

Susana Agustí Montolío

**Estudio de la Hematología y la Bioquímica sanguínea
de las Rapaces Nocturnas Ibéricas**



Directores:

Santiago Lavín González

Rafaela Cuenca Valera

Carolyn Cray

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

**Estudio de la Hematología y la Bioquímica sanguínea
de las Rapaces Nocturnas Ibéricas**

Susana Agustí Montolío

Directores:

Santiago Lavín González

Rafaela Cuenca Valera

Carolyn Cray

Tesis Doctoral

Departament de Medicina i Cirurgia Animals

Facultat de Veterinària

Universitat Autònoma de Barcelona

2015

Los Doctores *SANTIAGO LAVÍN GONZÁLEZ* y *RAFAELA CUENCA VALERA*, Catedrático de Universidad y Profesora Titular del Área de conocimiento de Medicina y Cirugía Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Autónoma de Barcelona, respectivamente, junto a *CAROLYN CRAY*, Professor of Clinical Pathology and Microbiology & Immunology, Division of Comparative Pathology, Department of Pathology and Laboratory Medicine, University of Miami Miller School of Medicine Miami, Florida,

INFORMAN:

que la memoria titulada **“ESTUDIO DE LA HEMATOLOGÍA Y LA BIOQUÍMICA SANGUÍNEA DE LAS RAPACES NOCTURNAS IBÉRICAS”**, presentada por **SUSANA AGUSTÍ MONTOLÍO** para la obtención del grado de **Doctora 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 15 de Septiembre de 2015.

Firmado: Santiago Lavín González

Firmado: Rafaela Cuenca Valera

Firmado: Carolyn Cray

Puedes conseguir todo lo que te propongas

si lo deseas con todo tu corazón

EL CERZO

de Susana Agustí Montolío

Érase una vez un huerto, un huerto vivo, un huerto alegre, un huerto que le acababa de dar la bienvenida a la primavera.

En su interior, las hortalizas tiernas variadas y coloridas lo adornaban de tal manera, que parecía más bien un campo de bellas flores. A su alrededor, tal y como la muralla protectora de un castillo, se extendía una fila de imponentes y exuberantes árboles frutales. Se divisaban impresionantes manzanos, esbeltos perales, elegantes higueras, todos ellos poseedores de una verde y densa frondosidad renacida tras el duro e infértil invierno.

Sin embargo, en una esquina y detrás de una hilera de altos matorrales se encontraba un cerezo, un cerezo que a pesar de poseer un tronco fuerte y unas raíces largas, en sus ramas no se apreciaba ni una sola hoja.

Un día una hormiga curiosa que pasaba por allí, sorprendida y maravillada ante semejante espectáculo de colores a su alrededor se percató de la existencia de este árbol tan especial. Inmediatamente detuvo su marcha y entabló conversación con él.

- Hola árbol- dijo la hormiga.

- Hola hormiga- dijo el cerezo.

- ¡Oh! Que paisaje tan encantador, es una gran suerte poder vivir en un entorno tan privilegiado- dijo la hormiga.

- Si... eso dicen todos los que vienen por aquí- dijo el cerezo en un tono melancólico.

- Mmm... perdona mi indiscreción, pero... por la época en la que nos encontramos y ante la explosión de vida que nos rodea, no llego a entender por qué en tus ramas no ha brotado todavía ninguna hoja, y ni si quiera hay indicios de ello.

- Bueno... si... es que tuve mala suerte... me plantaron detrás de estos arbustos tan altos que me impiden obtener una buena cantidad de agua y nutrientes para abastecerme y poder hacer brotar mis hojas- dijo el cerezo.

- ¡Ah! pero... perdona otra vez mi intromisión... ¿te has dado cuenta que por tu situación, la más cercana al pozo de agua, posees la tierra más húmeda y fértil de todo el huerto? Y... ¿que gracias a la presencia de arbustos a tu alrededor estás más protegido de las heladas y los vientos huracanados que el resto de árboles?- dijo la hormiga.

- Sí, tal vez tengas razón, pero... a quién le importa que yo tenga o no hojas, eso es un problema únicamente mío y de nadie más, además yo puedo sobrevivir así- dijo el cerezo con indicios de enfado.

- Las hojas son el alma de cualquier árbol, son las antenas que captan la energía necesaria del sol y que le permiten crecer más alto. Consiguen que sus ramas sean más fuertes y equilibradas ofreciendo el lugar idóneo para que parejas de aves enamoradas puedan dar cobijo y protección a sus pollos. Y una copa densa y tupida ofrecerá sombra y frescura en los cálidos días del verano.

Tus hojas, con los días darán paso a las flores. Esas bellas y perfectas creaciones de la naturaleza que son capaces de adornar con sus colores y olores hasta el paisaje más tenebroso, y atraerán y alimentarán a su vez a numerosos insectos hambrientos. Y por último, tras un proceso mágico de metamorfosis se convertirán en jugosas y sabrosas cerezas. ¿Y aún te preguntas que importancia tienen tus hojas?- dijo la hormiga.

- Bueno... quizás son importantes mis hojas, pero... ¡mírame! soy pequeño y tengo unas ramas y un tronco débil y quebradizo, y si además me comparo con el resto de árboles del huerto... todavía me siento más insignificante- dijo el cerezo.

- Pero amigo... tú no puedes compararte con el resto de árboles, ¡mira! Aquél es un manzano, tiene el tronco corto y grueso propio de los manzanos, y ¿qué me dices de esa higuera? tiene las hojas grandes y las ramas muy abiertas como todas las higueras que he visitado. Pero ¡tú! Tú no eres un manzano ni una higuera, ¡eres un cerezo! ese árbol cuya floración provoca una explosión de emoción, asombro y alegría a cualquiera que tiene el privilegio de contemplarlo- dijo la hormiga.

- ¿Sí? ¿Es cierto que mis flores son tan bonitas y mis frutos tan apreciados?

- ¡Por supuesto! Dijo la hormiga- yo he viajado largas distancias y he contemplado diferentes árboles frutales, y siempre, siempre que en mi ruta me encuentro con un cerezo, me detengo y contemplo maravillada tal espectáculo natural.

- ¡Sí, de acuerdo! no me puedo comparar con ellos porque cada uno de nosotros somos una especie diferente con formas únicas y características, pero... me falta fuerza, la realidad es que no soy capaz de hacer brotar mis hojas, mis flores y mis frutos... esa es mi triste y lamentable realidad- dijo el cerezo con tristeza.

- He conocido otros cerezos en flor que finalmente dieron cerezas maravillosas, y aunque cada ejemplar es único y especial, ellos poseían las mismas facultades que tú. Por lo tanto no te lamente porque tienes todo lo necesario para hacer brotar la vida en tus ramas yermas...- dijo la hormiga.

- Entonces.... ¿qué me pasa, pequeña y sabia hormiga? ¿Dónde está el problema?-dijo el cerezo angustiado.

- Este enigma mí querido amigo es muy fácil de resolver, la causa es la falta de confianza en ti mismo, la ausencia de credibilidad en tus enormes e infinitas posibilidades. Eres tú y nadie más que tú quien se impone las limitaciones y crea las excusas necesarias para impedir tu desarrollo, sin quererlo has creado a tu alrededor una muralla

inquebrantable, a tu entender protectora, pero que te aísla de la energía creadora de los rayos del sol, y que te mantiene sediento y hambriento a pesar de tener ese pozo tan rico y esa tierra tan fértil a tu alrededor- dijo la hormiga.

- Entonces... pequeña, ¿qué puedo hacer?- dijo el cerezo.

- Simplemente, has de buscar la fortaleza interior con la que nace cada cerezo desde los principios de los tiempos, reconocerla, aceptarla y dejar que fluya libremente al exterior. Esa explosión de energía es tan poderosa que será capaz de destruir en mil pedazos el escudo que te rodea, dejando que el sol y el agua lleguen a ti.

Transcurrieron 12 meses... y en ese huerto vivo, en ese huerto alegre, ese huerto que le acababa de dar la bienvenida a la primavera donde sus hortalizas lo hacían parecer un campo de flores, se divisaba a lo lejos un árbol imponente, de porte erecto y elegante que destacaba entre todos los árboles frutales por el brillo de sus hojas, la frondosidad de su copa y la belleza mágica de sus flores. A su lado, un pozo y una pequeña hilera de arbustos que lo protegían y custodiaban de las adversidades. Me acerqué con curiosidad para averiguar de qué especie de árbol frutal se trataba y pude ver con asombro que era un cerezo.

FIN

Agradecimientos

¿Cómo se reconocen los GRANDES SUEÑOS? Son aquellos que nacen en lo más profundo del corazón gracias a la fuerza poderosa del amor incondicional. Te impulsarán más lejos de lo jamás hayas imaginado y te ayudarán a superar cualquier obstáculo que aparezca en el camino. Y son aquellos que para alcanzarlos será necesario atravesar una fuerte tormenta que te enseñará a disfrutar de la belleza del arcoiris. Hoy me siento profundamente feliz porque puedo gritar a los cuatro vientos que he podido cumplir uno de los míos. Y la respuesta a... ¿Cómo te sientes? Es... me siento en paz. Por ello, desde aquí donde ahora me encuentro, satisfecha y orgullosa de mi misma, mientras disfruto de la belleza de un rayo de luz descompuesto en 7 colores, quiero empezar a agradecer.

Gracias a todos esos clientes y mascotas del Centre Veterinari Terrassa que han traspasado la barrera profesional y se han convertido en buenos amigos: Gema "Dinou", Juanjo "Nala y Moe", Pilar "Madi" y muchos más. Cada palabra de ánimo ha sido un empujón para continuar.

Gracias a Rosa y a todos los compañeros/as con los que he trabajado: Griselda, Mónica, Jenny, Flor, Manuel y Raquel. Todos ellos pacientes y buenos amigos. En especial a David, por estar a mi lado en los peores momentos y ser el hombro donde apoyarme. Gracias por estar, por escucharme, por animarme, por abrazarme y sobre todo por ayudarme a exteriorizar mi mundo interior.

Gracias a las compañeras y los alumnos/as de la Academia Campus. Gracias por enriquecerme con vuestras ilusiones y aspiraciones, gracias por todos esos debates trascendentales donde han surgido soluciones a casi todos los problemas de la humanidad y especialmente gracias por entrenarme para superar mi fobia a hablar en público.

Gracias Manel por compartir 10 años de vida. Gracias por tus ánimos, ellos fueron los que en un principio me hicieron creer que esto era posible. Perdón. Te deseo toda la felicidad de este mundo.

Gracias a todas los voluntarios y trabajadores de los centros de Torreferrusa y Vallcalent. Vuestro trabajo es esencial. Gracias Olga, la humildad, la dulzura y el amor por tu trabajo te definen. Gracias Elena por tu gran profesionalidad y disponibilidad. Y gracias

Rafa, gracias por tu confianza y tu gran implicación por este proyecto desde el minuto uno. Decirte amigo que te admiro por tu lealtad y nobleza.

Gracias a todos los búhos y lechuzas por vuestra imprescindible colaboración. ¡Esto va por vosotros!

Gracias a todos los compañeros del SEFaS y del Servicio de Hematología Clínica Veterinaria. Gracias a todos por animarme y ayudarme siempre que lo necesité. Gracias Eva, tú fuiste el ángel que me ayudó al principio. Hay pocas personas con las que he conectado de manera tan intensa. Ojalá algún día volvamos a trabajar juntas porque eres ¡una crack! Gracias Roser por tus buenos consejos y cuando quieras te presto a Muppet. Gracias Jorge por tus bonitas palabras... "Doctora" entre muchas otras. Gracias Xavi, siempre tienes la solución a todos mis problemas. Eres un sol. Gracias Gregorio porque tus buenos días tienen algo especial, no sé el por qué pero te prometo que intentaré descubrirlo. Gracias Andreu, por tu sonrisa sincera, eres un chico fabuloso. Gracias a ¡mi Montse! Mi compañera de sufrimientos. Te adoro y conforme más te conozco más me gustas. Gracias Diana, eres una gran chica y te mereces lo mejor. Gracias Raquel y confía que todo saldrá bien. Gracias Encarna, simplemente decirte que eres muy grande y que te admiro por tu gran profesionalidad. Gracias Jaume, tu apoyo y cariño es muy importante para mí aunque no sepa expresarlo, tú y yo haremos muchas cosas juntos. Gracias Marta, por tu bondad y tus bonitas palabras. Siempre es un placer comer contigo. Gracias Emmanuel, nunca dejes de brillar porque tu luz nos ilumina a todos. Y estate preparado para el futuro. Gracias Oscar, nadie mejor que tú para animar el momento de la comida. Gracias Josep Pastor e Ignasi Marco por compartir conmigo vuestros enormes conocimientos.

Gracias a mis directores de tesis. Thank you Carolyn, you are a brilliant and visionary scientific, you are a model for me. Thank you for your trust and for your pretty words. Gracias Santiago por confiar en mí, gracias por guiarme y darme esa primera oportunidad, sin ella esto no hubiera sido posible. Nunca he olvidado una frase que me dijiste al principio "el que algo quiere, algo le cuesta". Y gracias Rafi, GRACIAS en mayúsculas. Gracias por ser LA MEJOR DIRECTORA, gracias porque siempre has estado a

mi lado salvándome en los peores momentos. Gracias por enseñarme tantas cosas que debía aprender. Sin ti esta tesis no hubiera sido posible. GRACIAS.

Y Gracias a esas personas que forman parte de mí. Gracias a mis niñas Manoli y Jone. Gracias Manoli, por hablar mi idioma, eres un ejemplo de superación y buen corazón. Gracias Jone por tu sincera y descomunal amistad. Siempre has estado a mi lado en los momentos más importantes de mi vida, y por supuesto este ha sido uno de ellos. Me siento profundamente privilegiada de ser tu amiga. Tu amistad es uno de los mayores tesoros de mi vida.

Gracias a Albert, gracias por ofrecerme el motivo para intentar día a día ser mejor de lo que soy. Gracias por ayudar a descubrirme. Ahora ya sé cuál es mi siguiente sueño, y la mitad de ese sueño es poder compartirlo contigo.

Gracias a mi Muppet, Puça y Alf. Sois la mejor compañía. Gracias por darme tanto.

Gracias a mis hermanas, Loli y Silvia, sus maridos Jose y Dani, y los amores de mis sobrinos, David, Alba y Ainara. Gracias por vuestro apoyo incondicional, sois ese hogar donde me siento segura, y puedo refugiarme de cualquier tormenta que aparezca. Gracias.

Y Gracias a mis padres, todo lo que soy y lo que llegaré a ser se lo debo a ellos. Gracias por darme raíces y alas para volar. Gracias por guiarme en la vida y convertirme en la persona independiente y soñadora que soy hoy. Esta tesis está dedicada especialmente a mi familia en general y a vosotros en particular. Gracias mamá por enseñarme que es el amor incondicional y gracias papá por enseñarme a ser una persona honrada, luchadora y paciente, tal y como tú lo eres. Con esta tesis quiero demostrarte que todo es posible si lo deseas con todo tu corazón, y darte fuerza y esperanza en tu batalla. GRACIAS a los dos por ser esos modelos en los que inspirarme.

Y muchas muchas muchas muchas muchas GRACIAS a todas las demás personas que me han apoyado para elaborar esta tesis y que por motivos de tiempo y espacio es

imposible agradecer personalmente. Y porque consideraba que la mejor manera en que puedo devolveros tanto apoyo y confianza depositada en mí era acabando esta tesis...

Aquí la tenéis.

Índice

Resumen.....	1
1. Introducción.....	7
2. Revisión bibliográfica	11
2.1. Biología de las Rapaces Nocturnas Ibéricas.....	13
2.1.1. Autillo europeo (<i>Otus scops</i>)	14
2.1.2. Búho chico (<i>Asio otus</i>).....	15
2.1.3. Cárabo común (<i>Strix aluco</i>).....	16
2.1.4. Mochuelo europeo (<i>Athene noctua</i>)	17
2.1.5. Lechuza común (<i>Tyto alba</i>)	19
2.2. Hematología aviar.....	21
2.2.1. Evaluación de la serie roja	21
2.2.2. Evaluación de la serie blanca	27
2.2.3. Evaluación de la serie trombocitaria	36
2.3. Bioquímica sanguínea aviar	37
2.3.1. Enzimas	38
2.3.2. Metabolitos.....	42
2.3.3. Minerales	48
2.3.4. Electrolitos	50
2.3.5. Proteínas	51
3. Objetivos.....	55
4. Estudios	59
4.1. STUDY I: Hematologic Reference Intervals and Age Effect in Iberian Strigiformes	

.....	61
4.2. STUY II: Plasma Biochemistry Reference Intervals and Age Effect in Iberian Strigiformes.....	85
4.3. STUDY III: Comparison of the novel semi-direct method using manual Romanowsky-based Diff-Quick stain with Natt & Herrick method to WBC count in birds	115
5. Discusión general	131
6. Conclusiones	143
7. Bibliografía.....	147

Resumen

La importancia de la hematología y la bioquímica sanguínea en medicina aviar se refleja en el incremento de estudios destinados a la obtención de los intervalos de referencia en muchas especies de aves en general y en las Estrigiformes en particular.

Para interpretar correctamente sus valores se requiere conocer la influencia que los factores ambientales, fisiológicos y metodológicos ejercen sobre los mismos. La edad es un factor muy relevante, especialmente en el primer periodo de vida las aves donde acontece el proceso de crecimiento.

Estudios realizados sobre otras especies de aves han demostrado que la edad influye sobre los parámetros hematológicos y bioquímicos produciendo cambios significativos en sus valores.

El objetivo de esta tesis doctoral fue determinar los intervalos de referencia hematológicos en cinco especies de Estrigiformes en diferentes clases de edad. Se muestrearon 339 animales; 92 cárabo comunes (*Strix aluco*), 88 mochuelos europeos (*Athene noctua*), 96 autillos europeos (*Otus scops*), 17 búhos chicos (*Asio otus*) y 48 lechuzas comunes (*Tyto alba*), procedentes de dos centros de recuperación de fauna salvaje localizados en la región Nord-Este de España.

De todos los parámetros analizados, únicamente las concentraciones de colesterol y albúmina junto a la osmolaridad plasmática no mostraron variabilidad inter específica. El resto de parámetros variaron entre especies.

Respecto a la comparación entre clases de edad, los resultados de nuestro estudio muestran que dentro del orden de las Estrigiformes se produce un incremento con la edad en el recuento total de eritrocitos, valor hematocrito y en las concentraciones de hemoglobina. Por el contrario, la concentración de fósforo y la actividad de la fosfatasa alcalina disminuyeron con la edad. Adicionalmente, dentro de la familia Strigidae se observó un incremento en las concentraciones de gamma globulina y sodio, y un descenso de la cifra total de leucocitos y de la concentración de calcio con la edad.

Esta tesis doctoral demuestra la importancia de considerar la edad como un factor relevante en la obtención de los intervalos de referencia hematológicos y bioquímicos en

las Estrigiformes, y evidencia que los pollos de estas especies son como una cohorte independiente. En base a ello se han propuesto dos intervalos de referencia.

En la segunda parte de este trabajo de tesis doctoral quisimos valorar la modificación propuesta por Arock et al., 2013 de un método semi-directo (MSDTLC) de recuento total leucocitario basado en el colorante eosinofílico del segundo paso de la tinción de Diff-Quick y determinar su grado de relación con el método directo hemocitométrico de Natt y Herrick, que tradicionalmente se emplea en la sangre aviar en los laboratorios. Se muestrearon 20 animales, 10 cárabos comunes (*Strix aluco*) y 10 buitres leonados (*Gyps fulvus*).

Se observó una buena correlación entre métodos ($r = 0.89$), ausencia de errores de tipo constante o proporcional y Bias = 2.06 (95 % CI -6.44 a 10.57). El método semi-directo obtuvo una imprecisión intra observador mayor (CV =16.3%) y una menor imprecisión entre observadores (CV = 8.5%) que la observada en el método de Natt y Herrick.

En conclusión, el método modificado de recuento leucocitario total, MSDTLC recientemente propuesto, permite un recuento fiable tanto de heterófilos como de eosinófilos en las muestras sanguíneas de cárabo común y de buitre leonado, muestra una alta precisión y por tanto puede ser empleado como alternativa de otros métodos semi-directos, cuando el método hemocitométrico directo no está disponible.

The importance of hematological and blood biochemistry testing in avian veterinary medicine is reflected in the increasing numbers of studies leading to the identification of reference intervals of Strigiformes. To conduct a proper clinical interpretation, a set of characteristic health values is required and the influence of the environmental, physiological and methodological factors should be understood. The age is an influential factor especially in the first time of life when the most rapid growth rate or increase in body mass occurs, and studies in other avian groups have shown the age significantly influences producing detectable changes in hematological and blood biochemistry parameters.

The objective of this study was to determine baseline data of hematologic and blood biochemistry parameters of five species of Iberian Strigiformes in different age classes. 339 nocturnal birds of preys were sampled from wildlife health centers, 92 Tawny Owls, 88 Little Owls, 96 Scops Owls, 17 Long-eared Owls and 48 Barn Owls.

Only the reference interval of cholesterol, albumin and plasmatic osmolality did not show inter-specific variability. The others hematologic and biochemical parameters varied between the species.

Between the age classes considered, a common trend was observed. Into the Strigiforme Order no differences were observed between juveniles and adults in any hematologic and blood biochemistry parameter. The packed cell volume, red blood cell count and hemoglobin of chicks were significantly lower than juveniles and adults, and alkaline phosphatase, calcium and phosphorus concentrations were significantly higher. In the Strigidae family, sodium and gamma globulins increased with age and total WBC and calcium decreased.

Our results evidenced the importance of considering age classes for the establishment of hematologic and biochemical reference intervals in the Strigiformes, and provide evidence that data from chicks of this Order were identified as unique group compared to older cohorts; therefore two hematologic and blood biochemical reference intervals by age have been defined.

Based on the staining affinity of heterophils and eosinophils in the step 2 of Diff-Quick

stain, it has been proposed to test a novel modified semi-direct method for total leukocyte count. The purpose of this study was compare this semi-direct romanowsky-based quick stain method with the direct method of Natt and Herrick and to study the intra and inter-observer imprecision in samples from two species of birds with a different differential leukocyte counts. 20 samples of tawny owl (*Strix aluco*) and griffon vulture (*Gyps fulvus*) were used to calculate the WBC by the two methods.

A good correlation was observed, $r = 0.89$; no constant and/or proportional error was found. The Bias was 2.06 (95 % CI -6.44 to 10.57). The intra-observer imprecision of a semi-direct romanowsky-based quick stain method was higher (in tawny owl CV = 18.3% and griffon vulture CV = 14.3%) than the Natt and Herrick method, but the inter-observer imprecision was lower (in tawny owl CV = 24% and griffon vulture = 7%) than the Natt and Herrick method.

In conclusion, the techniques did not produce equivalent results, but the semi-direct romanowsky-based quick stain method allowed reliable counting of both heterophils and eosinophils in tawny owl and griffon vultures blood samples and showed high precision and therefore could be used as an alternative of other semi-direct counting methods when direct hemocytomer method is not available.

Abstract

The importance of hematological and blood biochemistry testing in avian veterinary medicine is reflected in the increasing numbers of studies leading to the identification of reference intervals of Strigiformes. To conduct a proper clinical interpretation, a set of characteristic health values is required and the influence of the environmental, physiological and methodological factors should be understood. The age is an influential factor especially in the first time of life when the most rapid growth rate or increase in body mass occurs, and studies in other avian groups have shown the age significantly influences producing detectable changes in hematological and blood biochemistry parameters.

The objective of this study was to determine baseline data of hematologic and blood biochemistry parameters of five species of Iberian Strigiformes in different age classes. 341 nocturnal birds of preys were sampled from wildlife health centers, 92 Tawny Owls, 88 Little Owls, 96 Scops Owls, 17 Long-eared Owls and 48 Barn Owls.

Only the reference interval of cholesterol, albumin and plasmatic osmolality did not show inter-specific variability. The others hematologic and biochemical parameters varied between the species.

Between the age classes considered, a common trend was observed. Into the Strigiforme Order no differences were observed between juveniles and adults in any hematologic and blood biochemistry parameter. The packed cell volume, red blood cell count and hemoglobin of chicks were significantly lower than juveniles and adults, and alkaline phosphatase activity and phosphorus concentrations were significantly higher. In the Strigidae family, sodium and gamma globulins increased with age and total WBC and calcium decreased.

Our results evidenced the importance of considering age classes for the establishment of hematologic and biochemical reference intervals in the Strigiformes, and provide evidence that data from chicks of this Order were identified as unique group compared to older cohorts; therefore two hematologic and blood biochemical reference intervals by age have been defined.

Based on the staining affinity of heterophils and eosinophils in the step 2 of Diff-Quick

stain, it has been proposed to test a novel modified semi-direct method for total leukocyte count. The purpose of this study was compare this semi-direct Romanowsky-based quick stain method with the direct method of Natt and Herrick and to study the intra and inter-observer imprecision in samples from two species of birds with a different differential leukocyte counts. 20 samples of tawny owl (*Strix aluco*) and griffon vulture (*Gyps fulvus*) were used to calculate the WBC by the two methods.

A good correlation was observed, $r = 0.89$; no constant and/or proportional error was found. The Bias was 2.06 (95 % CI -6.44 to 10.57). The intra-observer imprecision of a semi-direct Romanowsky-based quick stain method was higher (in tawny owl CV = 18.3% and griffon vulture CV = 14.3%) than the Natt and Herrick method, but the inter-observer imprecision was lower (in tawny owl CV = 24% and griffon vulture = 7%) than the Natt and Herrick method.

In conclusion, the techniques did not produce equivalent results, but the semi-direct Romanowsky-based quick stain method allowed reliable counting of both heterophils and eosinophils in tawny owl and griffon vultures blood samples and showed high precision and therefore could be used as an alternative of other semi-direct counting methods when direct hemocytomer method is not available.

Introducción

Las Rapaces Nocturnas forman un orden de aves enigmáticas que mantienen desconocidos muchos aspectos de su biología debido en gran parte a su adaptación a la oscuridad. Demográficamente se caracterizan por presentar tamaños poblaciones reducidos a causa de una lenta tasa de reproducción (estrategia ecológica de la K), unida a su posición en la cúspide de la cadena trófica como carnívoros de segundo y tercer nivel que les obliga a explotar territorios de caza de gran extensión para cubrir sus requerimientos nutricionales.

Los últimos censos revelan que dicha vulnerabilidad natural, unida a la actual pérdida y fragmentación de su hábitat junto al incremento de las amenazas directas como la caza, el expolio, los atropellos, las electrocuciones y los tóxicos, está desembocando en un declive de sus poblaciones. Esta situación exige la contribución científica de diferentes disciplinas, como la hematología y la bioquímica sanguínea que ayuden a ampliar el conocimiento que se tiene sobre estas aves y que conduzca finalmente al planteamiento de las medidas más adecuadas para su conservación.

