tortoises are endangered species in eastern Europe (Honegger, 1974; Highfield and Martin, 1990). The species is actually included in the International Union for Conservation of Nature and Natural Resources (IUCN) Appendix II (vulnerable) (Stubbs, 1989) and in the European Union regulation 3626/82 Attachment C.

Herpesviral infections in chelonians have been associated with several diseases in different species (Jacobson, 1994; Pettan-Brewer et al., 1996). Herpesviral infections has been associated with stomatitis and enteritis in Hermann's and four-toed (*Agrionemys horsfieldii*) tortoises

(Lange et al., 1989); stomatitis and encephalitis in Hermann's and spur-thighed tortoises (Müller et al., 1990); glossitis and meningoencephalitis in Hermann's tortoises (Heldstab and Bestetti, 1989); and stomatitis in Hermann's and spur-thighed tortoises (Cooper et al., 1988; Braune et al., 1989). Upper respiratory tract diseases, mainly rhinitis, are among the most common diseases affecting captive tortoises (Keymer, 1978; Lawrence and Needham, 1985; Jacobson et al., 1991). Running nose syndrome is a significant potentially transmissible disease of tortoises. Several outbreaks have been described in Europe during recent years, with the main clinical sign being a bilateral, persistent, seromucous rhinitis. Although a viral etiology has been advocated by some authors (Lawrence and Needham, 1985; Highfield, 1993; Jacobson, 1994), the exact causative agent has not been yet identified.

Simultaneously to the above, an epidemic of chronic rhinitis was detected in 1988 in the USA affecting desert tortoises (*Gopherus agassizii*). Electron microscopic studies demonstrated the presence of *My-*

coplasma spp. in the nasal epithelium of all the diseased animals and in one of the controls (Jacobson et al., 1991). However, viral particles were recently identified in lungs, oral and nasal cavity lesions in this species (Pettan-Brewer et al., 1996). Thus, it is postulated that a virus may be responsible for the first stages of this upper respiratory tract disease as it is for the European running nose syndrome, although they also may be different clinical processes. The present study describes the clinical signs, hematological and serum biochemistry changes and microscopic lesions found in a captive population of spur-thighed tortoises with chronic rhinitis due to a herpesviral infection.

MATERIAL AND METHODS

An epidemic of chronic rhinitis was detected in a private collection of tortoises from Palafrugell (Girona, Spain, 46°40'N, 5°20'E). The overall population consisted of 50 adult spur-thighed tortoises, three four-toed tortoises and 12 Hermann's tortoises, but the disease process affected only the spur-thighed tortoises. The spur-thighed tortoises had come from Southern Morocco and had been continuously introduced since 1984. The animals had been reproductively successful at the rate of 100 new tortoises per year until the chronic rhinitis epidemic appeared. All the adult tortoises lived in semi-wild conditions. The diet consisted of a mixture of wild plants from the area and commercial vegetables and fruits (Highfield, 1990; Boyer and Boyer, 1994). There were no extreme temperatures in their restrained habitat; hibernation pattern were similar to those seen in their natural habitat.

In 1990, rhinitis was noticed after the hibernation period in March. This was not coincident with any new importation or introduction. Thirty-three spur-thighed tortoises were affected of the overall population of 50 tortoises and only 12 individuals hatched that year during the hatching period from August to September. Eight tortoises died and 12 were euthanatized. The remaining animals were treated with enrofloxacin (5% Baytril, Bayer AG, Leverkusen, Germany), which controlled the disease (Highfield, 1993; Bonnie et al., 1994).

Two groups of animals were used for this study. The first group (Group I) consisted of 33 clinically ill animals (eight males and 25 females), weighing from 240 to 2,480 g. Twelve of them were euthanatized for the histopatho-

logical study. The second group (Group II) consisted of 29 healthy animals (10 males and 19 females) from three private collections located in the same geographic area and weighing from 360 to 2,420 g. All the tortoises (Groups I and II) were adult animals. Thorough physical examinations as described by Jacobson (1987) and Jackson and Lawton (1992) were performed to identify clinically healthy animals. To establish hematological reference values, animals from three disease-free zoological collections, which had not introduced new animals for 2 yr were studied. Thus, asymptomatic carriers were excluded.

Blood samples were obtained during March and April from Groups I and II by puncture of the dorsal coccygeal vein, using 0.45 × 13 mm needles and 1 to 2 ml syringes (Samour et al., 1984). From each sample, 0.6 ml were introduced in heparinized tubes (Jacobson, 1987; Jacobson et al., 1992) (Microtainer, Becton Dickinson & Co., Rutherford, New Jersey, USA) and 0.6 ml were placed in plastic tubes, allowing them to clot for 30 to 40 min and then centrifuging them at 3,000 (r.p.m.) for 10 min to obtain serum.

All samples were refrigerated (0–4 C) until they were processed for hematology and glucose determinations. Time between sample collection and processing was always <4 hr (Jacobson, 1992). Serum was frozen until biochemical analysis could be performed. Red blood cell and leukocyte counts were manually performed by the hemocytometric method, using modified Natt-Herrick solution (1:100 dilution) and a Neubauer chamber (Campbell, 1996).

Hemoglobin concentration was determined by the cyanomethemoglobin method, using a photometer (4010 Photometer, Boehringer Mannheim, Hamburg, Germany). To avoid false increased values due to the cloudiness produced by free erythrocyte nuclei (Campbell, 1996), readings of the samples were performed after centrifugation at 3,000 (r.p.m.) for 5 min. Hematocrit value was determined by the microhematocrit method, using a microhematocrit centrifuge (Hawksley, Lancing, W Sussex, England) and centrifuging at 16,000 (r.p.m.) for 5 min. Erythrocytic indices, MCV (mean corpuscular volume), MCH (mean corpuscular hemoglobin) and MCHC (mean corpuscular hemoglobin concentration) were calculated using standard formulas (Campbell, 1996). The differential leucocyte count was performed by microscopic identification of 100 cells on a May-Grünwald/Giemsa (Panreac, Barcelona, Spain) stained blood smear, following the identification criteria described by Hawkey and Dennett (1989) and Alleman et al. (1992).

The serum biochemical parameters determined were glucose, total bilirubin, urea, creatinine, uric acid, cholesterol, phosphorus, sodium, potassium, chloride, aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), lactate dehydrogenase (LDH), gamma glutamyltransferase (GGT), alkaline phosphatase (AP), amylase, lipase, total protein concentration, and protein fractions. Most of these parameters were automatically determined at 37 C by a Merck Autoanalyzer (Vitalab Selectra model, Barcelona, Spain), using Merck reagents. Sodium and potassium were determined by a selective electrode photometer (Beckman, Electrolyte 2A model, Fullerton, California, USA).

Serum total proteins were determined by the Biuret method (Jacobson, 1992). Serum protein fractions were separated and quantified by electrophoresis using an ATOM-501 feeder (Sebla, Lyon, France) with an electrophoretic bucket and cellulose acetate bands. Migration was performed with 0.04 M sodium veronal buffer at 200 volts and 50 mA for 28 min. Staining was accomplished with amide black (Panreac, Barcelona, Spain). The obtained fractions were then quantified by photodensitometric read, using the DIGISCAN ATOM-430 photodensitometer (Photodensitometer D.V.S. Sebla, Mod. 1510, Lyon, France).

Due to the presence of an exoskeleton and the inability to explore them, radiology is essential in the diagnosis of clinical processes affecting tortoises (Jackson and Sainsbury, 1992). Two different views, antero-posterior and latero-lateral, were performed on each tortoise to better evaluate both lung fields and to detect pneumonic foci (Jacobson, 1987).

Necropsies of the 12 euthanatized animals from Group I were performed. Euthanasia was by an intracoelomic injection of sodium pentobarbital (Pentobarbital sodique, Sanofi, Libourne, France). The heads of five of these tortoises were bisected longitudinally with an electric saw, complete necropsies were performed following the technique of Cooper (1992). Tissues from all organs were fixed during 24 hours in 10% buffered formalin for their histopathological study. Three mm-thick blocks were then cut and fixed again in 10% buffered formalin for an additional 6 hr. The cut sections were then embedded in paraffin and processed following routine procedures (Bancroft and Stevens, 1992). Four μ m-thick sections were cut from each block and there were stained with hematoxylin and eosin. Tissue blocks for transmission electron microscopy (TEM) were fixed in 2% osmium tetroxide (OsO_4) in Sorensen buffer for 30 min at room temperature and then washed twice in Sorensen buffer for 10

min. One mm-thick semi-thin sections were cut and stained with toluidin blue for light microscopy. Ultra-thin sections were cut and stained with uranyl acetate and lead nitrate for transmission electron microscopy (Bancroft and Stevens, 1992).

A Student-Fisher *t*-test for independent data was used to statistically evaluate the hematological and biochemical parameters between Group I (ill tortoises) and Group II (healthy tortoises) with significant differences set at $P \leq 0.05$.

RESULTS

The main clinical sign of affected tortoises was sialorrhoea, which was bloody in some of the affected animals. The most frequent lesions were stomatitis and glossitis, with presence of bloody ulcers and diphtheric membranes that covered the dorsal surface of the tongue and the hard palate, and even reached the glottis and esophagus in some animals. All the diseased spur-thighed tortoises showed bilateral and persistent rhinitis with serous to mucopurulent nasal discharge, frequently associated with radiographically evident bronchopneumonia. Dyspnea was present in seven animals (23%), which presented increased respiratory sounds, open-mouth breathing and totally extended necks. Two of the animals had large cutaneous ulcers covered by caseous material on the caudal surface of one rear limb. Blepharitis and keratitis were seen in three of the affected animals. One of the tortoises showed a unilateral "arcus lipoides corneae" without hypercholesterolemia.

Hematologic and serum biochemical results of animals from Groups I and II are shown in Tables 1 and 2, respectively. Significant differences between Groups I and II were found in only two of 12 hematological parameters evaluated, lymphocytes and heterophils. Diseased tortoises displayed marked lymphocytosis (mean = 52%) and heteropenia (mean = 35%) with a high percentage of toxic heterophils. Ectopic, pale blue-stained, long intracytoplasmic inclusions were found in lymphocytes from three animals. Similar inclusions also were observed in the cytoplasm

TABLE 1. Hematologic parameters of the spur-thighed tortoises from Spain with (Group I) and without (Group II) rhinitis.

Parameters	Units	Group I ^a		Group II ^b			
		n ^c	Mean	SD ^d	n ^c	Mean	SD ^d
Red blood cell count	10 ¹² /L	21	0.46	0.1	29	0.45	0.1
Hematocrit value	%	16	23.7	7.4	20	21.7	7.7
Hemoglobin concentration	g/L	20	81.1	18.2	22	76.4	31.6
Mean corpuscular volume	fL	16	502.2	117.6	20	471.9	164.6
Mean corpuscular hemoglobin	pg	19	196.5	65.2	22	181.4	87.5
Mean corpuscular hemoglobin concentration	g/L	14	357.0	55.0	19	447.5	25.4
White blood cell count	10 ⁹ /L	22	7.4	4.1	29	8.3	3.9
Lymphocytes ^e	%	13	51.8	19.8	10	19.6	10.2
Monocytes	%	13	6.6	8.3	10	3.7	2.5
Heterophils ^e	%	13	35.3	17.8	10	58.1	14.4
Eosinophils	%	13	4.9	4.2	10	8	3.0
Basophils	%	13	1.5	1.5	10	2.5	2.1

^a Tortoises with rhinitis.

^b Healthy tortoises.

^c Sample size.

^d Standard deviation.

^e $P < 0.05$ between Groups I and II.

of erythrocytes from two of these tortoises. Three of the diseased tortoises also had a normocytic-normochromic anemia. Aspartate aminotransferase (AST) and α -globulin fraction values were significantly higher (mean = 213.34 U/l and 1.11 g/dl, respectively) in Group I than in the control group (Group II). Radiographically, four tortoises had unilateral pneumonia. Hepatomegaly was observed in three animals in which hepatic steatosis was later diagnosed.

At necropsy, a small amount of intracoelomic fat was found in the inguinal and axillary areas. All the necropsied females had ovarian follicles in different maturation stages. The examination of the longitudinally transected heads demonstrated the existence of abundant seromucous secretion in the nasal cavity and upper respiratory airways. Diphtheroid glossitis was found in six animals. The fibrinoid material extended caudally, surrounding the glottis and even reaching the tracheal bifurcation. Two animals showed emphysematous areas in both lungs and the presence of exudate within the airways. Splenomegaly was observed in one tortoise.

Microscopic lesions were found in the respiratory system and the oral cavity. Animals were classified into three groups depending on the degree and type of lesions found. Tortoises in Group A showed non-specific inflammatory lesions in nasal and oral mucosae, animals in Group B displayed similar lesions plus a catarrhal purulent bronchopneumonia, and animals in Group C were those with intranuclear eosinophilic inclusions in epithelial cells of the respiratory system and oral cavity in addition to the lesions previously described for Groups A and/or B.

Group A consisted of seven animals. All had glossitis and stomatitis with marked epithelial hyperplasia, a severe mixed inflammatory infiltrate (mononuclear cells and polymorphonuclear heterophils) in the epithelial lamina propria, and some degree of exocytosis. In the respiratory system, the variable inflammatory reaction was mainly located in the nasal cavity and trachea. Tracheitis was especially intense in two animals, which showed marked epithelial hyperplasia with areas of squamous metaplasia. A severe mixed inflammatory infiltrate in the lamina propria, exocytosis,

TABLE 2. Serum biochemical parameters of the spur-thighed tortoises from Spain with (Group I) and without (Group II) rhinitis.

Parameter	Units	Group I ^a			Group II ^b		
		n ^c	Mean	SD ^d	n ^c	Mean	SD ^d
Glucose	mEq/L	18	66.3	42.9	20	63.1	42.0
Total bilirubin	mg/dl	7	0.4	0.5	16	0.5	0.7
Urea	mg/dl	27	21.4	20.7	20	31.9	22.2
Creatinine	mg/dl	26	0.3	0.5	15	0.5	0.3
Uric acid	mg/dl	16	1.7	1.2	15	1.9	1.1
Cholesterol	mg/dl	17	171.2	68.4	5	124.8	90.1
Phosphorus	mg/dl	2	7.8	1.0	7	8.0	5.9
Sodium	mEq/L	1	122.0	—	8	135.0	15.6
Potassium	mEq/L	2	3.6	0.7	6	3.5	0.9
Chloride	mEq/L	2	219.5	173.2	9	117.0	15.2
AST ^e	UI/L	29	213.3	295.4	24	52.2	40.2
ALT	UI/L	24	9.6	14.5	12	18.9	18.3
LDH	UI/L	12	128.9	285.9	21	121.5	248.4
GGT	UI/L	8	4.5	4.6	9	2.3	2.9
Alkaline phosphatase	UI/L	12	229.2	317.0	17	196.1	219.9
Amilase	UI/L	4	0.5	0.4	19	1.5	1.7
Lipase	UI/L	3	14.3	17.9	17	63.5	80.7
Total proteins	g/dl	24	3.5	1.2	25	3.7	1.9
Albumin	g/dl	7	1.1	0.4	13	1.1	0.6
Globulins							
α ^e	g/dl	6	1.1	0.06	13	0.6	0.3
β	g/dl	6	0.6	0.03	13	0.5	0.2
γ	g/dl	6	0.8	0.03	13	0.7	0.3
Albumin/Globulin ratio		6	0.5	0.1	13	0.6	0.2

^a Tortoises with rhinitis.^b Healthy tortoises.^c Sample size.^d Standard deviation.^e $P < 0.05$ between Groups I and II.

and abundant cell debris in the tracheal lumen. In addition, a slight activation of lung lymphoid aggregates and presence of a mixed inflammatory infiltrate (mononuclear cells and polymorphonuclear heterophils) was observed in the alveolar septa.

The two animals included in Group B showed a catarrhal purulent bronchopneumonia in addition to the lesions described for Group A. Their alveolar spaces were filled with foamy macrophages, polymorphonuclear heterophils (PMNH), coccid bacteria, and abundant cell debris. In Group C, all three animals displayed severe glossitis, stomatitis and fibrino-necrotizing and/or purulent rhinotracheitis with numerous intranuclear eosinophilic inclusions within epithelial cells (Figs. 1, 2). Moreover, the nasal fossae and tracheal

lumen were partially obstructed by large amounts of purulent exudate (PMNH, macrophages, multinucleated giant cells, bacteria and cell debris). One animal showed only a slight activation of lymphoid aggregates and a scarce amount of mixed inflammatory infiltrate in the interstitial tissue of the alveolar septa. A catarrhal purulent bronchopneumonia was observed in the other two animals. Broad necrotic areas with loss of the epithelial layer and abundant fibrin deposits were observed in the trachea of the first animal. Intranuclear eosinophilic inclusions also were observed in the alveolar epithelium of this animal.

The ultrastructural study of nasal, lingual, and tracheal epithelium with intranuclear eosinophilic inclusions revealed

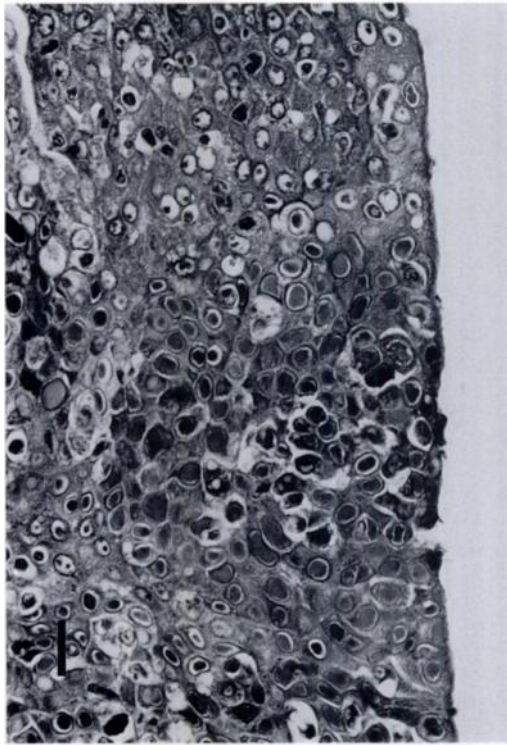


FIGURE 1. Lingual epithelium from a spur-thighed tortoise with herpesvirus infection. The microphotograph shows a marked epithelial hyperplasia, exocytosis of mononuclear cells and multiple intranuclear eosinophilic inclusions in the lingual epithelium. H & E. Bar = 30 μ m.

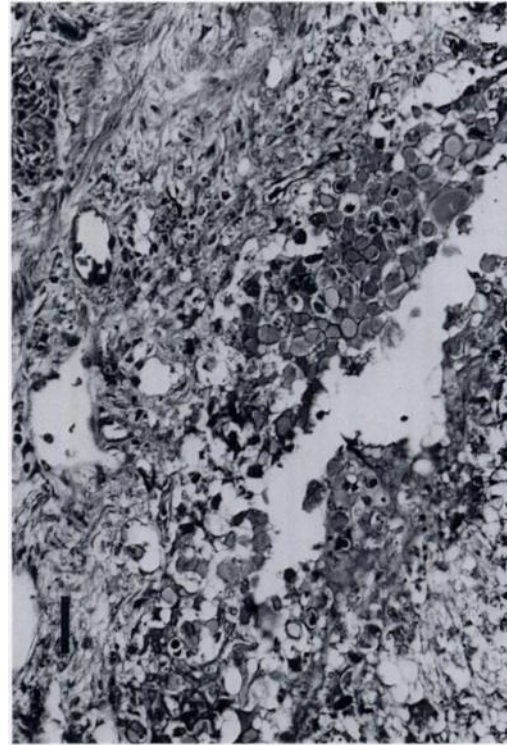


FIGURE 2. Nasal epithelium from a spur-thighed tortoise with herpesvirus infection. The microphotograph shows degenerated and necrotic epithelial cells with multiple intranuclear inclusions in some of them. H & E. Bar = 60 μ m.

intranuclear and intracytoplasmic viral particles (Fig. 3). Intranuclear virions were 130 nm diameter, hexagonal-shaped structures without lipidic envelopes and appeared to be randomly distributed throughout the nucleoplasm. Intracytoplasmic particles were morphologically similar, but showed lipidic envelopes and were bigger (300 nm diameter). They also were distributed randomly throughout the cytoplasm. Their size, morphology and distribution were consistent with those of herpesvirus particles.

DISCUSSION

Clinical signs of diseased tortoises were similar to those described in the running nose syndrome (Jackson, 1991; Highfield, 1993). The first clinical signs observed are nasal discharge, salivation and anorexia,

followed by the appearance of caseous necrosis of membranes on the tongue and oral mucosa; the clinical signs were similar to herpesvirus infection in a desert tortoise (Pettan-Brewer et al., 1996). However, upper respiratory tract signs prevail in the desert tortoise with the upper respiratory tract disease associated with *Mycoplasma* spp. (Jacobson et al., 1991).

