

Pohľad do ríše exotov – hematológia u plazov

Chov plazov sa v posledných rokoch teší čoraz väčšej obľube. To sa odráža v organizácii početných výstav exotov a v predaji plazov v každom väčšom obchode so zvieratami a s chovateľskými potrebami. Zvieratá sú ponúkané s výhodnou cenou a v „all-inclusive“ akciách a kupované nič netušiacimi milovníkmi zvierat. Často nasleduje už po krátkom čase nemilé prebudenie sa do reality – zvieratá ochorejú a v rastúcom počte sa prezentujú vo veterinárnych ambulanciách.

To sa postará o určite vítanú zmenu v bežnom chode veterinárnej praxe, predstavuje však aj novú výzvu.

Nielen fyziológia ektotermných plazov a napríklad ich reakcia na lieky sa markantne odlišuje od cicavcov, ale aj možnosti laboratórnych vyšetrení, ktoré máme k dispozícii a morfológia krvných buniek sú veľmi rozdielne.



Obr.1: Leguán zelený vo svojom prirodzenom habitate

Odber vzoriek

Technika odberu krvi významne závisí od druhu pacienta. Metódy ako odstrihnutie pazúra alebo konca chvosta sú posudzované ako obsolentné a nie sú žiadnou alternatívou k odborne prevedenej venopunkcii (Tab 1).

Platia všeobecné odporúčania:

- môže sa odoberať 0.5 až 0.8% telesnej hmotnosti od zdravého nedehydratovaného zvieratá.
- ako antikoagulans sa uprednostňuje Li-heparín, nakoľko EDTA môže viesť

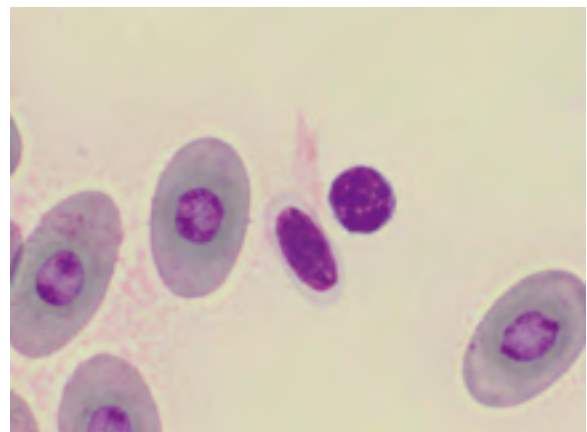
- predovšetkým u korytnačiek k hemolýze.
- z dôvodu vyvarovania sa preanalytických chýb (starnutie buniek, aglutinácia) sa odporúča okamžite zhotoviť krvný náter.

Korytnačky	<ul style="list-style-type: none"> • vena jugularis • vena subcarapacialis • vena coccygea dorsalis a ventralis • (sinus occipitalis, v. brachialis, v. femoralis)
Jaštery	<ul style="list-style-type: none"> • vena coccygea ventralis • vena abdominalis ventralis • (plexus brachialis)
Hady	<ul style="list-style-type: none"> • vena coccygea ventralis • (srdce) • (vena palatina)

Tab.1: Miesta odberu krvi u plazov

Analytika

Základným rozdielom medzi krvnými bunkami plazov a cicavcov je, že jadrá majú nielen leukocyty a prekursor erytrocytov, ale aj zrelé erytrocyty a trombocyty (Obr.2).



Obr.2: Erytrocyty, trombocyt (v strede) a lymfocyt

Automatizované počítanie buniek v krvi spočíva vo všeobecnosti v zmeraní a lýze erytrocytov a následnom počítaní leukocytov. Keďže sa jadrá erytrocytov a trombocytov u plazov nerozpustia, nie je možné spoľahlivé a exaktné odlišenie buniekových línií. Preto nie je veľmi zmysluplné merať krv plazov na hematologických analyzátoroch. Človek je tak odkázaný na manuálne stanovovanie počtu buniek:

Jednou možnosťou je počítanie buniek v počítacích komôrkach (napr. Unopette System, Natt and Herrick's Solution). Metodika je náročná a napriek tomu poznamenaná vyššou variabilitou výsledkov ako pri automatizovaných postupoch. Druhou možnosťou je posúdenie počtu leukocytov a trombocytov na ofarbených krvných náteroch. Aj táto metóda sa vyznačuje vysokou nepresnosťou, s trochou cviku je ale jednoduchá a rýchla na uskutočnenie. Počíta sa s objektívom 40x (t.j. zväčšenie 400x), resp. aj s objektívom 100x (t.j. zväčšenie 1000x) minimálne 10 zorných polí v monolayeri. Vypočíta sa priemerný počet leukocytov na zorné pole a toto číslo sa násobí druhou mocninou zväčšenia objektívu (t.j. pri 40x objektíve faktorom 1600 a pri objektíve 100x faktorom 10000). Výsledok je počet buniek na μl krvi. Malý príklad počítania:

7 leukocytov/400x zorné pole
 $7 \times 1600 = 11200$
 Celkový počet leukocytov je 11200/ μl

Trombocyty sa počítajú analogicky k leukocytom pri zväčšení 1000x, ale násobia sa faktorom 15000.

Okrem toho sa z krvného náteru stanoví diferenciálny krvný obraz a posúdi sa morfológia buniek.

Počet erytrocytov sa nedá určiť, ale stanovenie hematokritu v hematokritovej centrifúge sa uskutočňuje rovnako ako u cicavcov.

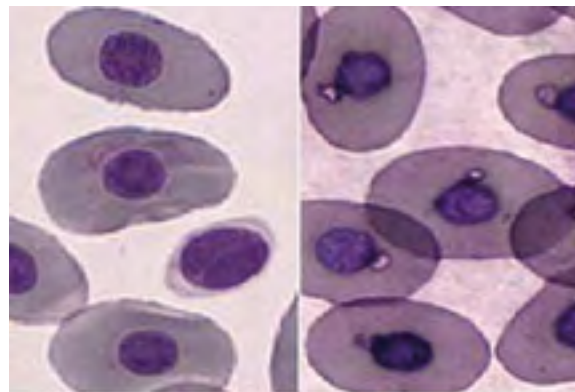
Koncentrácia hemoglobínu sa dá stanoviť prostredníctvom hematologických analyzátorov.

Bunková morfológia

Erytrocyty plazov sú oválne s jedným, centrálnym situovaným bunkovým jadrom. Cytoplazma je v závislosti od farbenia oranžová až ružová alebo svetlofialová s homogénnou štruktúrou. Často pozorujeme bodkové bazofilné alebo nepravidelné priehľadné inklúzie (Obr.3.) Jedná sa väčšinou o artefakty, ktoré vznikajú v priebehu farbenia alebo z dôvodu príliš dlhého schnutia preparátu.

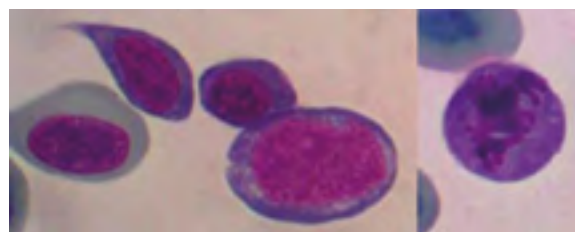
Mierny stupeň anizocytózy a polychromazie je u väčšiny plazov fyziologický.

Zvýšený počet polychromatických (juvenilných) erytrocytov sa vyskytuje pri regeneratívnych anémiách, počas zvliekania kože a u mladých zvierat.