Este trabajo afronta el estudio de la Hematología y la Bioquímica sanguínea de cinco especies de Rapaces Nocturnas Ibéricas, en condiciones de salud desde una perspectiva global, partiendo de la escasa bibliografía publicada que existe sobre el tema, junto a la enorme aplicabilidad que pueden ofrecer en el diagnóstico y tratamiento de las enfermedades aviares. En este estudio se proporcionan los valores de referencia de sus principales parámetros de relevancia clínica, y se analiza la influencia de la edad de las aves en ellos.

Adicionalmente incluimos la evaluación de un método novedoso para el recuento total de leucocitos que se basa en el colorante eosinofílico empleado en la tinción de Diff-Quick, caracterizada por su coste reducido y su amplia distribución.

Esta tesis amplía el conocimiento de las Estrigiformes, constituyendo en primer lugar un punto de apoyo para los clínicos que manejan estas aves en sus actividades, y para otros investigadores, que a pesar de pertenecer a ciencias muy dispares como la Ecología o la Biología Evolutiva, basan sus investigaciones en el estudio de la sangre de estos animales con la finalidad de averiguar aspectos desconocidos de su biología. Creemos

que los datos aportados constituirán una herramienta práctica importante en los programas de conservación de este grupo animal, que contribuirá a disminuir sus amenazas actuales así como a detectar nuevos peligros a los que pueden enfrentarse en el futuro las poblaciones de Rapaces Nocturnas más meridionales de Europa.

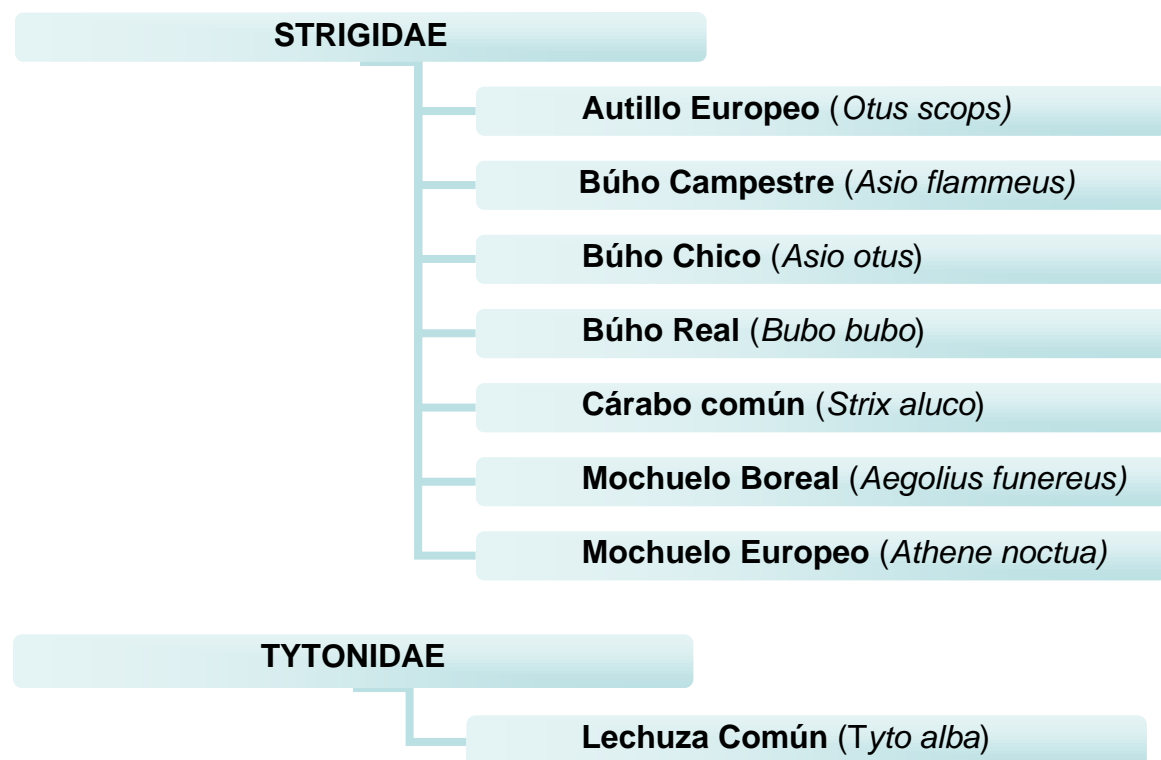
Revisión bibliográfica

2.1. BIOLOGÍA DE LAS RAPACES NOCTURNAS IBÉRICAS

Las Rapaces Nocturnas pertenecen al Orden Estrigiforme y se clasifican en dos familias: Strigidae, o búhos verdaderos y Tytonidae comúnmente conocidas como lechuzas.

Los búhos se caracterizan por poseer un cráneo redondeado, órbitas de gran tamaño, el pico en forma de gancho, la fúrcula neumática y el esternón con dos pares de orificios en su borde. Además, la longitud del tercer dedo es superior a la del segundo y su uña presenta el borde liso. Simultáneamente incorporan el estado mesóptilo en su desarrollo post embrionario y los huevos tienen forma redondeada. Las lechuzas sin embargo, presentan el cráneo más alargado, las órbitas de menor tamaño, el pico recto, la fúrcula no neumática y un único par de orificios en el esternón. Contrariamente a los búhos, muestran el filo de la uña aserrado, ausencia de plumaje mesóptilo y los huevos adoptan una forma elíptica (Mikkola, 1983).

En nuestro país residen un total de 8 especies de rapaces nocturnas:



2.1.1. Autillo Europeo, *Otus scops* (Linnaeus, 1758)

De distribución paleártica, el autillo europeo está presente principalmente en las regiones templadas norte Africanas, Asiáticas y Europeas donde se encuentra en los territorios más meridionales (Del Moral *et al.*, 2012). Es una especie migradora transahariana que viaja desde el continente africano que constituye el área de invernada hasta Europa donde lleva a cabo su reproducción. La población reproductora está representada por la subespecie *O. scops mallorcae*, mientras que los individuos invernantes corresponden a la subespecie *O. scops scops* (Cramp, 1985).

Constituye la rapaz nocturna ibérica de menor tamaño, presentando una longitud total de 19 a 21 cm, una envergadura alar de 45 a 59 cm, y pesos comprendidos entre los 60 y 145 gramos.

El hábitat de esta especie lo forman los terrenos abiertos o semiabiertos, comprendidos entre el nivel del mar y los 800 metros de altitud, aunque también se ha llegado a describir su presencia hasta los 2.000 m (Estrada *et al.*, 2004), principalmente aquellos de estructura heterogénea en los que se combina un componente agrícola (campos de cereal, plantaciones de naranjos, olivos, almendros o algarrobos) junto a otro de tipo forestal (robleales, alcornocales, dehesas y pinares) prefiriendo evitar las zonas de bosque denso (Del Moral *et al.*, 2012). También está presente en zonas húmedas como ramblas y vegetación de ribera, y su capacidad para tolerar la presencia humana le permite aumentar su dispersión situándose en parques de ciudades y edificios rurales (Martínez *et al.*, 2006).

El autillo europeo basa su dieta en la ingesta de artrópodos, primordialmente insectos de gran tamaño cuyo porcentaje puede alcanzar más del 90% del total de presas consumidas, en aves de pequeño tamaño, micromamíferos e inusualmente anuros y ciertos lacértidos (Manzanares, 1986).

Establece los nidos preferentemente en oquedades de árboles viejos, en ocasiones beneficiándose de los agujeros excavados por el pito real (*Picus viridis*) así como en huecos de edificios viejos o reutilizando nidos de urracas (*Pica pica*) (Baucells y Vila, 2002). La puesta de los huevos se desarrolla desde principios de abril hasta mediados de

mayo y deposita entre 3 y 6 huevos, con un promedio de 4, a intervalos de 2 días cada uno (Nicolai, 1995).

Datos aproximados reflejan una población nacional de 30.000 a 34.000 parejas reproductoras (Purroy, 1997). Está considerada la estrigiforme menos estudiada y más amenazada (Escandell, 2013). Actualmente está incluida en el Listado de Especies Silvestres en Régimen de Protección Especial y en el Catálogo Español de Especies Amenazadas (Real Decreto 139/2011). Los principales peligros a los que se expone la especie son, en primer lugar aquellos que afectan a la calidad de su hábitat como el abandono o la intensificación de la agricultura, junto a la destrucción provocada por los incendios forestales. En segundo lugar, se encuentran los factores que actúan directamente sobre la especie reduciendo su eficacia biológica como son el abuso indiscriminado de plaguicidas, la caza ilegal y los atropellos (Del Moral *et al.*, 2012).

2.1.2. Búho Chico, *Asio otus* (Linnaeus, 1758)

El búho chico presenta una distribución mundial de tipo holártica circumpolar limitada septentrionalmente por la isoterma del mes de julio inferior a 15 °C. En España se encuentran dos subespecies: *Asio otus otus* y *Asio otus canariensis*. La primera se distribuye por la Península Ibérica y Baleares mientras que la subespecie *canariensis* es autóctona de las Islas Canarias.

Es un ave de tamaño medio que presenta una longitud total de 35-39 cm, 85-100 cm de envergadura alar y entre 160-378 g de peso (Manzanares, 1986). Aunque ambos sexos tienen colores similares, las hembras suelen adoptar tonos más oscuros (Nicolai, 1995).

En nuestro país, el 70% del total de la especie habita en bosques de árboles caducifolios y semicaducifolios, donde encuentra altas tasas de micromamíferos, junto a los bosques de estructura mixta que están unidos a cultivos de cereales y que se localizan entre el nivel del mar y los 1.400 m de altitud (Estrada *et al.*, 2004). También está presente en otra gran variedad de hábitats como bosques de ribera, campos de frutales e incluso en el interior de núcleos urbanos (Manzanares, 1986).

El búho chico es un depredador especialista que basa su alimentación en la ingesta de micromamíferos de tamaño pequeño y mediano, que llegan a representar una proporción del 97-100% del total de la biomasa consumida (Delibes *et al.*, 1983).

Son monógamos y solitarios aunque algunos individuos tienden a anidar en pequeñas colonias (Del Hoyo, 1999). Entre los meses de marzo y junio realizan la puesta con un promedio de 4-6 huevos (Nicolai, 1995). En nuestra latitud se comporta como una especie sedentaria aunque puede realizar pequeños desplazamientos si escasea el alimento (Mikkola, 1983).

En nuestro país se estima una población de 4.800-6.550 parejas reproductoras (Purroy, 1997), aunque debido a la dificultad que presenta la detección de sus ejemplares, es posible que las densidades documentadas estén infravaloradas (Estrada *et al.*, 2004). Está incluida en el Listado de Especies Silvestres en Régimen de Protección Especial y en el Catálogo Español de Especies Amenazadas (Real Decreto 139/2011).

Entre los principales factores desencadenantes de su regresión se encuentran la deforestación, la destrucción de nidos de córvidos adecuados para la cría, los envenenamientos, la caza ilegal y la expansión de la agricultura intensiva junto al abandono de las zonas rurales (Del Moral *et al.*, 2012).

2.1.3. Cárabo Común, *Strix aluco* (Linnaeus, 1758)

El cárabo común tiene una distribución paleártica. En España está representado por la subespecie *Strix aluco sylvatica* y se encuentra presente en todo el territorio nacional a excepción de los archipiélagos Balear y Canario (Perrins, 2006).

Es un ave de apariencia robusta, mediano tamaño y hábitos estrictamente nocturnos. Los adultos alcanzan una longitud total de 37 a 46 cm, una envergadura alar de 90-100 cm y pesos que oscilan entre 336-695 g en las hembras y 331-490 g en los machos. Su plumaje es polimórfico, y en España las formas más comunes son la pardo-rojiza seguida de la gris (Manzanares, 1986).

Aunque es una especie preferentemente forestal que se localiza en los bosques frondosos de tipo caducifolio (robledales, castaños y hayedos) que se sitúan desde el nivel del mar hasta los 2.000 metros de altitud, se adapta a otro tipo de hábitats como son las zonas escasas de árboles y las ciudades (Sánchez *et al.*, 1995).

La dieta del cárabo común se caracteriza por su amplio espectro, y se compone básicamente de micromamíferos, especialmente roedores de monte, aunque en condiciones de escasez en el ambiente suele incorporar otros órdenes de animales como son las aves, los peces, los anfibios y los invertebrados entre los que destacan los insectos y las lombrices (Manzanares, 1986).

Su estrategia reproductiva es principalmente monógama y territorial, con territorios de cría que fideliza y protege durante toda la vida a menos que se deterioren o se le moleste (Mikkola, 1983). Realiza una puesta anual entre los meses de febrero y junio depositando una media de 3 a 5 huevos (Nicolai, 1995).

El cárabo común es una de las estrigiformes más abundantes de la Península Ibérica con una población estimada de 45.000 a 61.000 parejas reproductoras (Purroy, 1997). Las causas de amenaza para la especie son la caza furtiva de pollos, los atropellos, los envenenamientos y las colisiones contra estructuras eléctricas. Sin embargo, parece que tales peligros suelen afectar preferentemente a aquellas poblaciones que ocupan los hábitats de peor calidad (Del Moral *et al.*, 2012).

2.1.4. Mochuelo Europeo, *Athene noctua* (Scopoli, 1769)

El mochuelo europeo presenta una distribución euroasiática principalmente localizada en los países con clima templado y mediterráneo situados por debajo de los 55° N de latitud, aunque también ocupa la región afro tropical donde es capaz de tolerar condiciones más desérticas (Bezzel, 1989). En la Península Ibérica y en Mallorca se encuentra la subespecie *A. noctua vidali* y la subespecie norteafricana *A. noctua glaux* se encuentra en Ceuta y Melilla (Del Moral *et al.*, 2012).

Se trata de un estrigiforme de pequeño tamaño que presenta una longitud total de 21 a 27 cm, una envergadura alar de 57- 61 cm y pesos que oscilan entre los 124- 198 g. En nuestra latitud su plumaje es de color pardo oscuro y salpicada por abundantes manchas blanquecinas (Manzanares, 1986).

Su hábitat se relaciona principalmente con los espacios abiertos que presentan bajas densidades de árboles y que se localizan preferentemente desde el nivel del mar hasta los 1.200 m de altitud (Estrada *et al.*, 2004). Aunque está presente en campos de cultivo, zonas áridas, jardines, parques, y en edificaciones abandonadas, los ambientes preferidos por el mochuelo común son aquellos que han sido transformados por las actividades agrícolas como paisajes de estructura en mosaico (Martínez y Zuberogoitia, 2004).

La dieta del mochuelo es de amplio espectro trófico y las principales fuentes de energía la forman los invertebrados, los micromamíferos, aves de pequeño tamaño, anfibios y ciertos grupos de reptiles como lagartos y serpientes (Hume, 2007).

Construye los nidos en las copas y huecos de árboles así como en cavidades de edificios (Bezzel, 1989). La puesta, con un tamaño de 3 a 5 huevos sucede entre los meses de abril y mayo y tras 25-28 días de incubación por la hembra, los huevos eclosionan. Los pollos con 35 días de edad ya están listos para abandonar el nido y tan sólo 10 días después estarán capacitados para volar (Nicolai, 1995).

Estudios estiman en España un mínimo de 39.433 parejas reproductoras reflejando una disminución del tamaño poblacional de un 20% en los últimos 30 años (Del Moral *et al.*, 2012). Está incluida en el Listado de Especies Silvestres en Régimen de Protección Especial y del Catálogo Español de Especies Amenazadas (Real Decreto 139/2011).

Los principales peligros a los que se enfrenta la especie consisten en primer lugar la intensificación o el abandono de la agricultura que han conducido a la tala de árboles viejos y a la desaparición de las construcciones rurales donde se forman los huecos para poder criar, junto a la eliminación de estructuras lineales que aprovecha como perchas para cazar. Secundariamente el uso de plaguicidas provoca la muerte directa de las presas así como un efecto de toxicidad indirecta debido al fenómeno de

bioacumulación; finalmente la presencia de infraestructuras de origen humano conduce a atropellos y electrocuciones (Del Moral *et al.*, 2012).

2.1.5. Lechuza común, *Tyto alba* (Scopoli, 1769)

Especie cosmopolita cuya área de distribución se localiza entre los paralelos 60° norte y 60° sur de latitud (Mikkola, 1983) pero ausente en los países de Asia más orientales (Bezzel, 1989). En España están presentes 2 subespecies reproductoras, la *Tyto a. alba* y *T. a. gracilirostris*. La primera se distribuye en toda la Península Ibérica, Baleares y las Canarias mientras que la segunda se limita a las islas orientales del archipiélago canario. Además la subespecie *Tyto a. guttata* propia del centro y este de Europa, ha pasado de ser una especie hibernante en nuestro país, a reproducirse e incluso hibridarse con la subespecie nominal en las provincias de Vizcaya, Madrid, y también en Lleida (Zuberogitia y Campos, 1999).

Es una rapaz nocturna de tamaño mediano con 35-40 cm de altura, casi un metro de envergadura y 300 g de peso medio. Las subespecies *Tyto a. alba* y *T. a. gracilirostris* presentan una variación interindividual en la coloración del plumaje, la parte dorsal es de color pardo amarillento, con variabilidad en cuanto a la cantidad de manchas grises y negras mientras que ventralmente es blanca y salpicada con manchas negras en forma de gota (Bezzel, 1989). La subespecie *Tyto a. guttata* se diferencia de las anteriores por adoptar un tono dorado más intenso y presentar abundantes puntos negros de mayor tamaño (Manzanares, 1986).

La lechuza común ocupa preferentemente los espacios abiertos, heterogéneos, poco alterados y con buena disponibilidad de cavidades, aunque también se distribuye en zonas litorales y en ambientes húmedos. En general es una especie que se haya muy ligada a la presencia humana, constituyendo los paisajes agro-pastorales el hábitat típico en nuestro país (Martínez y Zuberogitia, 2004).

Su dieta se basa fundamentalmente en la caza de vertebrados de pequeño tamaño, concentrando sus capturas sobre los micromamíferos propios de las zonas abiertas. Las

aves también forman parte de su espectro trófico junto a anfibios, reptiles e invertebrados (Manzanares, 1986).

Las lechuzas comunes son fieles a los territorios de cría año tras año. No suelen construir nidos, limitándose a depositar los huevos sobre un montón de egagrópilas secas en el interior de cavidades localizadas en edificios rurales o abandonados (Bezzel, 1989). Las lechuzas normalmente realizan una puesta año, aunque en condiciones de abundancia de presas pueden elevar su prolificidad llevando a cabo 2 ó 3 nidadas anuales. El tamaño medio es de 3 a 6 huevos, con 4 como media, que ponen a intervalos de 48 horas aproximadamente (Zuberogoitia, 2000).

Aunque es una especie típicamente sedentaria, los adultos pueden realizar pequeños desplazamientos fuera de su territorio, frecuentemente condicionados por la disponibilidad de alimento (Estrada *et al.*, 2004).

Con una población nacional estimada en 50.400 - 90.500 parejas reproductoras (Del Moral *et al.*, 2012), España es uno de los principales países de Europa con mayor abundancia de la especie. Sin embargo, tanto a nivel continental como nacional se ha evidenciado un retroceso poblacional, resultando ser más acusado en las zonas propias de cultivo cerealista y en el Levante, donde se ha detectado una disminución de hasta el 69%. Las causas a las que puede estar asociado este fenómeno son el abandono de las zonas de cultivo con la consiguiente alteración del hábitat típico de la especie, junto a otras causas de mortalidad no natural entre las que se incluyen los disparos (39.3%), los expolios (25,9%) y las muertes por atropello que parecen incrementarse año tras año (Martínez y Zuberogoitia, 2004). Está incluida en el Listado de Especies Silvestres en Régimen de Protección Especial y en el Catálogo Español de Especies Amenazadas (Real Decreto 139/2011) donde la subespecie *T. a. gracilirostris* se encuentra en una situación más alarmante al estar considerada vulnerable.

2.2. HEMATOLOGÍA AVIAR

La hematología aviar es la disciplina que estudia las células sanguíneas y los tejidos hematopoyéticos de las aves. Su principal aplicación es de tipo clínico ya que permite comprobar el estado de salud y de enfermedad, contribuye a monitorizar tanto la evolución de un proceso patológico como la respuesta al tratamiento y finalmente ayuda a establecer el pronóstico. El hemograma constituye la prueba de laboratorio que cuantifica y evalúa los diferentes tipos celulares presentes en la sangre (Schalm's, 2010).

2.2.1. Evaluación de la serie roja

En las aves, el análisis de la serie roja se realiza al igual que en el hemograma de mamíferos, a partir de la determinación del recuento total de eritrocitos, el valor hematocrito, la concentración de hemoglobina, los Índices eritrocitarios de Wintrobe (Volumen Corpuscular Medio, Concentración de Hemoglobina Media y la Concentración de Hemoglobina Corpuscular Media) y la valoración de la morfología de los eritrocitos (Campbell y Ellis, 2007).

Recuento Total de Eritrocitos

El recuento total de eritrocitos se obtiene en hematología aviar mediante métodos automatizados y manuales. El uso de los contadores electrónicos celulares exige una calibración previa del umbral de apertura del aparato de acuerdo al tamaño del eritrocito de la especie de ave en cuestión. Esta corrección se debe a que suelen emplearse los aparatos que fueron diseñados en su origen para los eritrocitos de mamíferos que se caracterizan por poseer un tamaño menor que el del eritrocito aviar (Schalm's, 2010). En segundo lugar se encuentran las técnicas manuales que utilizan las cámaras de recuento celular. Las más utilizadas son el método de Natt y Herrick (Natt y Herrick, 1952) y el sistema Unopette (5850) (Costello, 1970). El recuento directo se realiza previa tinción de la muestra con la solución de Natt y Herrick y tras contar el

número de células presentes en los recuadros centrales de ambos lados de la cámara de Neubauer y multiplicarse por 10^4 (Campbell y Ellis, 2007).

Respecto a la relación que frecuentemente se establece entre el tamaño corporal del ave y el recuento total de sus eritrocitos, en las rapaces las dimensiones de este tipo celular suele presentar unas magnitudes superiores a las observadas en otros órdenes de aves, con recuentos totales eritrocitarios bajos, situándose habitualmente en el límite inferior documentado para esta clase animal que oscila entre $1.9 - 5.0 \times 10^{12}$ cel/ L (Polo *et al.*, 1992). En las Estrigiformes se ha descrito un intervalo de referencia de $1.3 - 4.1 \times 10^{12}$ cel/ L (Ammersbach *et al.*, 2013).

Valor Hematocrito

El valor Hematocrito (HCT) se define como el porcentaje de volumen de sangre que ocupa la fracción de glóbulos rojos respecto al volumen total de sangre y se considera la medida más rápida y económica para valorar la serie roja. En patología clínica aviar se determina a partir del método manual estándar del tubo de microhematocrito, el cual también permite observar el color del plasma informando sobre la existencia de hemólisis, ictericia o lipemia de la muestra, además de realizar una primera valoración de la capa de leucocitos y trombocitos a partir del *buffy coat* (Schalm's, 2010).

Las aves presentan valores de hematocrito que oscilan generalmente entre el 0.35 – 0.55 L/L (Schalm's, 2010) y suelen relacionarse con el nivel de actividad de la especie o el individuo (Villegas *et al.*, 2002). En general, las especies que presentan hábitos más terrestres como *Gallus gallus domesticus* poseen un rango inferior 0.22 – 0.35 L/L que las especies voladoras, cuyo intervalo se sitúa generalmente entre el 0.40 – 0.55 L/L (Van der Heyden, 1994).

En general, el valor Hematocrito de las rapaces suele situarse en un rango del 0.39 – 0.44 L/L siendo superior al descrito en otros grupos de aves (Smith y Bush, 1978). Esta característica ha sido relacionada con su importante capacidad voladora (Carpenter, 1975). Dentro de una misma especie, el valor puede variar entre individuos en estado

salvaje y aquellos mantenidos en condiciones de cautividad donde encuentran reducida su capacidad de movimiento y/o presentan un mejor estado de hidratación (Hunter y Powers, 1980).

En las Estrigiformes en particular, se ha descrito un intervalo de referencia de 0.35 – 0.61 L/L (Ammersbach *et al.*, 2013).

La concentración de Hemoglobina

La hemoglobina (HGB) es el pigmento respiratorio universal de la clase de los vertebrados y su medición espectrofotométrica dentro de la hematología aviar se encuentra dificultada por la presencia del núcleo eritrocitario. Para eliminar esta interferencia resulta necesario realizar un previo lisado de las células junto a una adecuada retirada de los núcleos (Schalm's, 2010).

La concentración de hemoglobina en la sangre de las aves en general, y las rapaces en particular es similar a la encontrada en mamíferos y se sitúan generalmente entre 120 - 180 g/l, presentando gran variabilidad entre especies (Balasch *et al.*, 1976).

Índices de Wintrobe

En hematología aviar, los Índices eritrocitarios de Wintrobe se obtienen a partir del número de eritrocitos, valor hematocrito y concentración de hemoglobina, utilizando las mismas fórmulas empleadas en mamíferos.

El *volumen corpuscular medio* (VCM) se calcula como: $VCM (fl) = (HCT / N^{\circ} \text{eritrocitos}) \times 10$ y nos informa sobre el tamaño del eritrocito. Las aves presentan valores superiores a los encontrados en los mamíferos y menores que los reptiles. La *hemoglobina corpuscular media* (HCM) se obtiene mediante la fórmula: $HCM (pg) = (HGB / HCT) \times 10$ y expresa la cantidad media de hemoglobina por 100 ml de sangre total. La *concentración de hemoglobina corpuscular media* (CHCM) se determina por la siguiente fórmula:

CHCM (g/L) = (HGB / HCT) X 10 y se corresponde con la cantidad de hemoglobina por 100 ml de eritrocitos.

El VCM, la HCM y la CHCM de las aves en general y de las rapaces en particular presentan una importante variabilidad interespecífica y adoptan generalmente valores más bajos que los obtenidos en mamíferos a causa de la presencia del núcleo (Van der Heyden, 1994). Su valor diagnóstico radica en que son utilizados para clasificar las anemias en normocrómicas e hipocrómicas, en base a si sus valores se encuentran dentro o por debajo del rango normal de la especie (Campbell y Ellis, 2007).

Morfología de los Eritrocitos

Los eritrocitos maduros de las aves son células elípticas y nucleadas. Esta morfología está considerada un carácter homólogo que comparte con los peces, anfibios y reptiles. Con las tinciones de tipo romanowsky el citoplasma compuesto mayoritariamente de hemoglobina, se tiñe de naranja a rosado pálido y muestra una estructura uniforme (Claver y Quaglia, 2009).