Characteristic hematological changes in affected tortoises include heteropenia and lymphocytosis. Since animals that had epithelial viral inclusions in several tissues showed the highest lymphocyte counts, lymphocytosis in these ill tortoises could be associated with herpesvirus infection. Moreover, such animals showed more severe heteropenia and toxic changes in heterophils. Heteropenia and presence of toxic heterophils could be associated with a

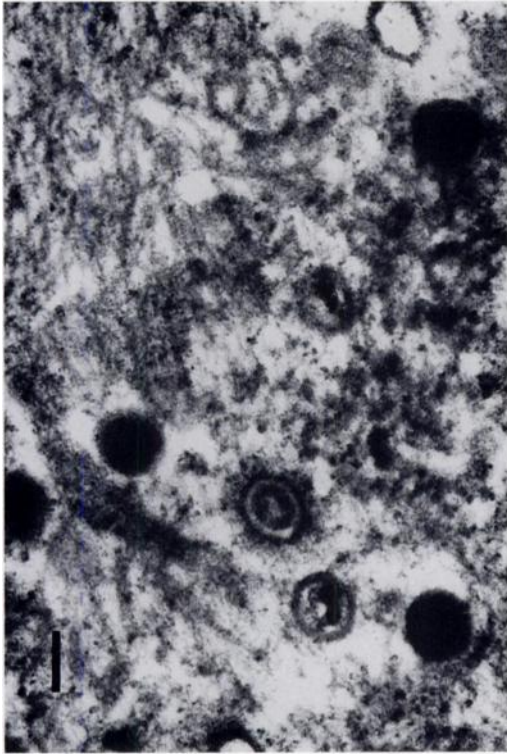


FIGURE 3. Transmission electron micrograph of the lingual epithelium from a spur-thighed tortoise with herpesvirus infection. Intranuclear viral particles have an electron dense core surrounded by a electron dense hexagonal capsid. Bar = 100 μ m.

secondary bacterial infection (Campbell, 1994).

Jacobson et al. (1991) found anemia in desert tortoises with upper respiratory tract disease associated with *Mycoplasma* spp. and related the anemia to chronic inflammation. We found no differences in erythrocyte counts, hematocrit values or hemoglobin concentrations between the diseased and healthy tortoises of our study. However, some of the diseased tortoises showed normocytic-normochromic anemia. The significance of intracytoplasmic inclusion bodies in lymphocytes and erythrocytes remains undetermined. Since they were found in animals with larger amounts of intranuclear inclusion bodies in several tissues, further ultrastructural studies are needed to better clarify their meaning. The significant increases in AST activity

and α -globulin levels in diseased tortoises could be due to the severe tissue necrosis present (Jacobson et al., 1991; Campbell, 1996).

The histopathological lesions found in tongue, oral cavity, trachea, and lungs are similar to those previously described in herpesvirus infections (Harper et al., 1982; Braune et al., 1989; Heldstab and Bestetti, 1989; Lange et al., 1989; Müller et al., 1990; Pettan-Brewer et al., 1996). In contrast, in desert tortoises infected with *Mycoplasma agassizii* the lesions are primarily confined to the nasal cavity (Jacobson et al., 1991; Jacobson et al., 1995). *Mycoplasma* spp. were not seen in our study, but cultures were not performed to rule out their presence.

As in mammalian herpesviruses, the herpesvirus found in our study shows a marked tropism for epithelial tissue. Viral replication takes place in the oral mucosa epithelium, which could mean that transmission from animal to animal is mainly oral. From there, the virus spreads to other organs and systems (Müller et al., 1990). Viral replication also occurs in the respiratory tract, which could be indicative of aerosol transmission. Müller et al. (1990) have suggested vertical transmission for this virus because they found intranuclear viral particles in the ductus deferent epithelium in male tortoises. In our study, ovarian follicles were found in different maturation stages, which could indicate that the process does not affect folliculogenesis. However, egg hatching seemed to be severely diminished.

Herpesviruses often induce persistent and latent infections with irregular periods of disease reactivation and viral shedding. Infected animals may remain asymptomatic for several years (Müller et al., 1990; Gerlach, 1994). Possibly this also occurs in tortoises. The high incidence of the disease during the spring and summer months may be due to activation of latent viruses due to the immunosuppression present after hibernation (Lawrence and Needhan, 1985; Braune et al., 1989).

Highfield (1993) reported mortality rates from 50 to 100% in tortoises affected of running nose syndrome. In our study, eight out of 50 tortoises died during a 5 mo period. Mortality decreased after treatment of secondary bacterial infections with enrofloxacin at 10 mg/kg/day, intramuscularly, for 10 days (Highfield, 1993; Prezant et al., 1994). If the more severely affected animals were not allowed to hibernate, mortality rates also were reduced. Most animals showed signs of rhinitis after hibernation, so they had to be treated again at that time. Using this treatment protocol, all the remaining animals but one were kept alive subsequently. Prognosis of affected tortoises is difficult to assess due to the lack of sustained studies.

The existence of asymptomatic or latently infected animals among recently imported or new introductions of tortoises in their natural habitat hinders disease control. Quarantine periods, serologic testing, PCR tests, lingual prints and cell cultures could be useful for clinical diagnosis and identify carriers (Müller et al., 1990).

LITERATURE CITED

- ALLEMAN, A., E. R. JACOBSON, AND R. E. RASKIN. 1992. Morphologic and cytochemical characteristics of blood cells from the desert tortoise (*Gopherus agassizii*). *American Journal Veterinary Research* 53: 1645-1651.
- BANCROFT, J. D., AND A. STEVENS. 1992. Theory and practice of histochemical techniques. Churchill Livingstone, Edinburgh, UK, 677 pp.
- BONNIE, L. R., M. PAPICH, AND R. A. COOK. 1994. Pharmacokinetics of enrofloxacin after a single intramuscular injection in indian star tortoises (*Geochelone elegans*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 25: 88-94.
- BOYER, D. M., AND T. H. BOYER. 1994. Tortoise care. *Bulletin of the Association of Reptilian and Amphibian Veterinarians* 4: 16-28.
- BRAUNE, S., W. GEIB, AND W. THIEL. 1989. Eine neue durch Herpesviren verursachte Erkrankung bei Landschilkröten. *Tierärztliche Praxis* 17: 416-419.
- CAMPBELL, T. W. 1994. Hematology. *In Avian medicine: Principles and application*. B. W. Ritchie, G. J. Harrison and L. R. Harrison (eds.). Wingers Publishing Inc., Lake Worth, Florida, pp. 176-198.
- . 1996. Clinical pathology. *In Reptile medicine and surgery*. D. R. Mader (ed.). W. B. Saunders Co., Philadelphia, Pennsylvania, pp. 248-257.
- COOPER, J. E., S. GSCHMEISSNER, AND R. D. BONE. 1988. Herpes-like virus particles in necrotic stomatitis of tortoises. *Veterinary Record* 21: 544.
- . 1992. Post-mortem examination. *In Manual of reptiles*. P. Beynon (ed.). British Small Animal Veterinary Association, Cheltenham, UK, pp. 40-45.
- GERLACH, H. 1994. Viruses. *In Avian medicine: Principles and application*. B. W. Ritchie, G. J. Harrison and L. R. Harrison (eds.). Wingers Publishing Inc., Lake Worth, Florida, pp. 874-885.
- HARPER, P. A. W., D. C. HAMMOND, AND W. HEUSCHELE. 1982. A herpesvirus-like agent associated with a pharyngeal abscess in a desert tortoise. *Journal of Wildlife Diseases* 18: 491-494.
- HAWKEY, C. M., AND T. B. DENNETT. 1989. Normal and abnormal red cells, granulocytes, lymphocytes, monocytes and azurophils. *In A colour atlas of comparative veterinary haematology*. C. M. Hawkey and T. B. Dennett (eds.). Wolfe Medical Publications, London, UK, 192 pp.
- HELDSTAB, A., AND G. BESTETTI. 1989. Herpesviridae causing glossitis and meningoencephalitis in land tortoises (*Testudo hermanni*). *Herpetopathologia* 1: 5-9.
- HIGHFIELD, A. C., AND J. MARTIN. 1990. Is there a tortoise AIDS in our midst. *Special Report, Tortoise Trust Newsletter Autumn*: 2-8.
- . 1990. Keeping and breeding tortoises in captivity. Longdunn Press Ltd., Bristol, UK, 149 pp.
- . 1993. Running nose syndrome. *Tortoise Trust Newsletter* 2: 1-2.
- HONEGGER, R. E. 1974. The reptile trade. *In International zoo year book*. The Zoological Society of London, London, UK, 14: 47-52.
- JACKSON, O. F. 1991. Reptiles. Part One. Chelonians. *In Manual of Exotic Pets*. P. H. Beynon and J. E. Cooper (eds.). British Small Animal Veterinary Association, Cheltenham, UK, pp. 221-243.
- , AND P. C. LAWTON. 1992. Examination and diagnostic techniques. *In Manual of exotic pets*. P. H. Beynon and J. E. Cooper (eds.). British Small Animal Veterinary Association, Cheltenham, UK, pp. 32-35.
- , AND A. W. SAINSBURY. 1992. Radiological and Related Investigations. *In Manual of exotic pets*. P. H. Beynon and J. E. Cooper (eds.). British Small Animal Veterinary Association, Cheltenham, UK, pp. 63-66.
- JACOBSON, E. R. 1987. Reptiles. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* 17: 1203-1225.
- , J. M. GASKIN, M. B. BROWN, R. K. HARRIS, C. H. GARDINER, J. L. LAPOINTE, H. P. ADAMS, AND C. REGGIARDO. 1991. Chronic upper respiratory tract disease of free-ranging desert tor-

- toises (*Xerobates agassizii*). *Journal of Wildlife Diseases* 27: 296–316.
- . 1992. Laboratory investigations. In *Manual of exotic pets*. P. H. Beynon and J. E. Cooper (eds.). British Small Animal Veterinary Association, Cheltenham, UK, pp. 50–53.
- , J. SCHUMACHER, AND M. GREEN. 1992. Field and clinical techniques for sampling and handling blood for hematological and selected biochemical determinations in the desert tortoise, *Xerobates agassizii*. *Copeia* 1: 237–241.
- . 1994. Causes of mortality and diseases in tortoises: A review. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 25: 2–17.
- , M. B. BROWN, I. M. SCHUMACHER, B. R. COLLINS, R. K. HARRIS, AND P. A. KLEIN. 1995. Mycoplasmosis and the desert tortoise (*Gopherus agassizii*) in Las Vegas Valley, Nevada. *Chelonian Conservation and Biology* 1: 279–284.
- KEYMER, I. F. 1978. Diseases of Chelonians: (I) Necropsy survey of tortoises. *Veterinary Record* 16: 548–552.
- LANGE, H., W. HERBST, J. M. WIECHERT, AND T. SCHLIEBER. 1989. Elektronenmikroskopischer Nachweis von Herpesviren bei einem Massensterben von griechischen Landschildkröten (*Testudo hermanni*) und Vierzehenschildkröten (*Agrionemys horsfieldii*). *Tierärztliche Praxis* 17: 319–321.
- LAWRENCE, K., AND J. R. NEEDHAM. 1985. Rhinitis in long term captive Mediterranean tortoises (*Testudo graeca* and *T. hermanni*). *Veterinary Record* 21: 662–664.
- MÜLLER, M., W. SACHSSE, AND N. ZANGGER. 1990. Herpesvirus-Epidemie bei griechischen (*Testudo hermanni*) und der maurischen landschildkröte (*Testudo graeca*) in der Schweiz. *Schweizer Archiv für Tierheilkunde* 132: 199–203.
- PETTAN-BREWER, K. C. B., M. L. DREW, E. RAMSAY, F. C. MOHR, AND L. J. LOWENSTINE. 1996. Herpesvirus particles associated with oral and respiratory lesions in a California desert tortoise (*Gopherus agassizii*). *Journal of Wildlife Diseases* 32: 521–526.
- PREZANT, R. M., R. I. ISAZA, AND E. R. JACOBSON. 1994. Plasma concentrations and disposition kinetics of enrofloxacin in gopher tortoises (*Gopherus polyphemus*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 25: 82–87.
- SAMOUR, H. J., D. RISLEY, T. MARCH, B. SAVAGE, O. NIEVA, AND D. M. JONES. 1984. Blood sampling techniques in reptiles. *Veterinary Record* 114: 472–476.
- STUBBS, D. 1989. *Testudo graeca*. In *The conservation biology of tortoises*. I. R. Swinglad and M. W. Klemens (eds.). Occasional Papers of the IUCN Species Survival Commission. Vol. 5, Gland, Switzerland, pp. 31–33.

Received for publication 9 July 1997.

4.3. ESTUDIO III

**Micobacteriosis atípica sistémica en tortuga
mediterránea (*Testudo hermanni*)**

INTRODUCCIÓN

La tortuga mediterránea (*Testudo hermanni*) es una de las dos especies de tortugas terrestres presentes en la Península Ibérica. Las únicas poblaciones en estado salvaje se encuentran en las Islas Baleares y en Cataluña, estando estrictamente protegidas por leyes nacionales e internacionales. Su estatus de conservación se clasifica como vulnerable por la *Internacional Union for Conservation of Nature* (IUCN) (Appendix II).

Las principales amenazas para la supervivencia de la especie se relacionan con los incendios forestales, la fragmentación del hábitat (infraestructuras viarias, urbanizaciones, cultivos) y su recolección como animal de compañía (Merchán y Martínez-Silvestre, 1999). El plan de recuperación para esta especie incluye programas de cría en cautividad junto con la monitorización de las poblaciones salvajes y las reintroducidas (Soler Massana y Martínez-Silvestre, 2005).

En los reptiles cautivos los organismos infecciosos (virus, bacterias, hongos) y parasitarios son la principal causa de mortalidad (Frye, 1991). La mayoría de las bacterias implicadas son Gram negativas. *Aeromonas*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Morganella*, *Providencia*, *Pseudomonas* y *Salmonella* son las más frecuentemente aisladas en los animales enfermos (Mayer y Frank, 1974, Jacobson, 1984). Las infecciones micobacterianas son frecuentes en los reptiles, siendo mayormente diagnosticadas a partir de estudios histológicos de las lesiones.

El Género *Mycobacterium* pertenece a la Familia *Mycobacteriaceae*, comprende alrededor de 150 especies, todas ellas mostrando las mismas características morfológicas: Gram positivas, aerobias, inmóviles (excepto *M. marinum*), no esporuladas, ácido-alcohol resistentes, oportunistas y patógenos obligados. Su patogenicidad difiere significativamente según la especie. Por motivos prácticos el género *Mycobacterium* se ha dividido en dos grupos: (I) Complejo *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC), el cual incluye *M. tuberculosis*, agente causal de la tuberculosis en humanos y animales, *M. bovis*, agente etiológico de la tuberculosis bovina, *M. caprae*, especie próxima a *M. bovis*, y al igual que ella causante de tuberculosis en los

animales, *M. africanum*, afectando a la especie humana, *M. microti*, que afecta a los topillos y a otros roedores europeos, *M. canetti* y *M. pinnipedii* y (2) *Mycobacterium* no tuberculosas (MOTT) o *non-tuberculos mycobacteria* (NTM), que comprende *M. avium* complex y las micobacterias atípicas (Clifton-Hadley, 2001, Rastogi *et al.*, 2001, Gavier-Widén *et al.*, 2012).

Alrededor de 32 especies y subespecies de micobacterias pueden causar enfermedad en los seres humanos, animales domésticos y animales salvajes. En la mayoría de los casos estas enfermedades son contagiosas, causando infecciones de tipo crónico y mostrando una gran variedad de hospedadores. Los tres grupos implicados en la mayoría de los procesos infecciosos son *Mycobacterium leprae*, *Mycobacterium avium* complex y *Mycobacterium tuberculosis* complex.

Las infecciones micobacterianas en reptiles han sido descritas en diferentes especies, incluyendo cocodrilos (Ariel *et al.*, 1997), serpientes (Kiel, 1977, Quesenberry *et al.*, 1986, Hernández-Divers y Shearer, 2002), tortugas (Rhodin y Anver, 1977, Martínez-Silvestre *et al.*, 1991, Greer *et al.*, 2003, Oros *et al.*, 2003, Murray *et al.*, 2009) y saurios (Murray, 1996, Kramer, 2006, Girling y Fraser, 2007) con la afectación de diferentes órganos y sistemas (Olson y Woodard, 1974, Rhodin y Anver 1977, Quesenberry *et al.*, 1986, Hernández-Divers y Shearer, 2002, Girling y Fraser 2007, Roh *et al.*, 2010, Slany *et al.*, 2010). En los reptiles, las principales especies de micobacterias aisladas son: *M. marinum*, *M. chelonae*, *M. thamnophaeos*, seguidas por casos aislados de infección por *M. haemophilum*, *M. kansasii*, *M. agri*, *M. confluentis*, *M. hiberniae*, *M. neoaurum* y *M. nonchromogenicum* (Jacobson, 2007). La especie aislada con mayor frecuencia es *M. marinum*, seguida de *M. chelonae* y *M. thamnophaeos* (Jacobson, 2007).

M. marinum es una bacteria ubiquista, saprofítica y fotocromogénica de crecimiento lento (Grupo I de Runyon) y potencialmente patogénica para una amplia variedad de animales poiquilotermos. Ha sido aislada a partir de granulomas viscerales en diferentes tortugas marinas (Leong *et al.*, 1989, Schilger *et al.*, 1999, Posthaus, 1997), a partir de lesiones cutáneas de un grupo de lagartos espinosos egipcios (*Uromastix aegypticus*) mantenidos en un acuario destinado inicialmente a peces (Morales y Dunker, 2001) y en un

dragón barbudo con enfermedad sistémica (Girling y Fraser, 2007). Griffith (1939) aisló *M. marinum* en el 71% (20 de 28 casos) de micobacteriosis en el Parque Zoológico de Londres entre 1924 y 1933.

M. chelonae ha sido aislada a partir de la articulación del codo y un nódulo cutáneo, pulmón, hígado, riñón, bazo y pericardio de una tortuga bastarda (*Lepidochelys kempii*) con osteoartritis (Greer *et al.*, 2003). *M. chelonae* se aisló también en una boa constrictor con lesiones orales ulcerativas y proliferativas, y granulomas paratraqueales, pulmonares y hepáticos (Quesenberry *et al.*, 1986). *M. thamnophis* ha sido identificada en una boa constrictor con granulomas hepáticos (Kiel, 1977a) y en una serpiente listada (*Thamnophis* spp.) (Aronson, 1929).

Skoric *et al.* (2012) aisló micobacterias en 9 (56,3%) de 16 muestras del terrario de una hembra de dragón de Komodo (*Varanus komodoensis*) y en 6 (37,5%) de 16 muestras del terrario del macho. Las micobacterias identificadas fueron *M. smegmatis*, *M. intracellulare*, *M. a. hominissuis*, *M. peregrinum*, *M. interjectum* y *M. fortuitum*. Soldati *et al.* (2004), en un estudio retrospectivo de las lesiones granulomatosas encontradas en 90 reptiles necropsiados en la Universidad de Zúrich entre 1990 y 1991, encontraron mediante PCR y secuenciación genómica, 23 casos positivos para *Mycobacterium*, con 9 identificaciones para *M. agri*, *M. chelonae*, *M. confluentis*, *M. haemophilum*, *M. hiberniae*, *M. neoaurum* y *M. nonchromogenicum*. *Mycobacterium* sp. se detectó en el 15,6% de los casos mediante la tinción de Ziehl-Neelsen y un 25,6% con técnicas de PCR. Todas las micobacterias pertenecían a las MOTT. Ebani *et al.* (2012) describieron una prevalencia del 16,6% a partir de las heces de reptiles aparentemente sanos. Todas las micobacterias pertenecían al Grupo IV de Runyon (crecimiento rápido): *M. chelonae*, *M. fortuitum* y *M. peregrinum*. *M. kansaii*, perteneciente al Grupo I de Runyon, ha sido identificado en una tortuga china de caparazón blando (*Pelodiscus sinensis*) mantenida en cautividad (Orós *et al.*, 2003) con lesiones en el caparazón y nódulos pulmonares.

Parece ser que hay una relación comensal en la mayoría de las situaciones, debido a que la mayoría de las micobacterias que afectan a los reptiles son organismos ubicuos y a la baja prevalencia de la infección, pudiendo haber una predisposición a padecer la enfermedad por parte de los animales activamente infectados. Los suelos, aguas y alimentos contaminados son probablemente la fuente de infección para los reptiles inmunodeprimidos, convirtiéndose ellos mismos en un reservorio adicional para los humanos. Las micobacteriosis son consideradas un

proceso infeccioso esporádico en las colecciones de reptiles bien gestionadas, presentando una incidencia anual del 0.1 al 0.5% (Brownstein, 1978, 1984, Jacobson, 2007, Skoric *et al.*, 2012).

En el presente estudio se describe el cuadro clínico, los cambios hematológicos y bioquímicos, las lesiones microscópicas y el diagnóstico de una micobacteriosis sistémica atípica en una población cautiva de tortuga mediterránea occidental.

MATERIAL Y MÉTODOS

Animales

La colección privada objeto del estudio estaba ubicada en la población francesa de Le Boulou, Departamento de los Pirineos Orientales. Se componía de 22 ejemplares adultos de tortuga mediterránea occidental (*T. h. hermanni*). Los animales vivían en condiciones de semilibertad, en una zona llana, cercana al mar, con un régimen de precipitaciones semejante al rango de distribución natural de la especie (Sierra de la Albera, Girona). La zona no estaba sometida a temperaturas extremas y las condiciones de hibernación eran las mismas que tenían en estado salvaje. Su alimentación consistía en la vegetación propia de la zona (Cheylan, 1981, Budó *et al.*, 2009) a la que se añadía de forma regular diversas frutas y hortalizas, para alcanzar un régimen alimentario del 85% de material herbáceo y verduras, 15% de frutas y 5% de alimentos ricos en proteínas, según los criterios establecidos para la especie (Highfield, 1990, Boyer, 1994).

Durante el período inmediatamente posterior a la hibernación (Marzo-Abril), seis ejemplares adultos (cinco hembras y un macho) con pesos oscilando entre 1150 y 1630 g. presentaron signos de anorexia, debilidad y letargia. Además, se observó inflamación y edema en las articulaciones de las extremidades, particularmente en las posteriores, y en dos ejemplares inflamación y edema en la cola (Figs. 1 y 2).