Obr.3: vľavo normálne erytrocyty a jeden trombocyt, vpravo erytrocyty s artefaktmi vzniknutými pri sušení

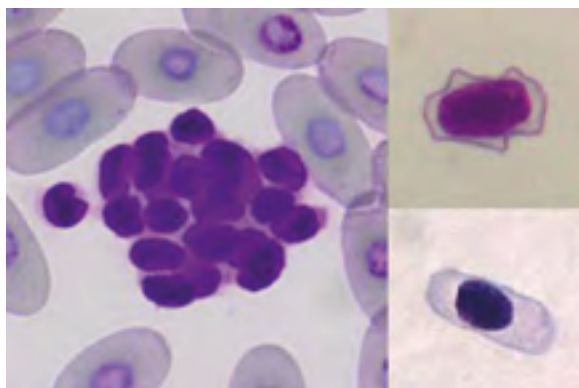
V zriedkavých prípadoch regeneratívnych anémií ale tiež pri masívnych zápaloch či posthibernálne sa stretávame s dysplastickými prekurzormi erytrocytov. Na rozdiel od cicavcov, u plazov nepredstavujú nevyhnutne príznak ochorenia kostnej drene či erytroleukémie.



Obr.4: dysplastické vývojové štádiá erytrocytov (vľavo) a erytrocyt v mitóze (vpravo) u chameleóna s masívnym zápalom z dôvodu cudzieho telesa v kloake.

Trombocyty sú v krvných náteroch veľmi často agregované, čo sťažuje posúdenie ich celkového počtu. Pri výskyte väčšieho počtu agregátov (Obr.5) môžeme ale vychádzať z toho, že sa počet trombocytov pohybuje v referenčnom rozmedzí.

Morfologicky môžu trombocyty plazov vyzeráť veľmi rozdielne, vždy ale obsahujú jadro a väčšinou majú oválny tvar (Obr.5). Cytoplazma je zväčša bezfarebná, v niektorých prípadoch sa ukazuje ako bledomodrá alebo bledofialová. Keď sú také trombocyty ešte aj okrúhle, je veľmi ľahké si ich zameniť s malými lymfocytmi. (Obr.6).

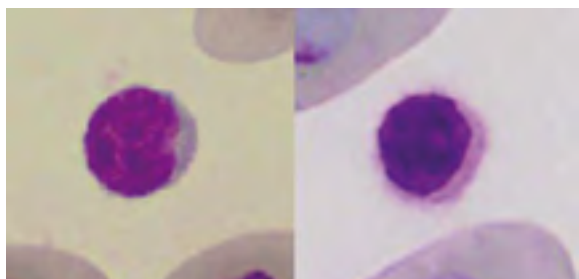


Obr.5: vľavo: agregát trombocytov (korytnačka grécka), vpravo: odlišná morfológia trombocytov (hore agama, dolu veľhad kráľovský)

Leukocyty plazov sa rozdeľujú na heterofilné, eozinofilné a bazofilné granulocyty, lymfocyty, monocyty a azurofily. Klasifikácia je často ťažká, nakoľko morfológia medzi jednotlivými druhmi, ale tiež medzi poddruhmi jedného druhu veľmi výrazne varíruje.

Diferenciálny krvný obraz vykazuje aj fyziologicky veľké výkyvy, na jednej strane individuálne v závislosti od ročného obdobia, vonkajšej teploty, čiastočne aj od pohlavia, na druhej strane medzi rôznymi druhmi. Niektoré druhy plazov majú tzv. lymfocytárny krvný obraz, čiže lymfocyty fyziologicky predstavujú väčšinový podiel leukocytov (napr. agama, leguán zelený, korytnačky), zatiaľ čo u ostatných dominujú granulocyty.

Lymfocyty sa veľmi podobajú lymfocytom cicavcov a vo všeobecnosti sa dajú ľahko odlišiť od ostatných bielych krviniek. Majú okrúhle jadro s kondenzovaným chromatínom a málo bazofilnej cytoplazmy.

