

林務局補助計畫

獼猴內視鏡結紮試驗及金龜血液及生化值研究

結案報告

## 摘要

台灣獼猴為台灣特有種，是珍貴的野生動物，除了人類之外，唯一原住於台灣的靈長類。其屬於晝行性且群體生活的動物。分布地區活躍於中低海拔山嶽，高從玉山國家公園，低至八卦臺地南部，其中低海拔以彰化二水、高雄壽山山區居多。

近年來隨著保育意識及復育工作的進行，台灣獼猴於野外的族群量大為增加，其棲地漸與民眾生活區域重疊，時有獼猴下山覓食造成民眾健康財務損失之報導。因此對於特定地區繁殖過盛或棲地飽和之情形，積極尋求生育控制之方法以謀求野生動物及在地居民之共同最大利益刻不容緩。

內視鏡微創手術為近年來手術醫療之一大進展，它包含手術時間短、手術創口侵入性小、術後疼痛、照顧、併發症少之優點，於野生動物的醫療上可達成在短時間內完成相對較大數量的處置，且手術後的縫線反應少無需長時間住院照顧傷口。內視鏡結紮為針對母畜進行輸卵結紮及公畜進行輸精管結紮，除上述之優點，由於動物之性腺並未如傳統手術方被摘除，所以體內荷爾蒙並不受影響，此對於群居的台灣獼猴之社會地位之維持及族群健康尤其重要。

因此本計畫之目的為利用內視鏡方法對於國立宜蘭大學收容之台灣獼猴進行母猴之輸卵結紮及公猴之輸精管結紮，母猴 6 隻公猴 20 隻共計 26 隻，未來期望達到野外長期族群之控制，減少野生動物與居民在共同土地上的衝突。

# 材料與方法

## 第一節 獼猴結紮

### (一) 實驗對象

飼養於國立宜蘭大學野生動物收容中心之台灣獼猴

### (二) 實驗方法

1. 待動物麻醉後，針對母畜進行超音波檢查，以確定其未懷孕。並進行剃毛及刷

洗之術前無菌準備工作，同時全程監控麻醉下之生理數值，必要時提供需要的

支持治療例如上針輸液或插管。

3. 公畜進行陰囊前之輸精管結紮：在陰囊前以手術刀畫開約 2 公分之創口，以組織鉗鈍剝分離出輸精管，以結紮線進行雙重結紮，並以手術刀畫斷輸精管，手術之傷口以可吸收縫線進行皮內縫合。

4. 母畜進行內視鏡之輸卵管結紮：於腹中線兩側各開一 2-3 公分之創口，以內視鏡管道維持與腹腔通道，伸入工作鏡並打氣撐開腹腔，以工作鉗確認輸卵管位置並加以燒灼，手術之傷口以可吸收縫線進行皮內縫合。

5. 將動物置於籠中待麻醉甦醒，並監控生理數值。

6. 放回籠中。

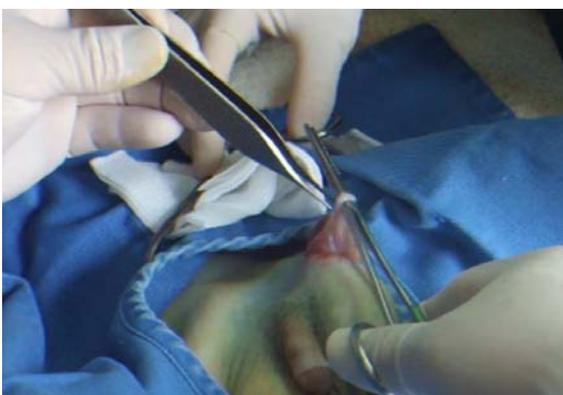


於國立宜蘭大學保育中心手術情形

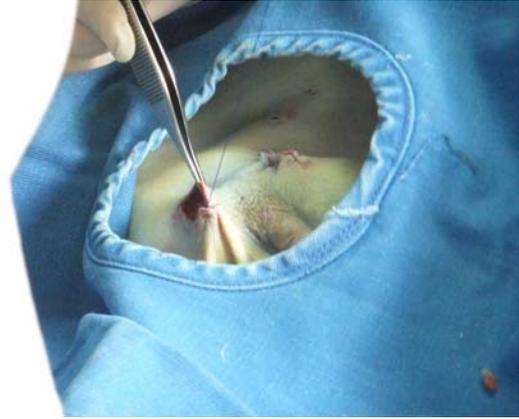
### 公猴輸精管結紮



於陰囊前切開皮膚，鈍剝分離皮下組織及精索夾膜



分離出輸精管，並於兩側做雙重結紮

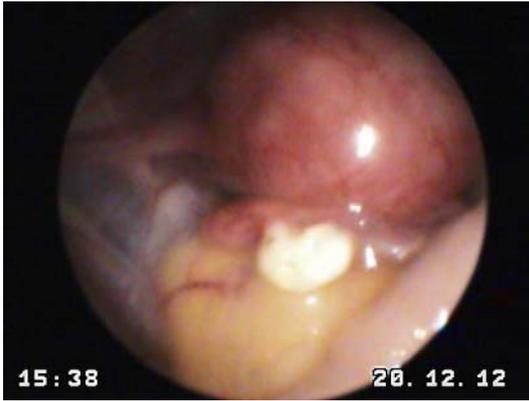


剪斷輸精管並做皮內縫合

母猴內視鏡結紮



母猴背側躺，以氣腹針刺入腹腔後，接上通氣管打氣



伸入 TROCHAR 後以內視鏡觀察腹腔及子宮



分離出輸卵管並進行燒灼，皮膚以皮內縫合

## 第四章 結果

### 第一節 公猴輸精管結紮及母猴輸卵管結紮

本年度共進行公母猴結紮 26 隻，其中公猴 20 隻、母猴 6 隻，結紮後動物皆無明顯副作用，此外也確定了麻醉及結紮流程、人力配置等細節，以利將來之野外工作。



結紮後傷口癒合良好，幾乎不見傷口疤痕



母猴傷口也癒合良好無疤痕

## 第五章 討論

### (一) 內視鏡結紮預算分析

此節將以預算分析角度探討麻醉藥效及內視鏡租用情形，麻醉部份將分為吹箭麻醉及口服投藥，口服投藥則有多種組合分開討論。

Table 1. 以吹箭進行麻醉

	單價(元)	劑量/Kg	單價(元)/kg
Zoletil	92/ml	3mg/kg	5.52/kg
Dexmedetomidine	280/ml	0.03mg/kg	14/kg
Atipamezole	280/ml	0.03mg/kg	14/kg
Atropine	10/ml	0.03mg/kg	0.3/kg
Meloxicam	60/ml	0.1mg/kg	0.6/kg
Propofol	16/ml	2mg/kg	12/kg
Penicillin G	1.5/ml	40000IU/kg	0.2/kg
Metoclopramide	10/ml	0.5mg/kg	1/kg
吹箭針頭	10/個		
吹箭針筒	50/個		

Table 2. 以 Chloral hydrate - Zoletil 進行口服麻醉

	單價(元)	口服劑量/Kg	針劑劑量/kg	單價(元)/kg
Zoletil	92/ml	30mg/kg		55.2/kg
Dexmedetomidine	280/ml		0.03mg/kg	14/kg
Atipamezole	280/ml		0.03mg/kg	14/kg
Atropine	10/ml		0.03mg/kg	0.3/kg
Meloxicam	60/ml		0.1mg/kg	0.6/kg
Propofol	16/ml		2mg/kg	12/kg
Penicillin G	1.5/ml		40000IU/kg	0.2/kg
Metoclopramide	10/ml		0.5mg/kg	1/kg
Chloral hydrate	4/g	90mg/kg		2.145/kg

Table3. 以 Chloral hydrate - Dexmedetomidine 進行口服麻醉

	單價(元)	口服劑量/Kg	針劑劑量/kg	單價(元)/kg
Zoletil	92/ml		3mg/kg	5.52/kg
Dexmedetomidine	280/ml	0.07mg/kg		32.67/kg
Atipamezole	280/ml		0.07mg/kg	32.67/kg
Atropine	10/ml		0.03mg/kg	0.3/kg
Meloxicam	60/ml		0.1mg/kg	0.6/kg
Propofol	16/ml		2mg/kg	12/kg
Penicillin G	1.5/ml		40000IU/kg	0.2/kg
Metoclopramide	10/ml		0.5mg/kg	1/kg
Chloral hydrate	4/g	90mg/kg		2.145/kg

Table 4. 以 Zoletil - Dexmedetomidine 進行口服麻醉

	單價(元)	口服劑量/Kg	針劑劑量/kg	單價(元)/kg
Zoletil	92/ml	21.5mg/kg		39.56/kg
Dexmedetomidine	280/ml	0.07mg/kg		32.67/kg
Atipamezole	280/ml		0.07mg/kg	32.67/kg
Atropine	10/ml		0.03mg/kg	0.3/kg
Meloxicam	60/ml		0.1mg/kg	0.6/kg
Propofol	16/ml		2mg/kg	12/kg
Penicillin G	1.5/ml		40000IU/kg	0.2/kg
Metoclopramide	10/ml		0.5mg/kg	1/kg

Table 5. 手術耗材

	單價(元)	個數	總價
手術口罩	3/個	3	9
手術帽	5/個	3	15
無菌手套	36/副	2	72
靜脈留置針	80/個	1	80
T set	70/個	1	70
Cap	30/個	1	30
IV set	30/個	1	30
蝴蝶針	20/個	1	20
各式針頭	5/個	2	10
縫線	75/個	0.5	37.5
刀片	8/個	1	8
針筒 3、5cc	10/個	3	30
針筒 1、10、20cc	20/個	4	80

Total			491.5
-------	--	--	-------

Table 6.以 7kg 的猴子為例所需要的麻醉及手術價錢

麻醉方式	麻醉單價	耗材單價	總價
吹箭	393.34	491.5	884.84
口服 Chloral hydrate - Zoletil	696.115	491.5	1187.615
口服 Chloral hydrate - Dexmedetomidine	609.735	491.5	1101.235
口服 Dexmedetomidine - Zoletil	833	491.5	1324.5

因此，綜合麻醉效果及價錢考量，口服麻醉以 Chloral hydrate - Zoletil 效果最好，且每隻猴子執行手術費用約 1100 元最為經濟。若配合內視鏡租用費每 2 日兩萬元，若 2 日內可執行 20 隻猴子的結紮，則公猴每次結紮費用約 1100 元、而母猴內視鏡結紮則為 2500 元，平均每隻猴子結紮費用約為 1800 元。若手術速度可再加以提升則能降低內視鏡租用成本，下降平均之結紮費用。

若再加入野外操作所必須的設備費用，手術環境設計建立，維持費用，包括：帳棚 8000 元，台車 6000 元、發電機 50000 元，捕捉器具材料包括：手操網，不鏽鋼籠 2500/個，共需 8 個 20000 元，因此粗估每年度每隻猴子成本會再增加 1500 元，共約母猴 4000 元、公猴 3300 元。

內視鏡器械若以單價購買則單價如下：夾線器 56000 元、抽吸管 4800 元、控制器 13000 元、結繩器 6000 元、撥棒 5000 元、雙極電燒鉗 38000 元、穿刺套管 45000 元、剪刀 42000 元、組織鉗 41000 元、穿刺針 6000 元、內視鏡 170000 元、雙極電燒線 6100 元、光源線 31000 元、30L 充氣機 650000 元、內視鏡主機(含鏡頭及光源)1200000 元，共計 2160900 元，因此若需執行計畫將會大幅增加每隻獼猴進行結紮之成本。

## 第六章 結論

在獼猴結紮部份本年度共完成 26 隻獼猴之結紮，確定了結紮獼猴之固定流程，未來內視鏡結紮方式對於特定地區之野生台灣獼猴進行生育及族群數量控制，應可發揮長足功效，並藉由長期監控其成效，可進一步評估野生動物之數量控制是否可以減少人獸間的衝突。未來擴大發展野生動物手術結紮、族群控制之模式，並有效推廣、長期應用。