Figura 1. Hembra de tortuga mediterránea con proceso edematoso en las extremidades posteriores.



Figura 2. Hembra de tortuga mediterránea con proceso edematoso en la cola y cloaca.

Muestras

Sangre

Se obtuvieron muestras de sangre de los seis ejemplares afectados, mediante punción de la vena coccígea dorsal (Samour *et al.*, 1984) con aguja de 23 G y jeringa de 2 ml. De cada muestra se depositaron 0,6 ml en dos tubos que contenían heparina de litio como anticoagulante (Jacobson *et al.*, 1992, Bolte, 1992, Muro *et al.*, 1998) (Microtainer, Becton Dickison & Co, Rutherford, NJ). Una de las muestras se destinaba a la determinación de los parámetros hematológicos y la otra a la de los parámetros bioquímicos sanguíneos. Esta última muestra sanguínea se dejaba a temperatura ambiente durante 30-40 minutos para proceder posteriormente a su centrifugación a 3000 rpm durante 10 minutos y a separar el plasma con el fin de evitar hemólisis, incrementos en los valores de potasio y descensos en los de la glucosa y sodio

(Jacobson, 1992, Abou-Madi y Jacobson, 2003). El plasma obtenido se mantuvo congelado a -20 °C hasta su posterior utilización para las determinaciones bioquímicas.

Citología

Se tomaron muestras por aspiración con aguja fina de diferentes articulaciones de las extremidades posteriores (previamente desinfectadas mediante povidona yodada) de dos de los animales afectados.

Biopsia

Se obtuvieron muestras de piel y del tejido subcutáneo de la cola de una de las hembras afectadas, previa anestesia local con lidocaína. Las muestras se fijaron en formalina al 10% durante 24 horas para su posterior estudio histológico.

Necropsia

Siguiendo la normativa sobre bienestar animal, y dados los signos avanzados de enfermedad en los animales afectados se decidió eutanasiar todos los animales afectados (6) mediante inyección intracelómica de Pentobarbital sódico. De cuatro de ellos se realizó una necropsia reglada completa obteniéndose muestras para la realización de estudios microbiológicos e histopatológicos, mediante fijación en formalina 10% durante 24 horas.

Análisis

Hematología y bioquímica sanguínea

El recuento total de eritrocitos (RBC) y leucocitos (WBC) se realizó mediante el método manual hemocitométrico, utilizando para ello la solución de Natt-Herrick (dilución 1:100) y la cámara de Neubauer (Natt y Herrick, 1952), siguiendo las técnicas descritas para aves (Campbell, 1988, Raskin, 2000). La concentración de hemoglobina se determinó mediante el método de la cianometehemoglobina, utilizando para ello un fotómetro (4010 Photometer, Boehringer Mannheim, Hamburgo, Alemania), y procediendo a su lectura tras la centrifugación durante 5 minutos a 3000 G para evitar el incremento de los valores debido a la turbidez ocasionada por los núcleos libres de

los eritrocitos (Campbell, 1988). El valor hematocrito se determinó mediante una centrifuga de microhematocrito (Hawksley, UK) tras centrifugar a 9072 G durante cinco minutos. Para determinar los índice eritrocitarios, VCM (volumen corpuscular medio), HCM (hemoglobina corpuscular media) y CMHC (concentración media de hemoglobina corpuscular) se utilizaron fórmulas estándar (Campbell, 1988).

El recuento diferencial de leucocitos se realizó sobre cien células teñidas por el método microscópico rutinario sobre una extensión sanguínea teñida con May-Grünwald/Giemsa (Schermer, 1967, Hawkey, 1983), siguiendo los criterios de identificación descritos por Hawkey (1989) y Jacobson (1992).

Los parámetros bioquímicos determinados fueron: proteínas totales, fracciones proteicas, aspartato aminotransferasa (AST), alanino aminotransferasa (ALT), creatinin quinasa (CK), fosfatasa alcalina (FA), lactato deshidrogenasa (LDH), alfa amilasa, glucosa, urea, ácidos biliares, ácido úrico, sodio, potasio, cloro, calcio y fósforo inorgánico. La mayoría de estos parámetros se determinaron de forma automatizada a 37°C mediante un Autoanalizador Merck (modelo Vitalab Selectra, Smithfield, USA). El sodio y potasio se determinaron utilizando un fotómetro de electrodo selectivo Beckman (Modelo Electrolyte 2ª, Fullerton, California, USA). Las proteínas totales séricas se determinaron mediante el método de Biuret (Jacobson, 1992). Las fracciones proteicas del suero se separaron y cuantificaron mediante electroforesis. Se utilizó un alimentador ATOM-501 con una cubeta de electroforesis y tiras de acetato de celulosa. La migración se realizó con tampón veronal sódico 0,04 M a 200 vol. y 50 mA durante 28 minutos y se tiñeron con negro amido. Las distintas fracciones obtenidas se cuantificaron posteriormente por lectura fotodensitométrica utilizando el fotodensinómetro DIGISCAN ATOM-430 (Fotodensitómetro D.V.-S. Sebla, Mod. 1510, Francia).

Citología

Se realizó un frotis directo con el aspirado articular. Posteriormente se aplicó la tinción de Ziehl-Neelsen para investigar la presencia de bacterias bacilares, acido-alcohol resistentes en las vacuolas de las células mononucleares (Girling y Fraser, 2007).

Histopatología

Las muestras de órganos obtenidas en la necropsia de los animales se cortaron en piezas de 3 mm de grosor y se volvieron a fijar en formalina al 10% durante 6 horas. A continuación se procedió a la inclusión del material cortado en parafina, así como a la elaboración de los bloques por los medios habituales (Bancroft y Stevens, 1992). A partir de todos los bloques se realizaron cortes histológicos de 4µm de grosor, mediante un microtomo de rotación, y se tiñeron mediante la tinción convencional hematoxilina-eosina para su revisión histológica con el fin de determinar naturaleza de las lesiones observadas macroscópicamente. Adicionalmente en los tejidos en los que se observaron granulomas se realizaron nuevos cortes histológicos del mismo grosor y se tiñeron con técnicas de Ziehl-Neelsen para la detección de micobacterias y con la tinción de Auramina.

Cultivo e identificación

Para el cultivo se utilizó el medio Löwenstein-Jensen, con base de huevo y glicerol, durante 26 semanas a una temperatura de incubación de 25°C, y el medio Middlebrook 7H11, con un suplemento de micobactina a 28 °C.

Extracción de ADN para PCR

A partir de cada bloque de parafina se cortaron secciones de 30 µm y se depositaron en tubos estériles de microcentrifugación. La parafina se extrajo mediante 1.2 ml de xileno. Después de su centrifugación a 13,000 g durante 5 minutos, el xileno residual fue separado del tejido residual mediante doble extracción con 1.2 ml de etanol absoluto. La muestra fue centrifugada a 13,000 g durante 5 minutos y el etanol fue cuidadosamente extraído. El ADN para análisis PCR fue extraído del tejido mediante un kit comercial de extracción (DNeasy[®] Tissue kit, Qiagen, Hilden, Germany).

En el ADN extraído a partir de los tejidos fijados en formalina e incluidos en parafina (bloques de parafina) se determinó la presencia de ADN micobacteriano, utilizando una técnica de PCR de amplio espectro descrita previamente (Kipar *et al.*, 2003). Se amplificó el gen para el ARN 16s a partir de suspensión bacteriana, y se procedió a la secuenciación del mismo.

RESULTADOS

Hematología y bioquímica sanguínea

Cuatro de los seis animales eutanasiados presentaron una marcada leucocitosis, con heteropenia, monocitosis y un gran número de células mononucleares. Cinco de los animales presentaban valores disminuidos en el recuento total de eritrocitos (Tabla 1). Se observó un incremento de la AST y moderado del ácido úrico, ALT, LDH y FAS. Los ácidos biliares sólo se pudieron analizar en tres animales. Dos animales presentaron hiperproteinemia (6,9 y 7,2 mg/dl respectivamente), con disminución de la fracción albúmina y marcado incremento de la fracción globulina y disminución del cociente A/G. Un animal presentó hipoproteinemia (3,1 mg/dl) asociado a una hipoalbuminemia (0,19 mg/dl). Dos animales presentaron banda pre-albúmina.

Citología

El análisis microscópico de los aspirados articulares reveló la presencia de numerosas células mononucleares con abundantes estructuras bacilares fagocitadas en vacuolas intracitoplasmáticas, que no se tiñeron con tinción de Romanowsky.

Tabla 1. Parámetros hematológicos y bioquímicos sanguíneos

Parámetro	Resultado						
	Myc-1	Myc-2	C-50	C-51	C-54	C-103	Rango*
Hemoglobina (g/dl)	7,3	8,81	6,3	4,4			6,14**
Valor hematocrito (%)	25	31			8		16-35* 24,44**
Eritrocitos(x10 ⁶ /μl)	385	375	360	220	400	620	490**
Leucocitos (x10 ³ /μl)	3	6	3	12	8	22	7,24**
Heterófilos %	50		33	70	73	79	48,6**
Eosinófilos %	26		29	1	8	0	23,3**
Basófilos%	0		0	1	1	0	2**
Linfocitos%	3		38	25	4	5	22,5**
Monocitos %	21		0	3	14	16	3**
Proteínas totales (g/dl)	6,9	4,7	4,9	3,1	7,2	5,2	2.03-5,56*/3,70**
Albumina (g/dl)	2,69	2,48	1,27	0,19	2,43	1,4	0,56-2,09*/1,10**
Globulina (g/l)	4,21	2,22	3,63	2,91	4,77	3,8	2,4**
Alfa 1 (g/dl)	1,59	0,93				1,32	0,60**
Alfa 2 (g/dl)	0,76	0,29				1,13	
Beta total (g/dl)	0,91	0,41				0,94	0,50**
Gamma (g/dl)	0,96	0,6	0,035			0,4	0,70**
Cociente A/G	0.64	1.12		0.07	0.49	0.37	0,6**
AST (U/L)	80	198	170	140	61	204	9,00-43,00*/52,20**
ALT (U/L)	11	22	6	5	3		0,00-2,00*/18,90*
CK (mmol/L)						42	5,00-488,00*
LDH (U/L)	824	991	394	201	122	1913	121,5**
AP (U/L)			629	536			99,00-461,00*/196,1**
Sodio (mmol/L)	129	128				135	117-137*/135**
Potasio (mmol/L)	3.8	7.3				4.5	3,59-6,90*/3,50**
Ácidos biliares (μmol/l))	27	25				18	
Glucosa (mg/dl)	138		81.7	55.2	111		45,00-104,00*/ 63,1**
Calcio (mmol/L)	8.5	14					2,22-4,79*
Fósforo inorgánico (mmol/L)		7.9				2.86	0,01-1,17*/8*
Ácido úrico (mg/dl)	2.9	3.85	1.8	2.2	2.5		0,85-9,01*
Urea (mg/dl)	10	8	43.1	8.1	4.2		3,00-36,00*/31,9**
Cloro (mEq/L)	88	96				114	117,00**
Fibrinógeno Pl.(g/L)	1.98 g/l	2.19					

**Muro *et al.*, 1998b *Mathes *et al.*, 2008

Necropsia e histopatología

En los cuatro animales necropsiados se observaron lesiones granulomatosas (Tablas 2 y 3), que se pueden clasificar en tres tipos, teniendo en cuenta sus características citológicas. En primer lugar, granulomas heterofílicos formados por un área central necrótica rodeada por infiltrado inflamatorio mayoritariamente polimorfonuclear, con algunos macrófagos y células gigantes multinucleadas. Este tipo de granuloma se considera de reciente formación, y con el tiempo se cronifica y evoluciona a granuloma histiocítico, un segundo tipo de granuloma que se caracteriza por un área central de necrosis rodeada por abundante infiltrado inflamatorio macrofágico, con células gigantes multinucleadas. Ocasionalmente también se observa escaso tejido fibroconectivo delimitando exteriormente el granuloma. Los granulomas mixtos constituyen el tercer tipo y están formados por un centro necrótico e infiltrado inflamatorio polimorfonuclear (heterófilos) y mononuclear (macrófagos) en cantidades similares. Se considera de cronicidad intermedia entre el granuloma heterofílico y el histiocítico (Figs. 5 a 8).

En el primer animal (C-51), el órgano más afectado fue el bazo (Fig.3), con un porcentaje de afectación del 90% y elevada cronicidad. De los 27 granulomas caracterizados, ninguno era heterofílico y la mayoría eran histiocíticos o mixtos. En el corazón, hígado y riñón, el porcentaje de afectación fue del 15-20% y los granulomas eran crónicos. En el pulmón y la piel se detectaron múltiples granulomas fúngicos con abundantes hifas no septadas intralesionales. El ovario no presentaba lesiones significativas. En el animal 2 (C-50), los órganos más afectados fueron el músculo, con un 85% de afectación, la piel (40%) y el hígado (10%) (Fig. 4). En estos órganos los granulomas eran crónicos, mayoritariamente histiocíticos. En la piel las lesiones eran más recientes, con presencia de granulomas heterofílicos y mixtos. El resto de órganos valorados no presentaban lesiones significativas. En el animal 3 (C-103), el bazo estaba afectado en un 100%, seguido del hígado (35%), riñón (20%) y corazón (10%). En este caso los granulomas eran de cronicidad media, ya que la mayoría eran mixtos y algunos histiocíticos. El resto de órganos valorados no presentaban lesiones significativas. En el animal 4 (MYC-1), la afectación era menor en comparación con los otros: el ovario tenía un 10% del parénquima afectado, el hígado un 1% y el pulmón

0,5%. En este caso, los granulomas eran de reciente formación, ya que la mayoría eran heterofílicos. El resto de órganos valorados no presentaban lesiones significativas.

Tabla 2. Localización de la lesiones

<i>Animal</i>	<i>Sexo</i>	<i>Cola</i>	<i>Extremidades</i>	<i>Hígado</i>	<i>Pulmón</i>	<i>Corazón</i>	<i>Riñón</i>	<i>Bazo</i>	<i>Páncreas</i>	<i>Ovario</i>
Myc-1	Hembra	+	+	+	+	+	+	+	+	+
C-50	Hembra	+	+	+	-	-	-	-	-	-
C-51	Hembra	+	+	+	-	+	+	-	-	-
C-103	Hembra	+	+	+	-	+	+	+	-	-

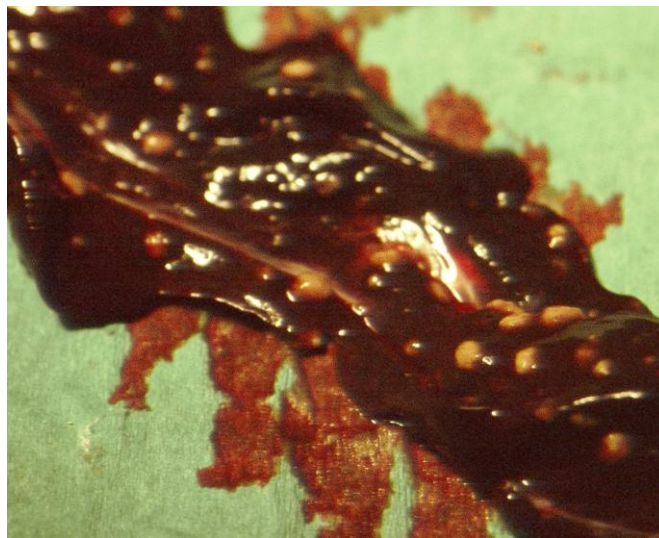


Figura 3. Granulomas esplénicos.

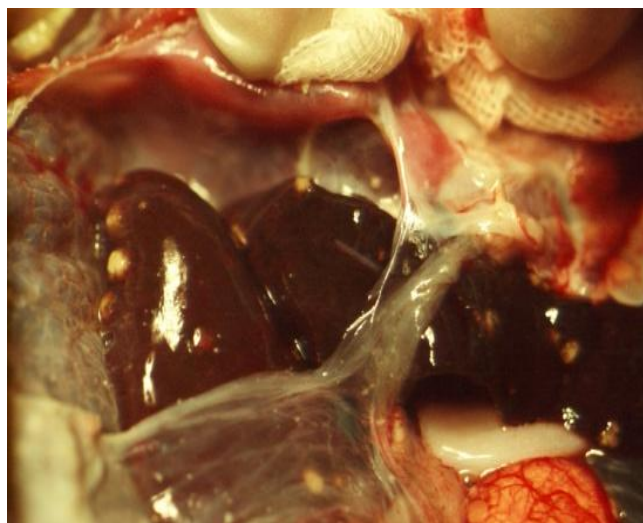


Figura 4. Granulomas hepáticos.

Tabla 3. Órganos afectados, número de muestras histológicas, porcentaje de afectación por muestra, número de granulomas, cronicidad de los granulomas por cada animal.

Animal	Órgano	Nº muestras	% afectación	Nº granulomas	Heterofílico	Histiocítico	Mixto
B-1565/94	Corazón	2	20%	5	1	4	0
	Bazo	1	90%	27	0	13	14
	Pulmón	1	granulomas fúngicos				
	Ovario	1	Sin lesiones	Sin lesiones			
	Riñón	1	15%	4	1	2	1
	Hígado	1	15%	10	0	0	10
	Piel	1	granulomas fúngicos				
B-1566/94	Corazón	1	Sin lesiones	Sin lesiones			
	Bazo	1	Sin lesiones	Sin lesiones			
	Hígado	1	10%	3	0	3	0
	Riñón	1	Sin lesiones	Sin lesiones			
	Músculo	1	85%	12	0	10	2
	Pulmón	1	Sin lesiones	Sin lesiones			
	Duodeno-páncreas	1	Sin lesiones	Sin lesiones			
	Intestino	1	Sin lesiones	Sin lesiones			
	Piel	1	40%	15	2	6	7
B-1257/94	Piel	2	Sin lesiones	Sin lesiones			
B-825/97	Corazón	1	10%	9	0	6	3
	Hígado	1	35%	6	0	6	0
	Riñón	1	20%	3	0	1	2
	Pulmón	2	Sin lesiones	Sin lesiones			
	Bazo	1	100%	8	0	6	2
	Estómago	1	Sin lesiones	Sin lesiones			
	Intestino	1	Sin lesiones	Sin lesiones			
E-1962/98	Hígado	1	1%	2	2	0	0
	Riñón	1	Sin lesiones	Sin lesiones			
	Bazo	1	Sin lesiones	Sin lesiones			
	Ovario	2	10%	1	0	0	1
	Pulmón	2	0.5%	2	1	0	1
	Estómago	3	Sin lesiones	Sin lesiones			
	Duodeno-páncreas	2	Sin lesiones	Sin lesiones			

Tinciones de Ziehl Neelsen y Auramina

Se observó la presencia de estructuras bacterianas ácido-alcohol resistentes en las muestras de los granulomas de todos los animales. Con la tinción de Auramina se obtuvo un resultado positivo en las muestras de todos los animales (Tabla 4).

Cultivo e identificación

El cultivo fue positivo en las muestras de todos los cuatro animales y en todos ellos se identificó *Mycobacterium nonchromogenicum* (Tabla 4).

Tabla 4. Resultados de la tinción de ZN, Auramina, PCR, cultivo y secuenciación.

Animal	Sexo	ZN	Aur.	PCR	Cultivo Secuenciación
C-51	H	+	+	+	<i>M. nonchromogenicum</i>
C-50	H	+	+	+	<i>M. nonchromogenicum</i>
C-103	H	+	+	+	<i>M. nonchromogenicum</i>
Myc-1	H	+	+	+	<i>M. nonchromogenicum</i>

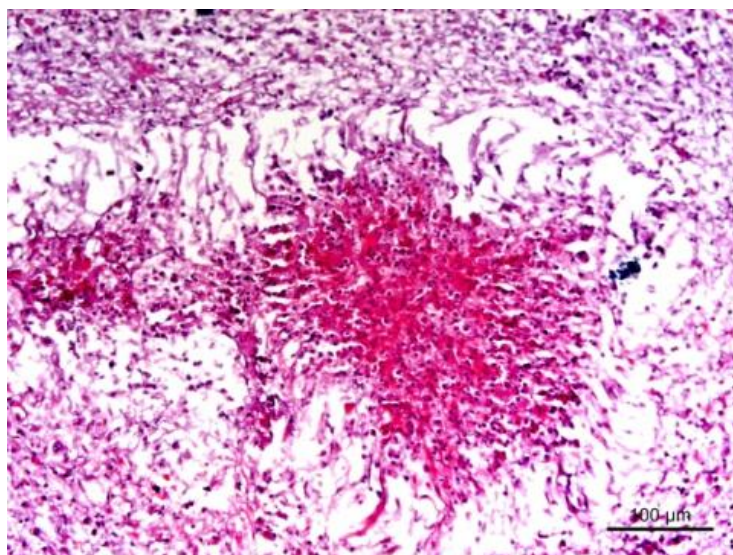


Figura 5. Granuloma heterofílico.

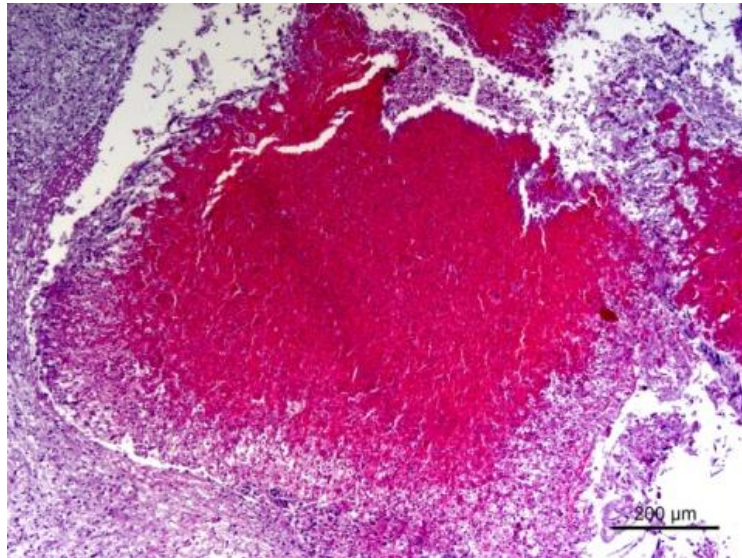


Figura 6. Granuloma histiocítico.