Los eritrocitos maduros de las rapaces nocturnas conservan la morfología típica de las aves como células elípticas con un núcleo ovoide acidófilo y un citoplasma eosinófilo y uniforme en su estructura (Clark *et al.*, 2009).

Presentan una longitud media comprendida entre las 14 y 15.7 micras y una anchura media que oscila entre las 7.5 y 7.9 micras (Palomeque y planas, 1977). Tienen una vida media de 25 a 45 días, bastante más corta que la de los eritrocitos de muchos otros órdenes de animales. Los reticulocitos constituyen la penúltima fase de maduración del eritrocito aviar y se caracterizan por presentar un tamaño mayor al del eritrocito adulto, una forma más redondeada y un citoplasma más basófilo. Se les identifica a partir de las tinciones supravitales donde muestran un punteado basófilo o “reticulum” que confluye alrededor del núcleo para formar un anillo continuo o discontinuo que se corresponde básicamente con restos de RNA (Mitchell y Johns, 2008). En aves sanas, al igual que en los reptiles, se considera fisiológico observar una cantidad reducida de reticulocitos en la

circulación sanguínea. El porcentaje que representan respecto al total de eritrocitos es variable entre las diferentes especies de aves, siendo normalmente inferior al 10%. Este fenómeno se relaciona con la alta tasa de renovación que muestran los eritrocitos en este grupo animal dada su escasa longevidad (Campbell y Ellis, 2007).

Variaciones fisiológicas

En las aves, el recuento total de eritrocitos, la concentración de hemoglobina y el valor hematocrito suelen verse influidos por la altitud, la edad, el sexo, la condición corporal, la época del año, el estrés, la localización geográfica, el nivel de ejercicio así como por ciertos estados fisiológicos claves en el ciclo vital de las aves como son la reproducción, la muda de las plumas y otros estados hormonales y nutricionales (Cray, 2015).

Las variaciones que experimentan los diferentes parámetros hematológicos de la serie roja con la edad han sido ampliamente investigadas en numerosas especies aviares (Hawkey. *et al.*, 1984; Montesinos *et al.*, 1997; Lanzarot *et al.*, 2001; Howlett. *et al.*, 2002; Villegas *et al.*, 2002; Gayathri *et al.*, 2004; Haefele *et al.*, 2005; Moreira dos Santos *et al.*, 2009; Jones *et al.*, 2014;). Durante el desarrollo postembrionario el número de eritrocitos, el HCT y la HGB tienden a incrementarse, unido a una disminución progresiva del volumen corpuscular medio por la disminución en el número de eritrocitos jóvenes circulantes de mayor volumen, en consecuencia a la estabilización en su producción conforme se avanza hacia la madurez (Campbell y Ellis, 2007). La CHCM desciende significativamente durante este periodo vital y la concentración de hemoglobina alcanza el valor óptimo cuando las aves llegan al estado adulto (Hawkey *et al.*, 1984).

Respecto a la influencia del sexo, varios autores han documentado diferencias en los valores hematológicos entre machos y hembras (KoCan, 1976; Mulley, 1979; Jimenez *et al.*, 1991). Se han descrito valores de eritrocitos, HCT, concentración de HGB y CHCM superiores en machos que en hembras (Itoh, 1992; Mihailov *et al.*, 1999; Hauptmanova *et al.*, 2006). Esta diferencia refleja probablemente la presencia de un mayor nivel de estrógenos en las hembras y de testosterona en los machos cuyos efectos sobre el sistema hematopoyético se caracterizan por reducir y aumentar respectivamente los

recuentos eritrocitarios en sangre (Sturkie's, 1976). Sin embargo, en otras investigaciones no se han hallado diferencias estadísticamente significativas en los parámetros hematológicos con respecto al sexo (Williams y Trainer 1971; Lavín *et al.*, 1992; Miller, 2001).

Es bien conocido que la producción de glóbulos rojos es dependiente del estado físico y nutricional en el que se encuentra el organismo. En aves también se ha documentado una correlación positiva entre el valor hematocrito, la masa corporal y las reservas grasas subcutáneas (Dawson y Bortolotti, 1997; Sergent, 2004; Hauptmanova *et al.*, 2006). Un estudio realizado sobre una población de cisnes de cuello negro (*Cygnus melanocoryphus*) constató como una reducción del 30% en la masa corporal a causa de una deficiencia nutricional, fue seguida por una reducción significativa en los valores del número de eritrocitos, HCT y concentración de HGB (Artacho *et al.*, 2007). Sin embargo otros autores (Dawson y Bortolotti, 1997) sugieren que las aves solo mostrarán variaciones marcadas en su valor hematocrito cuando se encuentran en una condición física extremadamente mala.

Otro tipo de factor que parece influir sobre los resultados hematológicos son las diferentes fases del ciclo anual. Williams y Trainer en 1971 observaron influencias estacionales sobre los valores de eritrocitos, HCT, HGB y CHCM de patos y gansos. Durante la estación invernal y el período previo a la reproducción se obtuvieron valores superiores en los parámetros citados respecto a los obtenidos en otoño o tras la puesta e incubación de los huevos. Estos resultados pueden relacionarse con la condición corporal que muestran las aves en estos periodos del año, ya que suelen dedicarse durante el invierno a desarrollar las suficientes reservas para afrontar el coste biológico de la reproducción (Hauptmanova *et al.*, 2006).

Aunque está bien documentada la anemia fisiológica que experimentan las hembras durante la puesta de los huevos (Gayathri *et al.*, 2004; Gayathri y Hedge, 2006; Wagner *et al.*, 2008), todavía no se conoce con exactitud los mecanismos que la desencadenan. Existen diferentes hipótesis al respecto; la primera defiende que está provocada por un efecto de hemodilución asociado a la producción de precursores del huevo que elevan la osmolaridad del plasma y que provoca un movimiento de agua a este compartimento

desde otros espacios fisiológicos para mantener la osmolaridad a un nivel constante. La segunda explicación aboga por la existencia de una supresión de la eritropoyesis provocada por dos causas, una primera con la intención de redirigir la energía metabólica y/o los factores comunes a ambos procesos para invertirlos en el gran coste biológico que supone la reproducción, o bien porque los estrógenos inhiben el desarrollo de los precursores en la médula ósea. Un tercer mecanismo es el que se ha asociado con la condición corporal que presentan las aves durante este periodo (Wagner *et al.*, 2008).

Por último, la muda de las plumas también constituye uno de los fenómenos fisiológicos más importantes dentro del ciclo vital de las aves. Su efecto sobre la serie eritrocitaria es variable según la especie de ave investigada. Un estudio realizado por Driver en 1981 describe cómo los niveles de eritrocitos, de HCT y concentración de HGB de un grupo de ánades reales (*Anas p. platyrhynchos*) descendían progresivamente durante el periodo de muda de sus plumas de vuelo. Por el contrario, una investigación llevada a cabo por Sergeant *et al.*, en 2004 describió un incremento del valor hematocrito durante el periodo de cambio de las plumas en pingüinos pequeños (*Eudyptula minor*), resultados que estos autores atribuyeron a la necesidad de aumentar la tasa metabólica y con ello el HCT para llevar a completar dicho proceso fisiológico.

2.2.2. Evaluación de la serie blanca

Los leucocitos de las aves se clasifican en dos categorías principales en base a la presencia de gránulos en su citoplasma y según el número de lobulaciones observadas en sus núcleos: los granulocitos (heterófilos, eosinófilos y basófilos) y los mononucleares (linfocitos y monocitos).

Su evaluación dentro de la clínica aviar se consigue a partir de tres parámetros esenciales del hemograma: el estudio de la morfología celular, el recuento total de leucocitos y finalmente con el recuento diferencial de cada tipo leucocitario (Campbell y Ellis, 2007).

Recuento total de leucocitos

En los vertebrados, el número total de leucocitos siempre alcanza valores inferiores al contabilizado para los eritrocitos en un mismo individuo y generalmente suele mantenerse una relación proporcional entre ambos valores cuya magnitud aumenta conforme se avanza en la escala evolutiva. Esta proporción va desde 5-12 en peces agnatos y condriictios, de 20 a 70 en los anfibios, de 100 en reptiles, hasta llegar a los mamíferos donde se dan relaciones de 350 a 2000. Las aves, sin embargo se sitúan en una posición intermedia con una relación de leucocitos y eritrocitos que oscila entre 70 y 200 (Verdaguer, 2001).

En hematología aviar, el recuento total de leucocitos se utiliza como índice para valorar la función defensiva y en último término el estado general del individuo. Sus intervalos de referencia muestran gran variabilidad entre las diferentes especies aviares estudiadas, incluso entre aquellas que pertenecen al mismo género (Campbell y Ellis, 2007).

En mamíferos, el recuento total leucocitario se obtiene principalmente mediante el uso de analizadores automatizados previa lisis de todos los eritrocitos. A pesar de las potenciales ventajas que pueden ofrecer estas técnicas en la hematología aviar como la rapidez, la precisión y la exactitud, estos aparatos presentan sin embargo ciertos inconvenientes en la práctica cuando se emplean con sangre de aves. La principal limitación se debe a las peculiaridades morfológicas de las células sanguíneas de las aves consistentes en la interferencia provocada por los núcleos de eritrocitos y trombocitos que invalidan el fundamento seguido en la sangre de mamíferos (Lilliehöök *et al.*, 2004). Estos impedimentos han obligado a la gran mayoría de laboratorios, al empleo de las técnicas manuales realizadas con cámaras hemacitométricas. Entre los más utilizados se encuentran el método directo de Natt y Herrick que supone diluir la muestra al 1:200 con el diluyente de Natt y Herrick que provoca la tinción de los leucocitos de azul oscuro. Para realizar el recuento, se cuentan todas las células blancas presentes en las nueve cuadrículas de gran tamaño de la cámara hemacitométrica y se aplica la siguiente fórmula: Recuento total de leucocitos/ μ l = (total de leucocitos en 9 cuadrículas de gran tamaño*1.1) X 200 (Campbell y Ellis, 2007).

Adicionalmente se puede emplear un procedimiento semi-directo basado en el recuento selectivo de heterófilos y eosinófilos como son los métodos Unopette (Costello, 1970) y Leukopet (VetLab Laboratory, Miami, FL, USA). Ambos métodos indirectos, utilizan el diluyente Phloxine B que tiñe exclusivamente los heterófilos y eosinófilos de color rojo anaranjado. Previo llenado de ambos lados de la cámara, se cuentan los granulocitos (células redondas, refráctiles de color rojo anaranjado) localizados en las 18 cuadrículas de mayor tamaño de la cámara de Neubauer. Una vez obtenido el recuento en cámara y previamente a realizar el cálculo mediante una fórmula matemática, es necesario llevar a cabo un recuento diferencial leucocitario para calcular el porcentaje de heterófilos y eosinófilos sobre la extensión sanguínea. La fórmula es la siguiente: Recuento total de leucocitos (μl) = (nº de células en 18 cuadrículas)/(% heterófilos + % eosinófilos) X 1760.

Cuando se utilizan los métodos manuales, la diferencia entre los resultados obtenidos en ambos lados de la cámara de recuento no deben exceder el 10%, y en el caso de que esto ocurra se recomienda repetir el procedimiento (Campbell y Ellis, 2007).

A partir de la extensión sanguínea se puede realizar una estimación del número total de leucocitos obteniendo la media presentes en 5 campos, a 1000X de aumentos y aplicando la siguiente ecuación: Nº de leucocitos totales estimados/ μl = media de leucocitos contados en los 5 campos/1000 X 3.500.000. Para el empleo de la fórmula es necesario conocer previamente el HCT del ave ya que si está fuera del rango normal (0.35 – 0.55 L/L) ha de practicarse una corrección del resultado mediante la siguiente ecuación: Nº de leucocitos estimado corregido/ μl = Nº de leucocitos estimado/ μl X HCT observado / HCT medio normal (45%) (Campbell y Ellis, 2007).

Para obtener resultados fiables, la estimación requiere que el recuento se realice en la zona de monocapa de la extensión sanguínea donde además las células deben estar correctamente teñidas y distribuidas. La estimación es menos fiable, especialmente en las especies que presentan un número bajo de leucocitos y/o cuando se ha de utilizar el HCT medio. Estas estimaciones se deberían emplear tan solo cuando no sea posible realizar el recuento cuantitativo o bien como medida de control del error laboratorial (Cray y Zaias, 2004).

Morfología de los leucocitos

La morfología de los leucocitos se ha mantenido constante durante el transcurso de la evolución en los cinco taxones de vertebrados a excepción de los heterófilos presentes en aves, reptiles, anfibios y peces respecto a los neutrófilos propios de los mamíferos que aunque considerados funcionalmente equivalentes, muestran diferencias notables en su composición (Claver y Quaglia, 2009).

El examen de la morfología leucocitaria se realiza a partir del estudio microscópico de la zona en monocapa del frotis sanguíneo, en cuya preparación resulta necesario realizar una correcta fijación de la muestra para conservar los gránulos intracitoplasmáticos de naturaleza hidrosoluble de heterófilos y basófilos (Latimer y Rakich, 2007).

El heterófilo maduro de las aves es una célula redonda con un diámetro medio de 8.8 μm . Bajo las tinciones de tipo romanowsky, su citoplasma está poco coloreado y contiene abundantes gránulos eosinofílicos (naranja, rojo o marrón) cuya forma, tamaño y características generales varían entre las diferentes especies de aves estudiadas (Clark *et al.*, 2009). El núcleo se tiñe en tono púrpura, está bi o trilobulado y su cromatina se observa fuertemente condensada (Campbell y Ellis, 2007).

Funcionalmente, los heterófilos de las aves son similares a los heterófilos de los reptiles ya que coinciden en su principal función y se consideran células análogas a los neutrófilos de los mamíferos puesto que presentan una función antibacteriana similar, pero con capacidades oxidantes y fagocitarias disminuidas por la ausencia de la enzima mieloperoxidasa (Claver y Quaglia, 2009).

Los heterófilos de las Estrigiformes se caracterizan por presentar abundantes gránulos citoplasmáticos con forma alargada y en tonalidades rojizas y eosinófilas (Clark *et al.*, 2009). En estas aves constituye habitualmente la célula blanca predominante y presenta un intervalo de referencia comprendido entre $0.6 - 15.6 \times 10^9 /\text{L}$ (Ammersbach *et al.*, 2013).

El eosinófilo presenta una forma redonda y un diámetro medio de 7.9 μm , aunque con notable variabilidad entre especies. El citoplasma se colorea de azul pálido y contiene

gránulos fuertemente eosinófilos de apariencia habitualmente redondeada aunque también pueden adoptar una forma oval o alargada (Clark *et al.*, 2009). La función de los eosinófilos no se conoce demasiado. A pesar de que se ha descrito eosinofilia en reacciones de hipersensibilidad retardada y en casos de parasitismo intestinal (Maxwell y Burns, 1985), su relación con la inmunidad parasitaria y la hipersensibilidad aguda aún no ha sido totalmente demostrada (Mitchell y Johns, 2008).

El eosinófilo constituye la célula de morfología más variable entre los diferentes taxones que componen el orden de las rapaces nocturnas. Mientras los eosinófilos de las especies del género *Tyto* tienen gránulos delgados, redondeados y eosinófilos, sus equivalentes en las especies del género *Strix* presentan gránulos redondos y de tonalidad de azulada a débilmente eosinófilos. Por el contrario, los ejemplares de los géneros *Asio* y *Otus* tienen gránulos robustos, redondos y de coloración eosinófila brillante. En las rapaces este tipo celular se caracteriza por presentar recuentos superiores a los observados en otros grupos de aves (Clark *et al.*, 2009) con un intervalo de referencia comprendido entre $0.1 - 6.3 \times 10^9 /L$ (Ammersbach *et al.*, 2013).

Los basófilos de las aves son células redondas de pequeño tamaño con un núcleo redondo que se posiciona central o excéntricamente, se colorea azul pálido y que a menudo se mantiene escondido bajo los gránulos citoplasmáticos que se tiñen profundamente basófilos.

Los gránulos de los basófilos aviares contienen histamina sugiriendo su intervención en las reacciones de inflamación aguda y de hipersensibilidad de tipo IV similar a las desempeñadas por los basófilos y mastocitos de mamíferos (Mitchell y Johns, 2008).

Los basófilos de las Estrigiformes, mantienen la morfología típica de las aves (Clark *et al.*, 2009) y su presencia supone habitualmente un porcentaje muy bajo en sus recuentos diferenciales con un intervalo de referencia comprendido entre $0.0 - 1.2 \times 10^9 /L$ (Ammersbach *et al.*, 2013).

Los linfocitos de las aves se clasifican en función de sus dimensiones como linfocitos de pequeño, mediano y gran tamaño. Morfológicamente son similares a los propios de reptiles y mamíferos. El núcleo es redondo, se posiciona central o excéntricamente con

su cromatina intensamente agrupada o reticulada y presentan una relación núcleo/citoplasma alta. Muestra un citoplasma homogéneo y débilmente basófilo que en ocasiones puede contener gránulos azurófilos cuyo significado por el momento sigue siendo desconocido, aunque se sospecha que se corresponden con células natural killer (Campbell y Ellis, 2007).

Los linfocitos de las Estrigiformes adoptan microscópicamente la morfología típica de esta clase animal (Clark *et al.*, 2009) y representan generalmente el segundo tipo de leucocito más abundante en la circulación sanguínea con un intervalo de referencia que fluctúa entre $0.3 - 12.5 \times 10^9 /L$ (Ammersbach *et al.*, 2013).

Los monocitos constituyen el tipo leucocitario circulante más grande de tamaño en las aves. Su forma celular y nuclear oscila desde redonda a ameboidea y de redonda a ligeramente dentada, respectivamente. El citoplasma puede contener vacuolas y se muestra de color azul grisáceo en el que se reconoce una zona próxima al núcleo más clara. Los monocitos constituyen el pool circulante utilizado para la reposición de los macrófagos tisulares y poseen una función similar a la de los monocitos de los mamíferos implicada en la actividad fagocitaria y como mediador del proceso inflamatorio (Mitchell y Johns, 2008).

Los monocitos de las Rapaces en general y de las Estrigiformes en particular, conservan la morfología típica de las aves (Clark *et al.*, 2009) y su presencia supone habitualmente un porcentaje muy bajo en sus recuentos diferenciales con un intervalo de referencia comprendido entre $0.1 - 4.3 \times 10^9 /L$ (Ammersbach *et al.*, 2013).

Variaciones Fisiológicas

El número de leucocitos varía según la fase de desarrollo del individuo, el sexo, los cambios en los ritmos estacionales y circadianos, el estrés y ciertas etapas de su ciclo vital (Campbell y Ellis, 2007).

Las investigaciones realizadas con el objetivo de documentar las variaciones que experimenta la serie leucocitaria durante las primeras fases de vida de las aves,

describen en las especies de crecimiento altricial un descenso progresivo en el valor total de leucocitos cuya magnitud se muestra variable entre las diferentes especies y los individuos analizados (Hawkey *et al.*, 1984; Bounous *et al.*, 2000; Howlet *et al.*, 2002).

Respecto a las modificaciones que experimentan los recuentos de cada grupo leucocitario conforme el ave avanza en su desarrollo post embrionario, existe un menor consenso entre los estudios realizados. Tanto en el estudio llevado a cabo por Montesinos y colaboradores (1997) sobre cigüeñas negras como en el realizado por Fairbrother y O'loughlin (1990) sobre ánades reales se observó un declive de la fracción linfocitaria con el consiguiente aumento del ratio heterófilos/linfocitos; sin embargo ambas investigaciones no coincidieron en las variaciones producidas sobre el resto de fracciones leucocitarias ya que en el primer estudio se observó además un descenso del recuento de los eosinófilos mientras que en el segundo se produjo un aumento significativo de los heterófilos.

Los cambios hematológicos que experimentan las aves una vez llegan a la fase juvenil fueron investigados en la avutarda kori (*Ardeotis kori*) muestreando a los animales a intervalos de un mes hasta que alcanzaron el estado adulto (Howlett *et al.*, 2002). Los resultados obtenidos ofrecieron diferencias entre los valores de leucocitos de individuos juveniles y de adultos, siendo los primeros más altos que los segundos. Sin embargo, en este caso el recuento diferencial en el estado juvenil se caracterizó por presentar las fracciones de heterófilos y linfocitos valores numéricos iguales.

Respecto a las posibles diferencias en la serie blanca existentes entre hembras y machos, en el estudio realizado por Shave y Howard, 1976 sobre diferentes especies de patos silvestres, no se observaron influencias claras entre sexos y los autores consideraron que las ligeras fluctuaciones observadas en sus resultados podrían deberse más bien a probables diferencias en los estados metabólicos de cada grupo.

En los vertebrados ectotermos se ha observado como el recuento de los leucocitos varía en función de las condiciones ambientales. Un ejemplo de esta regla lo representan los reptiles en los que durante el invierno se han contabilizado recuentos inferiores a los encontrados en la estación estival (Machado *et al.*, 2006). En el caso de las aves, Shave

en 1976 y Williams y Trainer en 1971, tras determinar los recuentos leucocitarios de diferentes especies de patos y gansos durante un intervalo de estudio anual, no observaron diferencias ni tendencias claras en los valores de sus recuentos leucocitarios ni en el diferencial leucocitario, apoyando con ello la hipótesis de que los hemogramas de los animales ectodermos (peces, anfibios y reptiles) se ven más influidos por las condiciones ambientales que los hemogramas de los endotermos (aves y mamíferos) (Campbell y Ellis, 2007).

El fotoperiodo es otra variable ambiental que puede influir en los recuentos leucocitarios de las aves. Ochs y Dawson (2007), en su estudio realizado sobre hembras de golondrina bicolor observaron cómo a lo largo del día, los niveles de heterófilos aumentaban mientras que los de linfocitos descendían. Las investigaciones de Ots *et al.*, (1988) y Hörak *et al.*, (1988) aunque no pudieron detectar una relación entre el momento del día y la relación de heterófilos y linfocitos en carboneros comunes, sí hallaron que el recuento total de leucocitos se mostraba más elevado durante la noche que durante el día.

El estrés producido por las actividades de captura y manejo, así como por ciertas interacciones sociales y ambientales es uno de los estímulos más extensamente estudiados capaz de provocar variaciones en los recuentos leucocitarios de las aves (Gross y Siegel, 1983).

El agente estresante desencadena una respuesta fisiológica multiorgánica cuyos efectos se han conservado evolutivamente a través de los diferentes grupos taxonómicos de vertebrados. En términos generales provoca en un primer momento la elevación de los niveles de glucocorticoides plasmáticos (principalmente corticoesterona en aves) que ya son medibles en unos pocos minutos, a la que le siguen consecuencias más lentas y perdurables en el tiempo como las producidas sobre la hematología, apareciendo el leucograma de estrés (Schalm's, 2010).

En las especies de aves de vida silvestre, las variaciones en el ratio H/L ayudan a disciplinas como la Ecología y la Fisiología de la Conservación, de reciente aparición a reconocer el estado general de las aves y detectar peligros o situaciones de riesgo en

poblaciones naturales en las que las aves se encuentran sometidas a un estado de estrés fisiológico crónico (Davis *et al.*, 2008).

La reproducción, la muda de las plumas y la migración son etapas del ciclo vital de las aves de gran actividad metabólica que exigen demandas energéticas elevadas que pueden afectar a su sistema inmunitario y por tanto reflejarse en sus recuentos leucocitarios (Quillfeldt *et al.*, 2008). En un estudio realizado en hembras de pingüinos (*Pygoscelis adeliae*) se observó un descenso del ratio H/L durante la estación reproductora (Vleck *et al.*, 2000); los resultados obtenidos por Hörak *et al.*, (1988) mostraron sin embargo una tendencia opuesta. Una investigación sobre hembras de golondrina bicolor encontró los ratios de H/L más elevados en las hembras con nidadas más numerosas, mostrando por tanto una relación positiva entre el tamaño de puesta y por tanto el coste de la reproducción con los niveles de estrés que presentaban estas aves (Ochs y Dawson, 2007).

La muda de las plumas es otra importante etapa en el ciclo vital de las aves cuya influencia sobre la hematología ha sido investigada. Mientras que en el estudio realizado sobre una población de ánades reales se observó como el número de heterófilos y linfocitos declinaba significativamente durante y tras el periodo de renovación de sus plumas (Driver, 1981), la investigación llevada a cabo sobre gorriones comunes (*Passer domesticus*) describió un incremento en los valores de monocitos y basófilos (Paz *et al.*, 2001).

Respecto a las posibles fluctuaciones hematológicas asociadas a la migración, un estudio realizado en el zorzalito de Swainson (*Catharus ustulatus*), el zorzalito rojizo (*C. fuscescens*) y el zorzal maculado (*Hylocichla mustelina*) encontró diferencias significativas entre los valores leucocitarios de las aves que migraron y las que no. Las aves migradoras se encontraban en peor condición fisiológica y presentaban menores recuentos totales de leucocitos y de linfocitos junto a un aumento en el número de heterófilos en comparación a las no migradoras. Adicionalmente observaron como tales variaciones sanguíneas se acentuaron conforme aumentaba la distancia recorrida por las aves (Owen y Moore, 2006).

2.2.3. Evaluación de la serie trombocitaria

En patología aviar, el hemograma también permite la evaluación de los trombocitos a partir del recuento total junto a la valoración de la morfología celular en el frotis sanguíneo.

Recuento Total de Trombocitos

En los vertebrados no mamíferos, los trombocitos forman el segundo tipo de células sanguíneas más abundante después de los eritrocitos. En las aves, su concentración se encuentra habitualmente entre las $20-30 \times 10^9$ células/L.

Su recuento total en la práctica se realiza muy pocas veces de forma directa utilizando la cámara hemocitométrica, debido a la gran tendencia que tienen estas células a agregarse (Mitchell y Johns, 2008) y a la dificultad para diferenciarlas de los linfocitos (Ammersbach *et al.*, 2015).

El recuento directo se realiza previa tinción de la muestra con la solución de Natt y Herrick y tras contar el número de células presentes en los recuadros centrales de ambos lados de la cámara de Neubauer y multiplicarse por 10^4 .

La estimación de los trombocitos se realiza calculando la media de trombocitos que se observa en cinco campos de la extensión de sangre, en la zona de monocapa y con 100x aumentos y aplicando la siguiente ecuación: Número de Trombocitos estimado/ μl = media de trombocitos contados en 5 campos / 1000 X 3.500.000

En el caso de que el ave presente un HCT fuera del rango normal de la especie, ha de realizarse una corrección sobre el valor obtenido mediante el siguiente cálculo: Recuento de Trombocitos estimado corregido/ μl = Número de Trombocitos estimado X (PCV observado/PCV normal (45%)) (Campbell y Ellis, 2007).