## 中文摘要

金龜(*Mauremys reevesii*)為臺灣四種原生淡水龜之一，目前臺灣本島的族群數量幾近滅絕，僅在金門有穩定族群，且為第一級瀕臨絕種保育類野生動物，但臺灣對金龜的保育醫學研究極少，因此本研究針對金龜建立其正常體態參考指標及血液生化參考值，以期應用在獸醫臨床醫學及生態保育研究上。

實驗對象為飼養於金門縣金沙鎮之半開放圈養環境內且臨床理學檢查正常之成年金龜 27 隻，其中雄龜 12 隻、雌龜 15 隻。

血液生化參考值之建立，以同一群金龜於 2011 年 4 月、7 月、11 月及 2012 年 2 月為金門之四季代表月份，以物理保定方式從金龜之頸靜脈採取血液樣本。血液檢驗項目包含血容比、血紅素、紅白血球計數及血球細胞染色。生化學包含總蛋白、白蛋白、尿酸、尿素氮、肌胺酸酐、葡萄糖、天門冬酸轉氨酶、氨基丙酸轉氨酶、膽固醇、三酸甘油酯、鹼磷酶、血鈣、血磷、肌酸磷激酶、加瑪麩氨酸轉換酶、乳酸鹽脫氫酶及鈉鉀氯離子共 17 項，以國際臨床病理聯盟(International Federation of Clinical Chemistry, IFCC)法則建立正常參考值的範圍，並分析性別及季節單獨對於血液生化值的影響和性別與季節的交互作用。

血液學及生化數值的分析可得到，在雄雌龜間，異嗜球及嗜鹼性球比例、天門冬氨酸轉氨酶、鈣、磷、膽固醇、總蛋白、三酸甘油酯有明顯差異，雌金龜有顯著高的血鈣、血磷、膽固醇、三酸甘油酯，與大部份的爬蟲類研究相符，主要原因是與產卵及卵生成相關；季節方面，除了白血球數及分類比例、氨基丙酸轉氨酶、天門冬酸轉氨酶無差異外，其餘反應進食及代謝功能的項目都有明顯差異，可觀察到金龜整體代謝機能從春季開始逐漸旺盛到度冬時減退的變化。

本實驗所得到的健康體態參考指標和血液生化參考值可直接應用在該物種的救傷醫療、檢疫、收容等獸醫臨床及相關保育工作上；另外亦可與已建立起的斑龜、柴棺龜、食蛇龜資料統合，完成了台灣原生淡水龜血液生化參考值方面的保育醫學資料庫。

關鍵字：金龜、血液、血液生化、體態、參考值、血球細胞、瀕臨絕種

# 第一章 緒言

臺灣的陸生爬蟲類有八十種，包括了龜鱉類、蛇類與蜥蜴類；在分類學上分屬龜鱉目 (Chelonia)、有鱗目 (Squamata) 等二目十一科。淡水龜有一科三屬四種，分別為金龜 (*Mauremys reevesii*)、食蛇龜 (*Cuora flavomarginata*)、柴棺龜 (*Mauremys mutica*) 與斑龜 (*Ocadia sinensis*)。目前除了斑龜外，其餘三種皆被列為保育類野生動物。

本研究的實驗對象金龜原本是亞洲鄰近地區分布最為廣泛、數量最龐大的龜鱉類物種之一，但近年在臺灣本島的族群驟減、幾近滅絕，因此被列為第一級瀕臨絕種保育類野生動物 (野生動物保育法, 2009)。金門地區由於昔為戰區的特殊屬性，仍保有豐富的野生動物資源，成為臺灣轄區內唯一擁有穩定金龜族群的地區 (林, 2012)。由此分布的現況可知目前金龜在臺灣地區的生存岌岌可危，其潛在保育危機除了人為干擾、棲地破壞外，更有與棲地外來的斑龜及柴棺龜存在明顯的雜交現象 (Fong, 2010)，因此與金龜相關的保育醫學研究更有其重要性。

血液生化參考值為任何動物醫療的基礎之一，對於動物個體和整體生態兩方面都有很大的價值。個體上參考值可以用來評估動物的健康狀況，瞭解體內生理變化和疾病的進程與嚴重程度 (Campbell, 2005)，作為醫療上診斷及治療成效的評估。在生態上，血液生化學檢查可用來判斷整個族群和生態系統是否健康，以及偵測新興傳染病的傳播，更可以配合其他多種的研究指標，長期監測環境的變化。在國外對於原生野生動物的血液生化參考值建立與研究已行之有年，台灣擁有世上少有豐富的生物多樣性，卻對原生物種的保育醫學研究相當缺乏，尤其對於金龜這種已成為本土瀕臨絕種的物種而言，此類資料更能提供其醫療的支援及保育的基礎。

本研究收集了金龜一年四季的血液學及生化值數據資料，建立起健康金龜在不同季節的血液生化參考值，以此資料為基礎探討不同季節、性別、生理狀態對各項血檢值的影響。研究結果除了和國外其它龜種比較討論外，更重要的是與國內另外三種原生龜的血液資料整合，完成臺灣本土淡水龜類的血液生化學資料庫，加上前述正常健康體態換算公式，希望能提供醫療救傷、檢疫、收容等相關保育工作之基礎對照值，給予臨床工作及研究者更大的助益。



## 第二章 文獻探討

### 第一節 金龜簡介

金龜(*Mauremys reevesii*)，又稱為烏龜、草龜、臭青龜，英文俗名為 Reeves'turtle 或 Chinese three-keeled turtle；原屬於地龜科(Geoemydidae)的烏龜屬(*Chinemys*)，但現今經基因分析後重新歸於同科的擬水龜屬(*Mauremys*) (Rhodin, 2010)。

金龜的天然分布範圍包括臺灣、中國大陸各省、朝鮮半島及日本，且在中國、韓國和日本是常見物種，其生存受到了野外棲地破壞、過度獵捕作為食材藥材的威脅，因此被國際自然保護聯盟瀕危物種紅色名錄(The IUCN Red List of Threatened Species)列為瀕危物種(endangered) (van Dijk, 2011)；華盛頓公約則列為附錄三(Appendix III of CITES)。目前金龜在台灣的保育現況主要因灌溉埤塘及溪流水泥化，破壞棲息環境，於台灣本島已無發現野生族群，僅在金門有小型族群分布(Chen, 2010)，因此被林務局列為第一級瀕臨絕種保育類野生動物。而金龜在中國大陸有具規模的養殖場，以提供肉用藥用市場所需(Guo, 1998)，另外也會出口人工繁殖幼龜至歐美國家，在寵物市場也有一席之地；在臺灣瀕臨滅絕的情況反倒是較為特殊的。

金龜為中等大小之淡水龜，背甲長多在 20 公分左右；外型最大的特徵為深褐色背甲上三條明顯的縱脊，深棕色至黑色的頭部兩側及頸部有圓形至不規則彎曲狀的金色花紋，也為其得名的原因。金龜有明顯的雌雄二型性(sexual dimorphism)：雌性龜殼寬廣而雄性窄短，雄龜尾巴長且寬，泄殖孔位置超過背甲邊緣；雌龜在孵化三個月後生長速度較雄龜快很多，故成熟後體型較大，雄龜背甲長極少超過 15 公分；最明顯的分別是大部份雄龜會在成熟後出現黑化(melanism)現象，金色花紋消失而整體皮膚及殼呈現黑色，雌龜則不會出現此情形(van Dijk, 2011)。

金龜主要棲息於低海拔山區、丘陵、平原或沼澤地的各種水域環境；春天進入交配期，五到八月產卵，每窩產卵 2-9 枚，每個生殖季可產 3-4 窩；食性為雜食，攝食植物莖葉、種子、小型魚類、螺貝類、蚯蚓、昆蟲等(Lovich, 2011)。



圖 1：金龜深褐色背甲上三條明顯的縱脊



圖 2：頭部兩側及頸部不規則彎曲狀的金色花紋



圖 3：黑化之成年金龜雄性個體。Photo by Nobuhiro Kawazoe.

### 第三節 爬蟲類的血球型態及功能

爬蟲類血球分為七類，分別為紅血球、血栓球、異嗜球、淋巴球、嗜鹼性球、嗜酸性球及單核球，根據物種之差別仍會具有不同型態或大小之差異。可使用 Ramanowsky-type stains 的染色法進行觀察。

#### (一) 紅血球 (Erythrocytes)

爬蟲類成熟紅血球為有核、雙盲端之橢圓形，大小較鳥類及哺乳動物為大，約為  $14 \times 8 \mu\text{m} \sim 23 \times 24 \mu\text{m}$ 。細胞核呈卵圓至圓形位於細胞中央與長軸平行，內含深紫色染色質。細胞質在 Ramanowsky stain 下呈橘至粉紅色。

未成熟紅血球為圓形至稍不規則，有著較大的核和嗜鹼性細胞質，大小較成熟紅血球小。

在紅血球細胞質內有時可觀察到圓形至不規則形的嗜鹼性包含體，此為採樣過程中造成的人為誤差，大部份為退行性的胞器 (Alleman, 1992)，臨床上不具意義 (Campbell, 2007)。

#### (二) 血栓球 (Thrombocytes)

血栓球在爬蟲類大小約  $9-12 \mu\text{m}$  (Thierry, 1998)，外型呈現橢圓至紡錘形帶有細胞核。細胞核有緻密染色質，染色為紫色且位於細胞中央。細胞質通常不顯色且可能出現嗜天青顆粒 (azurophilic granules)。活化的血栓球常常會聚集成群，帶有不規則的細胞質邊界和空胞。血栓球在爬蟲類的功能和鳥類血栓球及哺乳類血小板類似，為形成血栓的主要角色 (Campbell, 2004)。

#### (三) 異嗜球 (Heterophils)

為爬蟲類中較大型的白血球，大致上為圓形約  $10-23 \mu\text{m}$  大；細胞質透明無染色性，內充滿梭狀的嗜伊紅性顆粒為最大特徵；細胞核圓形至卵圓形，深染具緻密的染色質。異嗜球會吞噬並消滅微生物，功能相似於哺乳類的嗜中性球 (Neutrophils)，當感染或炎症反應時會出現 toxic change，細胞質變藍並出現深紫色顆粒與空泡。在爬蟲類異嗜球的數目會因緊迫而升高，冬眠時降低。

#### (四) 淋巴球 (Lymphocytes)

爬蟲類淋巴球的型態與作用與鳥類哺乳類相似，製造免疫球蛋白和參與細胞免疫；大小不一致，小淋巴球約  $5-10 \mu\text{m}$ ，大淋巴球可到  $15 \mu\text{m}$  以上。極高的核質

比為其特色，少部份的細胞質可看到淡染成同質性的藍色，沒有顆粒和空泡。

#### （五）嗜鹼性球（Basophils）

在血片下觀察較異嗜球及嗜酸性球小，為 8-15 $\mu\text{m}$  的圓形細胞。細胞質內有大量深藍色至紫色的圓形嗜鹼性顆粒，會擋住細胞核；細胞核不分葉且通常離心。不同的爬蟲類嗜鹼性球比例相差很大，有些龜類可超過 50%，但海龜卻幾乎沒有。嗜鹼性球表面有免疫球蛋白，可脫顆粒釋放出組織胺。

#### （六）嗜酸性球（Eosinophils）

大小約 11-17 $\mu\text{m}$ ，細胞質與異嗜球一樣充滿嗜伊紅性顆粒，但顆粒為圓形，且細胞質會被染成淡藍色，可以此區分（Campbell, 2007）。但在某些爬蟲類像綠鬣蜥，其細胞質顆粒在 Ramanowsky-type stain 下會染成藍色（Alleman, 1992），此點要注意。