DISCUSIÓN

Las enfermedades infecciosas son una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en los reptiles cautivos. Muchas de estas infecciones pueden ser tratadas adecuadamente si son diagnosticadas a tiempo. Las bacterias Gram negativas suelen ser los patógenos más frecuentemente involucrados en las enfermedades infecciosas de los reptiles (Cooper, 1981, Ross, 1981). Este hecho no es sorprendente ya que las bacterias Gram-negativas son las más frecuentemente aisladas en los reptiles sanos (Raidal *et al.*, 1988), como *Salmonella* spp., que ha sido cultivada en más de un 90% de las colonias de reptiles (Chiodini y Sundberg, 1981). Por contra, las bacterias Gram-positivas han sido escasamente asociadas a enfermedad en los reptiles (Plowman *et al.*, 1987). Las micobacterias solo han sido aisladas en un 0,1-0,5% de los reptiles cautivos presentes en colonias bien manejadas (Brownstein, 1978, 1984, Jacobson, 2007, Skoric *et al.*, 2012). Parece ser que la infección es el resultado de la inmunosupresión provocada por un manejo inadecuado (estrés, temperaturas y humedad inadecuadas, alimentación inadecuada) (Tangredi y Evans, 1997).

La baja prevalencia de la infección por *Mycobacterium* spp. en los reptiles y la presencia ubicua de este microorganismo en el medio ambiente son altamente

indicativas de una resistencia natural a estos patógenos oportunistas (Brownstein, 1978, 1984, Jacobson, 2007). Las infecciones por micobacterias se pueden presentar con una gran variedad de signos clínicos dependiendo de los órganos y sistemas afectados. En nuestro caso, las lesiones granulomatosas se localizaron en la cola, articulaciones distales de las extremidades posteriores, con aparente diseminación a pulmón, corazón, riñón, bazo, páncreas y ovarios.

El diagnóstico clínico de las micobacteriosis en los reptiles puede ser difícil debido a la ausencia de signos clínicos específicos. *Mycobacterium* spp. debería considerarse en todos los casos en que haya presencia de lesiones granulomatosas, acompañadas de pérdida de peso, leucocitosis y resistencia a los antimicrobianos (Soldati *et al.*, 2004). La leucocitosis, acompañada de heteropenia y de monocitosis ha sido descrita en un caso de micobacteriosis sistémica en un dragón barbudo (Girling y Fraser, 2012). En los reptiles, al igual que ocurre en las aves, una monocitosis sugiere una enfermedad inflamatoria, especialmente una inflamación granulomatosa (Campbell, 2004). El número de heterófilos de las tortugas varía con la especie y con la estación del año, presentándose los valores más altos en el verano y los más bajos durante la hibernación (Martínez-Silvestre, 2011). La heteropenia con degranulación es típica de los procesos infecciosos (Frye, 1991, Strik *et al.*, 2007).

Nuestros resultados confirman que el ácido úrico no es un buen indicador (ni sensible ni específico) de enfermedad renal en los reptiles (Campbell, 2006). La concentración normal de ácido úrico en la tortuga mediterránea es de 3.81 mg/dl (0.85- 9,01 mg/dl) (Mathes, *et al.*, 2008). En animales sanos, los niveles son más elevados en el período post-hibernación y más bajos en el verano. En nuestro caso ningún animal superó los 3,85 mg/dl a pesar de las graves lesiones renales que presentaban. Esto podría ser debido a la particular estructura de los riñones de los quelonios, que siendo incapaces de concentrar su orina, puesto que su corteza renal carece de asas de Henle, tratan de conservar su hidratación mediante la eliminación de los residuos nitrogenados (ácido úrico y sales de urato fundamentalmente) mediante la secreción tubular (Martínez-Silvestre, 2011).

Debido a que el nitrógeno ureico se elimina por filtración glomerular, su valoración en sangre puede ser una prueba útil para determinar la azotemia prerrenal. Sin embargo, el nitrógeno ureico sanguíneo no se considera, por lo general, una prueba fiable para el diagnóstico de la enfermedad renal de los reptiles (Campbell, 2006). Un solo animal (43,1 mg/dl) superó los valores de referencia para la especie (Mathes *et al.*, 2008), sin estar asociado con un incremento del ácido úrico.

Los seis animales afectados presentaron incrementos significativos de la actividad de la AST. Esta enzima se encuentra presente en todos los tejidos corporales, y por lo tanto no se la considera una prueba órgano específica (Wetzel y Wagner, 1998). En enfermedades generalizadas, como septicemias y endotoxemias, se puede producir un aumento de su actividad asociado a la necrosis tisular. La ALT, al igual que la AST, no es una enzima órgano específica en reptiles. En ellos, el riñón tiene también una alta actividad de esta enzima (Ramsay y Dotson, 1995). El incremento en la actividad de la FA podría deberse a la enfermedad hepatobiliar (Campbell, 2006). Los marcados incrementos en la actividad de la LDH podrían deberse al daño hepático, muscular esquelético y/o cardíaco (Campbell, 2006).

Los ácidos biliares son útiles para comprobar la funcionalidad hepática, tanto en aves (Carpenter *et al.*, 1996) como en mamíferos (Kaneko *et al.*, 2008). Sin embargo no se ha estudiado en la mayoría de los reptiles, por lo que su utilidad está por determinar. En iguanas el valor basal es de 7,5 $\mu\text{mol/L}$ - 9,6 $\mu\text{mol/L}$ y aumenta hasta los 70 $\mu\text{mol/L}$ en aquellos animales con alteraciones hepáticas, como cirrosis, lipidosis y neoplasia (McBride *et al.*, 2004, Knotek *et al.*, 2009). En los casos aquí descritos los valores eran notablemente bajos teniendo en cuenta la gravedad de las lesiones hepáticas que presentaban los animales.

Dos animales presentaron hiperproteinemia (6,9 y 7,2 mg/dl, respectivamente). La hiperproteinemia se relaciona con deshidratación y aumento de la fracción globulínica, durante enfermedades inflamatorias crónicas, siendo este el caso de los dos animales en cuestión (4,21 mg/dl y 4,77 mg/dl), lo cual concuerda con lo descrito por Cray y Tatum (1998) para aves con micobacteriosis. Sólo un animal presentó

hipoproteïnemia (3,1 mg/dl) asociada a hipoalbuminemia (0,19 mg/dl), probablemente debido a la enfermedad hepato-renal crónica. La disminución del cociente A/G en tres animales fue como consecuencia del incremento de la fracción globulina y el descenso de la albúmina (Ritchie. *et al.*, 1984).

El fraccionamiento electroforético de las proteínas contribuye al diagnóstico de las enfermedades en los animales con hiperglobulinemia. No obstante, no se han establecido los valores de normalidad para la mayoría de las especies de reptiles (Cray y Tatum, 1998, Gicking *et al.*, 2004, Colagar y Jafari, 2007). Dentro de la fracción globulínica se puso de manifiesto un incremento de la fracción α , asociada a la necrosis tisular (Campbell, 1996). En general, las alfa-globulinas de los mamíferos incluyen proteínas de fase aguda, consistentes en alfa-lipoproteínas, alfa-1-antitripsina, haptoglobina, ceruloplasmina, amiloide-A, y alfa-2-macroglobulina (Kaneko, 1997). Dado que los niveles de proteínas de fase aguda pueden tener utilidad diagnóstica, se precisan de nuevos análisis de las bandas alfa-globulinas para evaluar su presencia. Igual a lo que ocurre con las alfa-globulinas, las beta-globulinas de las tortugas enfermas no pudieron ser separadas en las fracciones beta-1 y beta-2. En los animales domésticos, las beta-globulinas son también proteínas de fase aguda que incluyen el fibrinógeno, transferrina, beta-lipoproteína, y el complemento (Kaneko, 1997). El fibrinógeno plasmático es un importante indicador de inflamación, por lo que es preferible el plasma al suero para el estudio de los procesos que afectan a los reptiles (Rosenthal, 2000, Zaias y Cray, 2002).

Los reptiles afectados por micobacterias generalmente desarrollan lesiones granulomatosas, pudiendo afectar a diversos órganos. A diferencia de los mamíferos no se produce la calcificación de las mismas (Jacobson, 2007). *M. nonchromogenicum*, una micobacteria no pigmentada de crecimiento lento (Grupo III de Runyon), pertenece al *M. terrae* complex, junto a *M. triviale*. Hasta ahora *M. nonchromogenicum* sólo había sido descrito por Soldati *et al.* (2004) en una revisión de 90 casos de granulomas inflamatorios en reptiles. Se trataba de un quelonio no identificado con una lesión de tipo crónico. En el caso aquí descrito la especie

confirmada por secuenciación genética y aislada en cultivo puro fue *M. nonchromogenicum*.

La transmisión de las infecciones micobacterianas en los reptiles no es bien conocida. Los animales que padecen problemas locomotores y/o desórdenes de su sistema inmunitario están sometidos a un mayor riesgo de sufrir la enfermedad. Los factores de riesgo son el estrés, las afecciones nutricionales (cuantitativas y/o cualitativas) y las enfermedades crónicas (Soldati *et al.*, 2004, Girling y Fraser, 2012, Ebani *et al.*, 2012). Se ha sugerido como vía de entrada de la infección las lesiones causadas en la piel por el intento de apareamiento de los machos de Dragón de Komodo durante la estación reproductora (Skoric *et al.*, 2012). La alta prevalencia de *M. intracellulare* en el medio donde se mantenían en cautividad habría propiciado la infección. *M. interjectum* se aisló en un caimán marrón (*Caiman cocodrilus fuscus*) mantenido en cautividad (Slany *et al.*, 2010) infectado a partir del terrario contaminado vía las lesiones cutáneas. Incluso se ha sugerido la introducción de micobacterias por la aplicación de un microxip (Greer *et al.*, 2003).

Los animales aquí descritos en nuestro estudio podrían haberse contaminado durante el período de hibernación, que en el ámbito mediterráneo se produce entre los meses de octubre y marzo (Cheylan, 1981, Martínez-Silvestre *et al.*, 1991). Es justo durante este período de reposo hibernal cuando los valores leucocitarios se ven reducidos a su mínimo nivel (Duguy, 1970, Martínez-Silvestre *et al.*, 2011), haciendo las tortugas más vulnerables a la acción de los patógenos. Las mordeduras por roedores que pueden ocurrir durante este período, provocan lesiones cutáneas caudales que podrían haber facilitado la vía de entrada a las micobacterias (Martínez-Silvestre *et al.*, 1991), siendo su diseminación la vía hematogena (Ogden *et al.*, 1981, Greer *et al.*, 2003). La vía orofaríngea parecería descartada en este caso ya que no había ninguna lesión en la lengua o tubo digestivo, a diferencia de las lesiones linguales descritas en un dragón de Komodo (Skoric *et al.*, 2012).

Los reptiles son mantenidos con frecuencia como animales de compañía. Si padecen alguna infección se convierten en un serio riesgo para la salud de sus propietarios. El

riesgo de transmisión a los humanos es mayor cuando los animales infectados no muestran signos clínicos, ya que en ese caso no son tratados (Ebani *et al.*, 2012). Las posibilidades de tratamiento de las micobacteriosis en los reptiles son escasas, limitándose al empleo de la Isoniazida, Ethambutol, Rifampicina o Amikacina (Hoop, 1997, Greer *et al.*, 2003). Greer (2003) utilizó Amikacina en una tortuga marina con osteoartritis, aunque posteriormente fue eutanasiada debido a la falta de respuesta al tratamiento y al mal pronóstico del proceso. Se debería considerar siempre la eutanasia de los animales que presenten enfermedad micobacteriana sistémica, debido al potencial zoonótico de la infección y a la dificultad de alcanzar la curación tanto en los animales como en los humanos (Paré *et al.*, 2006, Greer *et al.* 2003, Girling y Fraser, 2007).

Las micobacterias pueden permanecer infectivas durante períodos superiores a los 7 años en el medio terrestre (Holz y Barker, 2012), por lo que sería recomendable cambiar la totalidad del substrato del terrario o bien la ubicación del mismo. Asimismo, las micobacterias muestran una gran resistencia a los desinfectantes químicos y a las radiaciones ultravioletas (Mitchell, 2012).

En medicina humana se considera a *M. nonchromogenicum* como no patogénica, aunque ha estado descrita en unos pocos casos de infección pulmonar, y en un caso de tenosinovitis secundaria a una punción traumática, al igual que ocurre con *T. terrae*. Probablemente, *M. nonchromogenicum* es el verdadero patógeno en el *M. terrae* complex y puede ser que se haya infradiagnosticado en algunos casos (Mayo *et al.*, 1998).

El presente estudio pone en evidencia el potencial patogénico de *M. nonchromogenicum* para las tortugas terrestres mediterráneas. Aunque en estas colecciones de reptiles no son frecuentes este tipo de infecciones, es necesario llevar a cabo medidas higiénicas y profilácticas estrictas, especialmente cuando se trata de especies de elevado valor ecológico, al estar estrictamente protegidas y en peligro de extinción. El control ha de ser todavía más estricto si las tortugas criadas en cautividad se destinan a proyectos de reintroducción mediante su liberación en el medio

ambiente, para evitar la introducción de patógenos en las poblaciones salvajes. Se requieren estudios más detallados para determinar la incidencia de las infecciones micobacterianas en las tortugas de vida salvaje. Asimismo, deben extremarse al máximo las precauciones por parte de los veterinarios de los centros de recuperación de fauna y de los cuidadores para la detección de las micobacteriosis en los reptiles en rehabilitación.

5. Discusi3n general

La tortuga mediterránea occidental (*Testudo hermanni hermanni*) y la tortuga mora (*Testudo graeca graeca*) son las dos únicas especies de tortugas terrestres presentes en la Península Ibérica y Baleares. Ambas subespecies representan las poblaciones más occidentales, presentando, a diferencia de las subespecies orientales, un rango de distribución más reducido y un marcado descenso poblacional; sin embargo, ciertas poblaciones orientales también están sufriendo actualmente un acusado declive (Bertolero *et al.*, 2011). Las causas primarias de su declive hay que encontrarlas en la destrucción y modificación del hábitat (básicamente debido a los incendios forestales, expansión de los asentamientos humanos, creación de infraestructuras viarias, cambios en el uso de la tierra, de los usos pastorales y a la agricultura intensiva), a la recolección como animal de compañía y al incremento de las poblaciones de sus depredadores naturales (carnívoros y jabalís).

Las propuestas para su conservación incluyen la preservación y restauración de su hábitat, la creación de reservas para su protección y la educación ambiental. La cría en cautividad y su posterior reintroducción en el medio natural es otra de las medidas importantes de conservación, que sólo se justifica en aquellas poblaciones más vulnerables (Bertolero, 2010, Zwartepoorte, 2011). En Cataluña sólo se reproduce con este fin la tortuga mediterránea occidental en el Centre de Recuperació d'Anfibis i Rèptils de Catalunya (CRARC), situado en la población de Masquefa (Barcelona), y en el Centre de Recuperació de la Tortuga de l'Albera, situado en Garrigella (Girona).

Es imprescindible tener en cuenta que el traslado de animales, la reintroducción a partir de poblaciones cautivas, y cualquier manejo que se realice con ejemplares de una especie en peligro de extinción tiene que ser, desde el punto de vista sanitario, impecable. Existe un elevado riesgo de transmisión de enfermedades, especialmente virales, cuando en una misma instalación se alojan tortugas de diferentes especies y de diferentes procedencias. Como se ha manifestado en los numerosos artículos científicos referentes a los brotes de herpesvirosis, el origen de los mismos solía recaer en las importaciones de animales exóticos y en la mezcla de especies de diferente origen zoogeográfico.

A la vista de las investigaciones de campo realizadas sobre las especies que nos ocupan, podemos afirmar desde un punto de vista general, que las poblaciones silvestres son poblaciones saludables. Para poder determinar el estado de salud de un animal, primero es necesario conocer sus parámetros fisiológicos basales, entre los que destacan los hematológicos y bioquímicos sanguíneos. Estos parámetros son particularmente difíciles de obtener en los quelonios, tanto por la existencia de un exoesqueleto que impide un adecuado acceso a los vasos sanguíneos como por la tendencia al retraimiento hacia el interior de los animales durante su manipulación. Esta misma dificultad en la obtención de las muestras se manifiesta en la observación de signos clínicos compatibles con enfermedad. Si ya de por sí, la fauna salvaje es poco propensa a manifestar clínicamente los procesos patológicos, en los reptiles en general, y particularmente en las tortugas, estas manifestaciones pueden ser desde débiles a inexistentes.

Además, el hecho de ser animales poiquiloterms, con períodos de hibernación o estivación, en función de la especie y del hábitat, provoca cambios fisiológicos que se manifiestan tanto en el hemograma como en los parámetros bioquímicos sanguíneos. Todo valor de normalidad debe ir referenciado con la especie, sexo, edad y período del año en que se ha obtenido, así como la vía de obtención de la muestra; sólo así podremos comparar los valores fisiológicos con los presuntamente patológicos.

En el primero de los estudios realizados se han obtenido una serie de valores de referencia para ambas especies, algunos de ellos hasta ahora inéditos (ácidos biliares y proteinograma) que han de permitir una mayor comprensión de los valores obtenidos en los animales presumiblemente enfermos. Asimismo, se ha determinado con exactitud qué anticoagulante debe utilizarse en la obtención de las muestras sanguíneas. También se ha discutido la relación de ciertos parámetros con patologías y afectaciones orgánicas concretas. Algunos parámetros, como es el caso del ácido úrico, se ha demostrado que tiene escaso valor diagnóstico en la evaluación de la enfermedad renal, observándose animales con grave afectación renal y valores de ácido úrico dentro del rango referenciado para la especie (Mathes *et al.*, 2005, Scope *et al.*, 2013, Andreani *et al.*, 2014).

Se han descrito diversas patologías con elevada contagiosidad en las tortugas terrestres: micoplasmosis, herpesvirosis, pasteurelosis, salmonelosis; que aunque no son frecuentes en animales de vida libre, podrían llegar a ser un problema si se introdujeran en una población salvaje. Estas enfermedades pueden desencadenar una elevada mortalidad en poblaciones cautivas de tortugas terrestres.

En el primer episodio patológico descrito en esta tesis, un brote de rinitis crónica asociado con un herpesvirus, la única especie afectada de las tres presentes en la colección objeto del estudio fue la tortuga mora. Este hecho contrasta con los episodios descritos en la literatura, en los cuales se hacía siempre referencia a la afectación de la tortuga mediterránea y de la tortuga rusa cuando la especie introducida era la tortuga mora. Este hecho presupone dos hipótesis: bien las tortugas importadas desde Marruecos eran portadoras asintomáticas del herpesvirus, desarrollándose el proceso clínico debido al estrés del transporte y a la cautividad, o bien fueron afectadas por un herpesvirus al que no estaban habituadas y que estaba presente en las otras especies de la colección. La mayoría de la literatura existente hace referencia a la tortuga mora como portadora asintomática, siendo su masiva importación procedente de Marruecos y su distribución entre numerosas colecciones herpetológicas de Europa y de Estados Unidos el origen de la afectación de la tortuga mediterránea y de la tortuga rusa. En nuestro caso fue totalmente al contrario, siendo la tortuga mora la especie afectada, quedando las otras dos aparentemente al margen de la infección. Hubiese sido muy interesante poder caracterizar el herpesvirus para poder compararlo con los 4 herpesvirus de los quelonios descritos hasta el momento (TeHV) y poder comprobar si pertenecía al TeHV1 o TeHV2 descritos ya como patógenos para la tortuga mora (Salinas *et al.*, 2011). Sin embargo, esto no fue posible debido a que en el momento de la realización del estudio la caracterización molecular de la cepa no se encontraba disponible.

Se ha descrito una mayor divergencia entre los herpesvirus de las tortugas que entre los herpesvirus humanos y de los simios. El herpesvirus humano tipo 1 o Virus herpes simple tipo-1 (VHS-1) y el herpesvirus Cercopiteco 1 (MchV1) son filogenéticamente más próximos que el TeHV2 y el TeHV3. Mientras que el VHS-1 causa infecciones

asintomáticas, el McHV1 causa procesos mortales. Es posible que entre los diferentes herpesvirus de las tortugas y para las diferentes especies de tortugas existan diferencias en cuanto a la gravedad de la enfermedad y las manifestaciones clínicas que ocasionen. De hecho, existen numerosos ejemplos de enfermedad grave, causada por herpesvirus, en hospedadores no habituales (Marschang *et al.*, 2001, Bicknese *et al.*, 2010).

Ante la aparición de un brote de rinitis-estomatitis-glositis en tortugas, el protocolo a seguir consiste, en primer lugar, en la realización de un test ELISA en todos los animales, tanto sanos como enfermos, para comprobar el porcentaje de la población que ha seroconvertido y comparar el estado inmunológico con la evolución de la enfermedad. En segundo lugar, hay que llevar a cabo un estudio molecular, mediante PCR, también en los animales sanos y en los enfermos, a partir de hisopos nasales, cloacales y orofaríngeos, con el fin de detectar el herpesvirus y poder tipificarlo. De esta manera se identifica el virus y los animales en los que está presente, se identifica la vía de excreción y se evalúa la respuesta de anticuerpos frente al herpesvirus. Debido a las lagunas existentes en el conocimiento de los herpesvirus de los quelonios, en las poblaciones cautivas sanas de tortugas terrestres se recomienda el chequeo regular de herpesvirus.