Morfología de trombocitos

Los trombocitos maduros de las aves son células nucleadas con forma redonda a ovalada y tamaño inferior al eritrocito. Su citoplasma presenta estructura reticulada, queda poco coloreado o en tonos gris azulado y presenta uno o varios gránulos eosinófilos. El núcleo es alargado y con la cromatina fuertemente agrupada (Jain, 1986). Desempeñan principalmente una función hemostática igual que las plaquetas de mamíferos, además de intervenir en la inmunidad innata gracias sus capacidades fagocíticas tanto de partículas abióticas como bióticas (Bertram, 1998) y son capaces de mostrar cierta capacidad antibacteriana (Carlson *et al.*, 1968; Awadhiya *et al.*, 1980).

Del origen de los trombocitos de las aves se sabe poco ya que no se han descubierto megacariocitos en la médula ósea (Jain, 1986) y las formas inmaduras se identifican en las extensiones de sangre por la mayor basofilia de su citoplasma y una forma celular y nuclear más redondeada.

2.3. BIOQUÍMICA SANGUÍNEA

La bioquímica sanguínea constituye junto a la hematología la base fundamental del diagnóstico laboratorial de las enfermedades. Permite evaluar tanto el estado nutricional como el de salud de los individuos y por tanto forma parte de las medidas empleadas en los programas de conservación de las especies amenazadas.

En las aves se recomienda que el análisis de la bioquímica sanguínea se realice a partir de la fracción plasmática tras la rápida centrifugación de la muestra sanguínea (Lumeij y de Brujine, 1985).

Los principales parámetros bioquímicos de relevancia clínica se clasifican en cuatro categorías en función de su composición y función. Son las enzimas, metabolitos, minerales y las proteínas.

2.3.1. Enzimas

El valor diagnóstico de estas sustancias orgánicas radica principalmente en la especificidad que muestran en su localización tisular. El aumento de su concentración en la circulación sanguínea depende de la integridad de las células donde se encuentran, del nivel de actividad de la molécula, su tasa de salida al plasma así como la velocidad de “aclaramiento” del mismo (Lumeij, 2008).

La medición laboratorial se realiza de manera indirecta basándose en la relación proporcional que se da entre la concentración plasmática y el nivel de actividad que presenta la molécula analizada en condiciones in vitro (Hochleithner, 1994).

Las principales enzimas analizadas en la bioquímica sanguínea aviar son la aspartato aminotransferasa (AST), la creatín kinasa (CK), la alanino aminotransferasa (ALT), la glutamato deshidrogenasa (GLDH), la gammaglutamil transferasa (GGT) y la fosfatasa alcalina (FA).

Aspartato Aminotransferasa, AST

La AST junto a la CK constituyen las enzimas de uso habitual para diagnosticar la enfermedad hepática en las aves (Lumeij, 2008). Se ha detectado actividad de la AST en diferentes tejidos como hígado, músculo esquelético, corazón, cerebro y riñones (Lumeij *et al.*, 1988), aunque su distribución varía entre las diferentes especies de aves estudiadas (Franson *et al.*, 1985). A pesar de su baja especificidad, un aumento de su concentración en sangre suele relacionarse principalmente con una lesión de origen hepático y muscular, constituyendo para la clínica aviar un marcador más sensible y específico que la ALT (Harr, 2002). Ciertos investigadores sin embargo, consideran que la AST únicamente permite identificar las alteraciones hepáticas de naturaleza aguda ya que conforme avanza la cronicidad del proceso, disminuye el número de hepatocitos funcionales lo que genera una concentración de la enzima dentro del rango normal de la especie (Ritchie y Harrison, 1994).

El límite superior establecido en los intervalos de referencia para la mayoría de especies

es de 230 U/L, sin embargo se han documentado valores superiores para el Orden de las Estrigiformes comprendidos entre 104-410 U/L (Ammersbach *et al.*, 2013). En condiciones patológicas se han descrito elevaciones de esta enzima en aves con deficiencias de vitamina E y selenio, así como intoxicadas por pesticidas (Hochleithner, 1994).

La edad y el sexo son variables fisiológicas que pueden influir sobre su concentración; se han encontrado diferencias entre pollos, jóvenes y adultos (Montesinos *et al.*, 1997; Bailey *et al.*, 1999; Villegas *et al.*, 2002). Las diferencias intersexuales han sido confirmadas gracias a los estudios llevados a cabo por Scholtz *et al.*, en 2009 que describen valores superiores en los machos que en las hembras, discrepancia que los autores atribuyen a las diferencias existentes entre sus niveles de actividad fisiológica.

Creatin kinasa, CK

La CK es una enzima de localización reconocida principalmente en músculo esquelético, cardíaco y cerebro que suele presentar un nivel de actividad variable entre especies (Franson *et al.*, 1985). Su valor diagnóstico en la clínica aviar radica en que permite la identificación de las lesiones de origen muscular y constituye junto a la AST una herramienta complementaria para el diagnóstico de la enfermedad hepática. Las Estrigiformes presentan valores superiores a los observados en otras especies, con un intervalo de referencia de 0-3169 U/L (Ammersbach *et al.*, 2013).

Situaciones patológicas en las que se han identificado aumentos de esta enzima son las necrosis e inyecciones musculares, convulsiones, deficiencias de vitamina E y Selenio, neuropatías, toxicidad por plomo y ocasionalmente en episodios de clamidiosis (Hochleithner, 1994).

El estrés y el ejercicio, son situaciones que provocan un incremento de los niveles de la enzima en sangre, junto con el aumento de la enzima AST. Estos incrementos son todavía mayores durante los procedimientos de captura y manejo de las aves silvestres existiendo incluso diferencias en función de la metodología empleada (Franson *et al.*,

2009) y/o el periodo de tiempo transcurrido posterior a la captura (Bailey *et al.*, 1999).

Durante la fase post embrionaria y juvenil de águilas Imperiales y de estorninos también se han observado valores aumentados respecto a las concentraciones detectadas en los adultos. Esta diferencia se atribuye al incremento de la condición corporal producida en este periodo vital (Ferrer *et al.*, 1987; Dobado-Berrios, 1998; Juráni *et al.*, 2004).

Alanina Aminotransferasa, ALT

Se encuentra principalmente en el hígado y el músculo. A pesar de ser una enzima muy útil en la clínica de perro y gato, en las aves sin embargo suele presentar un escaso valor en el diagnóstico de la enfermedad hepática (Harr, 2002), por su baja actividad en el órgano y por su larga vida media en el tejido muscular que puede llevar a una interpretación confusa y a un diagnóstico erróneo. La existencia de hemólisis en la muestra puede provocar una falsa elevación de su concentración (Lumeij, 1996).

En condiciones fisiológicas se ha observado un aumento asociado a la edad del ave (Bailey *et al.*, 1999) así como diferencias intersexuales, con presencia de valores superiores en los machos (Scholtz *et al.*, 2009). En las aves rapaces también se han documentado fluctuaciones en sus valores en función de la estacionalidad e independientemente del estado reproductor (Hochleithner, 1994).

Glutamato Deshidrogenasa, GLDH

Enzima mitocondrial localizada en el interior de los hepatocitos y considerada altamente específica y sensible en el diagnóstico de la enfermedad hepatobiliar de las aves. Su elevación en la circulación plasmática por encima de 5 UI/litros se ha asociado con cuadros de lesiones hepáticas graves con presencia de necrosis, en palomas intoxicadas con etilenglicol (Lumeij *et al.*, 1988).

Gamma Glutamyltransferasa, GGT

Enzima presente en el conducto biliar y en el epitelio renal tubular de las aves. En la actualidad se conoce poco respecto a su valor diagnóstico en relación a la enfermedad hepatobiliar.

En general los valores normales de muchas especies suelen estar comprendidos entre 0-10 U/L (Harr, 2002) y se han observado elevaciones durante episodios de enfermedad hepática y en aves que presentaban carcinoma biliar. Fisiológicamente se ha recogido en la bibliografía diferencias significativas entre los valores de hembras y machos (Scholtz *et al.*, 2009) reflejando un incremento del metabolismo hepático requerido para llevar a cabo la reproducción (Alonso-Álvarez *et al.*, 2002).

Fosfatasa Alcalina, FA

En las aves, la actividad de la fosfatasa alcalina se localiza fundamentalmente en el duodeno y en el riñón. La elevación de su concentración en la sangre se corresponde con un aumento en la síntesis más que con un daño celular.

Esta enzima se encuentra muy relacionada con el metabolismo del calcio y del fósforo y se le asocia con la actividad del sistema óseo, viéndose sujeta a variaciones en función de los diferentes estados fisiológicos por los que atraviesan las aves. Se han documentado aumentos de concentración asociados al crecimiento óseo en ejemplares jóvenes de águila Imperial (Ferrer *et al.*, 1987 y Dobado-Berrios, 1997) y buitres negros (Villegas *et al.*, 2002), en estorninos, durante la fase de desarrollo post embrionario (Juráni *et al.*, 2004); en hembras (Sribhen *et al.*, 2006), durante el periodo reproductor y en adultos que se encontraban realizando la muda (Franson *et al.*, 2009).

Bajo condiciones patológicas se ha documentado un aumento de su concentración durante episodios de enfermedad hepática, en cuadros de hiperparatiroidismo y enteritis, y unido a un aumento de la actividad osteoblástica por trauma, en reparación por osteomielitis y en neoplasias. Por el contrario, en aves alimentadas con dietas deficitarias en zinc se observaron valores disminuidos de FA (Hochleithner, 1994).

Amilasa

Las α amilasas son metaloenzimas calcio dependientes que catalizan carbohidratos complejos. Los órganos principales de síntesis son el páncreas y el duodeno. Su valor diagnóstico en humanos radica en el diagnóstico de pancreatitis aguda. En aves es una enzima poco estudiada y requiere de estudios para su validación.

2.3.2. Metabolitos

Los principales metabolitos analizados en la bioquímica clínica aviar son la glucosa, la urea, el ácido úrico, el colesterol, los triglicéridos, los ácidos biliares y la creatinina.

Glucosa

En las aves, la concentración de glucosa se analiza en muestras de suero o en plasma heparinizado y preferentemente por métodos enzimáticos. En su medición, las condiciones de almacenamiento no son tan relevantes en el resultado como lo son en los pequeños animales ya que los eritrocitos basan su metabolismo energético principalmente sobre los ácidos grasos (Lumeij, 1996).

Las concentraciones sanguíneas basales encontradas en aves se sitúan por encima de los 8.33 mmol/L superando generalmente a los valores observados en mamíferos (Harr, 2002) y presentando gran variabilidad entre las diferentes especies analizadas. Los principales factores que pueden ayudar a explicar esta diversidad son el tamaño del ave, correlacionado con su tasa metabólica (Ferrer *et al.*, 1987 y Dobado-Berrios, 1988) y el tipo de dieta que consumen que en último término desembocan en diferencias inter específicas respecto al metabolismo de la insulina y el glucagón. En general las aves carnívoras presentan intervalos de referencia superiores a los observados en aquellas que se alimentan de frutas y granos y además son capaces de mantener los niveles glucémicos postprandiales durante un periodo de tiempo mayor (Harr, 2002). En las Estrigiformes se ha obtenido un intervalo de referencia de 11.7-25.1 mmol/L

(Ammersbach *et al.*, 2013).

Las principales influencias fisiológicas y ambientales que pueden hacer variar los niveles de glucosa en las aves son la alimentación, dependiente de las condiciones de ayuno y postprandiales, la fase de crecimiento (Casado *et al.*, 2002; Villegas *et al.*, 2002), la estacionalidad (Spagnolo *et al.*, 2006; Artacho *et al.*, 2007), el fotoperiodo (Scope *et al.*, 2005) y el estrés (Scope *et al.*, 2002).

Las condiciones patológicas en las que se ha observado un incremento en la concentración de glucosa se corresponden a los casos de diabetes mellitus y de peritonitis (Woerpel y Roskopf, 1984). Por el contrario, un descenso patológico se ha documentado en episodios de disfunción hepática, septicemias, neoplasias y en aspergilosis (Hochleithner, 1994).

Urea y ácido úrico

Son metabolitos ampliamente utilizados en la clínica aviar ya que ayudan a diferenciar entre la deshidratación, los efectos postprandiales y la enfermedad renal (Harr, 2002).

La concentración de urea suele utilizarse generalmente como un indicador del nivel de hidratación ya que su reabsorción tubular es dependiente del estado hídrico, siendo máxima en las aves deshidratadas y mínima en aquellas que se encuentran en un buen estado de hidratación.

Su valor diagnóstico en la enfermedad renal es poco relevante debido a su escasa concentración sanguínea (Hochleithner, 1994); a pesar de ello, existen investigaciones en las que se ha obtenido una buena correlación entre la concentración de urea sérica y la enfermedad renal (Lumeij, 2008).

El ácido úrico representa el principal producto de desecho nitrogenado en los animales uricotélicos. Su determinación se lleva a cabo por métodos muy específicos y sensibles (Harr, 2002) y tradicionalmente se le considera el marcador bioquímico más utilizado para detectar la alteración renal en las aves (Wimsatt *et al.*, 2009) debido a que sus

niveles no se ven afectados por el estado de hidratación hasta que éste no se deteriora a un nivel extremo. Sin embargo, obtener la obtención de un valor del ácido úrico dentro del intervalo de referencia no asegura totalmente la ausencia de insuficiencia renal, ya que sólo el 50% del riñón se emplea para excretar deshechos proteicos y la hiperuricemia suele aparecer durante las fases finales de la enfermedad, cuando la filtración glomerular desciende más del 70-80% (Harr, 2002). En las Estrigiformes se ha descrito un intervalo de referencia de 175-993 $\mu\text{mol/L}$ (Ammersbach *et al.*, 2013).

La concentración de ácido úrico puede verse influida por diferentes condiciones fisiológicas de las aves como la edad, el sexo, el estado reproductor, el ayuno, la ingesta de alimento y la composición de la dieta (Kolmstetter y Ramsay, 2000), así como el ritmo circadiano y estacional. Por lo que concierne a la edad, en estudios llevados a cabo sobre loros eclectus (*Eclectus roratus*), guacamayos (*Ara spp.*) y cotorras (*Myiopsitta spp.*) los valores obtenidos en los individuos jóvenes fueron inferiores a los de los adultos (Clubb *et al.*, 1990, 1991); sin embargo, la investigación realizada por Casado *et al.*, 2002 en ejemplares de águilas calzadas (*Hieraaetus pennatus*) produjo resultados opuestos.

El sexo y el estado reproductor influyen también como hemos dicho en la concentración de ácido úrico, alcanzando los machos valores mayores al de las hembras (Sribhen *et al.*, 2006) e incrementos en las hembras durante la actividad ovulatoria (Lewandowski *et al.*, 1986) e incubatoria (Alonso-Álvarez *et al.*, 2002).

Respecto a la influencia que ejerce el ayuno, la ingesta de comida y la composición de la dieta sobre este metabolito, se ha observado en cisnes de cuello negro (*Cygnus melanocoryphus*) un descenso de la concentración de ácido úrico en plasma en condiciones de ayuno, reflejando una disminución en el catabolismo proteico que va siendo sustituido por el de las grasas como fuente de energía (Artacho *et al.*, 2007); sin embargo en investigaciones realizadas en otros grupos de aves donde se incluyen las rapaces, se ha documentado un efecto inverso (Ferrer, 1990). Los valores experimentan un incremento tras la alimentación, cuya magnitud difiere en función de la especie investigada (Kolmstetter y Ramsay, 2000); en aves carnívoras como los halcones se han documentado incrementos plasmáticos postprandiales de hasta 18 mg/dl (Lumeij y Remple, 1998).

Las especies que se alimentan de grano y fruta suelen presentar una concentraciones aproximadamente 50% menores que los descritos en aves carnívoras, e intraespecíficamente, el valor de ácido úrico incrementa a medida que aumenta la proporción de proteína en la dieta (Smith *et al.*, 2006).

Las situaciones de hipovitaminosis A, hipervitaminosis D3, las infecciones bacterianas y víricas, las intoxicaciones (drogas nefrotóxicas) y las lesiones tisulares pueden desencadenar el descenso de la tasa de filtración y por tanto una hiperuricemia. Por el contrario la hipouricemia se ha sugerido que puede aparecer en el curso de la enfermedad hepatocelular grave (Hochleithner, 1994).

Procedimientos como la extracción sanguínea realizada a partir del corte de la uña pueden producir la contaminación de la muestra con uratos y aumentar artefactualmente este valor (Lewandowski *et al.*, 1986).

En la actualidad se están investigando otros marcadores más sensibles y menos invasivos como la Creatinina y el N-acetyl- β -D-glucosaminidasa (NAG) para mejorar el diagnóstico de la enfermedad renal en las aves (Wimsatt *et al.*, 2009).

Colesterol

El valor clínico para el diagnóstico de este parámetro en las aves suele ser malo ya que su concentración sanguínea se ve sujeta a numerosas influencias de tipo fisiológico (Hochleithner, 1994). En primer lugar, los valores sanguíneos de colesterol presentan gran variabilidad en función del tipo de dieta que consume el ave; por lo general, las aves carnívoras presentan concentraciones superiores a las encontradas en las aves alimentadas con frutas y semillas (Lewandowski *et al.*, 1986).

El sexo y la reproducción son también variables que influyen sobre los niveles de colesterol. Sribhen *et al.*, (2006) obtuvieron diferencias significativas respecto al sexo en la concentración de colesterol del pollo combatiente (*Gallus gallus*) y describieron valores más elevados en las hembras respecto a los machos. Resultados contrarios se describen sin embargo, en el estudio realizado por Hochleithner, (1989) en periquitos

(Melopsittacus undulatus).

En las aves es conocido que la reproducción supone un gran coste fisiológico traducido en un incremento del metabolismo de las proteínas y de las grasas. En las hembras, los estrógenos liberados durante la fase de ovulación provocan una demanda en la síntesis de las lipoproteínas de muy baja densidad, VLDL dando como resultado un incremento de la concentración de lípidos en sangre (Stevens, 1996). Esta característica ha sido documentada en hembras de gaviota patiamarilla (*Larus michahellis*) y de ganso emperador (*Chen canagica*) en estudios realizados por Alonso-Álvarez *et al.*, (2002) y Franson *et al.*, (2009), respectivamente donde observaron un aumento progresivo en la concentración de colesterol a lo largo del periodo de incubación.

En las aves el colesterol total se determina como la suma de la fracción libre junto a la esterificada y aunque se ha observado que su concentración aumenta en situaciones patológicas de degeneración hepática, hipotiroidismo, obstrucción del conducto biliar y xantomatosis, y disminuye en la enfermedad hepática, aflatoxicosis, endotoxemia por *E. coli* y en spiroquetosis (Harr, 2002).

Triglicéridos

Los triglicéridos son la principal forma de almacenaje de lípidos y la mayor fuente de energía. En aves su valor diagnóstico ha sido poco analizado (Hochleithner, 1994).

En condiciones fisiológicas, la concentración de triglicéridos en sangre puede variar según el clima, la dieta, el sexo, el nivel de ejercicio y por el efecto de ciertas hormonas (Gylstorff y Grimm, 1987). En condiciones patológicas se han observado incrementos de la concentración de triglicéridos en casos de peritonitis por la puesta de huevos e hiperadrenocorticismos (Woerpel y Rosskopf, 1984).

Ácidos biliares (BA)

En las aves, la interpretación en la variación en las concentraciones de ácidos biliares pre

y postprandiales resulta complejo debido a la presencia de la molleja y del divertículo esofágico donde almacenan el alimento y a las variaciones en el tiempo de vaciado existentes entre especies (Harr, 2002).

La determinación puede realizarse por métodos enzimáticos o por radioinmunoensayo (RIA). Los BA son utilizados para valorar la función hepática. Usando métodos enzimáticos, concentraciones de ácidos superiores a 100 $\mu\text{mol/L}$ son considerados anormales y $> 75 \mu\text{mol/L}$ son sospechosos de insuficiencia hepática (Lumeij, 2008). Un descenso de su concentración puede deberse a una alteración en la absorción intestinal (Harr, 2002).

Creatinina

La creatinina sanguínea deriva principalmente del catabolismo de la creatina localizada en el músculo. La excreción de creatinina se realiza únicamente vía renal, donde es filtrada y reabsorbida libremente en los túbulos. En aves, la creatina se excreta en la orina antes de que sea transformada en creatinina (Bell y Freeman, 1971). La excreción urinaria de creatina puede ser una de las razones por la que los valores de creatinina plasmática no es un parámetro exacto para valorar la función renal.

Normalmente la producción de creatinina es relativamente constante y se afectada mínimamente por el catabolismo de las proteínas. Teóricamente, su liberación en sangre depende de la masa muscular, sin embargo no se han observado diferencias entre especies.

En las aves, se han documentado intervalos de referencia comprendidos entre 0.1-0.4 mg/dl (Hochleithner, 1994). No existe información sobre su concentración en Estrigiformes.

Se han producido incrementos en los niveles de creatinina en aves con lesiones renales severas por trauma y drogas nefrotóxicas, así como en peritonitis y septicemias (Lewandowski *et al.*, 1986)

2.3.3. Minerales

Calcio

Para su determinación se utilizan muestras de plasma heparinizado o suero, y frecuentemente se mide el calcio total como resultado de la suma del calcio biológicamente activo unido a proteínas, junto a la proporción que se encuentra quelado a iones. Esta distribución sanguínea obliga a que su interpretación deba realizarse unido al valor obtenido en la concentración de albúmina, ya que sus valores se encuentran frecuentemente relacionados (Lumeij, 2008). En las Estriformes se ha documentado un intervalo de referencia de 1.32-2.85 mmol/L (Ammersbach *et al*, 2013).

Las influencias fisiológicas más relevantes en las aves sobre la concentración de este mineral son el sexo, la fase de crecimiento y la ovulación.

Los niveles de Ca obtenidos en las hembras suelen ser mayores que en los machos (Sribhen *et al.*, 2006), diferencia que se acentúa espectacularmente durante la reproducción, y especialmente en la etapa de formación de los huevos, circunstancia que requiere un gran demanda del mineral obligando a aumentar la tasa de reabsorción enteral y provocando un aumento de la concentración plasmática (Fudge, 2000).

Respecto a las diferencias en la concentración de calcio entre los jóvenes y adultos, existe controversia de resultados obtenidos. Bailey *et al.*, (1999) en ejemplares de sisón moñudo (*Eupodotis ruficrista gindiana*) encontraron en los jóvenes concentraciones inferiores respecto a la determinada en adultos, característica que se asocia a las necesidades de este mineral durante el crecimiento óseo en las primeras etapas de la vida. Sin embargo, en pollos de araos colombinos (*Cephus Columba*) (Seiser *et al.*, 2000) de milanos negros (*Milvus migrans*) y milanos reales (*Milvus milvus*) (Viñuela *et al.*, 1991) y águilas imperiales (*Aquila adalberti*) (Dobado-Berrios and Ferrer, 1998) las concentraciones plasmáticas de calcio tendieron a incrementarse con la edad.

Entre las alteraciones patológicas que disminuyen los niveles de calcio en las aves se encuentran los cuadros convulsivos, el hipoparatiroidismo y el tratamiento con

glucocorticoides. Por el contrario sus valores aumentan en dietas con exceso de vitamina D, en tumores osteolíticos y en episodios de deshidratación (Hochleithner, 1994).

Fósforo

El fósforo tanto orgánico como inorgánico tiene un papel muy importante en el metabolismo de las aves. En las Estriformes se ha documentado un intervalo de referencia de 0.34-2.23 mmol/L (Ammersbach *et al*, 2013).

Se une al calcio para formar hidroxapatita presente en pico y huesos. Juega un papel importante como tampón plasmático y como fuente de energía celular en forma de ATP.

En aves se ha observado un incremento durante la fase de puesta de huevos y durante el crecimiento. Clínicamente se utiliza la ratio calcio: fósforo para el diagnóstico de la enfermedad renal (Harr, 2002).

Magnesio

El magnesio es un macronutriente que ayuda a mantener las funciones nerviosa y muscular normales y conserva los huesos fuertes. El magnesio también interviene en el correcto funcionamiento del corazón y la presión arterial. El magnesio igualmente ayuda al control de los niveles de azúcar en la sangre y ayuda a reforzar el sistema inmunitario.

En condiciones patológicas, un nivel alto de magnesio puede indicar hipoadrenocorticismo, insuficiencia renal crónica, oliguria, deshidratación y acidosis metabólica (Klemm y Klein, 2006).

2.3.4. Electrolitos

Cloro, Potasio y Sodio

El método más común para medir electrolitos en veterinaria es el del electrodo ion específico (ISE). El método ISE es menos sensible a la hemólisis de la muestra que los métodos espectrofotométricos, a excepción del potasio debido a su alta concentración a nivel intracelular.

Las funciones principales de los electrolitos son: el mantenimiento de la presión osmótica, electroneutralidad y distribución del agua (Harr, 2002).

A nivel clínico su valor diagnóstico radica en que, cualquier patología que altere la homeostasis del agua alterará la distribución de los electrolitos y por lo tanto la concentración plasmática.

En las Estrigiformes se han observado intervalos de referencia del sodio de 138-165 mmol/L y de potasio de 1.7-6.6 mmol/L (Ammersbach *et al*, 2013). El intervalo de referencia del cloro en las Estrigiformes no ha sido identificado.

Osmolaridad plasmática

En las aves la osmorregulación se logra gracias a la contribución de los riñones, el tracto intestinal, las glándulas salinas y el aparato respiratorio (Goldstein *et al.*, 2000). La osmolaridad relativa del espacio intra y extracelular determina el volumen de fluido en cada (Kohn y DiBartola, 2000).

El conocimiento de la osmolaridad plasmática es especialmente importante cuando se diseña la fluidoterapia para un paciente (Acierno *et al.*, 2009). En mamíferos la liberación de vasopresina es uno de los mecanismos primarios para el control de la osmolaridad plasmática. En mamíferos la osmolaridad plasmática se obtiene a través de la medición por osmómetros o a partir de cálculos por diferentes fórmulas: osmolaridad plasmática =

$(2 \cdot \text{Na}^+)$, $(2 \cdot \text{Na}^+) + (\text{concentración de glucosa}/18)$ o $(2 \cdot \text{Na}^+) + (\text{concentración de glucosa}/18) + (\text{concentración de BUN}/2.8)$. En aves psitácidas, Acierno *et al.*, (2009) observaron que la fórmula $(2 \cdot \text{Na}^+) + (\text{concentración de glucosa}/18) + (\text{concentración de BUN}/2.8)$ era la que ofrecía los resultados más comparables a los obtenidos por medición mediante osmómetros.