#### （七）單核球（Monocytes）

為爬蟲類血球最大型者，形狀從圓形至阿米巴狀；細胞核形狀也多變，圓形、橢圓、豆型、分葉都有，核仁及染色質較淋巴球淡染；細胞質呈淡藍至灰色，可見到空泡或吞噬的顆粒。含有嗜天青性顆粒的單核球又叫做嗜天青球，但不是所有爬蟲都可見，在蜥蜴、龜類及鱷魚只有觀察到少數；但在蛇可觀察到較多（Alleman, 1992）。爬蟲類單核球亦有吞噬功能，並在肉芽腫炎症反應有重要的功能（Raskin, 2000）。

## 第四節 爬蟲類的血液生化特性

爬蟲類血清生化數值會因許多外在因子，如種類、年齡、性別、營養狀態、季節與生理狀態等，而產生許多的波動 (Dessauer, 1970; Lawrence, 1987)，因此單獨血檢數值在爬蟲類臨床應用上不若一般哺乳動物般具有絕對性的意義，臨床上要針對某類爬蟲得到一有意義的參考值範圍也有其難度；但隨著各類爬蟲血檢資料的建立及對外在因子的探討，臨床工作者配合自身經驗和動物資料還是可以使用血清生化值對爬蟲的健康狀況做出精準的評估。

目前在爬蟲動物應用性較高的血檢項目包括了總蛋白質 (total protein)、白蛋白 (albumin)、血糖、尿酸、天門冬酸鹽轉氨酶 (AST)、肌酸激酶 (CK)、鈣、磷；以下就本實驗所使用的血液檢驗項目進行探討。

### (一) 總蛋白質 (Total protein, TP)

爬蟲類正常範圍在 3-7 g/dL。雌性動物在濾泡生成時血中總蛋白會明顯上升，此由雌性素引發的高蛋白血症幫助卵黃生成，而在排卵後血中蛋白就會回復正常 (Campbell, 2005)。

高蛋白血症多與脫水、慢性炎症反應造成球蛋白上升有關；低蛋白血症則需考慮慢性營養不良、吸收不良、消化不良、寄生蟲、大量失血及慢性肝腎疾病。

### (二) 白蛋白 (Albumin)

精確的白蛋白數值必須靠蛋白質電泳才能獲得。藉由蛋白質電泳可得到各種血漿蛋白的比例，在醫學上主要是做為監控急性和慢性炎症的進展情況，非診斷疾病之工具；再加上爬蟲類的參考值建立仍少，做為診斷的價值不高。

### (三) 血糖 (Glucose)

正常爬蟲動物的血糖範圍在 60-100 mg/dL，但會隨著動物生理狀態及外在因子而有變化，尤其是溫度會影響本身胰島素及昇糖素的分泌。低血糖的原因多為飢餓、營養不良、肝臟膽道疾病及敗血症；而高血糖通常是醫源性給予過多葡萄糖所致，如有持續性的高血糖及糖尿就要考慮糖尿病的可能，雖然在爬蟲類較少見。

### (四) 天門冬酸轉氨酶 (Asparatate aminotransferase, AST)

在爬蟲動物的肝臟細胞內活躍，但並非專一器官來源，在許多組織內都有分布。AST 上升通常代表肝臟或肌肉損傷；但全身性的問題如敗血症與中毒傷害到

許多組織器官也會造成上升。

(五) 乳酸鹽脫氫酶 (Lactate dehydrogenase, LDH)

與 AST 同為活躍之肝臟酵素，但分布廣泛幾乎所有的臟器皆有。在肝臟、骨骼肌受損及溶血時會升高。

(六) 加瑪麩氨基轉換酶 ( $\gamma$ -Glutamyltransferase, GGT)

為肝臟特異性高的酵素，以腎小管細胞、肝細胞微管表層及膽管上皮含量較多，另有其它來源之異構酶。血清中 GGT 的活性多來自肝，腎性 GGT 會由尿排出 (沈, 1997)。GGT 之肝特異性雖高，但正常組織中的濃度很低，不易偵測 (Hernandez-Divers, 2000)。

(七) 氨基丙酸轉胺酶 (Alanine aminotransferase, ALT)

ALT 在爬蟲肝臟內也有存在，但相較於哺乳動物的活性很低，且亦為不具器官專一性的酵素；ALT 升高對於肝臟問題的診斷意義不如 AST 及 LDH 來得有價值 (Campbell, 2005)。

(八) 鹼磷酶 (Alkaline phosphatase, ALKP)

與 ALT 一樣廣泛分布在各組織且對肝臟問題的反應不敏感，在爬蟲類利用價值不高，但可反應破骨細胞的活性。

(九) 肌酸激酶 (Creatine Kinase, CK)

CK 在爬蟲為肌肉專一性的酵素，可用來偵測肌肉損傷。保定過程中掙扎及癱瘓也會造成升高，常見上升原因還包括了創傷、肌肉注射刺激性藥物或輸液、系統性感染。常與 AST 及 LDH 一起用來判斷肌肉或肝臟問題。

(十) 尿酸 (Uric Acid)

陸生爬蟲類為了保存水份，其代謝出的含氮廢物為不溶於水的尿酸，因此哺乳類用以診斷腎臟疾病的 BUN 與 Creatinine 便不適用於所有爬蟲類。陸生爬蟲類 80-90% 的蛋白質代謝廢物是以尿酸形式從腎臟排除，故血中尿酸程度就直接與腎臟病有關，一般會低於 10 mg/dL。上升的原因有細菌感染、腎臟鈣化、嚴重敗血症、腎毒性藥物；另外脫水及進食高蛋白食物後也會有暫時性的高尿酸。如有腎臟病造成之高尿酸血症，通常代表腎臟已喪失三分之二以上的功能了。

(十一) 尿素氮 (Blood urea nitrogen, BUN)

在一般爬蟲類較沒有實用價值。以血中尿素氮來評估腎臟功能，只能使用在

會排除尿素 (urea) 的水生爬蟲類。BUN 的上升可能代表了嚴重腎臟疾病、腎前性氮血症或飲食中有大量的尿素成份。陸生爬蟲類因為是排除尿酸，血中 BUN 濃度甚低；而有些沙漠中陸龜有較高的 BUN 則是為了提高血液滲透壓，保存體內水份，非做為排除含氮廢物之用。

#### (十二) 肌胺酸酐 (Creatinine)

在大部份爬蟲的血中濃度極低 (<1 mg/dL)，沒有診斷腎臟疾病的價值。

#### (十三) 膽固醇 (Cholesterol)

爬蟲類之膽固醇濃度會因季節、進食頻率、冬眠與否而變動；雌龜會在夏季產蛋後，秋初時因卵巢再活化而升高，秋末再下降 (Duggana, 2001)。另外在野外及圈養個體間會因食物不同而出現差別 (Cartland, 1994.)。

#### (十四) 三酸甘油脂 (Triglycerides)

雌龜的三酸甘油脂通常較雄龜高 (Christopher, 1999)，雌龜在春季排卵及秋季卵巢再活化時其濃度會顯著增加 (Duggana, 2001)。

#### (十五) 血鈣 (Calcium)

爬蟲類的血鈣是由副甲狀腺素、抑鈣素及維生素 D3 所調控，但也會受到其它荷爾蒙的影響如雌激素、甲狀腺素、昇糖素。正常血鈣在 8-11 mg/dL，會因品種及生理狀態而有所波動：產蛋季節的雌爬蟲類因生殖活性及雌性素的刺激，在濾泡發育期和排卵前的血鈣會增加二到四倍。因為血鈣濃度也容易受外在因子影響，故測量離子鈣濃度的準確性會更高。

低血鈣可能因飲食鈣質或維生素 D3 缺乏、攝取過多磷、鹼血症、低蛋白血症、低副甲狀腺素，嚴重的症狀有震顫、癱軟及癲癇。高血鈣多和醫源性有關，過度補充鈣質與維生素 D3。

#### (十六) 磷 (Phosphorus)

爬蟲類正常血磷在 1-5 mg/dL。低血磷是由於長期禁食或飲食缺乏；高血磷則與腎臟疾病、飲食補充過度及過多維生素 D3 有關，故血中鈣磷比也可用來評估爬蟲腎臟功能。

#### (十七) 鈉、鉀、氯離子

爬蟲類鈉離子是在腸道吸收後運至腎臟進行重吸收或排除，鈉與鉀一樣受到 renin-angiotensin system 機制的調控。鹽腺也會調控血中鈉鉀氯濃度，但不是每個

爬蟲動物都有。各離子濃度在不同種爬蟲類參考值範圍會不一樣，像是陸龜及淡水龜、海龜、蜥蜴，所以在使用時要注意。爬蟲體內的離子濃度變化多是因為飲食補充過多、水合狀態或是流失過多（下痢、腸胃道疾病）所造成。

1. 準確 (Solberg, 1996)。

## 第三章 材料與方法

本實驗分為兩部份進行，第一部份為建立體態評估參考值，第二部份為金龜血液學及血液生化參考值範圍的分析。

### 第一節 體態評估參考值的建立

#### (一) 實驗對象

飼養於金門縣金沙鎮之半開放圈養環境內(圖 4)且臨床理學檢查正常之成年金龜 27 隻，其中雄龜 12 隻、雌龜 15 隻。根據金門縣近十年的月均溫(圖 5)決定四季採樣的月份為 2011 年 4 月、7 月、11 月及 2012 年 2 月。測量前先對個體進行理學檢查，項目包括口腔黏膜顏色、脫水程度、精神活動力、四肢力量、呼吸狀況、殼及皮膚有無異常外傷。體重以電子秤記錄至最小 1 公克為一單位，背甲長以游標尺記錄至最小 1mm 為一單位。

#### (二) 實驗方法

1. 以 Jackson 的方式將金龜依背甲長每 10 mm 根據性別、季節分組，將體重 (g) 除以背甲長 (mm) 後，計算各組的比值的平均值及標準差，同時紀錄最大及最小值。
2. 將測得金龜體重 (g) 和背甲長 (mm) 經過對數轉換後，根據性別和四季以 SAS 統計軟體求出其回歸直線方程式，及直線的 95% 信賴區間，以圖示表示和整理成體重換算公式。

## 第二節 血液及生化參考值的建立

### (一) 實驗對象

飼養於金門縣金沙鎮之半開放圈養環境內(圖 4)且臨床理學檢查正常之成年金龜 27 隻，其中雄龜 12 隻、雌龜 15 隻。根據金門縣近十年的月均溫(圖 5)決定四季採血的月份為 2011 年 4 月、7 月、11 月及 2012 年 2 月。抽血前除對個體進行理學檢查外，在 2011 年 7 月、11 月、2012 年 2 月以超音波從金龜左右鼠蹊凹窩處觀察濾泡大小，可幫助判斷公母並記錄生理狀態；體重及背甲長也以電子秤和游標尺記錄。抽取到的 1ml 全血分別進行血液學和血清學的檢驗，統整四個季節所得數據再進行統計學分析。



圖 4：實驗個體之飼養環境

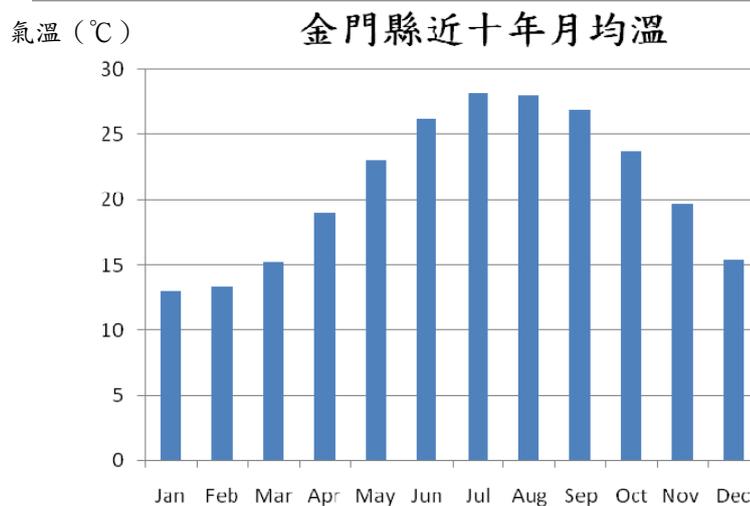


圖 5：金門縣 2001 年至 2010 每月均溫(資料來源：金門縣農業試驗所)