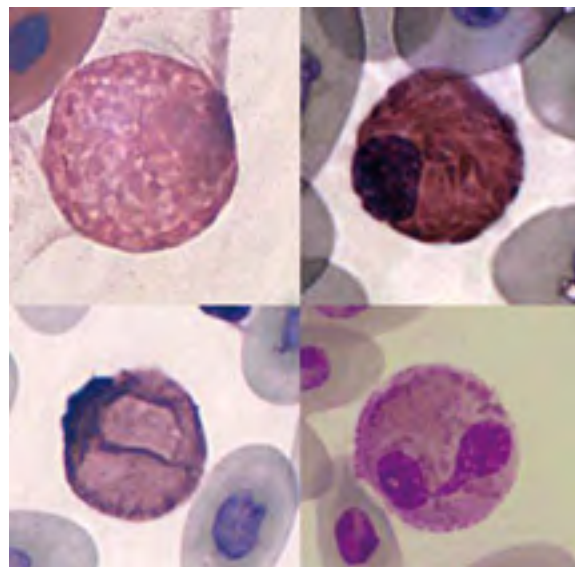


Obr.6: vľavo: malý lymfocyt, vpravo: trombocyt

Lymfocytózu pozorujeme v súvislosti so zápalmi a vírusovými infekciami.

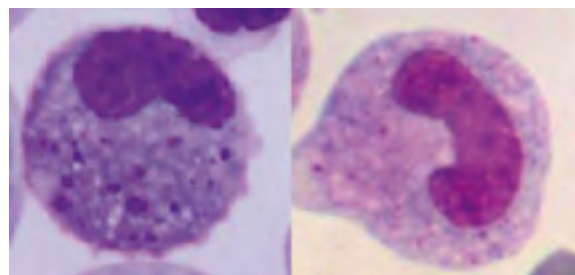
Heterofilné granulocyty funkčne zodpovedajú neutrofilom cicavcov. Granule sú na náteroch ofarbených rýchlofarbeniami väčšinou oranžové až ružové. V niektorých prípadoch sa môžu rozpustiť a

sposobiť tak eozinofilné sfarbenie cytoplazmy (Obr. 7, vľavo dolu). Rozlíšenie heterofilných a eozinofilných granúl je len na základe farby často nemožné. Heterofily sú však väčšinou väčšie ako eozinofily a granule majú pozdĺžny tvar, zatiaľ čo eozinofilné granule sú skoro vždy okrúhle.



Obr.7: Heterofilné granulocyty: vľavo hore: veľhad kráľovský, vpravo hore: korytnačka písmeňková žltolica, vľavo dolu: korytnačka žltocierna, vpravo dolu: leguán zelený

Heterofily niektorých druhov majú okrúhle jadrá (napr. korytnačky, krokodíly, hady), u iných (napr. leguány, chameleóny, agamy) je jadro zrelých buniek segmentované.

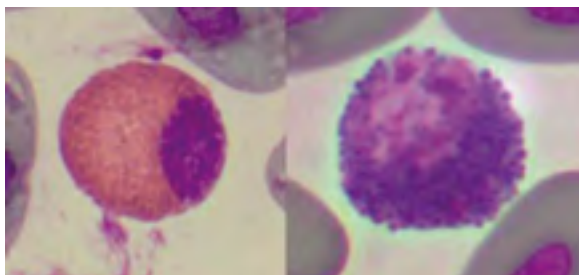


Obr. 8: vľavo: tyčinkovitý heterofil s toxickou granuláciou, vpravo: tyčinkovitý heterofil (leguán zelený)

Zvýšený počet heterofilov nachádzame v prvom rade pri zápaloch (často spolu s monocytózou), ale aj pri strese, paraneoplastických syndrómoch a pri leukémiách (zriedkavo).

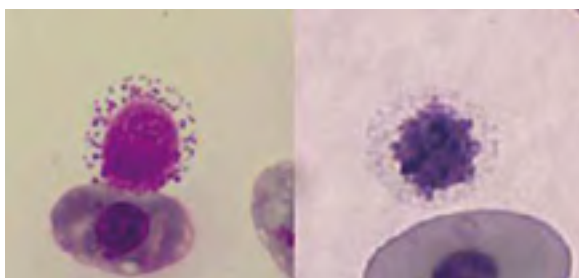
V prípade ťažkých, akútnych zápalov nachádzame u zvierat, ktoré majú normálne segmentované jadro, aj tyčinky (posun doľava). V extrémnych prípadoch môžeme vidieť toxické zmeny: strata fyziologických granúl, bazofilná a/alebo vakuolizovaná cytoplazma a toxická granulácia (Obr. 8).