2.3.5. Proteínas

Proteínas totales

Las proteínas plasmáticas son uno de los grupos de moléculas esenciales más importantes para la fisiología animal. Desempeñan funciones altamente especializadas como son el transporte de compuestos endógenos y exógenos poco solubles en agua, la regulación de la presión oncótica y el balance intra y extravascular de agua e intervienen además en la respuesta inflamatoria y en el control de la infección.

La concentración total de proteínas es un parámetro complementario para el diagnóstico de las enfermedades gastrointestinales, hepáticas, renales o de tipo infeccioso. Adicionalmente la determinación de la concentración total de proteínas permite diagnósticos específicos como en gammopatías monoclonales y ayuda al clínico a evaluar la naturaleza, la severidad y el progreso de la enfermedad. En las aves, el método más exacto para su cuantificación es el método Biuret (Lumeij y McLean, 1996).

La concentración total de proteínas plasmáticas en aves está comprendida entre 30-55 g/L, cantidad sustancialmente más baja a la que presentan los mamíferos (Rosenthal, 2000). En Estrigiformes se han observado intervalos de referencia de proteínas totales de 30-48 g/L (Ammersbach *et al*, 2013).

Fibrinógeno

El fibrinógeno es una proteína sintetizada y almacenada en el hígado e interviene en la fase final de la coagulación sanguínea donde es transformada en fibrina. Patologías de tipo inflamatorio, supurativo, traumático y neoplásico pueden aumentar su concentración plasmática en humanos y animales de compañía (Schalm's, 2010). Los niveles se encuentran disminuidos en fallos hepáticos terminales (Harr, 2002). Hawkey *et al.*, (1984) concluyeron que la estimación de su concentración unida al recuento de heterófilos es test válido en aves para detectar infecciones.

El método de precipitación por calor (Millar *et al.*, 1971) es el más utilizado. En clínica aviar se considera que los valores obtenidos por este método son menos exactos que los obtenidos para mamíferos ya que las aves, en comparación a los mamíferos, tienen cantidades mayores de componentes refráctiles tales como glucosa y lípidos que incrementarán el error de este método. Por ello, el valor que se obtiene se considera una estimación y no una medida real (Harr, 2002).

Electroforesis de proteínas plasmáticas

Las cinco fracciones principales en las aves son la prealbúmina, albúmina y las α , β y γ globulinas.

La prealbúmina no está presente en todos los grupos de animales. Hasta ahora sus únicas funciones conocidas son el transporte de hormonas tiroideas y del complejo retinol-vitamina A (Lumeij, 2008). Su concentración varía muy marcadamente entre las diferentes especies de aves analizadas, llegando a representar un porcentaje del 10 al 75% de la concentración total de albúmina (Tatum *et al.*, 2000).

La albúmina de las aves presenta las mismas funciones que en mamíferos. Es la proteína más abundante representando un 40-50% del total del plasma. Su concentración oscila entre 8 – 32 g/l (Cray *et al.*, 2007).

Las globulinas se clasifican en proteínas de fase aguda (α y β globulinas) y en

inmunoglobulinas (γ globulinas).

Las α globulinas son un grupo diverso constituido por proteínas transportadoras como la macroglobulina, la haptoglobulina, las lipoproteínas y la ceruloplasmina entre otras. Son sintetizadas casi exclusivamente por el hígado. En aves se divide en las fracciones α -1 y α -2 y en condiciones de salud suelen representar un 4-8% de la concentración total de proteínas.

Las β globulinas también son un grupo heterogéneo que se compone de lipoproteínas, transferrina, proteína C reactiva, complemento, ferritina y fibrinógeno. En el proteinograma de las aves sólo existe 1 fracción de β globulina cuyos valores normales oscilan entre 10-20% de la concentración total de proteínas.

Las γ globulinas son las inmunoglobulinas Ig A, Ig E, Ig D, IgG, Ig M. Intervienen en la respuesta inmune antígeno – anticuerpo y suelen representar aproximadamente un 10% de la concentración total de proteínas (Tatum *et al.*, 2000).

El proteinograma de las rapaces se caracteriza por presentar una baja e ilegible fracción de prealbúmina, una gran amplitud de las fracciones de fase aguda α y β globulinas y una fracción γ generalmente similar a la observada en las Psitácidas. Estas diferencias en las concentraciones de proteínas plasmáticas respecto a otros órdenes de aves resultan consecuentemente en una disminución del ratio albúmina/globulinas (Tatum *et al.*, 2000).

En Estrigiformes se han descrito intervalos de referencia de albúmina y globulinas de 21-47 g/L y 0-22 g/L respectivamente (Ammersbach *et al.*, 2013).

Objetivos

Los objetivos que persigue la presente tesis doctoral son:

1. Obtener los valores hematológicos de referencia de cinco especies de Estrigiformes Ibéricas y valorar la influencia de la edad sobre ellos.
2. Obtener los valores de referencia de diferentes parámetros de la bioquímica sanguínea de cinco especies de Estrigiformes Ibéricas y valorar el efecto de la edad sobre ellos.
3. Comparar dos métodos de recuento leucocitario en aves: un método semi-directo basado en el colorante eosinofílico de las tinciones rápidas tipo Romanowsky con el método directo de recuento leucocitario utilizando la solución de Natt y Herrick como diluyente.

Estudios

STUDY I

Hematologic Reference Intervals and Age

Effect in Iberian Strigiformes

ABSTRACT

The clinical importance of hematological testing in avian veterinary medicine is reflected in the increasing numbers of studies leading to the identification of hematological reference intervals of Strigiformes and other species. To conduct a proper clinical interpretation of hematologic values, a set of characteristic health values is required and the influence of the environmental and physiological factors should be understood. Studies of other avian groups have shown that the age significantly influences producing detectable changes in clinical parameters. The objective of this study was to determine baseline data of hematologic parameters of five species of Iberian Strigiformes in different age classes. 341 nocturnal birds of preys were sampled from wildlife health centers in Spain inclusive of 92 Tawny Owls (63 chicks; 15 juveniles 14 adults), 88 Little Owls (44 chicks; 33 juveniles; 11 adults), 96 Scops Owls (56 chicks; 25 juveniles; 15 adults), 17 Long-eared Owls (7 chicks; 10 juveniles) and 48 Barn Owls (34 chicks; 9 juveniles; 5 adults). A common trend between age classes compared was observed in the 5 species. No differences were observed between juveniles and adults in any parameter. In addition, the packed cell volume, red blood cell count and hemoglobin of chicks were significantly lower than juveniles and adults and the total WBC was significantly higher. Our findings provide evidence that data from chicks of this species were identified as unique group compared to older cohorts; therefore, two hematologic reference intervals by age have been defined.

INTRODUCTION

In the Strigiforme order two families has been recognized, the barn owls (Tytonidae) and the typical owls (Strigidae). Over 200 species are distributed among approximately 27 genera. Owls are found world-wide, covering nearly all types of terrestrial habitats (Mikkola, 1983).

Strigiformes comprise a large percentage of rehabilitated wild birds in wildlife rehabilitation centers. The eventual aims of many of these programs are designed to rehabilitate individual raptors and to breed endangered species with the goal to release them into their original environment (Molina-López *et al.*, 2014).

Hematologic analysis in birds, as in mammals, is the most frequent test for diagnostic workup and treatment of the individuals before release. It is even a more useful diagnostic tool in birds than in other vertebrate mammals as the former show few overt clinical signs of disease (Artacho *et al.*, 2007). Therefore the availability for clinicians of hematologic reference intervals (RIs) of as many wild birds as possible is important, but they do not always meet the recommended RI guidelines (Friedrichs *et al.*, 2012).

Several studies have been published in the past on the normal hematologic values of birds of prey mainly for diurnal raptors of the falconiformes (falcons) and accipitriformes (hawks, eagles) orders (Fudge, 2000). Nevertheless data regarding normal values in nocturnal raptors are scarce. In fact, only a few studies have been published for the Strigiforme order (Cooper, 1976; Smith y Bush, 1978; Spagnolo *et al.*, 2008; Chan *et al.*, 2012; Ammersbach *et al.*, 2013; Szavo *et al.*, 2014; Ammersbach *et al.*, 2015). Strigiformes are not related to other birds of prey and have completely different lifestyle and some physiological peculiarities. Thus group-specific reference intervals are needed to increase the value of blood tests and their interpretation (Ammersbach *et al.*, 2015).

The hematologic values are influenced by many pre-analytic factors (Cray, 2015). Studies of other avian groups have shown that the age of the animals significantly influences hematology producing detectable changes in clinical parameters (Schalm's, 2010).

In this report we present hematology RIs for five species of Iberian Strigiformes: Tawny Owl (*Strix aluco*), Little Owl (*Athene noctua*), Scops Owl (*Otus scops*), Long-eared Owl (*Asio otus*) and Barn Owl (*Tyto alba*) grouped by ages from two wildlife rehabilitation centers of Catalonia in North-eastern Spain. To our knowledge no values have been published to date for Little Owl and Scops Owl. These values provide a valuable data base for hematology of nocturnal birds of prey and may help veterinarians and rehabilitators in disease surveillance, diagnosis of clinical illnesses and conditions and determination of population health.

MATERIALS AND METHODS

Birds

The study was conducted between 2010 and 2012. Blood samples were collected from 341 nocturnal birds of prey of five different Strigiformes species, 92 Tawny Owls (63 chicks; 15 juveniles; 14 adults), 88 Little Owls (44 chicks; 33 juveniles; 11 adults), 96 Scops Owls (56 chicks; 25 juveniles; 15 adults), 17 Long-eared Owls (7 chicks; 10 juveniles), and 48 Barn Owls (34 chicks; 9 juveniles; 5 adults). No adults of Long-eared Owls were sampled.

All birds were wildlife animals, temporarily under human care for rehabilitation at the Torreferrusa and Vallcalent in North-east of Spain (3° 19' -0 ° E y 42° 51' -40 31N). 13 of 32 Barn Owls chicks were born in captivity from a breeding program. The age of the birds was determined according to the feather characteristics. Chicks were birds with downy plumage. Juveniles were birds without downy plumage and were born in the breeding season of that calendar year. Adults were birds with unknown birth date who were born before the current calendar year. The gender was not determined due to absence of sexual dimorphism.

At the admission, chicks, juveniles and adults were placed in individual cages located indoors. Healthy birds were moved to the outdoor aviaries where they would free forage. Flight rooms varied from 3 x 3 x 2 to 10 x 4 x 3 meter aviaries with top and sides covered by wire netting and weather protected sites and wooden perches included. Owls of the same species were housed in the same flight room until release.

The diet of the birds was rats, mice, quail and one-day-old chickens. Chicks were hand fed with whole rat meat shredded until the time that the bird would self-feed could forage.

The animals included in the study were selected by the health state, which was supported by the information obtained in the clinical history and the physical examination, and the results of complementary laboratory tests including blood parasites. The bird was considered infected when it had one parasite per 100 red blood cells and if so it was discarded for this study (Phalen *et al.*, 1995). Any animal with signs of disease, unhealed injuries, anorexia, or weight loss was excluded from the study.

During the physical examination, as measures of growth, the animals were weighted with a bascule (TB-413A, Denver Instrument, NY, USA) and the tarsus were measured with Vernier Caliper 150x0.05 mm (ECO, Metrica, Spain). Any measurement was taken of Long eared Owls and juveniles of Tawny Owl.

Blood samples collection

Sampling was done at the same hour (9.00 a. m to 11:00 a. m) to reduce diurnal variation in blood parameters and always at least 8-12 h after last feeding. Chicks were captured by hand and juveniles and adults were captured with nets.

Birds were physically restrained and blood was collected from the right jugular vein using disposable with 25- gauge needles and 1 ml plastic syringes. Blood was placed into microtainer tubes (Becton-Dickinson and Co, FranklinLakes, NC, USA) containing EDTA-K3 as anticoagulant (1.5 mg/ml blood). An air-dried smear was made for the differential white blood cell count and leucocyte morphology. The samples were kept in a cooler box

at approximately 0-4°C temperature until their arrival at the laboratory, and were analyzed in the first 24 hours.

Laboratory analyses

Packed cell volume (PCV) was determined by the microhematocrit centrifugation standard method (12,000 rpm for 5 minutes) with a microhematocrit reader (Hawksley & Sons Ltd, Sussex, UK). Red blood cell (RBC) count and white blood cell (WBC) count were calculated using the direct hemocytometer count method with Natt and Herrick solution (Natt and Herrick, 1952).

Hemoglobin (HGB) concentration was measured spectrophotometrically using the semi-automated hematology analyser Sysmex F-800 (Técnicas Médicas, MAB S. A. Barcelona, Spain) using the supernatant of a previously completed hemolyzed blood sample which was centrifuged before evaluation to remove the free nuclei (as they interfere with the spectrophotometric measurement of haemoglobin in avian blood samples).

The Wintrobe Indices (MCV, MCHC, and MHC) were calculated manually by using the standard formulas. The leukocyte differential count was performed by the routine microscopic procedure in a Wright-stained blood smear (Merck, Darmstadt, Germany). A count of 200 leukocytes was performed directly by microscopic examination under X100 magnification. Cells were observed and classified as heterophil, eosinophil, basophil, lymphocyte and monocyte. As thrombocyte count (TBC) is difficult to determine because these cells tend to clump, an estimate was obtained from the blood film using the same formula for the estimation of total leukocyte count (Campbell and Ellis, 2007). However, in Scops Owl and Long-eared Owl it was not possible to do these estimates due to the high degree of clumping.

Statistical analyses

Descriptive statistical (mean, median, standard deviation, minimum and maximum) and RIs with 90% confidence interval (CI) for the upper and lower limits were performed using the freeware program Reference Value Advisor (Geffré *et al.*, 2009) National Veterinary School, Toulouse, France; available at: <http://www.biostat.envt.fr/spip.php>. in accordance with the American Society of Veterinary Clinical Pathology (AVCP) guidelines (Flatland *et al.*, 2010; Friedrichs *et al.*, 2012).

To explore the influence of age on haematological parameters of the five avian species studied we eliminated outliers, defined by a box plot, as values above the upper quartile + 33 X the inner quartile range or below the lower quartile – 33 X the inner quartile range. Data distribution was tested with the Kolmogorov-Smirnov test. Statistical comparisons between age groups were performed using the Kruskal-Wallis for nonparametrical data and ANOVA for parametrical data. The exploration of the differences of the means between age classes was made with a Test T of two tails. Values of $P < 0.01$ were considered significant.

We use R program (R version 3.2.1 development core team, 2015). R foundation for statistical computing, Vienna, Austria. <http://www.R-project.org/>.

RESULTS

The descriptive statistics and the RI with 90% CI of PCV, RBC, HGB, MCV, MCHC, MCH, WBC count, WBC differential and TBC count of Tawny Owl, Little Owl, Scops Owl, Long-eared Owl and Barn Owl by age are shown in Tables 1 – 5. Differences between age classes were concentrated on chicks. No difference was observed in hematological parameters between juveniles and adults, and their values were grouped into one category (one-way ANOVA. $p < 0.01$). In the five species studied, PCV, RBC and HGB of chicks were significantly lower than juveniles and adults. The WBC count in Tawny Owl, Little Owl, Long eared Owl and Scops Owl were significantly higher in chicks than

juveniles and adults (Test T of two tails, $p < 0.01$). In Barn Owl no differences in WBC count were detected.

Significantly different variables between chicks and young and adults groups in the five species studied regarding the age factor included heterophils in Little Owl and Scops Owl and lymphocytes in Tawny Owl, Little Owl and Long-eared Owl.

The mean, standard deviation and range of weight (g) and length of tarsus (mm) by specie and age are shown in Table 6. In Tawny Owl, Little Owl and Barn Owl the values of PCV, RBC and HGB stabilized when individuals reached juvenile age. At this age, the tarsus length was the same of adult. Scops Owl individuals, however, did not follow this trend as no differences were observed in the weight or tarsus length between age groups.

Table 1. Hematology descriptive statistics and reference intervals (RIs/) for Tawny Owl by age.

Variable	Units	Descriptive statistics					Reference Interval with 90% CI		Reference Value Advisor		
		Mean	Median	SD	Minimum	Maximum	Lower limit (RI)	Upper limit (RI)	n	Distribution	Method
Chicks											
PCV*	L/L	0.31	0.31	0.03	0.24	0.39	0.26 (0.25-0.27)	0.37 (0.36-0.38)	61	NG	RT
RBC*	x10 ¹² /L	1.64	1.58	0.33	1.12	2.58	0.93 (0.83-1.05)	2.31 (2.17-2.45)	63	G	R
HGB*	g/L	107.72	105.50	14.17	85.00	138.00	77.48 (72.96-81.88)	135.50 (129.30-141.68)	58	G	R
MCV*	fL	198.37	192.83	37.53	142.86	283.94	118.52 (107.38-129.92)	271.61 (253.56-286.26)	63	G	R
MCHC	g/L	33.57	32.69	3.12	27.03	42.33	26.24 (25.21-27.67)	39.34 (37.70-40.98)	55	G	R
MCH	pg	67.10	65.49	10.77	48.16	90.71	44.04 (38.82-47.90)	88.16 (82.77-92.92)	56	G	R
WBC*	x10 ⁹ /L	16.25	15.18	4.76	7.15	29.48	8.26 (7.42-9.37)	27.33 (25.00-30.05)	61	NG	RT
Heterophils	%	27.55	24.50	10.59	13.00	53.50	4.22 (0.26-7.92)	48.68 (42.79-53.05)	63	G	R
Lymphocytes*	x10 ⁹ /L	4.25	3.77	1.74	0.93	8.70	0.36 (0.00-1.08)	7.65 (6.80-8.34)	60	G	R
	%	56.51	58.50	11.95	28.90	79.40	32.33 (28.91-36.48)	81.25 (77.61-85.63)	63	G	R
Monocytes	x10 ⁹ /L	9.10	8.59	3.10	2.99	16.02	2.64 (1.66-3.59)	15.32 (13.91-16.33)	61	G	R
	%	2.18	1.50	2.03	0.00	6.70	0.00 (0.00-0.00)	6.06 (4.99-6.88)	59	G	R
Eosinophils*	x10 ⁹ /L	0.32	0.21	0.30	0.00	1.13	0.00 (0.00-0.00)	0.97 (0.78-1.13)	58	NG	RT
	%	10.30	10.00	4.28	3.00	21.00	2.94 (2.33-3.99)	19.64 (17.87-21.59)	62	NG	RT
Basophils	x10 ⁹ /L	1.67	1.58	0.77	0.35	3.54	0.01 (0.00-0.28)	3.15 (2.84-3.47)	61	G	R
	%	2.55	2.50	1.63	0.00	7.00	0.00 (0.00-0.00)	5.70 (5.10-6.38)	62	G	R
H/L	x10 ⁹ /L	0.41	0.35	0.28	0.00	1.14	0.00 (0.00-0.00)	0.95 (0.82-1.06)	63	G	R
		0.50	0.40	0.30	0.20	1.20	0.00 (0.00-0.00)	1.00 (0.90-1.10)	60	NG	R
Thrombocytes	x10 ⁹ /L	10.64	10.50	3.86	1.40	17.50	2.56 (0.00-0.00)	19.31 (0.00-0.00)	18	G	R

* Values significantly different between chicks and juveniles/adults (P<0.01). CI indicates confidence interval; RI reference interval; n sample size; G Gaussian distribution; NG no Gaussian distribution; R robust method; RT robust method after Box- Cox transformation.

Table 1. Continued.

Variable	Units	Descriptive statistics					Reference Interval with 90% CI		Reference Value Advisor		
		Mean	Median	SD	Minimum	Maximum	Lower limit (RI)	Upper limit (RI)	n	Distribution	Method
Youngs / Adults											
PCV	L/L	0.39	0.38	0.03	0.34	0.46	0.32 (0.30-0.33)	0.45 (0.43-0.47)	28	G	R
RBC	x10 ¹² /L	2.34	2.37	0.36	1.42	3.13	1.59 (1.39-1.83)	3.09 (2.86-3.31)	28	G	R
HGB	g/L	121.96	122.00	10.95	101.00	140.00	99.05 (93.73-105.02)	145.04 (139.40-150.57)	28	G	R
MCV	fL	170.57	158.76	30.21	124.60	239.44	99.99 (83.33-116.22)	235.89 (209.29-254.62)	28	G	R
MCHC	g/L	32.16	32.00	1.39	30.26	35.14	29.08 (28.50-29.74)	34.96 (34.03-35.80)	28	G	R
MCH	pg	53.94	50.70	9.91	38.52	76.76	30.34 (24.52-36.03)	73.97 (66.02-80.35)	28	NG	RT
WBC	x10 ⁹ /L	10.17	10.01	2.87	6.38	16.72	3.93 (2.59-5.11)	15.96 (14.00-17.77)	28	G	R
Heterophils	%	28.65	28.00	13.27	7.00	52.00	0.52 (0.00-7.69)	56.54 (48.63-63.36)	27	G	R
	x10 ⁹ /L	2.98	2.64	1.66	0.49	6.80	0.00 (0.00-0.20)	6.48 (5.44-7.46)	27	G	R
Lymphocytes	%	56.32	58.00	14.08	30.96	84.50	26.54 (19.14-34.79)	86.07 (77.89-92.58)	27	NG	RT
	x10 ⁹ /L	5.65	4.96	1.95	2.18	9.96	0.70 (0.00-2.07)	9.35 (7.99-10.66)	27	G	R
Monocytes	%	5.12	5.00	3.41	0.00	12.00	0.00 (0.00-0.00)	12.06 (9.82-14.15)	27	G	R
	x10 ⁹ /L	0.45	0.34	0.34	0.00	1.16	0.00 (0.00-0.00)	1.17 (0.87-1.40)	24	G	R
Eosinophils	%	6.97	7.50	3.86	1.33	17.00	0.00 (0.00-0.73)	14.85 (12.73-17.34)	27	G	R
	x10 ⁹ /L	0.71	0.63	0.44	0.12	1.67	0.00 (0.00-0.00)	1.60 (1.28-1.88)	27	G	R
Basophils	%	2.55	2.25	1.24	1.00	5.00	0.00 (0.00-0.41)	5.15 (4.31-5.83)	26	G	R
	x10 ⁹ /L	0.24	0.23	0.11	0.09	0.48	0.00 (0.00-0.04)	0.47 (0.39-0.54)	25	G	R
H/L		0.60	0.44	0.44	0.10	1.65	0.10 (0.04-0.13)	2.13 (1.37-2.87)	26	NG	RT
Thrombocytes	x10 ⁹ /L	10.46	9.80	3.30	5.60	17.50	2.68 (0.00-0.00)	17.31 (0.00-0.00)	18	G	R

CI indicates confidence interval; RI reference interval; n sample size; G Gaussian distribution; NG no Gaussian distribution; R robust method; RT robust method after Box- Cox transformation.

Table 2. Hematology descriptive statistics and reference intervals (RIs) for Little Owl by age.

Variable	Units	Descriptive statistics					Reference Interval with 90% CI		Reference Value Advisor		
		Mean	Median	SD	Minimum	Maximum	Lower limit (RI)	Upper limit (RI)	n	Distribution	Method
Chicks											
PCV*	L/L	0.39	0.38	0.04	0.30	0.47	0.31 (0.30-0.33)	0.46 (0.44-0.48)	44	G	R
RBC*	x10 ¹² /L	2.36	2.37	0.35	1.66	3.12	1.64 (1.50-1.83)	3.09 (2.96-3.23)	43	G	R
HGB*	g/L	114.78	115.00	11.36	92.00	140.00	91.63 (86.61-97.39)	138.45 (133.10-143.60)	36	G	R
MCV	fL	163.53	164.00	16.99	134.75	203.56	127.89 (121.16-134.75)	197.57 (189.65-205.60)	41	G	R
MCHC*	g/L	28.96	29.05	1.83	24.21	32.11	25.37 (24.36-26.41)	32.93 (31.96-33.85)	35	G	R
MCH	pg	47.02	47.26	5.52	32.95	58.06	35.33 (31.95-38.34)	58.16 (55.26-60.81)	35	NG	RT
WBC*	x10 ⁹ /L	20.54	21.34	6.36	9.46	36.30	7.12 (4.84-10.29)	33.32 (30.46-35.62)	43	G	R
Heterophils*	%	29.44	27.33	10.69	10.75	55.50	6.10 (0.61-10.90)	50.68 (44.58-56.17)	43	G	R
Lymphocytes*	x10 ⁹ /L	6.57	5.13	4.33	2.22	17.85	2.36 (2.14-2.68)	23.01 (14.65-36.36)	42	NG	RT
	%	44.45	47.00	13.03	15.25	64.25	19.57 (12.93-27.21)	73.81 (68.32-81.47)	44	G	R
Monocytes	x10 ⁹ /L	8.99	8.21	3.48	4.22	17.67	1.49 (0.07-2.89)	16.06 (14.33-17.39)	44	G	R
	%	2.31	1.75	2.11	0.00	7.25	0.00 (0.00-0.00)	6.29 (5.01-7.55)	44	G	R
Eosinophils*	x10 ⁹ /L	0.45	0.28	0.40	0.00	1.39	0.00 (0.00-0.00)	1.28 (1.01-1.44)	44	G	R
	%	21.10	21.00	6.73	7.75	37.00	7.09 (4.40-10.18)	34.65 (31.54-37.73)	42	G	R
Basophils	x10 ⁹ /L	4.18	4.21	2.27	0.10	8.35	0.00 (0.00-0.38)	8.78 (7.61-9.74)	44	G	R
	%	1.30	1.50	0.71	0.00	2.75	00.00 (0.00-0.20)	2.80 (2.50-3.10)	43	G	R
H/L	x10 ⁹ /L	0.25	0.27	0.16	0.00	0.59	0.00 (0.00-0.00)	0.57 (0.50-0.64)	40	G	R
		0.80	0.60	0.50	0.20	1.80	0.20 (0.16-0.25)	1.60 (1.37-1.98)	40	NG	RT
Thrombocytes	x10 ⁹ /L	13.70	14.18	5.37	1.75	26.60	2.42 (0.06-5.36)	24.68 (21.63-27.26)	34	G	R

* Values significantly different between chickens and juveniles/adults (P<0.01). CI indicates confidence interval; RI reference interval; n sample size; G Gaussian distribution; NG no Gaussian distribution; R robust method; RT robust method after Box- Cox transformation.

Table 2. Continued.