Desde un punto de vista individual, existen diversos agentes patógenos de los quelonios que causan procesos cuyos signos clínicos se pueden solapar, por lo que es sumamente importante llevar a cabo estudios laboratoriales precisos que permitan diferenciar los herpesvirus de los iridovirus y de los micoplasmas. Para la correcta gestión de las poblaciones, también es crucial conocer con precisión que virus afecta a cada especie de tortuga y las implicaciones patológicas de estos virus para las otras especies. Hasta que no haya un conocimiento más extenso de la diversidad e importancia clínica de los herpesvirus de las tortugas terrestres, se debería descartar cualquier mezcla de especies en cautividad. La introducción accidental de animales enfermos o portadores de estos virus, podría tener efectos devastadores en las poblaciones de tortuga mora, máxime si tenemos en cuenta que ya existen antecedentes como el acaecido en la década de los 80 en el suroeste de los Estados

Unidos de América con la tortuga del desierto (Jacobson *et al.*, 1985). Es por lo tanto necesario extremar la vigilancia sobre todos los proyectos que incluyan la reintroducción de ejemplares cautivos al medio natural, e impedir estos programas mientras no se realice un estudio que determine la presencia de animales enfermos o portadores de herpesvirus. No obstante, en la actualidad, no siempre se aplica un adecuado protocolo sanitario preventivo tan exhaustivo en los animales que son reintroducidos en el medio ambiente.

Paralelamente a los procesos infecciosos que afectan exclusivamente a las tortugas y que pueden suponer un serio riesgo para la supervivencia de las especies, existen aquellos patógenos con potencial zoonótico, dentro de los cuales se encuentran bacterias como *Salmonella* spp, *Escherichia coli*, Enterococos resistentes a la vancomicina, *Chlamydomphila*, micobacterias; diferentes parásitos como Pentastómidos y *Cryptosporidium* sp.; virus, como el *West Nile Virus* y diversos hongos (Mitchell, 2011).

La micobacteriosis es una infección importante en los humanos, concretamente la tuberculosis causada por *Mycobacterium tuberculosis*. Sin embargo, hay un importante número de otras especies pertenecientes a este género que tienen capacidad zoonótica. No hay descritos casos de micobacteriosis debida a *Mycobacterium tuberculosis* complex en reptiles, probablemente debido a la temperatura de crecimiento de los micobacterias (Ebani *et al.*, 2012). La mayoría de los casos de micobacteriosis descritos en reptiles están atribuidos a tres especies: *M. marinum*, *M. chelonae* y *M. thamnopheos*. *M. nonchromogenicum*, una micobacteria atípica, no pigmentada, de crecimiento lento (Grupo III de Runyon), perteneciente al complejo *M. terrae*, sólo había sido descrita en una revisión de granulomas inflamatorios en reptiles (Soldati *et al.*, 2004), pero en ningún caso se había descrito una infección activa afectando a diversos animales de una misma colección zoológica. Las alteraciones biopatológicas observadas, anemia y leucocitosis acompañada de monocitosis y heteropenia, coincidían plenamente con las alteraciones descritas en reptiles afectados por infecciones micobacterianas de tipo crónico.

En nuestro estudio acerca de un episodio de micobacteriosis en tortuga mediterránea, *M. nonchromogenicum* fue la especie confirmada mediante secuenciación molecular y aislada en cultivo puro. La aparición de los animales enfermos coincidió con la salida de la hibernación (marzo-abril), lo cual nos impidió conocer la antigüedad de las lesiones. El período de reposo invernal supone para los reptiles un momento de máxima susceptibilidad a diferentes patógenos o bien a agresiones externas, ya que las tortugas hibernantes manifiestan durante este período un descenso en el recuento de heterófilos y de linfocitos (Sypek y Borysenko, 1988). Asimismo, el hecho de estar en reposo las hace más vulnerables a los ataques de los roedores. El hecho de hallar las lesiones macroscópicas en las extremidades posteriores y en la cola, hace sospechar de mordeduras por estos animales. La diseminación hemática hacia el resto de órganos y sistemas afectados contribuiría al agravamiento del proceso. La vía de infección orofaríngea podría estar descartada por el hecho de estar los animales en reposo y por la ausencia de lesiones granulomatosas en la lengua o tubo digestivo, a diferencia de las lesiones orales descritas en un dragón barbudo y asociadas a la ingesta de peces contaminados (Girling y Fraser, 2007). De hecho, la mayoría de casos descritos en la literatura de micobacteriosis en reptiles se relacionan con lesiones en los tegumentos: aplicación de un microxip (Greer *et al.*, 2003), lesiones en la piel por el intento de apareamiento en los Dragones de Komodo (Skoric *et al.*, 2012) o contaminación de lesiones cutáneas a partir de un ambiente contaminado (Slany *et al.*, 2010). Aunque no se ha descrito la existencia de una vía de transmisión vertical esta no sería descartable puesto que se hallaron micobacterias en el tejido ovárico.

Junto al riesgo que supone para las tortugas la infección por *M. nonchromogenicum*, habría que añadir el riesgo de transmisión a las personas. En medicina humana, esta especie de micobacteria se considera como no patogénica, aunque se ha descrito su implicación en unos pocos casos de infección pulmonar, en un caso de tenosinovitis secundaria (Ridderhof *et al.*, 1991) y lo que es más preocupante, en una infección diseminada en un paciente con SIDA (Mayo *et al.*, 1998).

Las posibilidades de tratamiento de las micobacteriosis en los reptiles son escasas, limitándose al empleo de la isoniazida, ethambutol, rifampicina o amikacina (Hoop,

1997, Greer *et al.*, 2003), por lo que se debería considerar siempre la eutanasia de los animales que presenten enfermedad micobacteriana sistémica, debido al potencial zoonótico de la infección y a la dificultad de alcanzar la curación tanto en los animales como en los humanos, especialmente cuando estos últimos padecen de algún proceso inmunosupresor.

El hecho de que las micobacterias puedan permanecer infectivas durante períodos superiores a los 7 años en el medio terrestre y su gran resistencia a los desinfectantes químicos y a las radiaciones ultravioletas, hace recomendable el cambio del substrato del terrario afectado o bien el cambio de la ubicación del mismo. Asimismo, deben extremarse al máximo las precauciones por parte de los veterinarios de los centros de recuperación de fauna y de los cuidadores, para la detección de las micobacteriosis en los reptiles en rehabilitación y realizar exámenes histológicos y cultivos (acompañados de la correspondiente PCR) de todas las lesiones granulomatosas aparecidas en los reptiles, ya que en la mayoría de los casos no expresarán apenas signos clínicos. El conocimiento de las micobacterias atípicas presentes en las tortugas de vida salvaje es todavía escaso, por lo que se necesitan más estudios que determinen las especies presentes y su papel en las enfermedades de las tortugas terrestres.

6. Conclusiones

PRIMERA

La heparina de litio es el anticoagulante de elección para la obtención y la manipulación de muestras sanguíneas de las tortugas terrestres mediterráneas, ya que el EDTA provoca hemólisis, agregación leucocitaria y trombocítica.

SEGUNDA

La tinción de Diff-Quick favorece la diferenciación de los gránulos de los heterófilos y la tinción de May-Grunwald-Giemsa permite una mejor diferenciación entre trombocitos y linfocitos, y entre heterófilos y eosinófilos.

TERCERA

La realización de cuarentena, improntas linguales, cultivos, análisis serológicos y PCR son necesarios para el diagnóstico e identificación de las tortugas portadoras sanas de la rinitis por herpesvirus.

CUARTA

El diagnóstico diferencial de las lesiones granulomatosas de las tortugas terrestres mediterráneas debe incluir a las micobacterias atípicas.

QUINTA

La rinitis crónica y las micobacteriosis son enfermedades que deben controlarse estrictamente en las colonias de cría en cautividad de tortugas terrestres mediterráneas, especialmente en aquellas destinadas a los proyectos de conservación.

7. Bibliografía

A.

Abou-Madi, N. y Jacobson, E. R. (2003). Effects of Blood Processing techniques on Sodium and Potassium Values: A Comparison between Aldabra Tortoises (*Geochelone gigantea*) and Burmese Mountain tortoises (*Manouira emys*). *Veterinary Clinical Pathology* 32 (2): 61-66.

Adkins, E., Driggers, T., Fergusson, G. W., Gehrman, W. H., Gyimesi, Z. S., May, S. B., Ogle, M. y Owens, T. (2003). Ultraviolet light and reptiles, amphibians. *Journal of Herpetologic Medicine and Surgery* 13: 27-37.

Agid, R., Duguay, R. y Saint Girons, H. (1961). Variations de la glicemie du glycogène hépatique et de l'aspect histologique du pancréas, chez *Vipera aspis*, au cours du cycle annuel. *Journal of Physiology* 53: 807-824.

Ahne, W. (1993). Viruses of Chelonia. *Zentralbl Veterinärmed [B]* 40: 34-45.

Alexander, F. (1976). An Introduction to Veterinary Pharmacology. 3^a ed. Churchill Livingstone, Edinburgh. pp: 291.

Alleman, A. R., Jacobson, E. R. y Raskin, R. E. (1992). Morphologic and cytochemical characteristics of blood cells from the desert tortoise (*Gopherus agassizii*). *American Journal of Veterinary Research* 53: 1645-1651.

Anderson, N. L., Wack, R. F. y Hatcher, R. (1997). Hematology and clinical chemistry reference ranges for clinically normal, captive, New Guinea snapping turtle (*Elseya novaguineae*) and the effects of the temperature, sex and sample type. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 28: 394-403.

Anderson, E. T., Minter, L. J., Clarke, E. O., Mroch, R. M., Beasley, J. F. y Harms, C. A. (2011). The effects of feeding on hematological and plasma biochemical profiles in green (*Chelonia mydas*) and Kemp's ridelye (*Lepidochelys kempii*) sea turtles. *Veterinary Medicine International* 890829.

Andreani, G., Carpenè, E., Cannavacciuolo, A., Di Girolamo, N., Ferlizza, E, Isani, G. (2014). Reference values for hematology and plasma biochemistry variables, and protein electrophoresis of healthy Hermann's tortoises (*Testudo hermanni* ssp.). *Veterinary Clinical Pathology* 43: 573-583.

Ariel, E., Ladds, P. W. y Roberts, B. L. (1997). Mycobacteriosis in young fresh-water crocodiles (*Crocodylus johnstoni*). *Australian Veterinary Journal* 75: 831-833.

Aronson, J. D. (1929). Spontaneous tuberculosis in snakes. *Journal of Infectious Diseases* 44: 215-223.

Austin, C. C. y Jessing, K. W. (1994). Green-blood pigmentation in lizards. *Compendium Biochemical and Physiology* 109 A: 619-626.

Azevedo, A. y Lunardi, L. O. (2003). Cytochemical characterization of eosinophilic leucocytes circulating in the blood of the turtle (*Chrysemys dorbingih*). *Acta Histochemica et Cytochemica* 105: 99-105.

B.

Benson, K. G., Paul-Murphy, J. y MacWilliams, P. (1999). Effects of hemolysis on plasma electrolyte and chemistry values in the common green iguana (*Iguana iguana*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 30: 413-415.

Bentley, P. J. (1959). Studies on the water and electrolyte metabolism of the lizard *Trachysaurus rugosus* (Gray). *Journal of Physiology* 145: 37-47.

Berry, K. H. (1990). The status of the desert tortoise in 1990: current population issues in California. *Proceedings of the First International Symposium on Turtles & Tortoises: Conservation and captive husbandry*. Beaman, K. R.; Caporaso, F.; Mckeown, S. y Graft, M. D. (eds.). Chapman University, Orange, California. pp: 80.

Bertolero, A. (2010). En: *Enciclopedia Virtual de los Vertebrados Españoles*. Salvador, A., Marco, A. (Eds.). Museo Nacional de Ciencias Naturales, Madrid.

Besse, P. (1949). Quelques affections à bacilles acido-résistants chez les pœcilothermes vivant en aquarium. *Bulletin de l'Académie Veterinaire de France* 22: 426.

Biberstein, E. L. y Fowler, M. F. (1980). A *Pasteurella* spp. associated with respiratory disease in captive desert tortoises. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 177: 804-807.

Bicknese, E. J., Childress, A. I. y Wellehan, J. F. X. (2010). A novel herpesvirus of the proposed genus *Chelonivirus* from an asymptomatic Bowsprit tortoise (*Chersina angulata*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 41: 353-358.

Bierman, R. y Blahak, S. (1994). First isolation of a Herpesvirus from tortoises with diphteroid-necrotizing stomatitis. Protocols of the 2nd World Congress of Herpetology, Australia.

Blatt, G. y Müller, P. (1979). Die Mortalitätsrate importierter Schildkröten im Saarlanda. *Salamandra* 10: 115-125.

Bolten, A. B. y Bjorndal, K. (1992). Blood profiles for a wild population of green turtles (*Chelonia mydas*) in the southern Bahamas: size-specific and sex-specific relationship. *Journal of Wildlife Diseases* 28: 407-413.

Bolten, A. B., Jacobson, E. R. y Bjorndal, K. A. (1992). Effects of anticoagulant and autoanalyzer on blood biochemical values of loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*). *American Journal of Veterinary Research* 53: 2224-2227.

Bone, R. D. (1992). Gastrointestinal system. En: *Manual of reptiles*. Beynon, P.H. (Ed). Cheltenham, British Small Animal Veterinary Association. pp: 101-113.

Bonnie, L.R., Klemens, M.W., Moehlman, P., Dierenfeld, E. y Karesh, W. (1994a). Blood values in free-ranging pancake tortoises (*Malacochersus tornieri*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 25: 63-67.

Bonnie, L. R., Papich, M. y Cook, R.A. (1994b). Pharmacokinetics of enrofloxacin after single intramuscular injection in indian star tortoises (*Geochelone elegans*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 25: 88-94.

Bourdeau, P. (1989). Pathologie des Tortues. 3^e partie : affections respiratoires, autres affections d'organes et thérapeutique. Le sang des tortues. *Point Vétérinaire* 21:52.

Boyd, J. W. (1988). Serum enzymes in the diagnosis of diseases in man and animals. *Journal of Comparative Pathology* 98: 381-404.

Boyer, D.M. y Boyer, T.H. (1994). Tortoise care: *Bulletin of Association of Reptilian and Amphibian Veterinarians* 4: 16-28.

Brancroft, J. D. y Stevens, A. (1992). Theory and practice of histochemical techniques. Churchill Livingstone, Edinburgh.

Braune, S., Geiss, W. y Thiel, W. (1989). Eien neue durch Herpesviren verursachte Ekkrankug bei Landschilkröten. *Tierärztliche Praxis* 17: 416-419.

Braysheer, M. L. (1976). The excretion of hyperosmotic urine and other aspects of the electrolyte balance of the lizard *Amphibolurus maculosus*. *Journal of Comparative Biochemistry and Physiology* 54: 341-345.

Brobst, D. (1986) Review of the pathophysiology of alterations in potassium homeostasis. *Journal of American Veterinary Medicine Association* 188: 1019-1025.

Brown, M. B., Schumacher, I. M., Klein, P. A., Harris, K., Correll, T. y Jacobson E. (1994). *Mycoplasma agassizii* causes upper respiratory tract disease in the desert tortoise. *Infection and Immunity* 62: 4580-4586.

Brown, M. B., Crenshaw, B. C., McLaughlin, G. S., Schumacher, I. M., McKenna, C. E., Klein, P. A. y Jacobson, E. R. (1995). Taxonomic anaylisis of the tortoise Mycoplasmas *Mycoplasma agassizii* and *Mycoplasma testudinis* by 16SrRNA gene sequence comparison. *International Journal of Systematic Bacteriology* 45: 348-350.

Brown, M. B., McLaughlin, G. S., Klein, P. A., Cresnshaw, B. C., Schumacher, I. M., Brown, D. R. y Jacobson, E. R. (1999). Upper respiratory tract disease in the gopher tortoises is causes by *Mycoplasma agassizii*. *Journal of Clinical Microbiology* 37: 2262-2269.

Brown, D. R., Merrit, J. L., Jacobson, E. R., Klein, P. A., Tully, J. G. y Brown, M. B. (2004). *Mycoplasma testudineum* sp. Nov., from a desert tortoise (*Gopherus agassizii*) with upper respiratory tract disease. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54: 1527-1529.

Brownstein, D. G. (1978). Reptilian mycobacteriosis. En: *Mycobacterial Infections of Zoo Animals*. Montali, R. J. (Ed.). Smithsonian Institution Press, Washington DC. pp: 665-668.

Brownstein, D. G. (1984). Mycobacteriosis. In: Hoff, G. L., Frye, F. L. and Jacobson, E. R. *Diseases of Amphibians and Reptiles*. Plenum Press, New York. pp: 1-23.

C.

Campbell, T. W. (1996). Clinical Pathology of Reptiles. En: *Reptile Medicine and Surgery*. 2nd ed. Mader, D. R. (Ed.). Saunders Elseviers Co. St. Louis, Missouri. pp: 453-470.

Campbell, T. W. (1998). Avian Hematology. Iowa State University Press, Ames. pp: 7-17.

Campbell, T. W. (2006). Clinical Pathology of Reptiles. En: *Reptile Medicine and Surgery*. Mader, D. R. (Ed.). Saunders Elseviers Co. Philadelphia. pp: 453-470.

Campbell, T. M. y Ellis, C. K. (2007). Avian and Exotic Animal Hematology and Cytology. 3rd ed. Ames, Blackwell Publishing, Iowa State University Press. pp: 320.

Carpenter, J. W., Komstetter, C. M., Bossart, G., Bachues, K. y Butine, M. D. (1996). The use of serum bile acids to evaluate hepatobiliary function in the cockatiel (*Nymphicus hollandicus*). *Proceedings of the Association of Avian Veterinarians*. pp : 73-74.

Cheylan, M. (1981). Biologie et écologie de la tortue d'Hermann, *Testudo hermanni* Gmelin, 1789. Mémoires et travaux de l'Institut de Montpellier. Ecole pratique des hautes Etudes. Montpellier. N° 13. pp : 70-72, 75, 152-165.

Christopher, M. M., Berry, K. H., Wallis, I. R., Nagy, K. A., Henen, B. T. y Peterson, C. C. (1999). Reference intervals and physiologic alterations in hematologic and biochemical values of free-ranging desert tortoises in the Mojave Desert. *Journal of Wildlife Diseases* 35: 212-238.

Chung, Cheng-shu, Cheng, Chiung-hsiang., Chin, Shin-chien., Lee, An-hsing y Chi, Chau-hwa. (2009). Morphologic and Cytochemical Characteristics of Asian Yellow Pond Turtle (*Ocadia sinensis*) Blood Cells and their Hematologic and Plasma Biochemical Reference Values. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 40: 76-85.

Clark, P., Johnstone, A. C., Ellison, R. y Goold, M. (2001). Inclusions in the erythrocytes of eastern water dragons (*Physignatus lesueurii*). *Australian Veterinary Journal* 79: 61-62.

Coates, M. L. (1975). Hemoglobin function in the vertebrates: An evolutionary model. *Journal of Molecular Evolution* 6: 285-307.

Colagar, H. y Jafari, N. (2007). Red blood morphology and plasma protein electrophoresis of the European pond terrapin *Emys orbicularis*. *African Journal of Biotechnology* 6(13): 1578-1781.

Costello, R. T. (1970). A Unoppette for eosinophil counts. *American Journal of Clinical Pathology* 54: 249-250.

Cooper, J. E., Gschmeissner, S. y Bone, R.D. (1988). Herpes-like virus particles in necrotic stomatitis of tortoises. *Veterinary Record* 123: 554.

Cooper, J. E. (1992). Post-mortem examination. En: *Manual of reptiles*. Beynon, Ph. (Ed.). Cheltenham, British Small Animal Veterinary Association. pp: 40-45.

Coulson, R. A. y Hernández, T. (1964). *Biochemistry of the Alligator. A study of metabolism in slow motion*. Baton Rouge, Louisiana State University Press. pp: 65-66.

Cox, W.R., Rapley, W. A. y Baker, I. K. (1980). Herpesvirus-like infection in a painted turtle (*Chrysemys picta*). *Journal of Wildlife Diseases* 16: 445-449.

Crawford, G., Jackson, J.R., Holcomb, Ch. M. y Jackson, M. M. (1971). Blood serum cholesterol levels in two congeneric species of molluscivorous turtles. *Compendium of Biochemical Physiology* 33: 459-461.

Crawford, G., Jackson, J.R., Holcomb, Ch. M. y Jackson, M. M. (1974). Aortic calcification, serum calcium, magnesium, sodium and cholesterol in *Gopherus polyphemus*. *Compendium of Biochemical Physiology* 49: 603-605.

Crawshaw, G. J. (1996). Comparison of plasma biochemical values in blood and blood-lymph mixtures from red-eared sliders, *Trachemys scripta elegans*. *Bulletin of Association of Reptile and Amphibian Veterinarians* 6: 7-9.

Cuadrado, M., Molina-Prescott, I. y Flores, L. (2002). Comparison between tail and jugular venipuncture techniques for blood sample collection in common chameleons (*Chamaleo chamaeleon*). *The Veterinary Journal* 53: 125-132.