Eozinofilné granulocyty obsahujú u väčšiny plazov žiarivo červené príp. oranžové okrúhle granule. U niektorých jašterov sa ukazujú malé, tiež guľaté, ale modrosivé granule (napr. leguán zelený, agama). Počet eozinofilov výrazne kolíše v závislosti od druhu (korytnačky majú často vysoké počty) ale aj od faktorov ako je ročné obdobie a parazitárne infekcie.



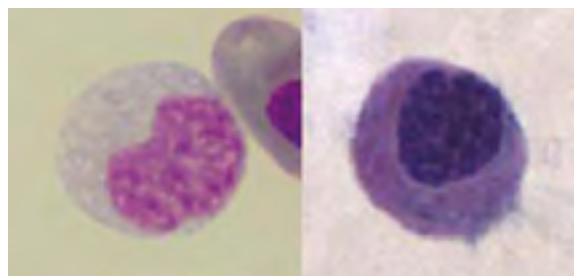
Obr. 9: eozinofilné granulocyty; vľavo: korytnačka písmenková ozdobná, vpravo: leguán

Bazofilné granulocyty majú tmavofialové granule, často v takom veľkom množstve, že nie je ani vidno excentricky uložené bunkové jadro. Pri použití súprav pre rýchle farbenie sa často granule nafarbia len čiastočne alebo vôbec, v extrémnych prípadoch sa dajú rozoznať len priehľadné cytoplazmatické vakuoly (Obr. 10).



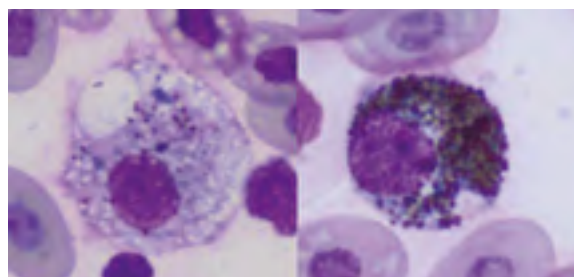
Obr.10: bazofilné granulocyty; vpravo sa granule nezafarbili, dajú sa rozoznať ako priehľadné vakuoly

Monocyty rovnako ako u cicavcov môžu mať rôzny tvar jadra, vždy sa ale vyznačujú veľkým množstvom modrosivej cytoplazmy. Pri aktivácii môže cytoplazma obsahovať priehľadné vakuoly. S monocytózou sa stretávame pri mnohých (predovšetkým granulomatózných) zápaloch.



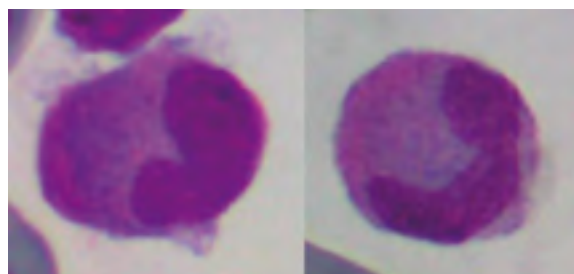
Obr.11: Monocyty; vľavo: korytnačka písmenková ozdobná, vpravo: veľhad kráľovský

Zvláštnosťou u plazov sú makrofágy, ktoré fagocytovali granule melanínu, tzv. melanomakrofágy. Často ich vidíme hlavne pri dermatitidach, ale aj pri iných zápalových procesoch (Obr. 12).



Obr.12: Melanomakrofágy, vľavo s niekoľkými, vpravo s mnohými granulami melanínu u leguána s masívnou dermatitídou

Pôvod **azurofilov** je vášnivo diskutovanou témou. Morfologicky bunky vyzerajú ako monocyty, ktoré obsahujú v cytoplazme jemné eozinofilné granule (Obr. 13). Preto sú mnohými autormi klasifikované ako podskupina monocytov, iní vedci ich považujú za samostatnú líniu buniek. Klinický význam azurofilov je však zatiaľ nejasný.



Obr.13: Azurofily u chameleóna jemenského