## (二) 實驗材料

1. 肝素抗凝管 Lithium Heparin tube (Greiner bio-one Co, VACUETTE<sup>®</sup>, USA)
2. 胰島素針 (Insulin 1ml Syringe U-100, with 29G needle, TERUMO<sup>®</sup>, JAPAN)
3. 微型離心機 (Labnet, Spectrafuge<sup>®</sup> Mini Centrifuge, USA)
4. 毛細管離心機 (H-240, HSANGTAI<sup>®</sup>, TAIWAN)
5. 全自動血球計數儀 (TOA Medical Electronic Co., Sysmex K-1000, Japan)
6. 乾式血清生化分析儀 (VITROS<sup>®</sup>350 Chemistry System, Johnson & Johnson company ortho-clinical diagnostic, USA)
7. 血球計數盤 (Hemocytometer Reichert Bright-Line 1490, Hausser Scientific Horsham, USA)
8. 血球染色液 Natt and Herrick's solution: 如表 1 所列之化學藥品以蒸餾水溶解後，稀釋至 1000ml，放置隔夜，再以 2 號濾紙 (Whatman No.2) 過濾後使用。
9. 東耀劉式染色液 (Liu's Stain A and B, ASK<sup>®</sup>, Taiwan)
10. 國祥 NIKON 研究級電動顯微鏡及數位影像系統 (NIKON ECLIPSE 80i microscope, Digital color microscope camera DS-Fi1)
11. 統計軟體：Microsoft Excel 2010、SAS 9.13 for Windows、SPSS 16.0 for Windows 及 DPS 軟體進行分析

表 1：Natt and Herrick's solution 染色液成份表

Chemicals	Amount
NaCl	3.88g
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2.50g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 12H <sub>2</sub> O	2.91g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.25g
Formalin(37%)	7.50ml
Methyl violet 2B	0.10g

## (三) 實驗方法

1. 保定：助手將頸部保定好，以免頭縮進殼中即可從頸靜脈採血。

2. 抽血：以 1 ml 29G 無菌胰島素針筒自頸靜脈採取 1 ml 的血液，放入 Lithium Heparin 抗凝管，其中取 0.75 ml 血液以微型離心機離心（6000 rpm, 2000 g），抽取上層血漿至離心管後保存於-20 °C 冰箱，再送至臺大動物醫院進行血漿生化分析；剩餘 0.25ml 的血液則用來進行血液學的分析。
3. 血球計數：將抗凝血液以紅血球稀釋管使用 Natt and Herrick's solution 稀釋 200 倍，血液和染液充分混合後靜置 5 分鐘，以血球計數盤在顯微鏡 400 倍下計算。紅血球為計算中央方格 1 mm 乘 1 mm 平方面積中四個角落及中間共 80 小格之總數；白血球則計算整個 3 mm 乘 3 mm 平方面積內共 400 小格內的數目，之後紅血球數目乘以 10000；白血球數目先加上 10%後再乘以 200，即為血液中每  $\mu\text{l}$  所含數目（Campbell, 2007）。
4. 血球分類：將抽血後尚未抗凝的血液以載玻片推製成血液抹片，以 Liu's Stain 染色，之後以 1000 倍油鏡下將白血球分為異嗜球、嗜酸性球、嗜鹼性球、淋巴球及單核球五類，共計數 100 顆，記錄各種白血球的比例。
5. 血容比（PCV）：利用毛細現象以毛細管吸取全血，用黏土封住底端後，放入毛細管離心機離心（12000 rpm）3 分鐘，再以 PCV reader 測量出數值。
6. 血紅素（Hb）：以全自動血球計數儀之氰化血紅素法進行分析。
7. 血球計數，血容比，血紅素在抽血後 12 小時內完成
8. 平均血球大小（MCV）、平均血球血紅素（MCH）、平均血紅素（MCHC）：以人工計算得出。
9. 血清生化學分析在抽血後 8 小時內完成。
10. 血液生化學分析：離心後血漿待測前保存-20 °C 冰箱，以乾式血清生化分析儀分析以下項目，天門冬酸轉氨酶（Aspartate aminotransferase, AST, GOT），氨基丙酸轉氨酶（Alanine aminotransferase, ALT, GPT）、鹼磷酶（Alkaline phosphatase, ALKP）、膽固醇（Cholesterol）、三酸甘油脂（Triglycerides）、總蛋白（Total Protein）、白蛋白（Albumin）葡萄糖（Glucose）、尿酸（Uric Acid）、尿素氮（BUN）、肌胺酸酐（Creatinine）、血鈣（Calcium, Ca）、血磷（Phosphorus）、肌酐激酶（Creatine Kinase, CK, CPK）、加瑪麩氨基轉換酶（ $\gamma$ -Glutamyltransferase, GGT）、乳酸鹽脫氫酶（Lactate dehydrogenase, LDH）及鈉鉀氯離子（Na, K, Cl）共 17 項

11. 統計學分析：以統計學方式建立正常血液生化參考值，同時分析相關因素對血液生化數值的關聯與影響。
- a. 在實驗中死亡、有明顯虛弱或疾病之臨床症狀的個體數據，一律不列入分析統計之中。
  - b. 去除極端值 (outlier)：當數值大於或小於平均值正負 3 個標準差時，視為極端值不列入分析。
  - c. 分別計算雌雄龜在不同季節血液及生化值之平均值、標準差及中位數。
  - d. 以柯-史法 (Kolmogorov-Smirnov test) 分別檢驗各血液生化值的數據在各性別及四季是否為常態分布 ( $P > 0.05$  為常態分布)，以決定該檢驗項目參考範圍的表示方式。
  - e. 當採樣個體大於 40 隻且數值呈常態分布時，取中間 95% 的信賴區間 (平均值 $\pm$ 2 倍標準差) 作為參考值範圍是最合適的。但本次實驗個體數小於 40，故各檢驗項目參考值範圍定義為最小值到最大值之間，若該項目數據呈常態分布，其參考值範圍也可用平均值 $\pm$ 標準差表示；如不呈常態分布的檢驗項目則不以平均值而以中位數定義。
  - f. 將四個季節所有的血檢項目數據擺在一起再以柯-史法檢驗，呈常態分布的項目以單因子變異數 (One-way ANOVA) 混合設計分別檢驗性別、季節因子對於數值的影響及季節、性別間對於血液及生化值影響的交互作用，若交互作用達顯著 ( $P < 0.05$ )，再進行更詳細的單純主要效果分析；數據非常態分布的血檢項目，則以 DPS 軟體以 Kruskal-wallis 單向等級變方分析法檢驗季節、性別對血檢數值的影響。

## 第四章 結果血液及生化參考值的分析

將四個季節所得到的血液學和生化學數值建立成一參考值範圍，並比較分析各項檢驗項目在不同性別與季節的差異。

依統計學方式，先求得各檢驗項目的平均值、中位數、標準差再去除極端值後，確認是否為常態分佈後再建立參考值範圍。由於四季分別採樣的個體數均不到四十隻，故參考值範圍以最小值到最大值定義；具有常態分佈的檢驗項目也可用平均值加減標準差做為參考值範圍；非常態分佈的檢驗項目則不以平均值而以中位數定義。參考值建立結果列於表 4 至表 11。

各檢驗項目在確認是否為常態分佈後再依各對應的統計學方法進行不同性別與季節的分析，結果見表 12,13。

### (一) 性別差異

1. 血液學參考值：除了異嗜球比例雌龜較雄龜高，嗜鹼性球比例雄龜較雌龜高外，其餘血液學之數值在雄雌龜間無顯著差異存在。
2. 血液生化參考值：雄龜的天門冬酸鹽轉氨酶（AST）及總蛋白（TP）較高；雌龜的血鈣（Ca）、血磷（Phosphorus）、膽固醇（Cholesterol）、三酸酞油脂（Triglycerides）較高。其餘生化學數值無顯著差異。

### (二) 季節差異

1. 血液學參考值：血紅素（Hb）、血容比（PCV）、紅血球數目（RBC）、平均紅血球容積（MCV）、平均紅血球血紅素含量（MCH）和平均紅血球血紅素濃度（MCHC）在春季達到最高；其中 PCV、MCV 和 MCHC 在夏季也為明顯高值。白血球總數不受季節之影響。
2. 血液生化參考值：白蛋白（Albumin）、鹼磷酶（ALKP）、肌胺酸酞（Creatinine）、肌酞激酶（CK）、血糖（Glucose）和尿酸（Uric acid）在春天和夏天達到顯著高值；血鈣（Ca）及膽固醇（Cholesterol）在夏天達到高值；血磷（Phosphorus）則是夏天秋天為高值；血中尿素氮（BUN）、三酸甘油脂（Triglyceride）和尿酸（Uric acid）則在冬天達到顯著低值。氨基丙酸轉胺酶（ALT）、天門冬酸鹽轉氨酶（AST）不受季節影響。

### (三) 性別與季節的交互作用

各項血液檢查數值中只有血鈣 (Ca) 及血磷 (Phosphorus) 達到顯著差異：雌龜的血鈣在夏季較其它季節高；而雌龜的血磷則在夏秋兩季明顯為高。

表 2：金龜春季血液學參考值

Parameters	All turtles n=20			Male n=9			Female n=11		
	Range <sup>a</sup>	Mean Median <sup>b</sup>	SD <sup>c</sup>	Range <sup>a</sup>	Mean Median <sup>b</sup>	SD <sup>c</sup>	Range <sup>a</sup>	Mean Median <sup>b</sup>	SD <sup>c</sup>
Hb(g/dL)	3.9-6.9	5.48	0.68	3.9-6.9	5.6	0.83	4.5-6.7	5.37	0.55
PCV(%)	20-34	23 <sup>b</sup>	-	23-34	27	3.76	20-29	22 <sup>b</sup>	-
RBC( $10^6/\mu\text{l}$ )	0.4-1.14	0.74	0.18	0.62-0.91	0.73	0.1	0.4-1.14	0.75	0.23
MCV(fl)	193-550	344	80	319-446	371	44	193-550	321	97
MCH(pg)	43-140	78	20.74	61-106	78	15	43-140	73 <sup>b</sup>	-
MCHC(g/dL)	17-27	22.76	2.66	17-24	21	2.6	22-27	24	1.71
WBC( $10^3/\mu\text{l}$ )	5.72-27.5	14.8	6.25	5.75-2.38	1.39	5.49	6.16-2.75	15.5	7
Heterophils(%)	12-61	35	15	12-46	32	12	13-61	38	16
Eosinophils(%)	0-5	-	-	0-5	-	-	0-1	-	-
Basophils(%)	26-82	55	17	42-82	59	15	26-77	51	18
Lymphocytes(%)	0-4	1 <sup>b</sup>	-	0-2	0.56	0.7	1-10	2 <sup>b</sup>	-
Monocytes(%)	2-13	7	3	2-12	7	3	4-13	7	3