Cunningham, A. (2000). Emerging infectious diseases and amphibian declines. En: Proceedings of the Spring Meeting "Emerging Diseases". British Veterinary Zoological Society. Cotswold Wildlife Park, Burford, UK. pp: 35-37.

D.

Dantzler, W. H. (1967). Stop-flow study of renal function in conscious water snakes (*Natrix sipedon*). *Compendium on Biochemical and Physiology* 22: 131-140.

Davies, P. M. C. (1981). Anatomy and physiology. En: Diseases of the reptilian. Cooper, J. E. and Jackson, O. F. (Eds.). Vol I, San Diego, Academic Press. pp: 9-19.

Davison, A. J. 2002. Evolution of the herpesvirus. *Veterinary Microbiology* 86: 69-88.

Daw, J. C., Wegner, D. P. y Berne, R. M. (1967). Relationship between cardiac glycogen and tolerance to anoxia in the Western painted turtle, *Chrysemys picta belli*. *Compendium on Biochemical and Physiology* 22: 69-73.

Dawson, W. R. (1960). Physiological responses to temperature in the lizard *Eumeces obsoletus*. *Physiology and Zoology* 33: 87-99.

Dein, F. J. (1984). Laboratory Manual of Avian Hematology. E. Northport, Association of Avian Veterinarians, New York, New York.

Dessauer, H. C. (1970). Blood chemistry of reptiles: physiological and evolutionary aspects. En: *Biology of the Reptilia*, vol. 3, Morphology. Gans, C. y Parsons, T. (Eds.). Academic Press. New York. pp: 1-72.

Díaz-Paniagua, A. y Andreu, A. C. (2005). En: *Enciclopedia Virtual de los Vertebrados Españoles*. Salvador, A., Marco, A. (Eds.). Museo Nacional de Ciencias Naturales, Madrid.

Dickinson, V. M., Jarchow, J. y Trueblood, M.H. (2002). Hematology and plasma biochemistry reference range values for free-ranging desert tortoises in Arizona. *Journal of Wildlife Diseases* 38: 143-153.

Dietehelm, G y Stein, G. (2006). Hematologic and blood chemistry values in reptiles. En: *Reptile Medicine and Surgery*. 2nd ed. Mader, D. (Ed.). St. Louis, Saunders Elsevier. pp: 212-250.

Divers, S. J., Redmayne, G. y Aves, E. K. (1996). Haematological and biochemical values of 10 green iguanas (*Iguana iguana*). *Veterinary Record* 138: 203-205.

Divers, S. J. y Cooper, J. E. (2000). Reptile hepatic lipidosis. *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine* 9: 153-164.

Divers, S. J. (2000). Reptilian liver and gastrointestinal testing. En: *Laboratory medicine: avian and exotic pets*. Fudge, A. M. (Ed.). Philadelphia, Saunders Company. pp: 205-209.

Drury, S. E. N., Gough, R., E., McArthur, S. D. J. y Jessop, M. (1998). Detection of herpesvirus-like and papillomavirus-like particles associated with diseases of tortoises. *Veterinary Record* 143: 639.

Drury, S. E. N., Gough, R. E. y McArthur, S. D. J. (1999). Isolation and identification of herpesvirus and papillomavirus from tortoises in Great Britain. *Proceedings of the Association of Reptilian and Amphibian Veterinarians* 69.

Dubewar, D. M. (1979). Effect of hypocalcemic and hypercalcemic substances on the parathyroid histology of the lizard, *Uromastix hardwickii* (Gray). *Zeitschrift für mikroskopisch-anatomische Forschung* 93: 315-320.

Duguy, R. (1970). Number of blood cells and their variation. En: *Biology of the Reptilia*, Vol. 3. Gans, C. y Parsons, T. (Eds.). Academic Press. New York. pp: 93-109.

Dumont, M. (1979). "Halte aux importations de tortues". *Le Courrier de la Nature* 61: 20-22.

Dutton, C. J. y Taylor, P. (2003). A comparison between pre-and post hibernation morphometry, hematology and blood chemistry in viperid snakes. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 34: 53-58.

E.

Eatwell K. (2010). Calcium and phosphorus values and their derivatives in captive tortoises (Testudo species). *Journal of Small Animal Practice* 51:472–475.

Ebani, V. V., Fratini, F., Bertelloni, F., Cerri, D. y Tortoili, E. (2012). Isolation and identification of mycobacteria from captive reptiles. *Research in Veterinary Science* 93: 1136-1138.

Ellman, M. M. (1997). Hematology and plasma chemistry of the inland bearded dragon, *Pogona vitticeps*. *Bulletin of the Association of Reptilian and Amphibian Veterinarians* 7: 10-12.

F.

Feldman, S. H., Wimsatt, J., Marchang, R. E., Johnson, A. J., Brown, W., Mitchell, J. C. y Sleeman, J. M. (2006). A novel mycoplasma detected in association with upper respiratory diseases syndrome in free-ranging eastern box turtles (*Terrapene carolina carolina*) in Virginia. *Journal of Wildlife Diseases* 42: 279-289.

Frair, W. (1982). Serum Electrophoresis and Sea Turtle Classification. *Compendium of Biochemical Physiology* 72: 1-4.

Friedman, F. F. (1903). Spontane lungentuberkulose bei schildkroten und die stellung des tuberkelbazillus im system. *Zeitschr Tuberk* 4: 439-457.

Frische, S., Bruno, S., Fago, A., Weber, R. E. y Mozzarelli, A. (2001). Oxygen binding by single red blood cells from the red eared turtle (*Trachemys scripta*). *Journal of Applied Physiology* 90: 1679-1684.

Fritz, U. y Havas, P. (2006). Checklist of Chelonians of the World. German Federal Ministry of Environment, Nature Conservation and Nuclear Safety and Museum of Zoology Dresden. Dresden.

Fritz, U. y Havas, P. (2013). Order Testudines: 2013 update. *Zootaxa* 3703: 12-14.

Frost, J. W. y Schmidt, A. (1997). Verh. Erkgr. *Zootiere* 38: 25-27.

Frye, F. L., Oshiro, L. S., Dutra, R. R. y Carney, J. D. (1977). Herpesvirus-like infection in two Pacific pond turtles. *Journal of American Veterinary Medical Association* 171: 882-884.

Frye, F. L. y Centofanti, B. V. (1991). Successful treatment of iatrogenic (diet related) hypervitaminosis D and hypercalcemia in and iguana (*Iguana iguana*). *Proceedings of the Four International Colloquium on the Pathology and Therapeutics of Reptiles and Amphibians*, Bad Nauheim, Germany. pp: 244-250.

Frye, F. L. (1991). Hematology as applied to clinical reptile medicine. En: *Biomedical and Surgical Aspects of captive Reptile Husbandry*, 2nd ed. Krieger Publishing, Malabar, Florida. 1st Vol. pp: 209-280.

G.

Garner, M. M., Homer, B. L., Jacobson, E. R., Raskin, R. E., Hall, B. J., Weis, W. A. y Berry, K. H. (1996). Staining and morphologic features of bone marrow hematopoietic cells in desert tortoises (*Gopherus agassizii*). *American Journal of Veterinary Research* 57: 1608-1615.

Gaskin, J. M. (1988). The serodiagnosis of psittacine viral infection. *Proceedings of the Association of Avian Veterinarians* 7

Gibbons, P. M. (2001). Comparative vertebrate calcium metabolism and regulation. *Proceedings of the Association of Reptiles and Amphibians Veterinarians* 8: 267-280.

Gicking, J. C., Foley, A. M., Harr, K. E., Raskin, R. E. y Jacobson, E. R. (2004). Plasma protein electrophoresis of the Atlantic loggerhead sea turtle, *Caretta caretta*. *Journal of Herpetology Medicine and Surgery* 14: 13-17.

Giménez, A., Esteve, M., Pérez, I., Anadón, J., Martínez, J. y Palazón, J. (2004). La tortuga mora en la región de Murcia, conservación de una especie amenazada. Diego Marín Librero (Ed.). S. L. Murcia, Spain.

Giménez, M., Saco, Y., Pato., Busquets, A., Martorell, J. M. y Bassols, A. (2010). Plasma protein electrophoresis of *Trachemys scripta* and *Iguana iguana*. *Veterinary Clinical Pathology* 39: 227-235.

Girling, S. J. y Fraser, M. A. (2012). Systemic mycobacteriosis in an inland bearded dragon (*Pogona vitticeps*). *Veterinary Record* 14: 526-527.

Glazebrook, J. S. y Campbell, R. S. F. (1990). A survey of the disease of marine turtles in northern Australia I. farmed turtles. *Diseases of Aquatic Organisms*: 83-95.

Göbel, T. y Spöble, H. (1991). Blood collecting technique and selected reference values for Hermann's tortoise (*Testudo hermanni hermanni*). En: Proceedings: 4th International colloquium on pathology and medicine of reptiles and amphibians. German Veterinary Association, Bad Nauheim, Germany. pp: 129-134.

Göbel, T. y Spöble, H. (1992). Blutentnahmetechnik und Serumnormalwerte wichtiger Parameter bei der griechischen Landschildkröte (*Testudo hermanni hermanni*). *Tierärztliche Praxis* 20: 231-234.

Gottdenker, N. L. y Jacobson, E. R. (1995). Effect of venipuncture sites on hematologic and clinical biochemical values in desert tortoises (*Gopherus agassizii*). *American Journal of Veterinary Research* 56: 19-21.

Greer, L. L., Strandberg, J. D. y Whitaker, B. R. (2003). *Mycobacterium chelonae* osteoarthritis in a Kemp's ridley sea turtle (*Lepidochelys kempii*). *Journal of Wildlife Diseases* 39(3): 736-741.

Griffith, A. S. (1939). Infections of wild animals with tubercle bacilli and other acid-fast bacilli. *Proceedings of Royal Society of Medicine* 32: 1045-1412.

Grioni, A., Ho, K. K. Y., Karraker, N. E. y Leung, K. M. Y. (2014) Blood clinical biochemistry and packed cell volume of the chinese three-striped box turtle, *Cuora trifasciata* (reptilia: Geoemydidae). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 45:2, 228-238.

H.

Haigh, S.A. (1991). Characterization of the blood cells and the establishment of haematological and biochemical reference intervals for the Eastern Long neck tortoise (*Chelodina longicollis*). Diploma in Veterinary Studies (Wildlife Medicine and Husbandry), University of Sydney.

Harper, P. A., Hammond, D. C. y Heuschele, W. P. (1982). A herpesvirus-like agent associated with pharyngeal abscess in a desert tortoise. *Journal of Wildlife Diseases* 18: 491-494.

Harr, K. E., Alleman, A. R., Dennis, P. M., Maxwell, L. K., Lock, B. A., Bennet, R. A. y Jacobson, E. R. (2001). Morphologic and cytochemical characteristics of blood cells and hematologic and plasma biochemical reference ranges in green iguana. *Journal of American Veterinary Medical Association* 218: 915-921.

Hart, M. G., Samour, H. J., Spratt, D. M. J., Savage, B. y Hawkey, C. M. (1991). An Analysis of Haematological Findings on a Feral Population of Aldabra Giant Tortoises (*Geochelone gigantea*). *Comparative haematology International* 1: 145-149.

Hattingh, J. y Smith, E. M. (1976). Anticoagulants for avian and reptilian blood: heparin and EDTA. *Pflügers Archiv* 363: 267-269.

Hawkey, C. M. y Dennett, T. B. (1989). En: *A Colour Atlas of Comparative Veterinary Haematology*. Hawkey, C. M. y Dennett, T. B. (Eds.). Wolfe Medical Publications, London.

Hawkins, R. I. y Mawdesley-Thomas, L. E. (1972). *Journal of Fish Biology* 4: 193-232.

Heard, D., Harr, K. y Wellehan, J. (2004). Diagnostic sampling and laboratory tests. En: *British Small Animal Veterinary Association Manual of Reptiles*, 2nd ed. Girling, S. J. y Raiti, P. (Eds.) Blackwell Publishing Inc., U. K. pp: 78-79.

- Heldstab, A. y Bestetti, G. (1982). Spontaneous viral hepatitis in a spur-tailed mediterranean land tortoise (*Testudo hermanni*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 13: 113-120.
- Heldstab, A. y Bestetti, G. (1989). Herpesviridae causing glossitis and meningoencephalitis in land tortoises (*Testudo hermanni*). *Herpetopathologia* 1: 5-9.
- Hernandez-Divers, S. J. y Shearer, D. (2002). Pulmonary mycobacteriosis caused by *Mycobacterium haemophilum* and *M. marinum* in a royal python. *Journal of American Veterinary Medical Association* 11: 1661-1663.
- Hervás, J., Sánchez-Gordón, P. J., De Chacón, F., Carrasco, L. y Gómez-Villamandos, J. C. (2002). Hepatitis associated with herpesviral infection in the tortoise (*Testudo horsfieldii*). *Journal of Veterinary Medicine Series B* 49: 11-114.
- Hidalgo-Vila, J., Díaz-Paniagua, C., Pérez-Santiagosa, N, Plaza, A., Camacho, I. y Recio, F. (2007). Hematological and biochemical reference intervals of free-living mediterranean pond tortoises (*Mauremys leprosa*). *Journal of Wildlife Diseases* 43: 798-801.
- Highfield, A. C. y Martin, J. (1990). Special report. *Tortoise Trust Newsletter*. August: 2-8.
- Highfield, A. C. (1990). Keeping and breeding tortoises in captivity. London Press Ltd., Bristol. pp: 108-111.
- Highfield, A. C. (1993). Running Nose Syndrome. *Tortoise Trust Newsletter* 2: 1.
- Hitchner, S. B. y Calnek, B. W. (1980). Inactivated vaccine for parrot herpesvirus infection (Pacheco's disease). *American Journal of Veterinary Research* 41:1280.
- Hodges, R. D. (1977). En: "*Comparative Clinical Haematology*". (R. K. Archer and L. B. Jeffcott, eds.). Blackwell Scientific Publications, Oxford. pp: 483-517.
- Hoff, G. L. y Hoff, D. M. (1989). Herpesviruses of Reptiles. Office of Epidemiological Services. Kansas City Health Department. pp: 159-167.
- Holt, P. E. y Cooper, J. E. (1976). Stomatitits in the Greek tortoise (*Testudo graeca*). *Veterinary Record* 98: 156.

Holz, P. y Holz, R. M. (1994). Evaluation of ketamine, ketamine/xylazine and ketamine/midazolam anesthesia in red-eared slider (*Trachemys scripta elegans*), *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 25: 531-537.

Honegger, R. E. (1974). The reptile trade. *International Zoo Yearbook*, 14: 47-52.

Hutton, K. E. G. y Goodnight, C. J. (1957). Variations in the blood chemistry of turtles under active and hibernating conditions. *Physiological Zoology* 30: 198-207.

I.

Innis C, DeVoe R, Mylniczenko N, Garner M. (2010). A call for additional study of the safety of subcarapacial venipuncture in chelonians. *Proceedings of the AAZV and ARAV*. South Padre Island, TX, October, 23–29, 8–10.

[ISIS] International Species Information System. (2002). Physiological reference values American units. CD-ROM. Apple valley, Minnesota.

J.

Jackson, O. F. (1980). The sick chelonian. *Proceedings of the European Herpetological Symposium*. pp: 1.

Jackson, O. F. y Needham, J. R. (1983). Rhinitis and virus antibody titres in chelonians. *Journal of Small Animal Practice* 24: 31-36.

Jackson, O. F. (1991). Reptiles Part One Chelonians. En: *Manual of Exotic Pets*. Beynon, P. H. y Cooper, J. E. (Eds.). Cheltenham. British Small Animal Veterinary Association. pp: 221-243.

Jackson, O. F. y Lawton, P. C. (1992). Examination and diagnostiques techniques. En: *Manual of Exotic Pets*. Beynon, P. H. y Cooper, J. E. (Eds.). Cheltenham. *British Small Animal Veterinary Association*. pp: 32-35.

Jacobson, E. R., Gaskin, J. M. y Clubb, S. L. (1982a). Papilloma-like virus infection in Bolivian side-neck turtles. *Journal of American Veterinary Medical Association* 181: 1325-1328.

Jacobson, E. R., Gaskin, J. M. y Wahlquist, H. (1982b). Herpesvirus-like infection in map turtles. *Journal of American Veterinary Medical Association* 181: 1322-1324.

Jacobson, E. R., Clubb, S. L., Gaskin, J. M. y Gardiner, C. H. (1985). Herpevirus-like infection in Argentine tortoises: *Journal of American Veterinary Medical Association* 187: 1227-1228.

Jacobson, E. R., Gaskin, J. M., Roelke, M., Greiner, E. C. y Allen, J. (1986). Conjunctivitis, tracheitis, and pneumonia associated with herpesvirus infection in green sea turtles. *Journal of American Veterinary Medical Association* 9: 1020-1022.

Jacobson, E. R. (1987). Reptiles. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* 17: 1203-1225.

Jacobson, E. R., Buergelt, C., Williams, B. y Harris, R. K. (1991a). Herpesvirus in cutaneous fibropapillomas of the green turtle *Chelonia mydas*. *Diseases of Aquatic Organisms* 12: 1-6.

Jacobson, E. R., Gaskin, J. M., Brown, M. B. Harris, R. K., Gardiner, C. H., Lapointe, J. L., Adams, H. P. y Reggiardo, C. (1991b). Chronic Upper Respiratory Tract Disease of free-ranging desert tortoises (*Xerobates agassizii*). *Journal of Wildlife Diseases* 27: 296-316.

Jacobson, E. R., Schumacher, J. y Green, M. (1992). Field and clinical techniques for sampling and handling blood for hematologic and selected biochemical determinations in desert tortoises, *Xerobates agassizii*. *Copeia* 1: 237-241.

Jacobson, E. R. (1993a). Blood collection techniques in reptiles: laboratory investigations. En: Fowler, M. E. (Ed.). *Zoo and Wild Animal Medicine Current Therapy* 3. Philadelphia, PA: WB Saunders. pp: 144-152.

Jacobson, E. R. (1993b). Snakes. *Veterinary Clinics of North America (Small Animal Practice)* 23: 1179-1212.

Jacobson, E. R. (1994a). The Desert Tortoise and Upper Respiratory Tract Disease. *Bulletin of the Association of Reptilian and Amphibian Veterinarians* 4: 6-7.

Jacobson, E. R. (1994b). Viral diseases of Reptiles. En: *Zoo and Wild Animal Medicine*. Fowler, M. E. (Ed.). pp: 153-159.

Jacobson, E. R. (1994c). Causes of mortality and diseases in tortoise: a review. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 25: 2-17.

Jacobson, E. R., Schumacher, J., Telford, S. T., Greiner, E. C., Buergelt, C. D. y Gardiner, Ch. H. (1994a). Intranuclear coccidiosis in radiated tortoises (*Geochelone radiata*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 25: 95-102.

Jacobson, E. R., Wronski, T. J., Schumacher, J., Reggiardo, C. y Berry, K. H. (1994b). Cutaneous dyskeratosis in free-ranging desert tortoises, *Gopherus agassizii*, in the Colorado desert of Southern California. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 25: 68-81.

Jacobson, E. R., Brown, M. B., Schumacher, I. M., Collins, B. R., Harris, R. K. y Klein, P. A. (1995). Mycoplasmosis and the desert tortoise (*Gopherus agassizii*) in Las Vegas Valley, Nevada. *Chelonian Conservation and Biology* 1: 279-284.

Jenkins, J. R. (1996). Diagnostic and clinical techniques. En: Reptile medicine and surgery, Mader, D. R. (Ed.). W. B. Saunders Company, Philadelphia. pp: 264-276.

Johnson, A. J., Pressier, A. P., Wellehan, J. F., Brown, R. y Jacobson, E. R. (2005). Identification of a novel herpesvirus from California desert tortoise (*Gopherus agassizii*). *Veterinary Microbiology* 111: 107-116.

K.

Kabisch, D. y Frost, J. W. (1994). Isolation of herpesvirus from *Testudo hermanni* and *Agrionemis horsfieldii*. *Verh Erkr Zootiere* 36: 241-245.

Kaneko, J. J. (1989). Serum Proteins and the Dysproteinemias. En: *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*, J. J. (Ed.). 4ª ed. Academic Press, London. pp: 142-165.

Kaneko, J. J., Harvey, J. W. y Bruss, M. L. (2008). *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. 6th ed. Elsevier Inc., 915

Kaphalake, E. (2001). A review of phosphorus for the reptile practitioner. *Proceedings of the Association of Reptilian and Amphibian Veterinarians* 8: 281-286.