Variable	Units	Descriptive statistics					Reference Interval with 90% CI		Reference Value Advisor		
		Mean	Median	SD	Minimum	Maximum	Lower limit (RI)	Upper limit (RI)	n	Distribution	Method
Youngs / Adults											
PCV	L/L	0.44	0.44	0.04	0.35	0.53	0.35 (0.33-0.37)	0.52 (0.50-0.54)	43	G	R
RBC	x10 ¹² /L	2.70	2.68	0.38	2.01	3.67	1.99 (1.85- 2.12)	3.53 (3.34-3.72)	44	G	R
HGB	g/L	136.76	136.00	10.53	123.00	155.00	113.80 (107.26-119.47)	159.31 (151.93-165.70)	21	G	R
MCV	fL	161.17	163.27	19.96	119.89	206.73	120.35 (112.14-130.52)	202.71 (194.27-211.65)	40	G	R
MCHC	g/L	31.06	31.25	1.79	27.71	33.95	27.37 (26.25-28.63)	35.08 (34.00-35.82)	21	G	R
MCH	pg	49.47	49.80	7.03	37.13	62.02	34.17 (30.15-39.10)	64.52 (59.83-68.79)	20	G	R
WBC	x10 ⁹ /L	12.20	12.32	3.15	5.72	19.36	5.39 (4.50-6.96)	18.31 (16.92-19.99)	41	G	R
Heterophils	%	25.77	24.38	9.81	9.50	48.80	4.20 (0.10-9.25)	45.32 (39.21-51.47)	32	G	R
Lymphocytes	x10 ⁹ /L	3.00	3.05	1.31	0.00	4.92	0.29 (0.00-0.99)	5.76 (5.13-6.39)	31	G	R
	%	50.22	52.75	10.02	27.75	66.5	29.68 (25.20-36.31)	72.54 (67.46-77.55)	33	G	R
Monocytes	x10 ⁹ /L	6.44	6.07	2.25	2.52	12.54	1.39 (0.31 -2.68)	10.78 (9.51-12.02)	35	G	R
	%	2.68	2.25	1.72	0.00	6.75	0.00 (0.00-0.00)	6.07 (4.90-7.10)	34	NG	RT
Eosinophils	x10 ⁹ /L	0.24	0.23	0.11	0.00	0.45	0.00 (0.00-0.06)	0.48 (0.41-0.54)	27	G	R
	%	18.66	18.25	6.31	7.25	31.50	5.50 (2.81-8.34)	31.66 (28.20-34.56)	35	G	R
Basophils	x10 ⁹ /L	2.62	2.40	1.25	0.53	4.99	0.00 (0.00-0.52)	5.21 (4.54-5.77)	35	G	R
	%	1.77	1.50	1.12	0.00	4.00	0.00 (0.00-0.00)	4.03 (3.23-4.66)	33	NG	RT
H/L	x10 ⁹ /L	0.22	0.22	0.13	0.00	0.48	0.00 (0.00-0.01)	0.48 (0.41-0.54)	32	G	R
Thrombocytes	x10 ⁹ /L	0.48	0.42	0.21	0.15	0.91	0.01 (0.00-0.11)	0.93(0.76-1.03)	29	G	R
		14.08	13.65	3.41	7.35	21.35	5.98 (4.27-8.69)	22.63 (17.97-23.68)	20	NG	RT

CI indicates confidence interval; RI reference interval; n sample size; G Gaussian distribution; NG no Gaussian distribution; R robust method; RT robust method after Box- Cox transformation.

Table 3. Hematology descriptive statistics and reference intervals (RIs) for Scops Owl by age.

Variable	Units	Descriptive statistics					Reference Interval with 90% CI		Reference Value Advisor		
		Mean	Median	SD	Minimum	Maximum	Lower limit (RI)	Upper limit (RI)	n	Distribution	Method
Chicks											
PCV*	L/L	0.38	0.37	0.04	0.32	0.49	0.29 (0.28-0.31)	0.45 (0.43-0.47)	56	G	R
RBC*	x10 ¹² /L	2.44	2.45	0.33	1.70	3.30	1.76 (1.65-1.91)	3.11 (2.97-3.26)	51	G	R
HGB*	g/L	112.89	112.00	10.53	96.00	141.00	90.76 (86.99-94.49)	133.59 (129.57-137.81)	55	G	R
MCV	fL	154.10	149.38	26.24	108.43	224.60	95.63 (86.43-106.94)	203.65 (190.66-217.58)	53	G	R
MCHC	g/L	29.66	29.87	1.97	25.15	34.72	25.71 (25.06-26.66)	33.74 (33.01-34.57)	56	G	R
MCH	pg	45.55	44.81	7.20	31.76	63.10	33.71 (32.34-35.40)	63.26 (57.83-68.78)	53	NG	RT
WBC*	x10 ⁹ /L	21.95	21.12	6.89	8.58	37.40	7.80 (5.52-10.29)	35.97 (33.23-38.46)	55	G	R
Heterophils*	%	32.49	29.50	11.95	13.50	59.50	6.57 (2.54-11.60)	56.79 (50.73-62.04)	47	G	R
	x10 ⁹ /L	6.85	6.18	3.28	1.93	14.11	0.00 (0.00-1.08)	13.53 (11.79-15.04)	45	NG	RT
Lymphocytes	%	38.5	35.50	12.18	18.00	64.50	10.59 (6.30-15.44)	61.71 (54.80-68.50)	47	G	R
	x10 ⁹ /L	7.74	8.03	2.84	0.00	14.62	1.95 (0.86-3.28)	13.59 (12.40-14.81)	45	G	R
Monocytes	%	0.87	0.50	0.93	0.00	3.50	0.00	3.43	45	NG	NP
	x10 ⁹ /L	0.12	0.09	0.14	0.00	0.58	0.00	0.57	42	NG	NP
Eosinophils	%	11.38	10.00	9.43	0.00	32.50	0.00 (0.00-0.00)	30.26 (25.44-34.26)	44	G	R
	x10 ⁹ /L	2.07	1.73	1.98	0.00	6.98	0.00 (0.00-0.00)	5.82 (4.68-6.96)	44	G	R
Basophils*	%	1.44	1.50	0.86	0.00	3.00	0.00 (0.00-0.00)	3.16 (2.80-3.50)	41	G	R
	x10 ⁹ /L	0.28	0.28	0.21	0.00	0.83	0.00 (0.00-0.00)	0.70 (0.59-0.80)	42	G	R
H/L		0.90	0.90	0.50	0.20	2.20	0.19 (0.14-0.27)	2.15 (1.83-2.53)	44	NG	RT

* Values significantly different between chickens and juveniles/adults (P<0.01). CI indicates confidence interval; RI reference interval; n sample size; G Gaussian distribution; NG no Gaussian distribution; R robust method; RT robust method after Box- Cox transformation.

Table 3. Continued.

Variable	Units	Descriptive statistics					Reference Interval with 90% CI		Reference Value Advisor		
		Mean	Median	SD	Minimum	Maximum	Lower limit (RI)	Upper limit (RI)	n	Distribution	Method
Youngs / Adults											
PCV	L/L	0.42	0.42	0.04	0.33	0.49	0.34 (0.32-0.36)	0.50(0.49-0.52)	40	G	R
RBC	x10 ¹² /L	2.79	2.83	0.50	1.63	3.68	1.82 (1.58-2.08)	3.88 (3.67-4.10)	40	G	R
HGB	g/L	127.75	126.00	15.48	101.00	161.00	91.68 (84.93-103.00)	158.57 (146.77-171.41)	20	G	R
MCV	fL	155.15	147.80	28.69	124.29	251.53	124.34	250.70	40	NG	NP
MCHC	g/L	31.62	31.63	2.93	25.58	39.27	25.56 (23.56-28.03)	37.92 (35.01-39.98)	20	G	R
MCH	pg	46.87	45.60	6.28	38.60	62.65	29.36 (23.60-35.86)	63 (56.02-70.2)	20	G	R
WBC	x10 ⁹ /L	15.34	14.30	5.67	4.40	29.48	3.00 (0.38-5.75)	26.69 (23.44-29.61)	38	G	R
Heterophils	%	34.47	31.50	14.65	14.05	67.50	1.19 (0.00-8.92)	64.27 (52.09-73.34)	25	G	R
	x10 ⁹ /L	6.35	5.21	3.68	1.11	14.85	1.21 (0.79-2.05)	16.96 (12.46-21.56)	25	NG	RT
Lymphocytes	%	43.52	41.05	10.76	27.00	68.00	19.63 (13.14-25.32)	66.31 (58.96-72.97)	25	G	R
	x10 ⁹ /L	7.95	7.60	3.61	2.52	17.12	0.04 (0.00-1.84)	15.35 (12.56-17.51)	25	G	R
Monocytes	%	1.75	0.66	2.53	0.00	10.00	0.00	6.61	25	G	R
	x10 ⁹ /L	0.30	0.15	0.40	0.00	1.72	0.00 (0.00-0.00)	1.03 (0.60-1.44)	25	NG	RT
Eosinophils	%	18.05	18.50	9.49	1.00	35.5	0.00 (0.00-3.38)	38.12 (32.09-43.16)	25	G	R
	x10 ⁹ /L	2.63	2.42	1.61	0.16	6.18	0.00 (0.00-0.04)	6.02 (4.87-7.02)	22	G	R
Basophils	%	1.55	1.00	1.36	0.00	5.00	0.00 (0.00-0.10)	2.70 (2.18-3.12)	25	G	R
	x10 ⁹ /L	0.16	0.72	0.09	0.00	0.33	0.00 (0.00-0.04)	0.35 (0.29-0.40)	20	G	R
H/L		0.91	0.77	0.60	0.24	2.50	0.17 (0.15-0.23)	2.47 (1.82-3.23)	25	NG	RT

CI indicates confidence interval; RI reference interval; n sample size; G Gaussian distribution; NG no Gaussian distribution; R robust method; RT robust method after Box- Cox transformation.

Table 4. Hematology individual values of Long-eared Owl by age.

		Chicks	Youngs
PCV*	L/L	0.35, 0.39, 0.39, 0.41, 0.4, 0.37, 0.38	0.40, 0.42, 0.40, 0.45, 0.38, 0.44, 0.45, 0.45, 0.49
RBC*	$\times 10^{12}/L$	2.81, 2.57, 2.54, 2.31, 2.45, 2.42, 2.43	2.82, 3.02, 2.57, 2.97, 2.79, 3.76, 3.34, 2.95, 3.45, 3.38
HGB	g/L	118.00	133.00, 159.00, 127.00, 127.00, 144.00, 148.00, 146.00, 139.00
MCV	fL	124.56, 151.75, 153.85, 177.49, 163.60. 152.89	156.70, 141.84, 139.30, 155.64, 151.52, 136.20, 117.02, 134.73, 149.15, 130.43, 144.97
MCHC	g/L	33.71	33.25, 31.75, 28.22, 32.73, 32.89, 33.18, 30.89
MCH	pg	41.99	47.16, 52.74, 49.42, 42.76, 38.30, 44.31, 49.49, 40.29
WBC*	$\times 10^9/L$	14.19, 17.49, 16.28, 11.22, 19.90, 17.10, 10.45	9.46, 11.44, 7.59, 11.99, 16.06, 10.01, 16.94, 7.95, 14.40, 14.96
Heterophils	%	30.00, 34.00, 46.00, 32.00, 25.00, 47.00, 25.00, 39.00, 25.00	30.00, 50.00, 32.00, 42.00, 55.00, 51.00, 60.00, 15.00
	$\times 10^9/L$	4.19, 5.95, 7.45, 3.62, 7.99, 6.71, 3.11	5.69, 2.41, 5.07, 8.83, 5.06, 10.12, 1.31, 10.47
Lymphocytes*	%	46.00, 41.00, 35.00, 44.00, 28.00, 40.00, 51.00	34.00, 50.00, 40.00, 34.00, 37.00, 30.00, 56.00, 23.00
	$\times 10^9/L$	5.53, 7.13, 5.74, 4.94, 4.77, 6.97, 5.38	3.92, 3.80, 4.80, 5.54, 3.73, 5.08, 4.50, 3.62
Monocytes	%	2.00, 3.00, 0.50, 6.00, 2.00, 3.00, 2.00	3.00, 6.00, 8.00, 6.00, 3.00, 8.00, 3.00, 4.00
	$\times 10^9/L$	0.21, 0.23, 0.08, 0.72, 0.3, 0.43, 0.16	0.37, 0.46, 0.90, 0.88, 0.28, 1.31, 0.20, 0.62
Eosinophils*	%	20.00, 19.00, 16.00, 15.00, 20.00, 15.00, 15.00	12.00, 9.00, 3.00, 7.00, 3.00, 20.00, 1.00
	$\times 10^9/L$	2.84, 3.45, 2.69, 1.68, 3.42, 2.61, 1.62	1.37, 0.76, 1.05, 0.40, 0.68, 0.42, 1.55
Basophils	%	3.00, 2.00, 2.00, 2.00, 2.00	1.00, 2.00, 2.00, 3.00, 3.00, 0.00, 5.00, 4.00
	$\times 10^9/L$	0.43, 0.53, 0.33, 0.27, 0.42, 0.39, 0.18	0.09, 0.17, 0.18, 0.4, 0.27, 0, 0.4, 0.58
H/L		0.64, 0.83, 1.3, 0.73, 1.67, 0.96, 0.58	1.45, 0.64, 1.06, 1.59, 1.35, 1.99, 0.29, 2.89

* Values significantly different between chickens and juveniles ($P < 0.01$).

Table 5. Hematology descriptive statistics and reference intervals (RIs) for Barn Owl by age.

Variable	Units	Descriptive statistics					Reference Interval with 90% CI		Reference Value Advisor		
		Mean	Median	SD	Minimum	Maximum	Lower limit (RI)	Upper limit (RI)	n	Distribution	Method
Chicks											
PCV*	L/L	0.32	0.31	0.05	0.22	0.42	0.21 (0.19-0.24)	0.40 (0.38-0.44)	34	G	R
RBC*	x10 ¹² /L	1.95	2.01	0.37	1.14	2.73	1.19 (1.01-1.40)	2.75 (2.56-2.93)	34	G	R
HGB*	g/L	92.00	86.50	16.66	61.00	130.00	53.66 (43.24-64.42)	127.95 (111.41-137.35)	24	G	R
MCV	fL	165.48	164.41	23.83	129.46	213.68	115.48 (105.72-126.95)	214.46 (202.06-225.31)	34	G	R
MCHC	g/L	29.09	28.33	2.50	24.29	33.89	23.32 (22.05-24.87)	34.38 (32.37-35.95)	24	G	R
MCH	pg	48.17	48.17	5.74	35.75	57.43	36.28 (32.88-40.28)	60.70 (57.63-64.41)	23	G	R
WBC	x10 ⁹ /L	19.79	20.46	5.33	8.36	31.02	8.71 (6.18-11.93)	31.02 (28.35-34.62)	33	G	R
Heterophils	%	42.61	42.42	14.81	18.75	71.00	10.63 (2.47-17.32)	72.16 (63.17-80.78)	32	G	R
	x10 ⁹ /L	8.53	7.47	3.85	2.15	16.82	0.00 (0.00-1.08)	15.54 (13.26-18.62)	32	NG	RT
Lymphocytes	%	26.02	26.75	7.32	10.00	44.71	10.76 (6.13-15.22)	41.28 (37.03-44.86)	31	G	R
	x10 ⁹ /L	5.37	5.33	2.09	1.14	10.16	0.92 (0.00-1.99)	9.59 (8.55-10.81)	31	G	R
Monocytes	%	0.65	0.50	0.55	0.00	2.00	0.00 (0.00-0.00)	1.68 (1.35-2.13)	29	G	R
	x10 ⁹ /L	0.14	0.11	0.14	0.00	0.57	0.00 (0.00-0.00)	0.69 (0.50-0.89)	30	NG	RT
Eosinophils	%	28.91	32.00	11.19	4.00	48.00	1.61 (0.00-13.37)	50.47 (45.24-54.78)	29	NG	RT
	x10 ⁹ /L	5.66	5.32	3.39	0.00	13.00	0.00 (0.00-0.00)	12.62 (10.87-14.33)	32	G	R
Basophils	%	1.60	1.50	1.07	0.00	4.25	0.00 (0.00-0.00)	3.72 (3.04-4.38)	31	G	R
	x10 ⁹ /L	0.30	0.25	0.19	0.00	0.79	0.00 (0.00-0.00)	0.69 (0.56-0.81)	30	G	R
H/L		1.70	1.50	0.80	0.70	3.30	0.00 (0.00-0.32)	3.38 (2.83-3.76)	29	NG	RT
Thrombocytes	x10 ⁹ /L	17.82	18.03	4.73	9.45	24.85	6.86	28.76	12	G	R

* Values significantly different between chickens and juveniles/adults (P<0.01). CI indicates confidence interval; RI reference interval; n sample size; G Gaussian distribution; NG no Gaussian distribution; R robust method; RT robust method after Box- Cox transformation.

Table 5. Continued.

Youngs / Adults

Variable	Units	Individual values
PCV	L/L	0.39, 0.44, 0.34, 0.40, 0.42, 0.47, 0.43, 0.41, 0.43, 0.37, 0.38, 0.43, 0.36
RBC	$\times 10^{12}/L$	1.76, 2.77, 2.44, 2.23, 2.95, 2.77, 2.65, 2.70, 2.61, 1.95, 2.43, 2.26, 1.82
HGB	g/L	107.00, 129.00, 104.00, 123.00, 133.00, 147.00, 141.00, 130.00, 125.00, 112.00, 121.00, 131.00, 121
MCV	fL	221.59, 158.84, 139.34, 179.78, 142.13, 169.68, 162.57, 151.85, 165.07, 189.74, 158.38, 190.69, 197.80
MCHC	g/L	27.44, 29.32, 30.59, 30.75, 31.67, 31.28, 32.79, 31.71, 29.07, 30.27, 31.84, 30.47, 30.56
MCH	pg	60.80, 46.57, 42.62, 55.28, 45.01, 53.07, 53.31, 48.15, 47.98, 57.44, 49.79, 58.08, 60.44
WBC	$\times 10^9/L$	22.99, 13.20, 6.16, 17.93, 17.93, 11.00, 21.45, 19.91, 30.36, 27.72, 10.01, 7.22, 17.05
Heterophils	%	47.00, 28.66, 49.50, 45.25, 37.50, 51.00, 46.50, 58.75, 71.25, 45.00, 52.45
	$\times 10^9/L$	10.81, 3.78, 8.88, 8.14, 4.13, 10.94, 9.26, 17.84, 4.45, 3.72, 7.67
Lymphocytes	%	48.50, 20.25, 33.00, 41.50, 40.00, 43.25, 30.00, 16.00, 39.00, 29.5, 33.00
	$\times 10^9/L$	3.63, 5.92, 4.57, 8.58, 8.61, 9.03, 4.37, 3.90, 2.13, 5.63
Monocytes	%	1.50, 2.00, 1.75, 3.00, 0.75, 0.50, 0.50, 1.00
	$\times 10^9/L$	268.95, 358.62, 0, 348.43, 207.90, 50.05, 36.10, 170.5
Eosinophils	%	0.00, 17.75, 9.50, 8.00, 5.00, 6.50, 10.00, 14.00, 13.00, 20.5
	$\times 10^9/L$	0.00, 3.18, 1.04, 1.72, 0.99, 1.97, 2.77, 1.40, 0.94, 3.49
Basophils	%	0.75, 1.25, 0.10, 3.25, 2.00, 2.25, 1.50, 3.00, 0.50
	$\times 10^9/L$	0.13, 0.22, 0, 0.21, 0.65, 0.61, 0.62, 0.15, 0.22, 0.09
Thrombocytes	$\times 10^9/L$	10.85, 18.55, 14.70, 18.85
H/L		2.44, 1.37, 0.9, 1.28, 1.08, 1.97, 1.14, 1.75, 1.36

CI indicates confidence interval; RI reference interval; n sample size; G Gaussian distribution; NG no Gaussian distribution; R robust method; RT robust method after Box- Cox transformation.

Table 6. Mean, SD and range of weight (g) and length of tarsus (mm) for 4 species of Strigiformes by specie and age.

		Chicks			Juveniles			Adults		
		n	Mean ± SD	Range	n	Mean ± SD	Range	n	Mean ± SD	Range
Tawny Owl	weight*	55	330.00 ± 51.00	210.00-500.00				12	426.00 ± 44.00	365.00-490.00
	tarsus*	54	5.51 ± 0.62	3.80-6.64				12	6.26 ± 0.15	5.90-6.50
Little Owl	weight*	34	129 ± 10	100.00-145.00	25	148.00 ± 19.00	115.00-200.00	7	142.00 ± 14.00	130.00-170.00
	tarsus*	34	4.05 ± 0.26	3.50-4.50	25	4.33 ± 0.16	4.00-4.60	7	4.36 ± 0.30	3.90-4.80
Scops Owl	weight*	50	89.00 ± 9.00	70.00-110.00	11	88.82 ± 12.94	70.00-115.00	14	87.00 ± 8.00	75.00-100.00
	tarsus*	50	3.05 ± 0.16	2.70-3.40	11	3.07 ± 0.15	2.80-3.30	14	3.11 ± 0.13	2.90-3.30
Barn Owl	weight	14	281.00 ± 88.00	150.00-440.00	8	285.00 ± 31.00	240.00-335.00	5	319.00 ± 67.00	265.00-410.00
	tarsus*	14	6.14 ± 1.05	4.10-7.50	8	7.34 ± 0.43	6.70-8.00	5	7.44 ± 0.35	6.90-7.80

*Values significantly different between chicks and juveniles/adults (P<0.05).

DISCUSSION

Reference intervals

Hematological RIs are needed to evaluate the health status in human and animal medicine. Literature regarding hematological data from raptorial birds is limited and published hematologic values of nocturnal raptors are rare. RIs generation should be a systematic process, with recognition of reference population definition, sample handling, method standardization, and the use of valid statistical methods (Cray, 2015). Differences in hematologic references ranges of the same species have been documented (Szabo *et al.*, 2014). Factors that may explain these results include variation in gender, nutrition, season environmental conditions and methods (Cray, 2015).

The main objective of this study was to determine baseline data of hematologic parameters of five species of Iberian Strigiformes in different age classes. This information is essential for the diagnosis of diseases at wildlife rehabilitation centers, where an increasing number of these species are assisted.

In general, the concentrations of the hematologic parameters in these owls species were within RIs documented for the order of Strigiformes by Ammersbach *et al.*, in 2013. In this study, the authors gather the hematologic values of eleven species of owls. The hematology results for adults of Tawny Owl and Barn Owl measured in our work were compared with those obtained by Cooper, (1976); Smith and Bush, (1978); Hawkey *et al.*, (1984); Spagnolo *et al.*, (2008); Szavo *et al.*, (2014) and Ammersbach *et al.*, (2015). Long-eared Owl's hematologic values for chicks and juvenile individuals obtained in our work have been compared with results from animals of different ages (Ammersbach *et al.*, 2015). Our values of PCV, RBC and HGB were similar to those described by these authors; nevertheless, WBC count and WBC differential were different.

In Tawny Owl, Little Owl, Scops Owl, Long-eared Owl, and Barn Owl the PCV, RBC and HGB increased with age. This variation is similar to those reported in other species of birds (Hawkey *et al.*, 1984; Montesinos *et al.*, 1997; Lanzarot *et al.*, 2001; Howlett *et al.*, 2002; Villegas *et al.*, 2002; Gayathri *et al.*, 2004; Haefele *et al.*, 2005; Moreira dos Santos

et al., 2009; Jones *et al.*, 2014;). RBC is an index of the oxygen transfer capacity of the blood. In adults, low values are considered a sign of anemia by illness and poor nutritional state (Artacho *et al.*, 2007; Campbell and Ellis, 2007). In chicks, lower values of PCV, RBC and HGB are considered physiologic and the increased with age is suggested this may be a compensatory mechanism to the increasing oxygen demands at flight time (Montesinos *et al.*, 1997; Lanzarot *et al.*, 2001).

Due to variety of methodologic limitations with automated techniques, complete and differential avian WBC counts must be obtained by manual methods. Manual CBCs are associated with a significantly variability in birds and mammals with an imprecision of 20-40% (Dein *et al.*, 1994; Lundorff and Kjelgaard-Hansen, 2006) and this imprecision precludes a good agreement between techniques (Vap *et al.*, 2012). In our study we employed the direct technique of Natt and Herrick for WBC counting while Ammersbach *et al.*, 2015 used the phloxine method.

Chicks of Tawny Owl, Little Owl and Scops Owl had significantly higher WBC counts compared to young and adults. This age-related variation is similar to reports for other species (Clubbs *et al.*, 1991; Karesh *et al.*, 1997; Montesinos *et al.*, 1997; Jones *et al.*, 2014;). There are a number of factors to take into account when interpreting high leucocyte values in birds in general, including stress from capture, caging and social interactions, diet, environmental conditions, molt, sex, disease, temperature, growth rate and season (Jones *et al.*, 2014). Two reasons have been proposed for the increase of WBC in chicks. First, it has been suggested that chicks have a more responsive immune system (Karesh *et al.*, 1997) and second, the differences in WBC are due to higher stress sensitiveness in chicks than juveniles/adults (Dickens and Romero, 2010).

In Barn Owl, there were no differences in WBC count between chicks and juveniles/adults. The absence of differences may be due to a decrease in the stress sensitiveness in chicks by captivity adaptation as many of these chicks were born in captivity from a breeding program.

Total analytical imprecision (random error) of WBC differential is composed of various sources of variation, with the most important being statistical sampling error (CV

sampling), inconsistent cell classification (CV classification) and inconsistent sample preparation (CV preparation). Hematologic studies of dogs and cats have shown that for differential counts obtained on 200 cells, the CV sampling alone exceeds the CV max for all cell types, except for neutrophils (Kjelgaard-Hansen, 2006). Thus, this imprecision could be an important reason of variability in the WBC count and WBC differential between studies.

Heterophil was the predominant leukocyte in Barn Owl and Long-eared Owl. Other species were primarily lymphocytic (Tawny Owl, Little Owl and Scops Owl) in agreement with previous report (Joseph, 1999). In our study Tawny Owl was a far more lymphocytic species (mean of H:L=0.6) than that described in the study of Spagnolo *et al.*, (2008) (mean of H:L=1.05). Conditions that affect heterophil and lymphocyte numbers are species, age, inflammatory/infectious diseases, and stress (Campbell and Ellis, 2007). Any combination of conditions in which the bird lives may act as stressors as handling, temperature variation, changes in the social hierarchy, injections, fear, and noise. In the past all kinds of stressors were believed to produce a stereotyped response that has been formulated as the “general adaptation syndrome” (Selye, 1936). However it has been shown that some stimuli differ in the response they evoke (Mitchell *et al.*, 1992). Therefore a possible explanation for this reversal in H/L ratio may be due to differences on the severity, type, and length of stressful events experienced by animals in both studies.