<sup>a</sup> 參考值範圍以最小值到最大定義；常態分布之項目也可用 Mean±SD 表示

<sup>b</sup> 表示非常態分布之項目，以中位數 (median) 定義，不以平均值 (mean) 表示

<sup>c</sup> 非常態分布之項目，不以標準差 (SD) 表示

表 3：金龜春季血液生化參考值

Parameters	All turtles n=20			Male n=9			Female n=11		
	Range <sup>a</sup>	Mean Median <sup>b</sup>	SD <sup>c</sup>	Range <sup>a</sup>	Mean Median <sup>b</sup>	SD <sup>c</sup>	Range <sup>a</sup>	Mean Median <sup>b</sup>	SD <sup>c</sup>
Albumin(g/dL)	0.9-2.3	1.43	0.4	1.1-2.3	1.4	0.5	0.9-2.2	1.45	0.4
ALKP(U/L)	33-103	54	21	35-90	57	25	33-174	53 <sup>b</sup>	-
ALT(U/L)	3-42	12 <sup>b</sup>	-	3-42	15	15	3-39	12 <sup>b</sup>	-
AST(U/L)	85-418	202	82	167-418	269	89	85-288	165	59
BUN(mg/dL)	5-27	12	5	5-27	12	8	5-16	12	4
Ca(mg/dL)	9.1-14.1	11.4	1.4	9.1-11.4	10.4	0.9	9.4-14.1	11.9	1.5
Phosphorous(mg/dL)	1.9-3.4	2.7	0.5	2-2.9	2.4	0.5	1.9-3.4	2.8	0.5
Cholesterol(mg/dL)	45-188	104	41	45-143	80	42	70-188	117	38
Creatinine(mg/dL)	0.2-0.6	0.3	0.1	0.2-0.5	0.3	0.1	0.2-0.6	0.4	0.1
CK(U/L)	164-893	386	199	374-893	583	182	164-530	210 <sup>b</sup>	-
Glucose(mg/dL)	33-102	59	18	55-158	87	38	33-83	49 <sup>b</sup>	-
Total protein(g/dL)	2.6-5.8	4.1	0.8	3.3-5.8	4	1	2.6-5.7	4.1	0.8
Triglyceride(mg/dL)	26-443	205	113	26-288	119	121	107-443	252	87
Uric acid(mg/dL)	0.8-2.5	1.3	0.4	0.8-1.7	1.2	0.3	0.9-2.5	1.4	0.5

<sup>a</sup> 參考值範圍以最小值到最大定義；常態分布之項目也可用 Mean±SD 表示

<sup>b</sup> 表示非常態分布之項目，以中位數 (median) 定義，不以平均值 (mean) 表示

<sup>c</sup> 非常態分布之項目，不以標準差 (SD) 表示

表 4：金龜夏季血液學參考值

Parameters	All turtles n=27			Male n=12			Female n=15		
	Range <sup>a</sup>	Mean Median <sup>b</sup>	SD <sup>c</sup>	Range <sup>a</sup>	Mean Median <sup>b</sup>	SD <sup>c</sup>	Range <sup>a</sup>	Mean Median <sup>b</sup>	SD <sup>c</sup>
Hb(g/dL)	4.9-8.3	6.3	0.9	5.6-8.3	6.8	0.9	4.9-7.4	5.8 <sup>b</sup>	-
PCV(%)	22-41	29	5	22-38	29	5	22-41	26 <sup>b</sup>	-
RBC( $10^6/\mu\text{l}$ )	0.36-0.95	0.64	0.16	0.36-0.93	0.58	0.15	0.37-0.95	0.68	0.16
MCV(fl)	237-889	482	142	237-889	541	177	316-595	434	87
MCH(pg)	64-206	104 <sup>b</sup>	-	67-206	114 <sup>b</sup>	-	65-143	91	21
MCHC(g/dL)	14-28	22	3	21-28	23	2	14-25	21	3
WBC( $10^3/\mu\text{l}$ )	7.04-26.6	16.4	5.6	12.3-24.2	17.8	4.65	7.04-43.6	12.98 <sup>b</sup>	-
Heterophils(%)	24-65	40	11	24-53	36	10	31-65	44	10
Eosinophils(%)	0-1	-	-	0	-	-	0-1	-	-
Basophils(%)	15-69	50	13	39-69	56	10	15-66	46	15
Lymphocytes(%)	0-11	4	3	1~7	4	2	0-15	5	4
Monocytes(%)	0-15	5	4	1~10	5	3	0-15	5	4

<sup>a</sup> 參考值範圍以最小值到最大定義；常態分布之項目也可用 Mean±SD 表示

<sup>b</sup> 表示非常態分布之項目，以中位數 (median) 定義，不以平均值 (mean) 表示

<sup>c</sup> 非常態分布之項目，不以標準差 (SD) 表示

表 5：金龜夏季血液生化參考值

Parameters	All turtles n=27			Male n=12			Female n=15		
	Range <sup>a</sup>	Mean Median <sup>b</sup>	SD <sup>c</sup>	Range <sup>a</sup>	Mean Median <sup>b</sup>	SD <sup>c</sup>	Range <sup>a</sup>	Mean Median <sup>b</sup>	SD <sup>c</sup>
Albumin(g/dL)	1.1-2.5	1.7	0.4	1.2-2.5	1.8	0.4	1.1-2.1	1.6	0.3
ALKP(U/L)	66-217	122 <sup>b</sup>	-	76-217	142	42	66-202	119 <sup>b</sup>	-
ALT(U/L)	3-44	17	13	3-44	19	14	3-38	11 <sup>b</sup>	-
AST(U/L)	113-462	241	95	155-462	305	98	113-293	190	54
BUN(mg/dL)	3-26	12	5	3-35	15.25	8.4	5-18	10	4
Ca(mg/dL)	9.3-19.2	13	2.8	9.3-13.4	10.7	1.2	11.6-19.2	14.7	2.4
Phosphorous(mg/dL)	3.1-6.5	4.3	0.8	3.1-4.8	3.8	0.5	3.6-6.5	4.7	0.8
Cholesterol(mg/dL)	101-207	148	27	119-207	148	28	101-192	149	28
Creatinine(mg/dL)	0.1-0.5	0.3 <sup>b</sup>	-	0.2-0.5	0.3 <sup>b</sup>	-	0.1-0.5	0.2 <sup>b</sup>	-
CK(U/L)	435-1536	898	306	435-3527	876 <sup>b</sup>	-	548-1396	923	304
Glucose(mg/dL)	49-155	95	31	62-148	104	27	49-155	71 <sup>b</sup>	-
Total protein(g/dL)	3.9-6.4	5.2	0.75	4-6.4	5.4	0.8	3.9-6.1	5	0.7
Triglyceride(mg/dL)	35-429	177	91	35-239	152	63	71-429	153 <sup>b</sup>	-
Uric acid(mg/dL)	0.5-1.2	0.8 <sup>b</sup>	-	0.6-1.1	0.75 <sup>b</sup>	-	0.5-1.2	0.84	0.2
GGT(U/L)	<5	-	-	<5	-	-	<5	-	-
LDH(U/L)	904-3900	1998	838	1021-3900	2239	830	904-5338	1837 <sup>b</sup>	-

<sup>a</sup> 參考值範圍以最小值到最大定義；常態分布之項目也可用 Mean±SD 表示

<sup>b</sup> 表示非常態分布之項目，以中位數 (median) 定義，不以平均值 (mean) 表示

<sup>c</sup> 非常態分布之項目，不以標準差 (SD) 表示

表 6：金龜秋季血液學參考值

Parameters	All turtles n=27			Male n=12			Female n=15		
	Range <sup>a</sup>	Mean Median <sup>b</sup>	SD <sup>c</sup>	Range <sup>a</sup>	Mean Median <sup>b</sup>	SD <sup>c</sup>	Range <sup>a</sup>	Mean Median <sup>b</sup>	SD <sup>c</sup>
Hb(g/dL)	4-7.4	5.8	0.8	4-7.4	6	0.9	4.8-7.1	5.7	0.6
PCV(%)	18-30	25 <sup>b</sup>	-	18-30	24	3	20-28	24.5	2.7
RBC( $10^6/\mu\text{l}$ )	0.44-0.86	0.63	0.11	0.46-0.86	0.69	0.12	0.44-0.71	0.58	0.08
MCV(fl)	244-547	398	74	144-547	362	77	328-545	426	59
MCH(pg)	63-132	95	16	63-132	88	18	83-127	100	14
MCHC(g/dL)	20-30	24 <sup>b</sup>	-	22-29	25	2	20-30	24	2
WBC( $10^3/\mu\text{l}$ )	7.7-26.6	12.8 <sup>b</sup>	-	8.14-26.6	17.8	5.36	7.7-24.9	13.1 <sup>b</sup>	4.5
Heterophils(%)	13-66	37	15	13-61	32	13	18-66	42	15
Eosinophils(%)	0-1	-	-	0	-	-	0-1	-	-
Basophils(%)	26-82	55	16	30-82	61	14	26-78	51	16
Lymphocytes(%)	0-7	2	2	0-6	2	2	0-7	2	2
Monocytes(%)	1-9	5	2	2-9	5	2	1-9	5	2

<sup>a</sup> 參考值範圍以最小值到最大定義；常態分布之項目也可用 Mean±SD 表示

<sup>b</sup> 表示非常態分布之項目，以中位數 (median) 定義，不以平均值 (mean) 表示

<sup>c</sup> 非常態分布之項目，不以標準差 (SD) 表示

表 7：金龜秋季血液生化參考值

Parameters	All turtles, n=27			Male, n=12			Female, n=15		
	Range <sup>a</sup>	Mean/median <sup>b</sup>	SD <sup>c</sup>	Range <sup>a</sup>	Mean/median <sup>b</sup>	SD <sup>c</sup>	Range <sup>a</sup>	Mean/median <sup>b</sup>	SD <sup>c</sup>
Albumin(g/dL)	0.8-1.9	1.2	0.3	0.9-1.9	1.2	0.3	0.8-1.7	1.2	0.3
ALKP(U/L)	40-121	60 <sup>b</sup>	-	40-109	64	17	47-139	63 <sup>b</sup>	-
ALT(U/L)	3-26	13	6	3-21	12	6	7-58	18	12
AST(U/L)	78-409	204 <sup>b</sup>	-	140-326	227	51	78-409	184	93
BUN(mg/dL)	7-64	17 <sup>b</sup>	-	11-80	28	22	7-25	17	6
Ca(mg/dL)	8.8-15.2	12.3	1.6	8.8-14.2	11.3	1.5	11.4-15.2	13	1
Phosphorous(mg/dL)	2.5-4.6	3.1	0.5	2.5-3.9	3	0.5	2.5-4.6	3.3	0.5
Cholesterol(mg/dL)	45-210	128	49	45-183	101	48	81-210	150	37
Creatinine(mg/dL)	0.1-0.2	0.2 <sup>b</sup>	-	0.1-0.2	0.15 <sup>b</sup>	-	0.1-0.2	0.2 <sup>b</sup>	-
CK(U/L)	138-1153	511	239	361-1153	593	232	138-842	445	232
Glucose(mg/dL)	36-106	66	16	42-169	75 <sup>b</sup>	-	36-81	64	14
Total protein(g/dL)	2.9-5.5	3.7 <sup>b</sup>	-	2.9-5.5	3.7 <sup>b</sup>	-	2.9-4.7	3.9	0.6
Triglyceride(mg/dL)	31-527	241 <sup>b</sup>	-	31-445	62 <sup>b</sup>	-	107-527	341	131
Uric acid(mg/dL)	1.3-3.4	1.8 <sup>b</sup>	-	1.3-3.4	2.1	0.7	1.5-3	1.9	0.5
GGT(U/L)	<5	-	-	<5	-	-	<5	-	-
LDH(U/L)	881-2414	1285	481	881-2414	1497	386	505-2285	1116	494
Na(mmol/L)	129-151	141	5	134-151	143	5	129-147	140	5
K(mmol/L)	3.3-5.5	4.5	0.5	3.3-5.1	4.4	0.6	4-5.5	4.7	0.5
Cl(mmol/L)	95-110	104	3	98-110	104	3	95-107	105 <sup>b</sup>	-