- Kaplan, H. M. y Rueff, W. (1960). Seasonal blood changes in turtles. *Proceedings of Animal Care Panel* 10: 63-68.
- Keller, J. M., Kucklick, J. R., Stamper, M. A., Harms, C. A. y McClellan-Green, P. D. (2004). Associations between organochlorine contamination concentration and clinical health parameters in loggerhead sea turtles from North Carolina, USA. *Environmental Health Perspectives* 112: 1074-1079.
- Kennedy, P. C. y Müller, M. (1993). The female genital system V. Diseases of the pregnant uterus. En: *Pathology of Domestic Animals*, ed. Jubb KVF, Kennedy PC, Parrish CR, 54th ed. Academic Press, San Diego. pp: 432-439.
- Keymer, I. F. (1978). Diseases of Chelonians. (1) Necropsy survey of tortoises. *Veterinary Record* 16: 548-552.
- Khalil, F. y Abdel-Messeih, G. (1962). Tissue constituents of reptiles in relation to their mode of life. II. Lipid content. *Compendium of Biochemical Physiology* 6: 171-174.
- Kiel, M. (1977). Reptilian tuberculosis in a boa constrictor. *Journal of Zoo Animal Medicine* 8: 9-11.
- Kimble, S. J. A. y Williams, R. N. (2012). Temporal variance in hematologic and plasma biochemical reference intervals for free-ranging eastern box turtles (*Terrapene carolina carolina*). *Journal of Wildlife Diseases* 48: 799-802.
- Knotek, Z., Knotkova, Z., Hrda, A. y Dorrestein, G. M. (2009). Plasma bile acids in reptiles. *Proceedings of the Association of Reptilian and Amphibian Veterinarians* 16: 124-127.
- Knotkova, Z., Doubek, J., Knotek, Z. y Hájková, P. (2002). Blood cell morphology and plasma biochemistry in russian tortoises (*Agrionemys horsfieldii*). *Acta vertebrata*. BRNO 71: 191-198.
- Kölle, P., Donhauser, J., Krause, D. y Hoffman, R. (2001). Blood values of European tortoises (*Testudo hermanni*, *Testudo graeca*, *Testudo marginata*, *Agrionemys horsfieldii*). *Tierärztliche Praxis Ausgabe K: Kleintiere- Heimitier* 29: 402-405.

Kölle, P. y Hoffman, R. (1996). Blood chemistry parameteres as a help in diagnosis of diseases of reptiles. *Tierärztliche Praxis Ausgabe G: Grobtiere Nutztiere* 24: 402-405

Küber-heiss, A., Schilcher, F. y Möstl, K. (1999). Herpesvirusinfektionen bei Landschildkröten in Österreich. *Wien Tierärztl Monatsschr* 86: 78-82.

L.

Lambert, M. R. K. (1979). Trade and the Mediterranean tortoises. *Oryx* 10: 161-166.

Lange, H., Herbst, W., Wichert, J. M. y Schelieber, Th. (1989). Elektronemikroskopischer Nachweis von Herpesviren bei einem Massensterebeng von griechischen Landschildkröten (*Testudo hermanni*) und Vierzehenschildkkkröten (*Agrionemys horsfieldii*). *Tieärztl Praxis* 17: 319-321.

Lawrence, K. (1985). An introduction to haematology and blood chemistry of the reptilia. Reptiles: breeding, behavior and veterinary aspects. British Herpetological Society. pp: 99-110.

Lawrence, K. y Needham, J. R. (1985). Rhinitis in long term captive Mediterranean tortoises (*Testudo graeca* and *hermanni*). *Veterinary Record* 117: 662-664.

Lawrence, K. y Hawkey, C. (1986), Seasonal variations in hematological data from Mediterranean tortoises (*Testudo graeca* and *Testudo hermanni*) in captivity. *Research in Veterinary Science* 40: 225.230.

Lawrence, K. (1987). Seasonal variation in blood biochemistry of long term captive Mediterranean tortoises (*Testudo graeca* and *hermanni*). *Research in Veterinary Science* 43: 379-383.

Lawton, M. P. C. (1992). Miscellaneous. En: *Manual of reptiles*. Beynon, P. H. (Ed.). Cheltenham, British Small Animal Veterinary Association. pp: 154.

LeBlanc, C. J., Heatley, J. J. y Mack, E. B. (2000). A review of the morphology of lizard leukocytes with a discussion of the clinical differentiation of bearded dragon, *Pogona vitticeps*, leukocytes. *Journal of Herpetological Medicine and Surgery* 10: 27-30.

Leong, J. K., Smith, D.L., Revera, D. B., Clary J. C., Lewis, D. H., Scott, J. L. y DiNuzzo, A. R. (1989). Health care and disease of captive-reared loggerhead and Kemp's ridley sea turtles. En: *Proceedings of the First International Symposium on the Kemp's Ridely Sea Turtle Biology, Conservation, and Management*, Caillouet, C. W. and Landry A.M. (Eds.), Galveston, TX, 178-201.

Lian, J. B., Carnes, D. L. y Glimcher, M. J. (1987). Bone and serum concentrations of osteocalcin as a function of 1, 25 dihidroxi vitamina D3 circulating levels in bone disorders in rats. *Endocrinology* 120: 2123-2130.

Lloyd, M. y Morris, P. (1999). Chelonian venipuncture techniques. *Bulletin of the Association of Reptilian and Amphibian Veterinarians* 9: 26-29.

López-Jurado, L. F., Talavera, P. A., Ibáñez, J. M., Macivor, A. y García, A. (1979). Las tortugas terrestres *Testudo graeca* y *Testudo hermanni* en España. *Naturalia Hispánica* (Madrid) 17: 1-63.

López-Olvera, J. R., Montané, J., Marco, I., Martínez-Silvestre, A., Soler, J. y Lavín, S. (2003). Effect of venipuncture site on hematologic and serum biochemical parameters in marginated tortoise (*Testudo marginata*). *Journal of Wildlife Diseases* 39: 830-836.

Lowe, Ch. H. (1990). Are we killing the desert tortoise with love, science and management? *Proceedings of the First International Symposium on Turtles & Tortoises: Conservation and captive husbandry*. Beaman, K. R., Caporaso, F., McKeown, S. y Graff, M. F. (eds.). Chapman University, Orange, California. pp: 84-106.

Lyman, R. A. (1945). The anti-hemolytic function of calcium in the blood of snapping turtle (*Chelydra serpentina*). *Journal of Zoo and Wildlife medicine* 21: 341-344.

M.

Mader, D. R., Hawath, C. C. y Paul-Murphy, J. (1985). The packed cell volume and serum chemistry of the gopher snake (*Pituohpis melanoleucos catenifer*). *Journal of Zoo Animal Medicine* 16: 139.

Mader, D. R. (1996). *Reptile Medicine and Surgery*. W. B. Saunders, Philadelphia.

Mader, D. R. (1998). Assesment of the body condition of the Californian desert tortoise *Gopherus agassizii* using morphometric analysis. *Proceedings of the Association of Reptilian and Amphibian Veterinarians*. Kansas. pp: 103-104.

Mader, D. R. y Klaasen, J. K. (1998). The effects of simple dilution on the plasma chemistry values in reptiles. *Proceedings of the Association of Reptilian and Amphibian Veterinarians*. pp: 61-62.

Mader, D. R. (2000). Normal Hematology of Reptiles. En: Schalm's Veterinary hematology. 5th ed. Feldman, B. F., Zinkl, J. G. y Jain, N. C. (Eds.). Lippincott, Williams y Wilkings. pp: 1126-1132.

Maginnis, L. A. y Hitzig, B. M. (1987). Acid-base status and electrolytes in red blood cells and plasma of turtles submerged at 3 degrees. *American Journal Physiology Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 253: 64-70.

Maginnis, L. A., Trapper, S. S. y Miller, L. S. (1983). Effect of chronic cold and submergence on blood oxygen transport in the turtle, *Chrysemys picta*. *Respiratory Physiology* 53: 15-29.

Marcus, L. C. (1971). Infectious diseases of reptiles. *Journal of American Veterinary Medical Association* 159: 1626-1631.

Marks, S. K. y Citino, S. B. (1990). Hematology and serum chemistry of the radiated tortoise (*Testudo radiata*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 21: 342-344.

Marschang, R. E., Gravendyck, M., y Kaleta, E. F. (1997). Herpesviruses in tortoises: investigations into virus isolation and the treatment of viral stomatitis in *Testudo hermanni* and *T. graeca*. *Zentralbl Veterinärmed [B]* 44: 385-394.

Marschang, R. E., Posthaus, H., Gravendyk, M, Kaleta, E. F. y Bacciarini, L. N. (1998a). Isolation of viruses from land tortoises in Switzerland, en: *Proceedings of the American Association of Zoo Veterinarians and American Association of Wildlife Veterinarians Joint Meeting*, Omaha, NE, pp: 281-284.

Marschang, R. E., Posthaus, H., Wild, P., Sterchi, P., Kaletta, E. F. y Bacciarini, L. N. (1998b). Isolation of an Irido-like virus from Hermann's tortoises, *Testudo hermanni*. En: *Proceedings of the European Association of Zoo and Wildlife Veterinarians (EAZWV) Second Scientific meeting, May 21-24. Chester UK, pp: 287-294.*

Marschang, R. E. (2000). Isolierung und Charakterisierung von Irido-, Herpes- und Reoviren aus Landschildkröten sowie Beschreibung eines nicht charakterisierten zytopathogenen Agens. Veterinary Dissertation, Justus- Liebig-Universität, Giessen, Germany.

Marschang, R. E., Frost, J. W., Gravendyck, M. y Kaletta, E. F. (2001). Comparison of 16 chelonid herpesviruses by virus neutralization tests and restriction endonuclease digestion of viral DNA. *Journal of Veterinary Medicine Series B* 48: 393-399.

Marschang, R. E. y Ruemenapf, T. H. (2002). Virus « X »: Characterizing a new viral pathogen of tortoises. En: *Proceedings of the Association of Reptilian and Amphibian Veterinarians, Ninth Annual Conference, Reno Nevada, 9-12 October, pp: 101-102.*

Marschang, R. E, McArthur, S. y Böhn, R. (2003). Comparison of five different methods for the detection of herpesvirus infection in a group of *Testudo horsfieldii* in Great Britain. En: *Proceedings of the Association of Reptilian and Amphibian Veterinarians, 10th Annual Conference, Minneapolis, Minnesota, 4-9 October. pp: 15-17.*

Marschang, R. E. y Scheneider, R. M. (2007). Antibodies to viruses in wild-caught spur-tighed tortoises (*Testudo graeca*) in Turkey. *Veterinary Record* 161: 102-103.

Martínez-Silvestre, A., Navarro, G y Marco, A. (1991). Micobacteriosis en una tortuga mediterránea. *Clínica Veterinaria de Pequeños Animales* 11: 181-183.

Martínez-Silvestre, A. y Mateu, E. (1997). Bacteriological features if rhinitis in captive Greek-tortoises, *Testudo graeca*. *Bulletin of the Association of Reptilian and Amphibian Veterinarians* 7: 12-15.

Martínez-Silvestre, A. y Soler, J. (1997). Aspectos biomédicos en el mantenimiento y reintroducción de quelonios ibéricos. *Jornadas de Conservación de la Tortuga mediterránea, Benicassin: 9-19.*

Martínez-Silvestre, A., Majó, N y Ramis, A. (1999). Caso clínico: herpesvirosis en tortuga del desierto Americana (*Gopherus agassizii*). *Clínica Veterinaria de Pequeños Animales* 19: 99-106.

Martínez-Silvestre, A., Lavín, S., Marco, I., Montané, J., López, J. R. y Soler-Massana, J. (2001). Haematology and plasma chemistry of captive *Testudo marginata*. En: *Proceedings: International Congress on Testudo genus*, B. Devaux (Ed.). Editions SOPTOM, Hyères, France, pp: 187-189.

Martínez-Silvestre, A., Silva, J. L. y Silveira, L. (2002). Hematología y bioquímica sanguínea del Lagarto Gigante de El Hierro (*Galliotia simonyi*) en cautividad. *Revista Española de Herpetología* 16: 5-10.

Mateo, M. R., Roberts, E. D. y Enright, F. M. (1984). Morphologic, cytochemical and functional studies of peripheral blood cells of young healthy American alligators (*Alligator mississippiensis*). *American Journal of Veterinary Research* 45: 1046-1053.

Mathes, K. A., Jacobson, E. R., Blahak, S., Braun, D. R. y Schumacher, I. M. y Fertrard, B. (2001). *Mycoplasma* and herpesvirus detection in European terrestrial tortoises in France and Morocco. En: *Proceedings of the Association of Reptilian and Amphibian Veterinarians*, Eight Annual Conference, Orlando, Florida, 18-23 September, pp: 97-99.

Mathes, K. A., Holz, A. y Fehr, M. (2006). Blood reference values of terrestrial tortoises (*Testudo* spp.) kept in Germany. *Tierärztliche Praxis Ausgabe K: Kleintiere- Heimitiere* 34: 268-274.

Mayer, J., Knoll, J., Innis, C. y Nitchell, M. A. (2005). Characterizing the hematologic and plasma chemistry profiles of captive Chinese water dragons, *Physignathus cocincinus*. *Journal of Herpetological Medicine and Surgery* 15: 45-42.

Mayo, J., Collazos, J. y Martínez, E. (1998). *Emerging Infectious Diseases* 4: 124-125.

McArthur, S. D. J. (2001). Renal function in chelonians: dehydration and the stabilization of posthibernation hyperuricaemia, hyperkalemia and anuria in *Testudo* sp. *Proceedings of Association of Reptilian and Amphibian Veterinarians*. Orlando Florida. pp: 87-97.

McBride, M., Koch, D. E., Hernández-Divers, S. y Wilson, G. H. (2004). Preliminary evaluation of resting and post prandial bile acid levels and a novel biliverdin assay in the green iguana (*Iguana iguana*). *Proceedings of the Association of Reptilian and Amphibian Veterinarians* 11: 105.

McCracken, H. (1993). Avian and Reptilian haematology and biochemistry. J. D. Stewart memorial Refresher Course for Veterinarians. Proceedings 207. Post Graduate Committee in Veterinary Science. University of Sydney. Sydney.

Mead, K. F. y Borysenko, M. (1984). Surface immunoglobulins on granular and agranular leukocytes in the thymus and spleen of the snapping turtle, *Chelydra serpentina*, *Developmental Compendium on Immunology* 8: 109-120.

Merchán, M. y Martínez-Silvestre, A. (1999). Tortugas de España. Ediciones Antiquaria. S. A.

Meyer, D. J., Coles, E. H. y Rich, L. J. (1992). *Veterinary laboratory medicine: Interpretation and Diagnosis*. W. B. Saunders, Philadelphia. pp: 101.

Migaki, G., Jacobson, E. R. y Casey, H. W. (1984). Fungal disease in reptiles. En: *Diseases of Amphibian and Reptiles*. Hoff, G. L., Frye, F. L. y Jacobson, E. R. (Eds.). Plenum Press, New York. pp: 183-204.

Mitchell, M. (2009). Snakes. En: *Manual of Exotic Pet Practice*. Mitchell, M. y Tully, T. (Eds.). Saunders Elsevier. St. Louis. pp: 143-170.

Montali, R. K. (1988). Comparative pathology of inflammation in higher vertebrates (reptiles, birds and mammals). *Journal of Comparative Pathology* 99: 1-26.

Montesinos, A., Martínez, R. y Jiménez, A. (2002). Plasma Bile Acid Concentration in Tortoises: Reference values and Histopathologic Findings of importance for Interpretation. En: 27th WSACA/FECAVA/AVEPA Congress, Granada, Spain, pp: 125-126.

Morales, P y Dunker, F. (2001). Fish tuberculosis, *Mycobacterium marinum* in a group of Egyptian spiny-tailed lizard, *Uromastix aegyptius*. *Journal of Herpetological Medicine and Surgery* 11: 27-30.

Müller, M., Sachsse, W. y Zangger, N. (1990). Herpesvirus epidemic in Greek (*Testudo hermanni*) and Moorish land tortoises (*Testudo graeca*) in Switzerland Schweiz. *Schweizer Archiv. Für Tierheilkunde* 132: 199-203.

Mundim, A.V., Queiroz, R.P., Santos, A.L.Q., Beletti, M.E. y Luz, V.L.F. (1999). Bioquímica Sanguínea da Tartaruga da Amazonia (*Podocnemis expansa*) em Seu Habitat Natural. *Bioscience Journal*. 15: 35-43.

Murakami, M., Matsuba, C., Une, Y., Nomura, Y. y Fujitani, H. (2001). Development of species-specific PCT techniques for the detection of tortoise herpesvirus. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 13: 513-516.

Muro, J., Cuenca, R., Viñas, L. y Lavín, S. (1994). Interés del hemograma en la clínica de quelonios. *Veterinaria en Praxis* 9: 24-29.

Murray, M. J. (2000). Reptilian blood sampling and artifact considerations. En: Laboratory medicine: Avian and exotic pets. A. F. Fudge (Ed.). W. B. Saunders Company, Philadelphia, pp: 185-192.

Murray, M., Waliszewski, N. T., Garner, M y Tseng, F., S. (2009). Sepsis and Disseminated Intravascular Coagulation in an Eastern Spiny Softshell Turtle (*Apalone spinifera spinifera*) with Acute Mycobacteriosis. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 40(3): 572-575.

Musquera, S., Masegu, J. y Planas, J. (1976). Blood proteins in turtles (*Testudo hermanni*, *Emys orbicularis* and *Caretta caretta*). *Compendium of Biochemical Physiology* 55: 225-230.

Myers, D. A., Mitchell, M. A., Fleming, G., Mayer, J., Lock, B., River, S. y Gill, A. (2009). Determining the value of bovine albumin as a blood cell stabilizer for pancake tortoise, *Malacochersus tornieri*, blood smears. *Journal of Herpetologic Medicine and Surgery* 18: 95-99.

N.

Natt, M. P. y Herrick, C. A. (1952). A new blood diluents for counting the erythrocytes and leucocytes of the chicken. *Poultry Science* 31: 735-738.

Needham, J. R. (1981). Microbiology and laboratory techniques. En: *Diseases of the Reptilia*. Cooper, J. E. y Jackson, O. F. (Eds.). London. Academic press. pp: 93-97.

Needham, J. R. (1986). Microbiology and captive reptiles. *Acta zoologica et pathologica antverpiensia* 79: 33-38.

Nevarez , J. G., Mitchell, M. A., LeBlanc, C. y Graham, P. (2002). Determination of plasma biochemistries, ionized calcium, vitamin D3, and hematocrit values in captive green iguanas (*Iguana iguana*) from El Salvador. *Proceedings Association of reptilian and Amphibian Veterinarians* 9: 87-94.

O.

O'Connor, M.P., Grumbles, J. S., George, R. H., Zimmerman, L. C. y Spotila, J. R. (1994). Potential hematological and biochemical indicators of stress in free-ranging desert tortoises exposed to a hydric stress gradient. *Herpetological Monograph* 8: 5-28.

Oettle, EE, Steyfler, Y. G. M. y Williams, M. C. (1990). High mortality in a tortoise colony. *South African Journal of Wildlife Research* 20(1): 21.

Oliveira-Júnior, A. A., Tavares-Dias, M. y Marcon, J. L. (2009). Biochemical and hematological reference ranges for Amazon freshwater turtle, *Podocnemis expansa* (Reptilia: Pelomedusidae), with morphologic assessment of blood cells. *Research in Veterinary Science* 86:146-151.

Olson, G. A. y Woodard, J. C. (1974). Miliary tuberculosis in a reticulated python. *Journal of American Veterinary Medical Association* 164: 733-735.

Origgi, F. C. y Jacobson, E. R. (2000). Diseases of the respiratory tract of chelonians. *Veterinary Clinics of North America. Exotic Animal Practice* 3: 537-549.

Origgi, F. C., Klein, P. A., Mathes, K., Blahak, S., Marshcang, R. E., Tucker, S. J. y Jacobson, E. R. (2001). Enzyme-linked immunosorbent assay for detecting herpesvirus exposure in Mediterranean tortoises (spur-thighed tortoises [*Testudo graeca*] and Hermann's tortoise [*Testudo hermanni*]). *Journal of Clinical Microbiology* 39: 3156-3163.

Origgi, F. C., Klein, P. A., Tucker, S. J. y Jacobson, E. R. (2003). Application of immunoperoxidase based techniques to detect herpesvirus infection in tortoises. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 15: 133-140.

Origgi, F. C., Romero, C. H., Bloom, D. C., Klein, P. A., Gaskin, J. M., Tucker, S. J. y Jacobson, E. R. (2004). Experimental Transmission of a Herpesvirus in Greek Tortoises (*Testudo graeca*). *Veterinary Pathology* 41: 50-61.

Orós, J., Deniz, S., Rodríguez, J. L., Rodríguez, F., Molina, J. M. y Fernández, A. (1996). Hallazgos anatomopatológicos y microbiológicos en reptiles mantenidos en cautividad y tortugas marinas de vida libre. *Revista Española de Herpetología* 10: 117-125.

Orós, J., Rodríguez, J. L., Déniz, S., Fernández, L. y Fernández, J. (1998). Cutaneous poxvirus-like infection in a captive Hermann's tortoise, *Testudo hermanni*. *Veterinary Record* 143: 508-509.

Orós, J., Acosta, B., Gaskin, J. M., Déniz, S. y Jensen, H. E. (2003). *Mycobacterium kansasii* infection in a Chinese soft Shell turtle (*Pelodiscus sinensis*). *Veterinary Record* 152: 474-476.

Otis, V. S. (1973). Hemocytological and serum chemistry parameters of the African puff adder, *Bitis arietans*. *Herpetologica* 29: 110-116.

Ottaviani, G. y Tazzi, A. 1977. The lymphatic system, en *Biology of the Reptilia*, Gans C and Parsons TS (Eds.), Vol. 6. *Morphology* E. Academic Press, New York, pp: 315-462.

Owens, D. W. y Ruiz, G. J. (1980). New methods of obtaining blood and cerebrospinal fluid from marine turtles. *Herpetologica* 36: 17-20.

Oyewale, J. O., Ebute, C.P., Ogunsanmi, A. O., Olayemi, A. O. y Durotoye, L. A. (1998). Weights and blood profiles of the west African hinge-backed tortoise, *Kinixys erosa* and the desert tortoise, *Gopherus agassizii*. *Zentralbl Veterinarmed A*. 45: 599-605.

P.

Pagés, T., Peinado, V. I. y Viscor, G. (1992). Seasonal changes in hematology and blood chemistry of the freshwater turtle *Mauremys caspica leprosa*. *Compendium of Biochemical Physiology* 103: 275-278.