Studies that examined the effect of age on other species of different birds concluded that there are age-related changes in the leucocyte differential count (Hawkey *et al.*, 1984; Montesinos *et al.*, 1997; Gayathri *et al.*, 2004; Haefele *et al.*, 2005; Moreira dos Santos *et al.*, 2009; Jones *et al.*, 2014), but there are many differences between species in the variation of leukocyte types (Howlett *et al.*, 2002). Our results show that the WBC differential do not follow a single common trend in function of age in Strigiformes, but its effect can't be excluded completely because it's could have been masked by the imprecision of the manual methodology (Kjelgaard-Hansen *et al.*, 2006) and others factors as sex and body size. Moreira dos Santos *et al.*, in 2007 observed in Ring-necked Pheasant (*Phasianus colchicus*) a variety of blood parameters showed statistically significant age and sex related differences. The amount of variation in the hematologic

parameters attributable to sex and age interaction didn't measure in this study.

Results of H:L ratio in our study for Long-eared Owl (chicks H:L=0.96; juveniles, H:L=1.41) disagree with those obtained with animals of different ages (H:L=1.8) (Ammersbach *et al.*, 2015). An explanation to this could be a transition from a differential WBC count that is primarily lymphocytic to one heterophilic as has been reported in several species of psittacine birds during maturation (Foldenauer *et al.*, 2007); however, this hypothesis should be treated cautiously given the low number of individuals included in both studies.

Regarding the moment when of PCV, RBC and HGB values of chicks are stabilized, it has been related with the end of the growth (Dujowich *et al.*, 2005). Our results in Tawny Owl, Little Owl and Barn Owl are in concordance with this statement; PCV, RBC and HGB values were stabilized when the animals reached the size adult (Table 6). Scops Owl, however, did not follow this trend.

To our knowledge, this is the first study of hematologic reference values for Little Owl, Scops Owl and Long-eared Owl under comparable conditions and determined by the same and specified methods and provide information to the rare data available for Tawny owl and Barn Owl. Significant differences were found for the hematologic parameters between age classes ($P < 0.01$). Therefore, two hematologic reference intervals by age have been presented. Although data reported here may not be entirely representative of those expected for free-ranging Strigiformes because of differences in diet and captivity stress, they may be useful in assessing physical condition of these raptors species at rehabilitation centers and breeding facilities and in making accurate healthcare decisions for nocturnal raptors.

STUDY II

Plasma Biochemistry Reference Intervals and Age Effect in Iberian Strigiformes

ABSTRACT

The blood biochemistry and the hematology are the fundamental basis of laboratory diagnosis of diseases. In Strigiformes there is sparse information about the reference values and the relationship with different pre-analytic factors. The age is an influential factor on biochemistry especially in the first time of life when the most rapid growth rate or increase in body mass occurs. The objective of this study was to determine baseline data of 29 blood biochemistry parameters of five species of Iberian Strigiformes in different age classes. 276 nocturnal birds of preys were sampled from wildlife health centers: 76 Tawny Owls (48 chicks; 15 juveniles 13 adults), 76 Little Owls (48 chicks; 15 juveniles; 13 adults), 74 Scops Owls (46 chicks; 14 juveniles; 14 adults), 8 Long-eared Owls (8 chicks) and 42 Barn Owls (29 chicks; 8 juveniles; 5 adults). Non adults and juveniles of Long-eared Owl were sampled. Only the RI of cholesterol, albumin and osmolality did not show inter-specific variability. A common trend between age classes compared was observed in the 5 species. Alkaline phosphatase, calcium and phosphorus concentrations declined with increasing age of the animals. In the species of Strigidae family sodium and the gamma globulins increased. The others biochemical parameters varied between the age classes considered. Differences were concentrated on chicks and no differences were observed between juveniles and adults in any parameter. Our results evidenced the importance of considering age classes for the establishment of biochemical reference intervals in this species and two biochemical reference intervals by age have been defined.

INTRODUCTION

In the Iberian Peninsula, the Strigiforme order is represented by 8 different species. Their presence in humanized environments expose them to numerous threats as poaching young birds, road accidents, poisonings and collisions with power structures, making them regular patients at centres for wildlife recovery (Molina-López *et al.*, 2014). The analysis of blood biochemistry in birds is clinically important because it provides an evaluation of the nutritional and health status and it is the basis of laboratory diagnosis of disease in addition to hematology. Additionally, in the field of wildlife conservation, studying blood biochemistry can provide clues to help identify the main dangers of human non-human cause potentially affecting natural populations (Low *et al.*, 2006; Padilla *et al.*, 2013).

Despite the many studies over the last years about blood biochemistry in avian wildlife species, few investigations have focused on species of the Strigiforme order (Franson *et al.*, 1985; Hernández, 1991; Tatum *et al.*, 2000; Spagnolo *et al.*, 2008; Chan *et al.*, 2012; Ammersbach *et al.*, 2013; Ammersbach *et al.*, 2015;).

There is sparse information about the reference values and the relationship with different physiological states of the life cycle of the bird. The age is a biological factor that influences on blood biochemistry, especially in the first time of life when the most rapid growth rate or increase in body mass occurs. Growth is a complex process involving numerous interactions among the endocrine regulatory system and others contributing (genetic, nutritional and environmental) factors (Sturkie's, 1976). The establishment of the biochemistry reference intervals of other avian species have shown that the age of the animals significantly influences producing detectable changes in blood biochemistry parameters (Viñuela *et al.*, 1991; Wyk *et al.*, 1998; Haebele *et al.*, 2005).

The aims of this study were to obtain the reference intervals of 29 biochemical parameters of five species of Iberian Strigiformes: Tawny Owl (*Strix aluco*), Little Owl (*Athene noctua*), Scops Owl (*Otus scops*), Long-eared Owl (*Asio otus*) and Barn Owl (*Tyto alba*) in different age classes from two wildlife rehabilitation centers of Catalonia in

North-eastern Spain.

MATERIAL AND METHODS

Birds

The study was conducted between 2010 and 2012. We collected blood samples used for analysis from 276 nocturnal birds of prey of five different Strigiformes species: 76 Tawny Owls (48 chicks; 15 juveniles 13 adults), 76 Little Owls (48 chicks; 15 juveniles; 13 adults), 74 Scops Owls (46 chicks; 14 juveniles; 14 adults), 8 Long-eared Owls (8 chicks) and 42 Barn Owls (29 chicks; 8 juveniles; 5 adults). Non adults and juveniles of Long-eared Owl were sampled.

All birds were wildlife animals and were temporarily under human care for rehabilitation at the Torreferrusa and Vallcalent in North-east of Spain ($3^{\circ} 19' - 0^{\circ} E$ y $42^{\circ} 51' - 40 31N$). 13 of 29 Barn Owls chicks were born in captivity from a breeding program. The age of the birds was determined according to the feather characteristics. Chicks were birds with downy plumage. Juveniles were birds without downy plumage and were born in the breeding season of that calendar year. Adults were birds with unknown birth date who were born before the current calendar year. The gender was not determined due to absence of sexual dimorphism.

At the admission chicks, juveniles and adults birds were placed in individual cages located indoors. Healthy birds were moved to the outdoor aviaries where they free feeding. Flight room varied from 3 x 3 x 2 to 10 x 4 x 3 meters aviaries with top and sides covered by wire netting and weather protected sites and wooden perches included. Owls of the same species were housed in the same flight room until release.

The diet of the birds was rats, mice, quail and one-day-old chickens. Chicks were hand fed with whole rat meat shredded until the time that the bird would self-feed could forage.

The animals included in the study were selected by the health state, which was supported by the information obtained in the clinical history and the physical examination, the display of normal behaviour of the species, and to the results of complementary laboratory tests including blood parasites. The bird was considered infected when it had one parasite per 100 red blood cells and it was discarded for this study (Phalen *et al.*, 1995). Any animal with signs of disease, unhealed injuries and anorexia or weight loss was excluded from the study.

Blood samples collection

Sampling was done at the same hour (9.00 a. m to 11:00 a. m) to reduce diurnal variation in blood parameters and always at least 8-12 h after last feeding.

Chicks were captured by hand and juveniles and adults were captured with nets. Birds were physically restrained and blood was collected from the right jugular vein using disposable with 25- gauge needles and 1 ml plastic syringes. The blood was placed into microtainer tubes (Becton-Dickinson and Co. Franklin Lakes, NY, USA) containing lithium heparin (1.8 mg/ml blood) as anticoagulant. Into first two hours, plasma samples were obtained by centrifuging the blood (1000 rpm for 10 minutes) and were immediately frozen at -70 °C. All were free of hemolysis and lipemia.

Laboratory analyses

Plasma was used for biochemical analyses on an Olympus AU400 analyser (Olympus. Mainz. Germany) including ion-selective electrodes. The following analytes were measured: Aspartate aminotransferase (AST), Creatine kinase (CK), Uric Acid, Glucose, Urea, Triglycerides, Glutamate dehydrogenase (GLDH), Alkaline Phosphatase (ALKP), Total Bile Acids, Alanine aminotransferase (ALT), Calcium (Ca), Phosphorus (P), Amylase (AMY), Gamma glutamyltransferase (GGT), Creatinine, Cholesterol, Magnesium (Mg), Sodium (Na), Potassium (K), Chloride (Cl). All reagents were obtained from the analyzer

manufacturer (Olympus System Reagent; Olympus. Dublin. Ireland); the test principles are listed in Table 1.

Table 1. Analytic methods for clinical biochemical analytes measured in Tawny Owl, Little Owl, Scops Owl, Long-eared Owl and Barn Owl.

PARAMETER	METHOD
Aspartate aminotransferase	Enzymatic and colorimetric method without addition of pyridoxal phosphate, tris (hydroxymethyl) aminomethane buffer. Aspartate concentration > 100 Mm.
Creatine kinase	Enzymatic and colorimetric method.
Uric Acid	UV method with N-acetylcysteine activator. Uricasa / PAP.
Glucose	Hexokinase.
Urea	Urease with glutamate dehydrogenase
Triglycerides	enzymatic of glycerol phosphate oxidase
Glutamate dehydrogenase	Recommended by the Deutsche Gesellschaft für Klinische Chemie. (α -oxoglutarate + NADH + NH ₄ → glutamate + NAD ⁺ + H ₂ O).
Alkaline Phosphatase	Recommended by the IFCC with 4-nitrofenilfosfat with buffer AMP.
Total Bile Acids	Amonia Enzymatic UV, Randox, Ardmore, United Kingdom.
Alanine aminotransferase	Enzymatic and colorimetric method, without addition of pyridoxal phosphate, tris (hydroxymethyl) aminomethane buffer, alanine concentration > 225 Mm.
Calcium	Arsenazo III.
Phosphorus	Molybdate.
Amylase	Colorimetric method, with addition of etilidè-G ₇ PNP.
Gamma glutamyltransferase	Recommended by the IFCC (with gamma-glutamil-3-carboxi-4-nitroanilida amb concentració > 4 mmol/L).
Creatinine	Jaffé.
Cholesterol	Cholesterol esterase enzymatic / POD.
Magnesium	Colorimetric with direct blue xilidil.
Sodium, Potassium and Chloride	Ion-specific electrode. Diluted.

Plasma protein electrophoresis was performed using cellulose acetate membranes (Cellogel ectrophoresis Co., Milan, Italy) and 0.04 M sodium veronal buffer (pH 8.6; ATOM, Barcelone, Spain) in an electrophoresis chamber (BioSystems Reagents & Instruments, Barcelone, Spain) connected to an electrophoresis power supply BTS-100

(BioSystems Reagents & Instruments). The electrophoretic separation was run for 35 min at 200V at room temperature. The membranes were stained with a solution of Amidoblack (Cellogel electrophoresis Co.). Electrophoretograms were scanned on a BioSystems BTS-245 densitometer (BioSystems Reagents & instruments) at 570 nm. The fractions determined were prealbumin, albumin, α -globulins (α -1 and α -2 were considered as a single fraction), β -globulins, and γ -globulins.

Fibrinogen was determined by heat precipitation method (Millar *et al.*, 1971). Plasma osmolality was determined by the equation $2 \times (\text{Na}^+ + \text{K}^+) + (\text{uric acid concentration}/16.8) + (\text{glucose concentration}/18)$ (Acierno *et al.*, 2009).

Statistical analyses

Descriptive statistical (mean, median, standard deviation, minimum and maximum) and RIs with 90% confidence interval (CI) for the upper and lower limits were performed using the freeware program Reference Value Advisor (Geffré *et al.*, 2009) National Veterinary School, Toulouse, France; available at: <http://www.biostat.envt.fr/spip.php>. in accordance with the American Society of Veterinary Clinical Pathology (AVCP) guidelines (Flatland *et al.*, 2010; Friedrichs *et al.*, 2012).

To explore the age variation of Tawny Owl, Little Owl, Scops Owl and Barn Owl we eliminated outliers, defined by a box plot, as values above the upper quartile + 33 X the inner quartile range or below the lower quartile – 33 X the inner quartile range. Data distribution was tested with the Kolmogorov-Smirnov test. The statistical comparison between age classes was made using the Kruskal-Wallis to nonparametrical dates and ANOVA to parametrical dates. Statistical values of $p < 0.01$ were considered to be significant. The exploration of the differences of the means between age classes was made with a Test T of two tails. R program (R version 3.2.1 development core team, 2015. R foundation for statistical computing. Vienna. Austria. <http://www.R-project.org/>) was used for statistical analysis.

RESULTS

In some cases, the amount of plasma recovered was insufficient for analysing all chemical variables. Therefore, samples sizes differed for the different chemistries. Statistically significant differences between the four species investigated were found in total values. Only the reference intervals of cholesterol, osmolarity and albumin did not show interspecific variability. The descriptive statistics (mean, median, standard deviation, minimum and maximum) and reference intervals (RI) for the 90% confidence interval (CI) for the upper and lower limits of the cholesterol, osmolarity and albumin concentration for Iberian Strigiformes are presented in Table 2. Descriptive statistical (mean, median, standard deviation, minimum and maximum) and reference intervals (RI) with 90% confidence interval (CI) of upper and lower limits of Tawny Owl, Little Owl, Scops Owl, Long-eared Owl and Barn Owl in different age classes with the comparison between them (one-way ANOVA. $p < 0.01$) are shown in Tables 3-7. Differences between age classes were concentrated on chicks. In addition, no differences were observed between juveniles and adults in any parameter and their values were grouped into one category. Of all parameters analysed only alkaline phosphatase, calcium, phosphorus showed differences in all species. In the species of Strigidae family (Tawny Owl, Little Owl and Scops Owl) sodium and the gamma globulins increased. The others biochemical parameters varied between the age classes considered (Test T of two tails, $p < 0.01$). In Tawny Owl concentrations of triglycerides creatinine, magnesium, chlorine, and total protein were lower in chicks while that of GGT and potassium was higher. In Little Owl CK, prealbumin and potassium were higher in chicks. In Scops Owl AST, ALT, amylase, GLDH, chloride, total protein, prealbumin, albumin and β - globulins were lower in chicks and GGT was higher than young and adults.

Finally in Barn Owl, only AST was lower in chicks.

Table 2. Descriptive statistics and reference intervals (RIs) of Cholesterol, Osmolarity and Albumin for the Iberian Strigiformes.

Variable	Units	Descriptive statistics					Reference Interval with 90% CI		Reference Value Advisor		
		Mean	Median	SD	Minimum	Maximum	Lower limit (RI)	Upper limit (RI)	n	Distribution	Method
Cholesterol	mmol/L	8.78	8.54	1.81	4.60	13.22	5.01 (4.64-5.33)	12.23 (11.80-12.72)	207	NG	RT
Osmolarity	mosm/Kg	324.52	324.11	7.11	307.73	341.78	310.35 (309.08-311.64)	338.5 (337.14-340.08)	209	G	R
Albumin	g/L	16.38	16.35	2.09	11.10	21.40	12.26 (11.91-12.62)	20.05 (20.12-20.86)	242	G	R

CI indicates confidence interval; RI, reference interval; n, sample size; G, Gaussian distribution; NG, no Gaussian distribution; R, robust method; RT, robust method after Box-Cox transformation.

Table 3. Blood biochemistry descriptive statistics and reference intervals (RIs) for Tawny owl by age.

Variable	Units	Descriptive statistics					Reference Interval with 90% CI		Reference Value Advisor		
		Mean	Median	SD	Minimum	Maximum	Lower limit (RI)	Upper limit (RI)	n	Distribution	Method
Chicks											
AST	U/L	235.3	236.00	24.90	191.00	297.00	183.28 (174.05 - 194.39)	285.32 (274.15 - 297.45)	41	G	R
CK	U/L	731.00	699.30	320.30	271.70	1549.2	46.52 (0 - 176.06)	1356.51 (1198.81 - 1511.72)	48	G	R
Uric acid	µmol/L	628.11	616.21	229.59	148.70	1127.15	148.70 (65.43 - 243.87)	1088.48 (975.47 - 1183.65)	47	G	R
Glucose	mmol/L	19.90	20.21	1.10	17.48	22.38	17.60 (17.21 - 18.22)	22.28 (21.75 - 22.71)	47	G	R
Urea	mmol/L	3.96	3.99	1.36	1.49	6.39	3.30 (1.98-4.73)	18.81 (17.04-20.01)	48	G	R
Tryglicerides *	mmol/L	1.17	1.18	0.57	0.29	2.40	0.00 (0.00-0.16)	2.29 (2.03-2.56)	47	G	R
GLDH	U/L	5.40	4.90	2.20	2.00	12.70	2.22 (1.96-2.55)	10.91 (9.35-12.7)	44	NG	RT
ALKP *	U/L	655.50	646.50	143.40	238.50	1063.40	370.01 (316.13-442.55)	946.72 (858.34-1048.98)	47	NG	RT
Bile Acid	µmol/L	23.40	23.10	8.70	4.60	44.10	5.56 (2.08-37.47)	41.14 (9.43-44.49)	45	G	R
ALT	U/L	69.10	67.50	16.00	31.00	104.00	34.21 (27-41.34)	99.8 (91.71-108.58)	42	G	R
Calcium *	mmol/L	2.60	2.60	0.10	2.40	2.76	2.40 (2.36-2.75)	2.78 (2.44-2.82)	42	G	R
Phosphorus *	mmol/L	2.58	2.52	0.36	1.87	3.39	1.83 (1.7-1.99)	3.26 (3.09-3.45)	44	G	R
Amylase	U/L	228.50	240.50	80.10	72.40	382.90	60.50 (31.69-98.44)	392.82 (353.59-427.92)	41	G	R
GGT *	U/L	4.50	5.00	0.90	3.00	6.00	2.34	6.67	38	NG	R
Creatinine *	µmol/L	26.52	17.68	1.77	17.68	26.52	18.56 (17.68-19.45)	28.29 (25.64-29.17)	43	NG	RT
Cholesterol	mmol/L	9.03	8.7	1.79	5.79	13.08	5.09 (4.46-5.77)	12.51 (11.53-13.39)	44	G	R
Magnesium *	mmol/L	0.86	0.86	0.04	0.78	0.95	0.76 (0.75-0.79)	0.93 (0.91-0.95)	40	G	R
Sodium *	mmol/L	146.60	146.60	2.70	140.60	152.20	141.02 (139.82-142.10)	152.15 (150.9-153.34)	44	G	R
Potassium *	mmol/L	3.10	3.10	0.50	2.00	4.00	2.07 (1.88-2.28)	4.19 (3.98-4.39)	43	G	R
Chloride *	mmol/L	110.2	110.4	2.20	105.30	11.90	105.70 (104.64-106.70)	114.85 (113.93-115.64)	44	G	R

* Values significantly different between chicks and juveniles/adults (P<0.01). CI indicates confidence interval; RI, reference interval; n, sample size; G, Gaussian distribution; NG, no Gaussian distribution; R, robust method; RT, robust method after Box-Cox transformation.

Table 3. Continued.

Variable	Units	Descriptive statistics					Reference Interval with 90% CI		Reference Value Advisor		
		Mean	Median	SD	Minimum	Maximum	Lower limit (RI)	Upper limit (RI)	n	Distribution	Method
Osmolarity	mosm/Kg	247.15	247.51	5.00	236.52	257.93	237.13 (235.15-239.7)	257.48 (255.45-259.64)	44	G	R
Fibrinogen	µmol/L	9.74	11.76	4.14	2.94	17.64	2.94	17.64	51	NG	NP
Total Protein *	g/L	32.73	32.75	2.73	27.30	38.10	27.21 (26.16-28.34)	38.33 (37.21-39.41)	46	G	R
Prealbumin	g/L	2.61	2.70	0.69	1.00	3.90	1.20 (0.90-1.50)	4.10 (3.80-4.30)	47	G	R
Albumin	g/L	16.22	16.10	2.24	11.10	21.40	11.50 (10.7-12.5)	20.7 (19.6-21.6)	46	G	R
α-globulins	g/L	2.67	2.7	0.56	1.30	3.80	1.50 (1.30-1.70)	3.80 (3.60-4.10)	46	G	R
B-globulins	g/L	8.98	9.05	1.46	6.20	13.00	6.00 (5.30-7.00)	12.00 (11.30-13.00)	44	G	R
γ-globulins *	g/L	2.07	2.10	0.59	1.00	3.70	0.80 (0.50 -1.10)	3.20 (2.90-3.50)	44	G	R
(P+A)/G		1.40	1.30	0.30	0.60	2.10	0.65 (0.51-1.78)	2.01 (1.84-2.16)	46	G	R
Young / Adults											
AST	U/L	225.88	233.50	54.13	147.00	342.00	107.93 (85.19-141.18)	338.13 (305.38-366.66)	26	G	R
CK	U/L	588.16	583.95	221.67	203.30	1036.30	94.29 (0-238.83)	1039.24 (889.86-1195.57)	22	G	R
Uric acid	µmol/L	629.30	625.73	233.76	269.44	1074.21	131.45 (26.17-242.68)	1115.84 (984.39-1233.02)	27	G	R
Glucose	mmol/L	19.96	19.55	1.82	15.78	23.80	15.97 (15.01-17.06)	23.84 (22.41-24.89)	25	G	R
Urea	mmol/L	4.74	4.62	1.02	3.14	6.21	2.56 (2.02-3.08)	6.90 (6.43-7.40)	28	G	R
Tryglicerides	mmol/L	1.66	1.5	0.61	0.87	3.34	0.83 (0.75-0.96)	3.42 (2.6-4.47)	27	NG	RT
GLDH	U/L	6.27	5.29	3.32	2.46	13.79	2.36 (2.05-2.89)	18.53 (12.01-31.00)	24	NG	RT
ALKP	U/L	99.85	104.98	52.72	37.84	232.87	0 (0-14.01)	209.63 (164.31-237.6)	28	NG	RT
Bile Acid	µmol/L	24.97	23.71	8.79	8.80	45.64	5.68 (0.70-11.18)	43.28 (37.04-48.86)	24	G	R
ALT	U/L	57.56	54.00	13.47	39.00	92.00	26.42 (18.22-35.07)	85.117 (74.31-93.86)	25	G	R
Calcium	mmol/L	2.41	2.40	0.13	2.18	2.73	2.13(2.06-2.2)	2.68 (2.6-2.76)	27	G	R
Phosphorus	mmol/L	1.21	1.23	0.50	0.51	2.18	0.13 (0-0.36)	2.25 (1.97-2.52)	27	G	R

* Values significantly different between chicks and juveniles/adults ($P < 0.01$). CI indicates confidence interval; RI. reference interval; n. sample size; G. Gaussian distribution; NG. no Gaussian distribution; R. robust method; RT. robust method after Box-Cox transformation.

Table 3. Continued.

Variable	Units	Descriptive statistics					Reference Interval with 90% CI		Reference Value Advisor		
		Mean	Median	SD	Minimum	Maximum	Lower limit (RI)	Upper limit (RI)	n	Distribution	Method
Amylase	U/L	187.57	182.70	52.70	80.10	247.50	77.09 (43.92-119.62)	302.52 (277.05-353.4)	23	G	R
GGT	U/L	2.74	3.00	1.13	1.00	5.00	0.73	5.72	27	NG	RT
Creatinine	μmol/L	28.29	28.29	2.65	24.75	33.59	22.98 (22.1-24.75)	33.59 (31.82-34.48)	24	G	R
Cholesterol	mmol/L	8.03	8.06	1.09	5.63	10.41	5.79 (5.04-6.57)	10.38 (9.62-11.02)	24	G	R
Magnesium	mmol/L	1.00	0.98	0.09	0.89	1.22	0.79 (0.73-0.84)	1.20 (1.10-1.26)	22	G	R
Sodium	mmol/L	155.03	155.60	2.38	150.00	159.20	149.96 (148.47-151.57)	160.23 (158.81-161.28)	27	G	R
Potassium	mmol/L	1.81	1.76	0.48	1.01	2.71	0.75 (0.57-1.02)	2.81 (2.52-3.08)	26	G	R
Chloride	mmol/L	114.67	115.00	2.08	110.80	117.90	110.29 (109.35-111.55)	119.17 (118.11-120.11)	26	G	R
Osmolarity	mosm/Kg	253.44	253.47	3.77	245.10	258.77	245.86 (243.09-248.56)	261.91 (259.62-264.32)	22	G	R
Fibrinogen	μmol/L	11.00	11.76	4.86	2.94	17.64	19.77	21.37	27	NG	RT
Total Protein	g/L	34.97	34.80	3.12	28.20	39.80	28.48 (26.85-30.28)	41.66 (40.05-43.25)	28	G	R
Prealbumin	g/L	2.98	3.00	0.46	1.90	3.90	2.03 (1.78-2.33)	3.97 (3.72-4.22)	26	G	R
Albumin	g/L	17.30	17.15	1.33	14.70	20.40	14.36 (13.63-15.26)	20.05 (19.08-20.98)	22	G	R
α-globulins	g/L	2.28	2.35	0.42	1.40	3.00	1.39 (1.16-1.69)	3.19 (2.98-3.41)	26	G	R
β-globulins	g/L	9.42	9.20	2.25	5.30	13.90	4.33 (3.57-5.48)	13.85 (12.41-15.32)	26	G	R
γ-globulins	g/L	3.44	3.15	1.08	1.80	6.00	0.93 (0.33-1.6)	5.65 (4.86-6.29)	26	G	R
(P+A)/G		1.37	1.33	0.34	0.69	2.03	0.62 (0.48-0.82)	2.05 (1.83 - 2.26)	26	G	R

CI indicates confidence interval; RI, reference interval; n, sample size; G, Gaussian distribution; NG, no Gaussian distribution; R, robust method; RT, robust method after Box-Cox transformation.

Table 4. Blood biochemistry descriptive statistics and reference intervals (RIs) for Little Owl by age.