<sup>a</sup> 參考值範圍以最小值到最大定義；常態分布之項目也可用 Mean±SD 表示

<sup>b</sup> 表示非常態分布之項目，以中位數 (median) 定義，不以平均值 (mean) 表示

<sup>c</sup> 非常態分布之項目，不以標準差 (SD) 表示

表 8：金龜冬季血液學參考值

Parameters	All turtles n=21			Male n=6			Female n=15		
	Range <sup>a</sup>	Mean Median <sup>b</sup>	SD <sup>c</sup>	Range <sup>a</sup>	Mean Median <sup>b</sup>	SD <sup>c</sup>	Range <sup>a</sup>	Mean Median <sup>b</sup>	SD <sup>c</sup>
Hb(g/dL)	3.4-7.3	5.8	1	3.4-7.3	5.5	1.3	4.6-7.3	5.9	0.8
PCV(%)	14-29	23	4	14-26	24 <sup>b</sup>	-	18-29	23	3
RBC( $10^6/\mu\text{l}$ )	0.38-0.73	0.6	0.11	0.42-0.73	0.64	0.1	0.38-0.73	0.58	0.1
MCV(fl)	265-480	387	52	265-394	346	45	338-480	408	43
MCH(pg)	63-129	99	18	63-100	86	13	75-129	105	17
MCHC(g/dL)	22-32	25	3	23-30	25	2	22-32	26	3
WBC( $10^3/\mu\text{l}$ )	4.84-28.8	17	5.84	12.3-23.3	19	4.19	4.84-28.8	16	6.4
Heterophils(%)	16-75	44	14	16-47	33	8	26-75	50	13
Eosinophils(%)	0-1	-	-	0	-	-	0-1	-	-
Basophils(%)	22-83	49	15	42-83	59	12	22-64	43	12
Lymphocytes(%)	*0-4	1 <sup>b</sup>	-	0-4	1	2	0-7	1 <sup>b</sup>	-
Monocytes(%)	1-19	6	4	1-19	7	6	1-14	6	3

<sup>a</sup> 參考值範圍以最小值到最大定義；常態分布之項目也可用 Mean±SD 表示

<sup>b</sup> 表示非常態分布之項目，以中位數 (median) 定義，不以平均值 (mean) 表示

<sup>c</sup> 非常態分布之項目，不以標準差 (SD) 表示

表 9：金龜冬季血液生化參考值

Parameters	All turtles, n=21			Male, n=6			Female, n=15		
	Range <sup>a</sup>	Mean/median <sup>b</sup>	SD <sup>c</sup>	Range <sup>a</sup>	Mean/median <sup>b</sup>	SD <sup>c</sup>	Range <sup>a</sup>	Mean/median <sup>b</sup>	SD <sup>c</sup>
Albumin(g/dL)	0.9-1.9	1.2 <sup>b</sup>	-	0.9-1.9	1.2 <sup>b</sup>	-	0.9-1.6	1.2	0.2
ALKP(U/L)	44-176	69 <sup>b</sup>	-	61-176	95	43	44-123	61 <sup>b</sup>	-
ALT(U/L)	4-35	18	8	4-23	15	8	9-35	19	8
AST(U/L)	92-404	203 <sup>b</sup>	-	183-323	251	58	92-404	190 <sup>b</sup>	-
BUN(mg/dL)	1-23	6 <sup>b</sup>	-	3-44	16	15	1-7	4	2
Ca(mg/dL)	8-11.3	9.5	1	8.5-10.9	9.3	0.9	8-11.3	9.6	1
Phosphorous(mg/dL)	1.8-3	2.4	0.3	1.8-2.6	2.28	0.3	1.9-3	2.4	0.3
Cholesterol(mg/dL)	45-204	108	48	45-152	49 <sup>b</sup>	-	55-204	123	43
Creatinine(mg/dL)	0.1-0.3	0.15 <sup>b</sup>	-	0.1-0.2	0.1 <sup>b</sup>	-	0.1-0.3	0.15 <sup>b</sup>	-
CK(U/L)	131-1155	447	260	432-805	616	140	131-1155	374	269
Glucose(mg/dL)	26-130	59	25	33-130	68	34	26-113	55 <sup>b</sup>	-
Total protein(g/dL)	2.4-5.3	3.5	0.7	2.4-5.3	3.6	1	2.5-4.5	3.5	0.6
Triglyceride(mg/dL)	15-274	93.4	74	15-92	18.5 <sup>b</sup>	-	19-274	117	74
Uric acid(mg/dL)	0.9-4.2	1.3 <sup>b</sup>	-	1-4.2	2.6	1.3	0.9-2.2	1.3 <sup>b</sup>	-
GGT(U/L)	0-8	-	-	0-7	-	-	0-11	-	-
LDH(U/L)	630-2988	1666	713	1072-2662	2389 <sup>b</sup>	-	630-2988	1429	643
Na(mmol/L)	133-141	136	3	131-141	135	4	133-140	137	3
K(mmol/L)	3.4-5	4.6 <sup>b</sup>	-	4.4-7.2	4.6 <sup>b</sup>	-	3.4-5	4.4	0.5
Cl(mmol/L)	98-104	101	1	100-103	102	1	98-104	101	2

<sup>a</sup> 參考值範圍以最小值到最大定義；常態分布之項目也可用 Mean±SD 表示

<sup>b</sup> 表示非常態分布之項目，以中位數 (median) 定義，不以平均值 (mean) 表示

<sup>c</sup> 非常態分布之項目，不以標準差 (SD) 表示

表 10：金龜血液學參考值性別及季節間的差異，及兩者間的交互作用結果

Parameters	Sex differences				Season differences						Sex/Season interaction	
	Male	Female	F-value*	P-value	Spring	Summer	Fall	Winter	F-value*	P-value	F-value*	P-value
Hb(g/dL)	-	-	*	nsd	H	-	-	-	*	0.0034	*	nsd
PCV(%)	-	-	*	nsd	H	H	-	-	*	0.0001	*	nsd
RBC( $10^6/\mu\text{l}$ )#	-	-	x	nsd	H	-	-	-	3.77	0.0138	x	nsd
MCV(fl)	-	-	*	nsd	H	H	-	-	*	<0.0001	*	nsd
MCH(pg)	-	-	*	nsd	H	-	-	-	*	0.0004	*	nsd
MCHC(g/dL)	-	-	*	nsd	H	H	-	-	*	0.001	*	nsd
WBC( $\mu\text{l}$ )	-	-	*	nsd	-	-	-	-	*	nsd	*	nsd
Heterophils(%)#	-	H	7.54	0.001	-	-	-	-	x	nsd	x	nsd
Eosinophils(%) <sup>&amp;</sup>												
Basophils(%)	H	-	*	0.018	-	-	-	-	*	nsd	*	nsd
Lymphocytes(%)	-	-	*	nsd	-	-	-	-	*	nsd	*	nsd
Monocytes(%)#	-	-	x	nsd	-	-	-	-	x	nsd	x	nsd

#表示該項檢驗項目數值呈常態分布

\*非常態分布之檢驗項目使用 Kruskal-wallis 法分析，無 F-value

<sup>&</sup>Eosinophil 的數量不論在何種季節及性別皆極少，無法進行分析比較

H: Mean Values were significant higher, L: Mean Values were significant lower, nsd: No significant difference.

表 11：金龜血液生化參考值性別及季節間的差異，及兩者間的交互作用結果

Parameters	Sex differences				Season differences						Sex/Season interaction	
	Male	Female	F-value	P-value	Spring	Summer	Fall	Winter	F-value	P-value	F-value	P-value
Albumin(g/dL)	-	-	*	nsd	H	H	-	-	*	<0.0001	*	nsd
ALKP(U/L)	-	-	*	nsd	H	H	-	-	*	0	*	nsd
ALT(U/L)	-	-	*	nsd	-	-	-	-	*	nsd	*	nsd
AST(U/L)	H	-	*	<0.0001	-	-	-	-	*	nsd	*	nsd
BUN(mg/dL)	-	-	*	nsd	-	-	-	L	*	<0.0001	*	nsd
Ca(mg/dL)#	-	H	21.19	<0.0001	-	H	-	-	23.99	<0.0001	6.26	0.001
Phosphorous(mg/dL)#	-	H	6.12	0.0034	-	H	H	-	60.05	<0.0001	2.54	0.0267
Cholesterol(mg/dL)#	-	H	13.23	<0.0001	-	H	-	-	7.21	0.0002	x	nsd
Creatinine(mg/dL)	-	-	*	nsd	H	H	-	-	*	<0.0001	*	nsd
CK(U/L)	-	-	*	nsd	H	H	-	-	*	<0.0001	*	nsd
Glucose(mg/dL)	-	-	*	nsd	H	H	-	-	*	<0.0001	*	nsd
Total protein(g/dL)#	H	-	7.61	0.0009	-	H	-	-	27.16	<0.0001	x	nsd
Triglyceride(mg/dL)	-	H	*	<0.0001	-	-	-	L	*	0.0033	*	nsd
Uric acid(mg/dL)	-	-	*	nsd	H	H	-	L	*	<0.0001	*	nsd

#表示該項檢驗項目數值呈常態分布

\*非常態分布之檢驗項目使用 Kruskal-wallis 法分析，無 F-value

H: Mean Values were significant higher, L: Mean Values were significant lower, nsd: No significant difference.

### 第三節 血球染色分類與形態觀察

血液抹片在抽血後立刻以未抗凝之全血推片而成，希望能避免抗凝劑對血球之破壞，再以與 Romanowsky stain 系列同原理的 Liu's stain 染色而成，在光學顯微鏡下以 1000 倍油鏡進行血球分類及形態觀察。

金龜血球形態與其它龜類並無太大差別，可直接依據特徵判斷分類；白血球分類上則發現嗜鹼性球及異嗜球所佔比例最高，嗜酸性球極少觀察到。血中紅白血球數量及各種白血球比例參考值列於表 4, 6, 8, 10。

#### (一) 紅血球 (Erythrocytes)

紅血球為橢圓狀，光學顯微鏡下大小一致約為  $11\mu\text{m} \times 18\mu\text{m}$ 。細胞核嗜鹼性，位於中央並可見染色質的聚集 (圖 14:A)，偶有見正在進行有絲分裂；未成熟紅血球較小，但細胞核大，數量不多偶爾可見。

#### (二) 血栓球 (Thrombocytes)

血栓球形狀大小不一，最大觀察到有約  $15\mu\text{m}$ ，大多數為  $8-11\mu\text{m}$ 。核嗜鹼性，核質比較高。在血片可見單一細胞 (圖 14:B) 或是多個聚集。細胞核橢圓至紡錘形邊緣有些不規則，細胞質染色不明顯且形狀多變，分類上要和小淋巴球區分。

#### (三) 異嗜球 (Heterophils)

異嗜球整體圓形，光學顯微鏡下直徑範圍約為  $14-18\mu\text{m}$ 。細胞核通常靠近邊緣，成橢圓或不規則形狀，有時會分葉；細胞質不具明顯染色性，充滿嗜伊紅性顆粒，顆粒有兩種形狀，一是扁平棒狀至紡錘狀 (圖 14:C)，另一種為橢圓至圓形 (圖 14:D)。

#### (四) 淋巴球 (Lymphocytes)

淋巴球直徑範圍約為  $7-10\mu\text{m}$ ，尺寸明顯較其它白血球來得小。細胞核及細胞質皆呈明顯嗜鹼性，有極高的核質比，以及核中聚集濃染的染色質 (圖 14:E,F)。

#### (五) 嗜鹼性球 (Basophils)

嗜鹼性球特徵為質內大量的紫色至深藍色圓形顆粒，細胞核常因大量嗜鹼性顆粒遮掩而不清楚 (圖 15:G)；但有時細胞化學染色法無法將所有顆粒染出，因此會呈空泡樣 (圖 15:H)，直徑範圍約為  $11-16\mu\text{m}$ 。細胞核通常稍微偏離細胞中