Pantaloni, F. (1985). Apports diagnostiques des examens hématologiques et biochimiques chez les rapaces. Thèse Doctorale Vétérinaire. Toulouse.

Pasmans, F., Blahak, S., Martel, A. y Pantchev, N. (2008). Introducing reptiles into a captive collection: The role of the veterinarian. *The Veterinarian Journal* 175:53-68.

Pettan-Brewer, K. C., Drew, M. L., Ramsay, E., Mohr, F. C. y Lowenstine, L. J. (1996). Herpesvirus particles associated with oral and respiratory lesions in a California desert tortoise (*Gopherus agassizii*). *Journal of Wildlife Diseases* 32: 521-526.

Peterson, C. C., (2002). Temporal, population and sexual variation in hematocrit of free-living desert tortoises: Correlation tests of causal hypotheses. *California Journal of Zoology* 80: 461-470.

Phillips, I. R., (1986). Reptiles encountered in practice: a survey of two hundred and forty cases. *Journal of Small Animal Practice* 27: 807-824.

Posthaus, H., Marschang, R. E., Gravendyck, M. (1997a). Study on herpesvirus infections in land tortoises in Switzerland. *Proceedings of American Association of Zoo Veterinarians* 17.

Posthaus, H., Bacciarini, I. N., Pagan, O., Krampe, M. y Heldstab, A. (1997b). Causes of mortality in hawksbill turtles (*Eretmochelys imbricate*) at the Basle Zoo. En: *Internationalen Symposiums uber die Erkrankungen der Zoo-und Wildtiere, Verhandlungs-bericht des 38, Zurich, Switzerland*. pp: 39-42.

Pugh, F. H. (1980). The advantages of ectothermy for tetrapods. *American Naturalist* 115: 92-112.

Prezant, R. M., Isaza, R. I. y Jacobson, E. R. (1994). Plasma concentrations and disposition kinetics of enrofloxacin in gopher tortoises (*Gopherus polyphemus*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 25: 82-87.

Prezant, R. M. y Jarchow, J. L. (1997). Indications and applications of clinical techniques in the green iguana. *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine* 6: 63-74.

Pritchard, P. C. H. (1996). Resolutions. En: Devaux, B. (Ed.). *International Congress of Chelonian Conservation*. Le Village des Tortues, Gonfaron, France.

Q.

Quackenbush, S. L., Work, T. M., Balazs, G. H., Parrish, C. R., Bowser, P. R. y Casey, J. W. (1998). Three closely related herpesviruses are associated with fibropapillomatosis in marine turtles. *Virology* 246: 392-399.

Quesenberry, K. (1991). Plasma electrophoresis in psittacide birds. *Proceedings Association of Avian Veterinarians*, pp: 112-117.

Quesenberry, K. E., Jacobson, E. R., Allen, J. L. y Cooley, A. J. (1986). Ulcerative stomatitis and subcutaneous granulomas caused by *Mycobacterium chelonae* in a boa constrictor. *Journal of American Veterinary Medical Association* 189: 1131-1132.

R.

Ramsay, E. C. y Dotson, T. K. (1995). Tissue and serum enzymes activities in the yellow rat snake (*Elaphe obsoleta quadrivittata*). *American Journal of Veterinary Research* 56: 423-428.

Raphael, B. L., Papich, M. y Cook, R. A. (1994a). Pharmacokinetics of enrofloxacin after a single intramuscular injection in indian star tortoises (*Geochelone elegans*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 25: 88-94.

- Raphael, B. L., Klemens, M. W., Moehlman, P, Dierenfeld, E. y Karesh, W. B. (1994b). Blood values in free-ranging pancake tortoises (*Malacochersus tornieri*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 25: 63-67.
- Raskin, R. E. (2000). Reptilian complete blood count. En: *Laboratory medicine: Avian and exotic pets*. Fudge, A. M. (Ed.), W. B. Saunders Company, Philadelphia, pp: 193-197.
- Raskin, R. E. y Valenciano, A. (2000). En: *Schalm's Veterinary Hematology*. 5th ed. Feldman, B. F., Zinkl, J. G. y Jain, N. C. (Eds.). Lippincott, Williams y Wilkins. pp: 337-346.
- Rastogi, N., Legrand, E. y Sola, C. (2001). The mycobacteria: an introduction to nomenclature and pathogenesis. *Revue scientifique et technique* (International Office of Epizootics) 20: 21-54.
- Rebell, G., Rywlin, A. y Haines, H. (1975). A herpesvirus-type agent associated with skin lesions of green sea turtles in aquaculture. *American Journal of Veterinary Research* 36: 1221-1224.
- Rechav, Y., Dauth, J., Dreyer, M. J. y Fielden, L. J. (1993). Selected biochemical parameters in captive mountain tortoises (*Geochelone pardalis*). *Journal of South African Veterinarian Association* 64: 35-36.
- Redrobe, S. (1997). Post-mortem of the mediterranean tortoise (*Testudo spp.*). *Proceedings of the Association of Amphibian and Reptilian Veterinarians* 1: 67.
- Redrobe, S. y McDonald, J. (1999). Sample collection and clinical pathology of reptiles. *Veterinary Clinics of North America: Exotic animal practice* 2: 709-730.
- Rhodin, A. G. J. y Anver, M. R. (1977) Mycobacteriosis in turtles: cutaneous and hepatosplenic involucmed in a *Phrynops hilari*. *Journal of Wildlife Diseases* 13: 180-183.
- Richter, A. G., Olsen, J., Fletcher, K., Bemirschke, K. y Bogart, M. (1977). Techniques for collecting blood from Galapagos tortoises and box turtles. *Veterinary Medicine/ Small Animal Clinician* 8: 1376-1378.

Ritchie, B. W. 1995. *Avian viruses: function and control*, Lakeworth, Fla, Wingers Publishing.

Ritchie, B. W., Harrison, G. J. y Harrison, L. R. (1994). *Avian Medicine: Principles and Application*. Wingers Publishing Inc, Florida.

Robertson, G. W. y Maxwell, M. H. (1990). Modified staining techniques for avian blood cells. *British Poultry Science* 31: 881-886.

Roizman, B., Desrosiers, R. C., Fleckenstein, B., López, C., Minson, A. C. y Studdert, M. (1996). En: *Virus Taxonomy. Classification and Nomenclature of Viruses*, 6th ed (Murphy, F. A., Fauquet, C. M., Bishop, D. H. L., Ghabrial, S. A., Jarvis, A. W., Martelli, G. P., Mayo, M. A. y Summers, M. D. Eds.), Springer-Verlag, Wien, 114-127.

Rosenthal, K. L. y Mader, D. R. (1996). Microbiology. En: Mader, D. R. (ed.). *Reptiles medicine and surgery*. Saunders Company, Philadelphia. pp: 118-125.

Roskopf, W. J. (1982). Normal hemogram and blood chemistry values for California desert tortoises. *Veterinary Medicine/Small Animal Clinician* 1: 85-88.

Roskopf, W. J. y Howard, E. (1983). End stage kidney disease in a Californian desert tortoise. *Tortuga Gazette*. May 5.

Roskopf, W. J. (1990), The Upper respiratory Syndrome in captive desert tortoises: diagnosis, treatment and management. Proceedings of the First International Symposium on Turtles & Tortoises: Conservation and captive Husbandry. Beaman, K. R.; Caporaso, F., McKeown, S. y Graff, D. (eds.). Chapman University, Orange, California. pp: 108-112.

Roskopf, W. J. (2000). Disorders of reptilian leukocytes and erythrocytes. En: *Laboratory medicine: avian and exotic pets*. Fudge, A. M. (Ed.). Philadelphia, Saunders Company. pp: 198-203.

Rucknagel, k. P. y Braunitzer, G. (1988). Hemoglobins of reptiles. The primary structure of the major and minor hemoglobin component of adult western painted Turtle (*Chrysemys picta belli*). *Biological Chemistry Hoppe-Seyler* 369: 123-131.

Ruiz, G., Rosenmann, M. y Núñez, H. (1993). Blood values in south american lizards from high and low altitudes. *Compendium Biochemistry and Physiology* 106 A: 713-718.

S.

Saint Girons, M. C. (1970). Morphology of the circulating blood cells. En: *Biology of the reptilian*, vol. 3. Gans, C. y Parsons, T. (Eds.). Academic Press, New York, pp: 73-91.

Salakij, C., Salakij, J. y Apibal, S. (2002). Hematology, morphology, cytochemical staining and ultrastructural characteristics of blood cells in King cobras (*Ophiophagus hannah*). *Veterinary Clinics and Pathology* 31: 116-126.

Salinas, M., Francino, O., Sánchez, A. y Altet, L. (2011). *Mycoplasma* and Herpesvirus PCR Detection in Tortoises with Rhinitis-stomatitis Complex in Spain. *Journal of Wildlife Diseases* 47(1): 195-200.

Samour, H. J., Risley, D., March, T., Savage, B., Nieva, O. y Jones, D. M. (1984). Blood sampling techniques in reptiles. *The Veterinary Record* 114: 472-476.

Samour, J. H., Hawkey, C. M., Pugsley, S. y Ball, D. (1986). Clinical and pathological findings related to malnutrition and husbandry in captive giant tortoises (*Geochelone* species). *Veterinary Record* 118: 299-302.

Sánchez, J. M., Crespillo, E. y Romero, J. (1986). La tortuga mora de la península ibérica. *Vida Silvestre* 59: 170-187.

Sánchez-Migallon, D., Mitchell, M. y Acierno, M. (2007). Estimating plasma osmolarities in captive male corn snakes (*Elaphe guttata guttata*) using a comercial osmometer and plasma chemistry-based formulae. *Proceedings Association of Reptilian and Amphibian Veterinarians* 14: 49.

Santos, A.L.Q., Malta, T.S., Mundim, A.V., Alves-Júnior, J.R.F. y Carvalho, S.F.M., (2005). Variacao dos constituintes bioquímicos sanguíneos de tartarugas-da-Amazonia (*Podocnemis expansa* Schweigger, 1812) (Testudinata) mantidas em criatorio comercial. *Archives of Veterinary Science* 10:1-8.

Schildger, B. J., Weib, R., Frank, H. y Wicker, R. (1991). Mycobacteriosis in Australian snake-neck turtles (*Chelodina longicollis*). En: Proceedings of the 4th *International Colloquium on Pathology and Medicine of Reptiles and Amphibians*, Bad Nauheim, Germany, 62-67.

Schumacher, I. M., Brown, M. B., Jacobson, E. R., Collins, B. R. y Klein, P. A. (1993). Detection of antibodies to a pathogenic mycoplasma in desert tortoises (*Gopherus agassizii*) with upper respiratory tract disease. *Journal of Clinical Microbiology* 31: 1454-1460.

Schumacher, J. (1996). En: *Reptile Medicine and Surgery*, Mader, D. R., ed. W. B. Saunders Company, Philadelphia. pp: 224-234.

Schumacher, J. (1997). Respiratory diseases of reptiles. *Seminar in Avian and Exotic Pet Medicine* 6: 209.

Scope, A., Schwendenwein y Schauburger, G. (2013). Characterization and quantification of the influence of season and gender on plasma chemistries of hermann's tortoises (*Testudo hermanni*, Gmelin 1789). *Research in Veterinary Science* 95: 59-68.

Seidel, M. E. (2003). Hemoglobina variation and comments on systematic relationship I the turtle family Emydidae. *Copeia* 4: 1118-1121.

Sheeler, P. y Barber, A. A. (1965). Reticulocytosis and iron incorporation in the rabbit and turtle: a comparative study. *Comparative Biochemistry and Physiology* 16: 63-76.

Shoemaker, V. H., Licht, P. y Dawson, W. R. (1966). Effects of temperature on kidney function in the lizard *Tiliqua rugosa*. *Physiological Zoology* 39: 244-252.

Skoric, M., Mrlik, V., Svobodova, J., Beran, V., Slany, M., Fictum, P., Pokorny, J. y Pavli, I. (2012). Infection in a female Komodo dragon (*Varanus komodensis*) caused by *Mycobacterium intracellulare*: a case report. *Veterinarni Medicina* 57(3): 163-168.

Smith, H. W. (1951). *The kidney: Its structure and function in Health and Disease*. Oxford University Press, New York.

- Soares, J. F., Chalker, V. J., Erles, K., Holtby, S., Waters, M. y McArthur, S. (2004). Prevalence of *Mycoplasma agassizii* and chelonian herpesvirus in captive tortoises (*Testudo* spp.) in the United Kingdom. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 35: 25-33.
- Soldati, G., Lu, Z. H., Vaughn, L., Polkinghorne, A., Zimmerman, D. R., Huder, J. B. and Pospischil, A. (2004). Detection of Mycobacteria and Chlamydiae in Granulomatous Inflammation of reptiles: A Retrospective Study. *Veterinary Pathology* 41: 388-397.
- Stacy, B. A. y Witaker, N. (2000). Hematology and blood biochemistry of captive mugger crocodiles (*Crocodylus palustris*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 31(3): 339-347.
- Stacy, B. A., Wellehan, J. F. X., Foley, A. M., Coberly, S. S., Manire, C. A., Mettee, N. S., Garner, M. M. y Jacobson, E. R. (2008). Two novel herpesviruses associated with disease in wild Atlantic loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*). *Veterinary Microbiology* 126: 63-73.
- Stein, G. (1996). Hematologic and blood chemistry values in reptiles. En: *Reptile Medicine and Surgery*. Mader, D. (Ed.). 1st edition, Philadelphia, WB Saunders.
- Stephens, G. y Creekmore, J. S. (1983). Blood collection by cardiac puncture in conscious turtles. *Copeia* 2: 522-523.
- Stöhr, A. C. y Marschang, R. E. (2010). Detection of a tortoise herpesvirus type 1 in a Hermann's tortoise (*Testudo hermanni boetgeri*) in Germany. *Journal of Herpetological Medicine and Surgery* 20: 61-63.
- Strik, N. I., Alleman, A. R. y Harr, K. E. (2007). Circulating inflammatory cells. En: *Infectious Disease and Pathology of reptiles: Color Atlas and Text*. Jacobson, E. R. (Ed.). Cabo Raton, Florida: CRC Press. pp: 167-218.
- Stubbs, D. (1989). *Testudo graeca*. En: *The Conservation Biology of Tortoises*. Swinglad, I. R. y Klemens, M. W. (Eds.). Occasional Papers of the IUCN Species Survival Commission, nº5, pp: 31-33.
- Sypek, J. y Borysenko, M. (1988). Reptiles. En: *Vertebrate blood cells*. Rowley, A. F. y Rarcliffe, N. A. (Eds.). Cambridge University Press. pp 211-256.

T.

Taylor, K. y Kaplan, H. M. (1961). Light microscopy of the blood cells of Pseudemid turtles. *Herpetologica* 17: 186-192.

Taylor, K., Kaplan, H. M. y Hirano, T. (1963). Electromicroscope study of turtle blood cells. *Cytologia* 28: 248-256.

Taylor, R. W. y Jacobson, E. R. (1982). Hematology and serum chemistry of the Gopher tortoise, *Gopherus polyphemus*. *Compendium of Biochemical Physiology* 72: 425-428.

Teifke, J. P., Löhr, C. V., Marschang, R. E., Osterrieder, N. y Posthaus, H. (2000). Detection of Chelonid Herpesvirus DNA by Nonradioactive In Situ Hybridization in Tissues from Tortoises Suffering from Stomatitis-Rhinitis Complex in Europe and North America. *Veterinary Pathology* 37: 377-385.

Telford, S. R. (2000). Reptilian renal and reproductive disease diagnosis. En: Fudge AM, ed. *Laboratory Medicine Avian and Exotic Pets*. Philadelphia, PA: WB Saunders, 219.

Tortolli, E. (2009). Clinical manifestations of nontuberculous mycobacteria infections. *Clinical Microbiology and Infection* 15: 906-910.

Tosunoglu, M., Varol Tok, C. y Çigdem, G. (2005). Hematological values in Hermann's Tortoise (*Testudo hermanni*) and Spur-thighed Tortoise (*Testudo graeca*) from Thrace region (Turkey). *International Journal of Zoological Research* 1: 11-14.

Troiano, J.C. y Silva, M.C., (1998). Valores hematológicos de referencia em tortuga terrestre Argentina (*Chelonoids chilensis chilensis*). *Analecta Veterinaria* 18, 47-51.

Troiano, J. C., Vidal, J. C., Uriarte, E., Gould, E. F., Gould, J. A., Heker, J., Simoncini, C. y Tapia, G. (2000). Osmotic fragility and erythrocyte size in *Iguana iguana* (*Sauria-iguanaidae*) in captivity. *Journal of Comparative Hematology* 22: 14-18.

Tüjrközan, O., Özdemir, A. y Kiremit, F. (2008). International Testudo Trade. *Chelonian Conservation and Biology* 7: 269-274.

Turton, J. A., Ladds, P. W., Manolis, S. C. y Webb, G. J. W. (1997). Relationship of blood corticosterone, immunoglobulin and haematological values in young crocodiles (*Crocodylus porosus*) to water temperature, clutch of original and body weight. *Australian Veterinary Journal* 75: 1124-1119.

U.

Ugurtas, I. M., Servinç, M. y Yildirimhan, H. S. (2003). Erythrocyte size and morphology of some tortoises and turtles from Turkey. *Zoological Studies* 42: 173-178.

Une, Y., Murakami, M., Uemura, K., Fugitani, H., Ishibashi, T. y Nomura, Y. (1999). Herpesvirus infection in tortoises (*Malacochersus tornieri* and *Testudo horsfieldii*). *Veterinary Pathology* 36: 624-627.

Une, Y., Murakami, M., Uemura, K., Fugitani, H., Ishibashi, T. y Nomura, Y. (2000). Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of herpesvirus in tortoises. *Journal of Veterinary Medical Science* 62: 905-907.

V.

VanDevanter, D. R., Warrener, P, Bennett, L., Schultz, E. R., Coulter, S., Garber, R. L. y Rose, T. M. (1996). Detection and analysis of diverse herpesviral species by consensus primer PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 34: 1666-1671.

Van Dijk, P.P., Iverson, J. B., Rhodin, A. G. J., Shaffer, H.B. y Bour, R. (2014). Turtles of the World, 7th Edition: Annotated Checklist of Taxonomy, Synonymy, Distribution with Maps, and Conservation Status. Turtle Taxonomy Working Group. Turtles of the World Checklist. *Conservation Biology of Freshwater Turtles and Tortoises: A Compilation Project of the IUCN/SSC Tortoise and Freshwater Turtle Specialist Group*. A.G.J. Rhodin, P.C.H. Pritchard, P.P. van Dijk, R.A. Saumure, K.A. Buhlmann, J.B. Iverson, and R.A. Mittermeier, Eds. Chelonian Research Monographs No. 5: 329-409.

Vlâdescu, C. (1964). The influence of temperature on the glycaemia of *Emys orbicularis* L. *Revue Roumaine Biologie. Section Zoologie* 9: 413-420.

W.

Wahlquist, H. (1990). Gopher tortoise conservation. *Proceedings of the First International Symposium on Turtles & Tortoises: Conservation and captive Husbandry*. Beaman, K. R.; Caporaso, F., McKeown, S. y Graff, D. (eds.). Chapman University, Orange, California. pp: 79.

Wallach, J. D. y Boever, W. J. (1983). *Diseases of exotic Animals: medical and surgical management*. Philadelphia, WB Saunders. pp: 983-987.

Welleham, J. F. X., Jarchow, J. L., Reggiardo, C y Jacobson, E. R. (2003). A novel herpesvirus associated with hepatic necrosis in a San Esteban chuckwalla (*Sauromalus varius*). *Journal of Herpetological Medicine and Surgery* 13: 15-19.

Westhouse, R. A., Jacobson, E. R., Harris, R. K., Winter, K. R. y Horner, B. L. (1996). Respiratory and pharyngo-esophageal iridovirus infection in a gopher tortoise (*Gopherus polyphemus*). *Journal of Wildlife Diseases* 32: 682-686.

Wetzel, R. y Wagner, R. A. (1998). Tissue and plasma enzyme activities in the common green iguana (*Iguana iguana*): *Proceedings of the Association of Reptilian and Amphibian Veterinarians* 2: 63.

Wilkinson, R. (2004). Clinical Pathology. En: *Medicine and Surgery of Tortoises and Turtles*: McArthur, S., Wilkinson, R. y Meyer, J. (Eds.). Blackwell Publishing Ltd. Iowa. pp: 141-187.

Wood, F. E. y Ebanks, G. K. (1984). Blood cytology and hematology of the green sea turtle *Chelonia mydas*. *Herpetologica* 40: 331-336.

Work, T. M. y Balazs, G. H. (1999). Relating tumor score to hematology in green turtles with fibropapillomatosis in Hawaii. *Journal of Wildlife Diseases* 35: 804-807.

Wright, A. y Jones, I. C. (1957). The adrenal gland in lizards and snakes. *Journal of Endocrinology* 15: 83-99.

Y.

Yang, Pu-Yu, Yu, Pin-Huan, Sheng-Hai Wu, Sheng-Hai y Chie, Chau-Hwa. (2014). Seasonal hematology and plasma biochemistry reference range values of the yellow-margined box turtle (*Cuora flavomarginata*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 45:2, 278-286.

Z.

Zaias, J., Norton, T., Fickel, A., Spratt, J., Altman, N. H. y Cray, C. (2006). Biochemical and hematologic values for 18 clinically healthy radiated tortoises (*Geochelone radiata*) on St. Catherines Island, Georgia. *Veterinarian Clinical Pathology* 35: 321-325.

Zwartepoorte, Henk (2011). British Chelonia Group Symposium. Open University, Milton Keynes, 13th March.