心且不具分葉，容易和其他白血球區別。

#### (六) 嗜酸性球 (Eosinophils)

嗜酸性球形態與異嗜球相似，直徑範圍 10-12 $\mu\text{m}$  略小，最大差別是嗜伊紅性顆粒為圓形，細胞質呈淡藍色，細胞核為圓形或不規則，且不位於中央的位置 (圖 14 : I)。

#### (七) 單核球 (Monocytes)

金龜的單核球不是最大的白血球，直徑範圍 11-16 $\mu\text{m}$ 。細胞核外型為馬蹄形或橢圓形，核染色和細胞質嗜鹼性較淋巴球呈色淡 (圖 14 : J)，細胞質偶爾可見些許空泡，但未觀察到嗜天青球的存在 (Azurophils)。

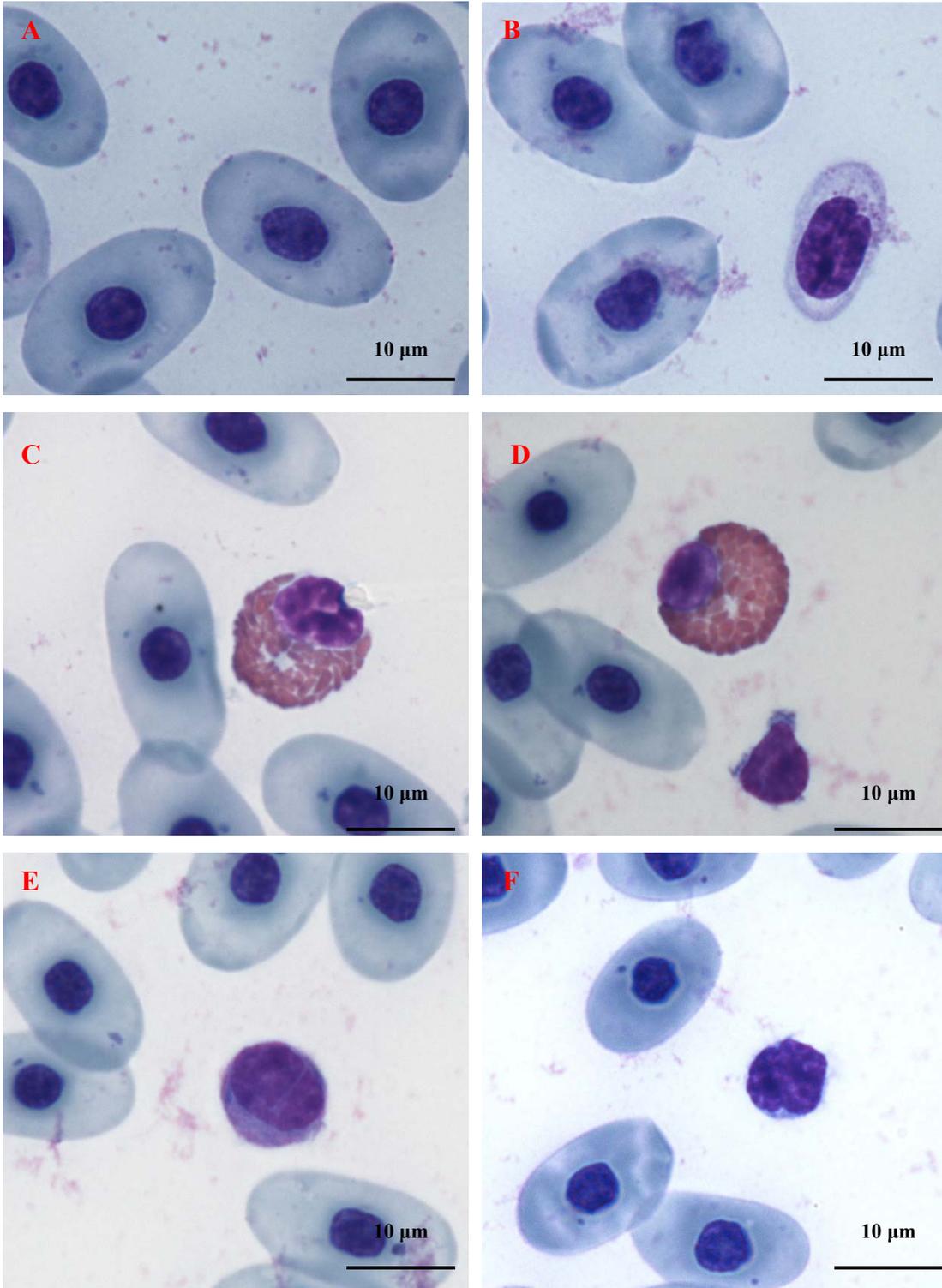


圖 6：以 Liu's Stain 染色的血球細胞，於油鏡 1000 倍下觀察之型態

A. 紅血球 (Erythrocyte) ◦ B. 血栓球 (Thrombocyte) ◦ C. D. 異嗜球 (Heterophil) ◦  
 E. F. 淋巴球 (Lymphocyte) ◦

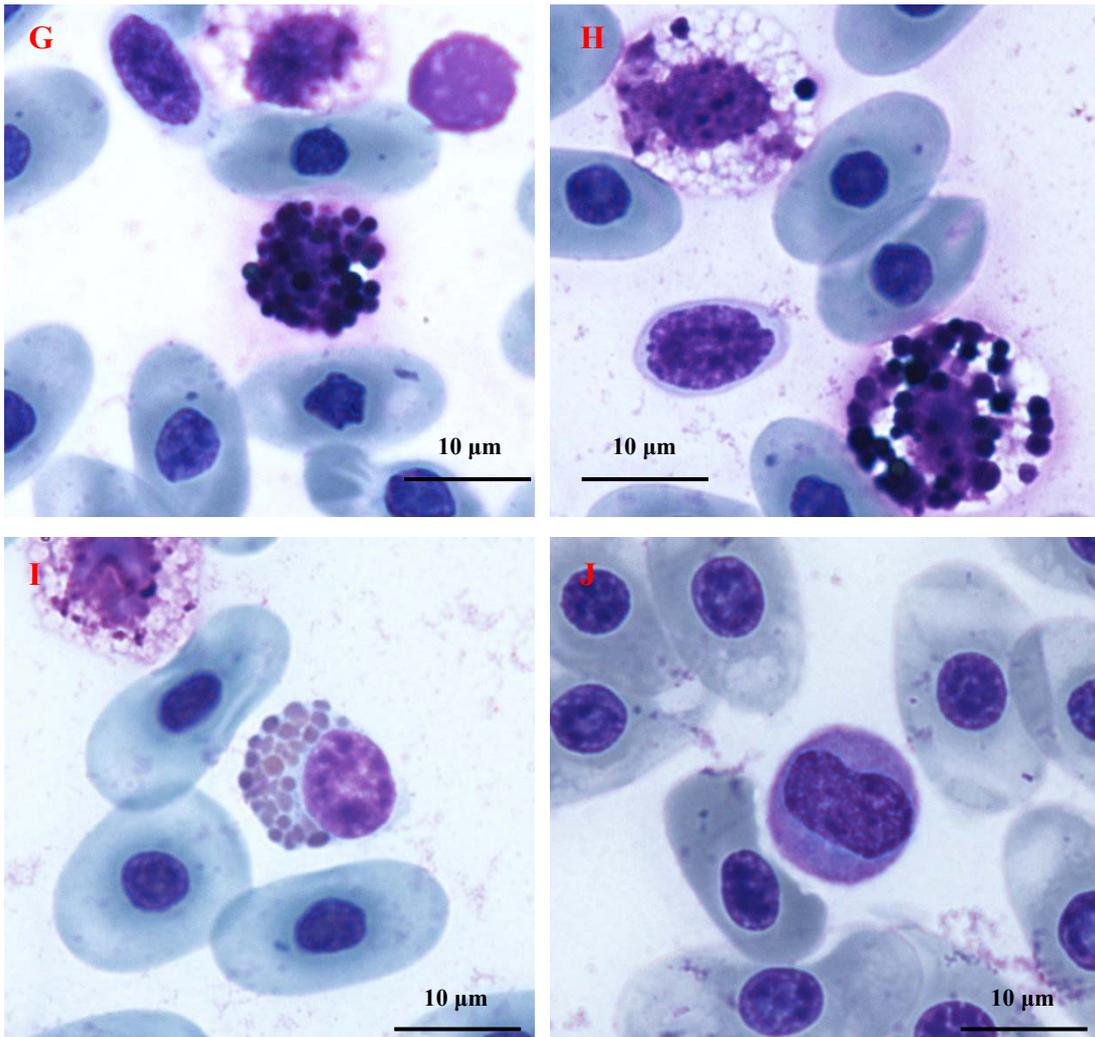


圖 7：以 Liu's Stain 染色的血球細胞，於油鏡 1000 倍下觀察之型態

G. H. 嗜鹼性球 (Basophil)。I. 嗜酸性球 (Eosinophil)。J. 單核球 (Monocyte)。

## 第六章 結論

本研究以同一群臨床表現健康之圈養金龜作為採樣對象，在一年內的四季代表月份共進行四次的採血及體態記錄，以進行健康體態的參數分析、健康個體血液學及生化參考值的建立，並進一步探討性別與季節對血檢值的影響。

在金龜健康體態評估的研究上，得到金龜的 Jackson's ratio 以及體重背甲長對數迴歸方程式，確定金龜的體重與背甲長有相關性，就可將測量到之背甲長代入方程式求得健康個體應有的體重範圍；臨床研究可利用以上這兩項結果快速評估出個體體態是否正常。建立起各項血液檢查項目正常參考值，才能正確評估個體之健康狀態及疾病進程，是臨床獸醫學上不可或缺的資料庫。比對季節、性別對血檢值的影響，可發現金龜的生理代謝功能最主要是因性別、繁殖期及氣溫而有明顯的變化，進而反映在血液檢查數值上。與其它龜類的血液生化學比較可發現，金龜的生理調控機制的確是近似於淡水龜類而與陸龜有較大差距，但仍有些項目是具有種別特異性，故建立起各物種的正常參考值是有必要性的。

金龜在台灣族群數量稀少，欲對大量野外個體採血難度很高；且對於初步建立正常參考值來說，圈養環境下的條件一致，變因較少，故本次研究對象為人工圈養個體。而野外個體有著環境、營養、疾病等影響血液生化參考值之外在差異，這些因素也都值得探討且對野外族群有更大的參考價值；故若能以本研究的結果為基礎，與野外個體做比較，定能得到更豐富完整的資訊，對於台灣原生淡水龜類的保育醫學工作有莫大助益。

## 參考資料

1. 林思民。2012。金龜現況調查與保育策略規劃。行政院農業委員會林務局保育研究系列 100-32 號。
2. 沈永紹。1997。獸醫實驗診斷學提要。華香園：243-360 頁。
3. 余品奐。2010。柴棺龜正常健康體態比例、淋巴液稀釋之血液樣本的臨床價值之研究。國立台灣大學臨床動物醫學研究所碩士論文。
4. 楊樸煜。2011。食蛇龜正常健康體態比例、血液及生化參考值之研究。國立台灣大學臨床動物醫學研究所碩士論文。
5. 鄭元毓。2007。以放射線學及超音波影象學觀察雌性柴棺龜生殖週期之變化。國立台灣大學獸醫學研究所臨床組碩士論文。
6. 野生動物保育法。2009。行政院農業委員會。
7. Anderson, N.L., R.F. Wack, and R. Hatcher. 1997. Hematology and Clinical Chemistry Reference Ranges for Clinically Normal, Captive New Guinea Snapping Turtle (*Elseya novaeguineae*) and the Effects of Temperature, Sex, and Sample Type. *J. Zoo Wildl. Med.* 28: 394-203.
8. Alleman, A.R., E.R. Jacobson, and R.E. Raskin. 1992. Morphologic and cytochemical characteristics of blood cells from the desert tortoise (*Gopherus agassizii*). *Am. J. Vet. Res.* 53: 1645-1651.
9. Blakey, C.S.G., J.K. Kirkwood. 1995. Body mass to length relationships in chelonian. *Vet Rec.* 136 : 566-568.
10. Bolten, A.B., and K.A. Bjorndal. 1992. Blood profiles for a wild population of green turtles (*Chelonia mydas*) in the southern Bahamas: size-specific and sex-specific relationships. *J Wildl Dis.* 28: 407-413.
11. Brenner, D., M. Lewbart, M. Stebbin, and D. Herman. 2002. Health survey of wild and captive bog turtles (*Clemmys muhlenbergii*) in North Carolina and Virginia. *J Zoo Wildl Med.* 33:311–316.
12. Campbell, T.W. 2005. Clinical pathology. In: Mader, D.R.(ed). *Reptile Medicine and Surgery*, 2<sup>nd</sup> ed. W. B. Saunders Co., Philadelphia. Pp. 453-470.
13. Campbell, T.W., and C.K. Ellis. 2007. *Avian and Exotic Animal Hematology and Cytology*. 3<sup>rd</sup> ed. Blackwell Publishing, Ames, Iowa.
14. Cartland, L.K., A. Cree, W.H.F. Sutherland, N.M. Grimmond, and C.M. Skeaff.

1994. Plasma concentrations of total cholesterol and triacylglycerol in wild and captive juvenile tuatara (*Sphenodon punctatus*). *New Zeal J Zool.* 21: 399-406.
15. Casal, A.B., Or' os J. 2006. Morphologic and cytochemical characteristics of blood cells of juvenile loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*). *Res Vet Sci.* 82:158–165.
  16. Nantarika, C., A. Sailasuta, J. Tangtrongpiros, S. Wangnaitham, and N. Assawawongkasem. 2010. Hematology and clinical chemistry of adult yellow-headed temple turtles (*Hieremys annandalii*) in Thailand. *Vet Clin Path.* 40: 174-184.
  17. Chen, T.H., and K.Y. Lue. 2010. Population status and distribution of freshwater turtles in Taiwan. *Oryx* 44:261-266.
  18. Chen, T. H., and K. Y. Lue. 2002. Growth Patterns of the Yellow-Margined Box Turtle (*Cuora flavomarginata*) in Northern Taiwan. *J Herpetol.* 36: 201-208.
  19. Chen, T.Y., Y.T. Lee, and C. H. Chi. 2011. Observation of reproductive cycle of female yellow-margined box turtle (*Cuora flavomarginata*) using radiography and ultrasonography. *Zoo Biol.* 29: 1-10.
  20. Christopher, M.M., K.H. Berry, R. Wallis, K.A. Nagy, T. Henen, and C.C. Peterson. 1999. Reference intervals and physiologic alterations in hematologic and biochemical values of free-ranging desert tortoises in the Mojave Desert. *J Wildl Dis.* 35: 212-238.
  21. Chung, C.S., C.H. Cheng, S.C. Chin, A.H. Lee, and C. H. Chi. 2009. Morphologic and cytochemical characteristics of Asian yellow pond turtle (*Ocadia sinensis*) blood cells and their hematologic and plasma biochemical reference values. *J Zoo Wildl Med.* 40: 76-85.
  22. Dessauer, H.C., 1970. Blood chemistry of reptiles: physiological and evolutionary aspects. In: *Biology of the reptilian*. Academic press, New York, Vol 3. Pp. 1-72.
  23. Dickinson, V.M., J.L. Jarchow, and M.H. Trueblood. 2002. Hematology and plasma biochemistry reference range values for free-ranging desert tortoises in Arizona. *J Wild Dis.* 38: 143-153.
  24. Duggana, A., M. Paolucci, A. Tercyakc, M. Gigliotti, D. Small, and I. Callarda. 2010. Seasonal variation in plasma lipids, lipoproteins, apolipoprotein AI and vitellogenin in the freshwater turtle, *Chrysemys picta*. *Comp. Biochem. Physiol. A.* 130: 253-269.
  25. Fong, J.J., and T.H. Chen. 2010. DNA evidence for the hybridization of wild turtles

- in Taiwan: possible genetic pollution from trade animals. *Conservation Genetics* . 11:2061-2066.
26. Frair, W. 1977. Sea turtle red blood cell parameters correlated with carapace lengths. *Comp Biochem Physiol*. 56: 467-472.
  27. Frair, W. and B.K Shah. 1982. Sea turtle blood serum protein concentrations with carapace lengths. *Comp Biochem Physiol A*. 73:337-339.
  28. Guo, Y.F., X.Y. Zou, Y. Chen, D. Wang, and S. Wang. 1998. Sustainability of Wildlife Use in Traditional Chinese Medicine.
  29. Harris, E.K. and J.C. Boyd. 1995. Stastical bases of reference values in laboratory medicine. Marcel Dekker, Inc. New York.
  30. Hattingh, J., and E.M. Smith. 1976. Anticoagulants for avian and reptilian blood: heparin and EDTA. *Pflug Arch Eur J Phy*. 363: 267-269.
  31. Healy, M.J.R. 1979. Outlier in clinical chemistry quality-control schemes. *Clin Chem*. 40: 678-677.
  32. Hernandez-Divers, S. J. 2000. Reptilian liver and gastrointestinal testing. In: Fudge A. M.(ed). *Laboratory Medicine: Avian and Exotic Pets*. W. B. Saunders Co., Philadelphia. Pp. 205-209.
  33. Hernandez-Divers, S. J., 2005. Diagnostic techniques. In: Mader, D.R.(ed). *Reptile Medicine and Surgery*, 2<sup>nd</sup> ed. W. B. Saunders Co., Philadelphia. Pp. 471-489.
  34. Innis, C.J., M. Tlusty, and D. Wunn. 2007. Hematologic and plasma biochemical analysis of juvenile head-started northern red-bellied cooters (*Pseudemys rubriventris*). *J Zoo Wildl Med*. 38:425–432.
  35. Jackson, C.G. Jr., C.M. Holcomb, and M.M. Jackson. 1970. The relationship between age, blood serum cholesterol level and aortic calcification in the turtle. *Comp Biochem Physiol*. 35:491-493.
  36. Jackson, C.G. Jr., C.M. Holcomb, and M.M. Jackson. 1974. Aortic calcification, serum calcium, magnesium, sodium and cholesterol in *Gopherus polyphemus*. *Comp Biochem Physiol A*. 49: 603-605.
  37. Jackson, O. F. 1980. Weight and measurement data on tortoises (*Testudo graeca* and *Testudo hermanni*) and their relationship to health. *J. small Anim. Pract.* 21: 409-416.
  38. Judit Hidalgo-Vila, Carmen Dí 'az-Paniagua, Natividad Pe´rez-Santigosa, Agustín Plaza, Ine´s Camacho, and Fernando Recio. 2007. Hematologic and Biochemical

- Reference Intervals of Mediterranean Pond Turtles (*Mauremys leprosa*). J Wildl Dis. 43: 798-801.
39. Lawrence, K. 1987. Seasonal variation in blood biochemistry of long-term captive Mediterranean tortoises ( *Testudo graeca* and *Testudo hermanni*). Res Vet Sci. 43: 379–383.
  40. Lovich, J.E., Y. Yasukawa, and H. Ota. 2011. *Mauremys reevesii*(Gray-1831)-Reeve’s turtle, Chinese three-keeled pond turtle. Chelonian Research Monographs No.5 by chelonian research foundation.
  41. Lumsden, J.H., and K. Mullen. 1978. On establishing reference values. Can J Comp Med. 42: 293-301.
  42. Lumsden, J.H. 1998. “Normal” or reference values: questions and comments. Vet Clin Path. 27(4):102-106.
  43. Maixner, J.M., B.C. Ramsay, and D.H. Arp, 1987. Effects of feeding on serum uric acid in captive reptiles. J Zoo Anim Med. 18: 62-65.
  44. Mead, K.F., M. Borysenko, and S.R. Findlay. 1983. Naturally abundant basophils in the snapping turtle, *Chelydra serpentina*, possess cytophilic surface antibody with reaginic function. J Immunol. 130:334–340.
  45. Michels, N.A. 1923. The mast cell in the lower vertebrates. La Cellule. 33:338–462.
  46. Murray, M.J. 2000. Reptilian blood sampling and artifact considerations. In: Fudge A. M.(ed). Laboratory medicine: Avian and exotic pets. W. B. Saunders Company, Philadelphia. Pp. 185–192.
  47. Muro, J., R. Cuenca, J. Pastor, L. Vinas, and S. Lavin. 1998. Effects of lithium heparin and tripotassium EDTA on hematologic values of Hermann's tortoises (*Testudo hermanni*). J Zoo Wildl Med. 29: 40-44.
  48. Ramsay, E.C., and T.K. Dotson. 1995. Tissue and serum enzyme activities in the yellow rat snake (*Elaphe obsoleta quadrivittata*). Am J Vet Res. 56: 423-428.
  49. Raskin, R.E. 2000. Reptilian complete blood count. In: Fudge A. M.(ed). Laboratory Medicine: Avian and Exotic Pets. W. B. Saunders Co., Philadelphia. Pp. 193-197.
  50. Rustad, P., P. Felding, and A. Lahti. 2004. Proposal for guidelines to establish common biological reference intervals in large geographical areas for biochemical quantities measured frequently in serum and plasma. Clin Chem Lab Med. 42(7):783-791.
  51. Saad, A.H. 1988. Corticosteroids and immune systems of non-mammalian

- vertebrates: a review. *Dev Comp Immunol.* 12: 281–494.
52. Saad, A.H., and R.E.L. Ridi. 1988. Endogenous corticosteroids mediate seasonal cyclic changes in immunity of lizards. *Immunobiology.* 177: 390–403.
53. Rhodin, A.G.J., P.P. van Dijk, J.B. Inverson, and H. B. Shaffer. 2010. "Turtles of the world, 2010 update: Annotated checklist of taxonomy, synonymy, distribution and conservation status". *Chelonian Research Monographs* 5: 000.112
54. Silverman, S. 2005. Diagnostic imaging. In: Mader, D.R.(ed). *Reptile Medicine and Surgery*, 2<sup>nd</sup> ed. W. B. Saunders Co., Philadelphia. Pp. 471-489.
55. Solberg, H.E. 1996. Establish and use of reference values. In: Burtis, C. A., and E. R. Ashwood (ed). *Tietz textbook of clinical chemistry* 3<sup>rd</sup> ed. W. B. Saunders Co., Philadelphia. Pp. 229-238.
56. Taylor, K., and H.W. Kaplan. 1961. Light microscopy of blood cells of Pseudemyd turtles. *Herpetologica.* 17:186–192.
57. van Dijk, P.P. 2011. *Mauremys reevesii*. In: IUCN 2011. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2011.2. [www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org)
58. Wood, F.E. and G.K. Ebanks. 1984. Blood cytology and hematology of the green sea turtle, *Chelonia mydas*. *Herpetologica.* 40: 331-336.
59. Work, T.M., R.E. Raskin, G.B. Batasz, and S.D. Whittaker. 1998. Morphologic and cytochemical characteristics of blood cells from Hawaiian green turtles. *Am J Vet Res.* 59:1252–1257.
60. Zaias, J., T. Norton, A. Fickel, J. Spratt, N.H. Altman, and C. Cray. 2006. Biochemical and hematologic values for 18 clinically healthy radiated tortoises (*Geochelone radiata*) on St Catherines Island, Georgia. *Vet Clin Pathol.* 35: 321-325.