Variable	Units	Descriptive statistics					Reference Interval with 90% CI		Reference Value Advisor		
		Mean	Median	SD	Minimum	Maximum	Lower limit (RI)	Upper limit (RI)	n	Distribution	Method
Chicks											
AST	U/L	237.50	230.00	44.70	137.00	337.00	141.63 (122.96-163.13)	326.24 (298.69-352.58)	38	G	R
CK*	U/L	755.60	788.50	329.20	150.60	1489.00	86.58 (0.00-269.34)	1446.48 (1305.33-1589.76)	38	G	R
Uric acid	μmol/L	617.40	582.90	269.44	65.43	1149.15	59.48 (0.00-189.15)	1175.32 (189.15-1287.74)	40	G	R
Glucose	mmol/L	18.07	18.17	1.78	14.44	22.40	14.37 (13.69-15.17)	21.66 (15.17-22.41)	41	G	R
Urea	mmol/L	3.71	3.57	1.18	1.07	6.07	1.23 (0.76-1.83)	6.14(5.47-6.73)	36	G	R
Tryglicerides	mmol/L	1.37	1.23	0.55	0.64	2.50	0.55 (0.49-0.65)	2.83 (2.32-3.26)	36	NG	RT
GLDH	U/L	7.30	7.00	3.50	0.30	16.10	0.00 (0.00-1.63)	14.44 (12.14-16.51)	31	G	R
ALKP*	U/L	332.10	342.20	96.30	84.26	532.58	143.00 (90.50-197.13)	540.22 (491.12-587.10)	38	G	R
Bile Acid	μmol/L	21.00	20.70	9.80	6.00	45.60	0.28 (0.00-4.56)	40.35 (35.37-45.36)	41	G	R
ALT	U/L	97.90	93.50	25.30	46.00	156.00	42.76 (32.19-54.52)	148.03 (54.52-159.37)	40	G	R
Calcium*	mmol/L	2.76	2.76	0.13	2.43	3.00	2.51 (2.45-2.57)	3.02(2.96-3.07)	37	G	R
Phosphorus*	mmol/L	2.45	2.40	0.48	1.55	3.68	1.42 (0.12-1.64)	3.41 (3.17-3.63)	40	G	R
Amylase	U/L	294.60	281.90	86.40	147.50	509.40	110.40 (69.83-145.45)	468.64 (425.31-511.35)	40	G	R
GGT	U/L	4.90	5.00	1.90	1.00	9.00	1.30	9.12	33	NG	RT
Creatinine	μmol/L	26.52	26.52	1.77	21.22	32.71	21.22 (20.33-22.1)	31.82 (30.06-32.71)	37	G	R
Cholesterol	mmol/L	9.48	9.02	1.78	6.43	12.96	5.56 (4.5-6.35)	13.23 (11.95-14.19)	31	G	R
Magnesium	mmol/L	0.97	0.95	0.16	0.71	1.19	0.73 (0.67-0.79)	1.21 (1.15-1.26)	40	G	R
Sodium*	mmol/L	151.50	151.00	3.10	145.70	157.90	144.96 (143.86-146.20)	157.70 (156.14-158.18)	41	G	R
Potassium*	mmol/L	1.80	1.80	0.50	0.80	2.80	0.76 (0.56-1)	2.87 (2.67-3.06)	40	G	R
Chloride	mmol/L	112.70	113.30	2.40	107.70	116.90	108.03 (106.82-109.35)	118 (117.02-118.86)	41	G	R

* Values significantly different between chicks and juveniles/adults (P<0.01). CI indicates confidence interval; RI. reference interval; n. sample size; G. Gaussian distribution; NG. no Gaussian distribution; R. robust method; RT. robust method after Box-Cox transformation.

Table 4. Continued.

Variable	Units	Descriptive statistics					Reference Interval with 90% CI		Reference Value Advisor		
		Mean	Median	SD	Minimum	Maximum	Lower limit (RI)	Upper limit (RI)	n	Distribution	Method
Osmolarity	mosm/Kg	326.60	327.00	6.20	313.30	341.80	314.09 (312.18-316.16)	339.06 (337.01-341.17)	41	G	R
Fibrinogen	µmol/L	9.80	11.80	5.70	2.94	23.50	2.94	23.52	44	NG	NP
Total Protein	g/L	35.64	34.90	3.85	28.40	45.40	27.19 (25.43-29.08)	43.41 (41.24-45.67)	35	G	R
Prealbumin*	g/L	5.78	5.75	1.35	3.40	8.90	2.90 (2.26-3.54)	8.46 (7.71-9.16)	34	G	R
Albumin	g/L	16.74	16.60	1.70	13.00	20.20	13.20 (12.42-14.05)	20.25 (19.40-21.18)	33	G	R
α-globulins	g/L	3.49	3.20	0.80	2.50	5.30	2.34 (2.22-2.48)	5.92 (4.83-7.18)	33	NG	RT
β-globulins	g/L	6.40	6.40	1.30	4.00	9.40	3.51 (2.93-4.31)	9.02 (8.25-9.86)	30	G	R
γ-globulins*	g/L	2.73	2.60	0.90	1.00	4.40	0.73 (0.33-1.18)	4.45 (4.02-5.00)	35	G	R
(P+A)/G*		1.70	1.70	0.40	0.90	2.43	0.92 (0.73-1.14)	2.53 (2.35-2.76)	31	G	R
Young / Adults											
AST	U/L	264.20	255.50	65.20	141.00	383.00	124.45 (94.17-156.47)	399.00 (357.25-435.27)	30	G	R
CK	U/L	454.90	462.70	224.60	46.10	1043.10	0.00 (0.00-106.09)	912.34 (775.49-1043.85)	29	G	R
Uric acid	µmol/L	648.33	608.48	291.45	179.63	1348.41	0.00 (0.00-146.32)	1214.00 (1021.27-1411.46)	32	G	R
Glucose	mmol/L	16.97	16.72	1.26	13.95	19.45	14.26 (13.63-14.90)	19.60 (18.68-20.31)	31	G	R
Urea	mmol/L	3.43	3.50	0.73	1.82	4.61	1.92 (1.47-2.43)	5.00 (4.63-5.36)	27	G	R
Tryglicerides	mmol/L	1.08	1.03	0.27	0.66	1.63	0.50 (0.40-0.63)	1.63 (1.46-1.77)	32	G	R
GLDH	U/L	6.60	6.10	3.20	0.35	12.81	0.00 (0.00-1.62)	13.42 (11.24-15.25)	23	G	R
ALKP	U/L	172.90	173.80	80.60	39.96	362.26	0.00 (0.00-40.88)	329.42 (281.65-387.85)	30	G	R
Bile Acid	µmol/L	19.20	17.10	9.60	4.12	40.86	0.00 (0.00-1.57)	37.35 (30.54-45.65)	29	G	R
ALT	U/L	82.80	79.00	24.20	47.00	150.00	30.00 (14.84-41.25)	131.17 (112.15-147.08)	31	G	R
Calcium	mmol/L	2.63	2.60	0.13	2.35	2.88	2.33 (2.25-2.41)	2.89 (2.81-2.97)	27	G	R
Phosphorus	mmol/L	1.15	1.12	0.23	0.76	1.62	0.67 (0.56-0.79)	1.61 (1.48-1.74)	26	G	R

* Values significantly different between chicks and juveniles/adults (P<0.01). CI indicates confidence interval; RI. reference interval; n. sample size; G. Gaussian distribution; NG. no Gaussian distribution; R. robust method; RT. robust method after Box-Cox transformation.

Table 4. Continued.

Variable	Units	Descriptive statistics					Reference Interval with 90% CI		Reference Value Advisor		
		Mean	Median	SD	Minimum	Maximum	Lower limit (RI)	Upper limit (RI)	n	Distribution	Method
Amylase	U/L	298.80	286.10	102.90	154.10	536.20	72.46 (35.01-121.65)	502.98 (440.13-567.89)	32	G	R
GGT	U/L	4.40	4.00	1.40	2.00	7.00	1.81	7.66	29	NG	RT
Creatinine	μmol/L	27.40	26.52	2.83	22.10	34.48	21.22 (20.33-22.98)	33.60 (31.82-34.50)	28	G	R
Cholesterol	mmol/L	9.25	8.55	3.10	3.47	16.38	2.41 (0.94-3.92)	15.62 (13.36-17.48)	31	G	R
Magnesium	mmol/L	0.95	0.97	0.15	0.71	1.22	0.63 (0.54-0.74)	1.27 (1.21-1.34)	23	G	R
Sodium	mmol/L	154.20	154.40	2.60	149.70	160.30	148.69 (147.56-150.21)	159.62 (158.36-160.79)	33	G	R
Potassium	mmol/L	1.20	1.20	0.30	0.83	1.84	0.65 (0.49-0.78)	1.74 (1.59-1.89)	31	G	R
Chloride	mmol/L	113.90	113.40	2.90	106.90	119.20	107.83 (106.53-109.26)	120.09 (118.16-121.64)	31	G	R
Osmolarity	mosm/Kg	326.60	327.00	6.20	313.30	341.80	314.09 (312.18-316.16)	339.06 (337.01-341.17)	31	G	R
Fibrinogen	μmol/L	8.56	5.88	5.48	2.94	17.64	0.00	19.46	34	NG	RT
Total Protein	g/L	37.64	38.40	5.40	26.50	49.90	26.23 (23.48-29.30)	48.93 (45.95-52.01)	31	G	R
Prealbumin	g/L	4.40	4.50	1.50	1.80	6.70	1.35 (0.71-2.21)	7.52 (6.85-8.19)	30	G	R
Albumin	g/L	15.60	15.30	2.00	11.90	19.60	11.29 (10.38-12.39)	19.9 (18.80-20.95)	30	G	R
α-globulines	g/L	3.20	3.30	0.60	1.90	4.60	1.97 (1.66-2.36)	4.52 (4.16-4.87)	26	NG	RT
β-globulines	g/L	7.10	6.90	1.70	4.60	11.40	3.34 (2.13-4.26)	10.45 (9.13-11.64)	25	G	R
γ-globulins	g/L	5.00	4.90	1.70	1.80	8.10	1.39 (0.62-2.34)	8.52 (7.54-9.38)	26	G	R
(P+A)/G		1.20	1.10	0.30	0.59	1.89	0.41 (0.25-0.6)	1.87 (1.66-2.06)	28	G	R

CI indicates confidence interval; RI. reference interval; n. sample size; G. Gaussian distribution; NG. no Gaussian distribution; R. robust method; RT. robust method after Box-Cox transformation.

Table 5. Blood biochemistry descriptive statistics and reference intervals (RIs) for Scops owl by age.

Variable	Units	Descriptive statistics					Reference Interval with 90% CI		Reference Value Advisor		
		Mean	Median	SD	Minimum	Maximum	Lower limit (RI)	Upper limit (RI)	n	Distribution	Method
Chicks											
AST*	U/L	248.04	248.00	50.35	160.00	378.00	141.63 (122.96-163.13)	346.88 (322.47-372.42)	46	G	R
CK	U/L	770.90	723.10	233.70	308.40	1202.90	271.15 (120.23-374.63)	1246.69 (1107.05-1340.98)	44	NG	RT
Uric acid	µmol/L	776.21	759.56	278.37	300.37	1521.5	195.69 (71.98-310.49)	1334.13 (1198.52-1453.10)	46	G	R
Glucose	mmol/L	16.72	16.87	1.26	14.01	19.36	14.19 (13.63-14.85)	19.36 (18.84-19.89)	42	G	R
Urea	mmol/L	4.25	3.97	1.40	2.11	8.46	2.16	8.44	42	NG	NP
Tryglicerides	mmol/L	1.82	1.59	0.92	0.82	4.99	0.82	4.92	45	NG	NP
GLDH*	U/L	5.50	3.30	5.40	1.10	22.10	1.04 (0.85-1.30)	35.91 (17.01-41.04)	41	NG	RT
ALKP*	U/L	489.60	440.70	181.50	220.80	871.50	221.46	866.84	46	NG	NP
Bile acids	µmol/L	36.30	38.00	18.60	7.60	81.80	0.00 (0.00-5.73)	73.95 (66.5-82.94)	45	G	R
ALT*	U/L	69.20	70.00	16.70	37.00	105.00	34.71 (28.89-42.45)	103.40 (96.04-110.13)	41	G	R
Calcium*	mmol/L	2.70	2.69	0.13	2.43	2.95	2.45 (2.4-2.5)	2.95 (2.75-3.00)	46	G	R
Phosphor*	mmol/L	2.00	1.91	0.42	1.29	2.93	1.30	2.94	41	NG	NP
Amylase*	U/L	139.40	130.10	63.20	45.10	304.30	45.94 (38.11-55.79)	299.60 (257.79-342.37)	44	NG	NP
GGT*	U/L	4.20	4.00	1.70	1.00	8.00	1.15	8.00	45	NG	NP
Creatinine	µmol/L	24.75	24.75	2.12	20.33	30.06	20.33 (19.45-21.22)	29.17 (28.29-30.06)	43	G	R
Cholesterol	mmol/L	8.16	8.17	1.3	4.59	10.75	5.54 (5.01-6.16)	10.88 (10.16-11.49)	40	G	R
Magnesium	mmol/L	0.97	0.96	0.16	0.78	1.29	0.73 (0.68-0.78)	1.20 (1.15-1.25)	44	G	R
Sodium*	mmol/L	151.40	151.30	1.90	147.80	155.80	147.50 (146.57-148.25)	155.21 (154.42-156.04)	43	NG	RT
Potassium	mmol/L	1.10	1.00	0.30	0.80	1.80	0.73 (0.69-0.77)	1.88 (1.62-2.15)	45	NG	RT
Chloride*	mmol/L	109.70	110.10	2.60	103.90	114.30	104.52 (103.33-105.8)	115.16 (114.08-115.99)	43	G	R

* Values significantly different between chicks and juveniles/adults (P<0.01). CI indicates confidence interval; RI. reference interval; n. sample size; G. Gaussian distribution; NG. no Gaussian distribution; R. robust method; RT. robust method after Box-Cox transformation.

Table 5. Continued.

Variable	Units	Descriptive statistics					Reference Interval with 90% CI		Reference Value Advisor		
		Mean	Median	SD	Minimum	Maximum	Lower limit (RI)	Upper limit (RI)	n	Distribution	Method
Osmolarity	mosm/Kg	321.9	321.4	4.90	308.23	331.08	311.90 (309.97-313.93)	331.93 (329.79-333.98)	44	G	R
Fibrinogen	μmol/L	6.93	5.88	4.77	2.94	23.52	2.94	23.52	46	NG	NP
Total Protein*	g/L	31.26	31.3	2.81	24.8	37.60	25.47 (24.48-26.69)	36.94 (35.54-38.02)	46	G	R
Prealbumin*	g/L	4.15	3.90	1.02	2.70	6.60	2.68 (2.52-2.85)	7.05 (5.94-8.71)	42	NG	RT
Albumin*	g/L	16.20	16.20	1.54	13.3	19.30	13.09 (12.52-13.73)	19.38 (18.76-19.94)	43	G	R
α-globulines	g/L	3.16	3.10	0.93	1.70	5.70	1.19 (0.76-1.54)	4.98 (4.52-5.40)	44	G	R
β-globulines*	g/L	4.90	4.70	1.00	3.10	7.30	2.81 (2.44-3.24)	6.95 (6.4-7.38)	43	G	R
γ-globulines*	g/L	2.30	2.30	0.60	1.10	3.70	0.98 (0.77-1.28)	3.56 (3.29-3.88)	42	G	R
(P+A)/G*		2.00	2.00	0.40	1.30	3.00	1.13 (0.96-1.31)	2.87 (1.31-3.06)	42	G	R
Young / Adults											
AST	U/L	369.90	364.00	112.50	178.00	577.00	125.85 (74.73-191.54)	601.36 (531.63-668.43)	25	G	R
CK	U/L	566.40	550.80	249.90	200.20	1139.10	13.89 (0.00-162.73)	1065.95 (889.59-1222.16)	26	G	R
Uric acid	μmol/L	887.44	827.37	383.05	218.29	1646.4	57.10 (0.00-247.44)	1684.47 (1432.87-1889.68)	28	G	R
Glucose	mmol/L	15.96	15.95	1.57	12.48	18.94	12.65 (11.81-13.59)	19.25 (18.31-20.16)	28	G	R
Urea	mmol/L	5.05	5.48	1.70	0.96	7.75	1.48 (0.34-2.87)	8.94 (7.79-9.94)	22	G	R
Tryglicerides	mmol/L	2.79	2.36	1.54	0.49	6.15	0.00 (0.00-0.15)	5.97 (4.82-6.80)	28	G	R
GLDH	U/L	19.30	11.50	16.50	2.15	54.41			19	G	R
ALKP	U/L	108.80	99.40	53.50	35.36	248.37	0.00 (0.00-18.34)	216.64 (176.73-250.52)	28	G	R
Bile Acid	μmol/L	43.40	41.30	26.60	5.97	98.6	0.00 (0.00-0.00)	97.31 (82.28-112.59)	27	G	R
ALT	U/L	102.30	102.00	44.40	23.00	203.00	4.45 (0-32.24)	192.19 (162.16-222.81)	24	G	R
Calcium	mmol/L	2.61	2.60	0.20	2.33	3.08	2.14 (2.04-2.28)	3.02 (2.87-3.16)	24	G	R
Phosphorus	mmol/L	1.30	1.13	0.52	2.10	2.73	0.00 (0.00-0.41)	2.34 (1.83-2.78)	23	G	R

* Values significantly different between chicks and juveniles/adults (P<0.01). CI indicates confidence interval; RI. reference interval; n. sample size; G. Gaussian distribution; NG. no Gaussian distribution; R. robust method; RT. robust method after Box-Cox transformation.

Table 5. Continued.

Variable	Units	Descriptive statistics					Reference Interval with 90% CI		Reference Value Advisor		
		Mean	Median	SD	Minimum	Maximum	Lower limit (RI)	Upper limit (RI)	n	Distribution	Method
Amylase	U/L	240.70	230.50	91.20	85.70	413.90	34.59 (0-88.89)	425.85 (361.8-491.05)	22	G	R
GGT	U/L	2.70	2.50	1.90	1.00	8.00	0.51	12.02	20	NG	RT
Creatinine	μmol/L	25.64	24.75	3.54	18.56	33.6	16.80 (15.02-19.45)	32.71 (30.06-35.36)	21	G	R
Cholesterol	mmol/L	10.38	9.72	3.02	6.69	15.6			17	G	R
Magnesium	mmol/L	0.97	0.97	0.28	0.79	1.24			17	G	R
Sodium	mmol/L	154.20	154.40	2.50	149.20	158.90			16	G	R
Potassium	mmol/L	1.20	1.10	0.20	0.95	1.80			16	G	R
Chloride	mmol/L	111.90	111.40	1.60	109.50	114.90			14	G	R
Osmolarity	mosm/Kg	321.90	321.40	4.90	308.23	331.08			16	G	R
Fibrinogen	μmol/L	8.16	5.88	5.90	2.94	23.52			16	NG	NP
Total Protein	g/L	39.90	39.80	4.50	30.80	50.00	30.28 (27.89-32.90)	49.28 (46.65-52.04)	26	G	R
Prealbumin	g/L	6.40	6.40	1.60	2.50	9.50	3.07 (2.10-4.13)	9.82 (8.78-10.70)	25	G	R
Albumin	g/L	18.60	18.20	3.60	1.17	2.72	10.84 (8.77-12.87)	25.91 (23.47-28.02)	25	G	R
α-globulines	g/L	3.70	3.80	0.80	1.70	5.40	1.9 (1.36-2.53)	5.48 (4.94-6.00)	25	G	R
β-globulines	g/L	6.60	7.00	1.60	3.40	8.90	3.21 (2.31-4.39)	10.08 (9.32-10.91)	25	G	R
γ-globulins	g/L	3.30	3.10	1.10	1.60	5.20	0.93 (0.45-1.53)	5.53 (4.79-6.09)	24	G	R
(P+A)/G		1.70	1.60	0.60	0.96	2.90	0.44 (0.17-0.75)	2.93 (2.56-3.26)	27	G	R

CI indicates confidence interval; RI. reference interval; n. sample size; G. Gaussian distribution; NG. no Gaussian distribution; R. robust method; RT. robust method after Box-Cox transformation.

Table 6. Blood biochemistry individual values for chicks of Long-eared Owl

AST	U/L	194.00, 251.00, 222.00, 304.00, 292.00, 225.00, 248.00
CK	U/L	273.90, 206.50, 243.70, 257.00, 147.60, 397.40, 259.10
Uric acid	µmol/L	258.10, 283.10, 520.50, 402.10, 607.90, 861.80, 978.50, 648.00
Glucose	mmol/L	16.40, 16.00, 22.40, 18.70, 18.70, 17.80, 19.90, 13.80
Urea	mmol/L	2.10, 4.10, 3.60, 3.60, 4.30, 4.90, 5.50
Tryglicerides	mmol/L	0.70, 1.20, 1.00, 1.05, 1.28, 0.71, 1.19
ALKP	U/L	27.80, 466.80, 430.10, 463.40, 491.10, 322.00, 190.80, 63.70
ALT	U/L	112.00, 58.00, 97.00, 81.00, 86.00, 60.00, 80.00, 65.00
Calcium	mmol/L	2.60, 2.70, 2.40, 2.60, 2.70, 2.60, 2.60, 2.80
Phosphorus	mmol/L	1.60, 2.80, 2.10, 2.20, 2.30, 2.70, 2.30, 2.30
Amylase	U/L	111.10, 75.60, 109.80, 101.00, 75.50, 87.30
GGT	U/L	2.00, 3.00, 3.00, 4.00, 4.00, 2.00, 1.00
Creatinine	µmol/L	25.60, 21.20, 29.20, 21.20, 23.90, 30.10
Cholesterol	mmol/L	7.10, 8.70
Magnesium	mmol/L	1.10, 1.20
Sodium	mmol/L	154.80, 171.10
Potassium	mmol/L	1.60, 2.80
Chloride	mmol/L	113.50, 137.30
Osmolarity	mosm/Kg	246.97
Fibrinogen	µmol/L	11.70, 8.80, 11.80, 11.70, 14.70, 11.80, 11.80, 5.90, 2.94, 5.88
Total Protein	g/L	30.10, 31.40, 32.60, 32.50, 30.50, 34.80
Prealbumin	g/L	2.20, 2.00, 2.40, 3.20, 2.70, 4.20, 7.30
Albumin	g/L	13.50, 14.10, 13.90, 16.60, 16.50, 15.20, 13.00
α-globulines	g/L	1.80, 2.30, 3.00, 2.40, 2.70, 3.30
β-globulines	g/L	6.50, 7.40, 9.50, 7.70, 7.60, 4.90, 6.40
γ-globulins	g/L	2.70, 2.60, 2.70, 3.00, 2.90, 3.70
(P+A)/G		1.40, 1.10, 1.10, 1.60, 1.40, 1.80, 1.40

Table 7. Blood biochemistry descriptive statistics and reference intervals (RIs) for Barn Owl by age.

Variable	Units	Descriptive statistics					Reference Interval with 90% CI		Reference Value Advisor		
		Mean	Median	SD	Minimum	Maximum	Lower limit (RI)	Upper limit (RI)	n	Distribution	Method
Chicks											
AST*	U/L	176.10	181.50	41.60	97.00	260.00	87.48 (67.56-111.2)	263.34 (241.00-284.54)	28	G	R
CK	U/L	2985.30	2948.90	869.00	1217.00	4383.70	1198.21 (754.40-1720.31)	4835.51 (4371.57-5221.44)	29	G	R
Uric acid	µmol/L	411.60	444.32	171.30	64.83	808.93	44.61(0.00-153.46)	773.24 (669.15-859.49)	29	G	R
Glucose	mmol/L	10.18	11.00	2.81	4.00	14.65	3.82 (2.21-5.75)	16.72 (15.14-18.46)	30	G	R
Urea	mmol/L	2.20	2.03	1.29	0.50	4.28	0.00 (0.00-0.00)	4.94 (4.08-5.65)	29	G	R
Tryglicerides	mmol/L	0.78	0.75	0.27	0.31	1.36	0.20 (0.08-0.37)	1.33 (1.17-1.49)	27	G	R
GLDH	U/L	4.50	3.00	3.30	1.10	13.41	0.90 (0.68-1.19)	20.54 (11.59-38.3)	26	NG	RT
ALKP*	U/L	599.40	578.30	178.70	248.10	1008.90	217.25 (111.69-313.9)	973.67 (865.47-1080.23)	26	G	R
Bile acids	µmol/L	11.53	9.16	7.90	7.92	65.13			15	G	R
ALT	U/L	25.30	21.50	11.80	10.00	51.00	0.00 (0.00-4.17)	46.65 (38.47-58.87)	23	G	R
Calcium*	mmol/L	2.60	2.60	0.15	2.45	2.85	2.43 (2.38-2.48)	2.75 (2.70-2.79)	24	G	R
Phosphor*	mmol/L	2.96	2.37	1.14	1.68	5.35	0.00 (0.00-0.69)	4.69 (4.03-5.9)	24	G	R
Amylase	U/L	991.10	1059.20	328.80	376.70	1645.00	284.97 (108.06-499.05)	1702.09 (1539.42-1873.29)	24	G	R
GGT	U/L	2.20	2.00	1.30	1.00	4.00			13	NG	RT
Creatinine	µmol/L	22.98	23.87	4.42	18.56	31.82			16	G	R
Cholesterol	mmol/L	9.57	9.86	2.26	5.75	13.54			14	G	R
Magnesium	mmol/L	0.81	0.82	0.04	0.76	0.88			9	G	R
Sodium	mmol/L	151.25	152.10	3.39	145.60	156.10			10	G	R
Potassium	mmol/L				3.50, 3.35, 3.48, 2.86, 3.27, 3.55, 3.50, 3.15				8	G	R
Chloride	mmol/L			110.00, 111.80, 113.30, 112.80, 115.20, 113.90, 114.30, 113.40, 114.80				9	G	R	

* Values significantly different between chicks and juveniles/adults (P<0.01). CI indicates confidence interval; RI. reference interval; n. sample size; G. Gaussian distribution; NG. no Gaussian distribution; R. robust method; RT. robust method after Box-Cox transformation.

Table 7. Continued.

Variable	Units	Descriptive statistics					Reference Interval with 90% CI		Reference Value Advisor		
		Mean	Median	SD	Minimum	Maximum	Lower limit (RI)	Upper limit (RI)	n	Distribution	Method
Osmolarity	mosm/Kg	229.07, 240.13, 243.65, 246.43, 249.19, 238.81, 250.81, 247.84, 249.58							9	G	R
Fibrinogen	µmol/L	13.69	11.76	9.64	2.94	35.28	0.00	20.14	26	NG	NP
Total Protein	g/L	34.15	34.30	8.60	25.80	44.70	23.72 (21.01-26.15)	44.76 (41.43-47.87)	30	G	R
Prealbumin	g/L	3.10	3.10	1.20	0.90	6.00	0.51 (0-1.27)	5.60 (4.88-6.26)	29	G	R
Albumin	g/L	16.34	16.30	1.90	12.80	20.00	11.97 (10.93-13.04)	20.87 (19.36-22.06)	24	G	R
α-globulins	g/L	1.33	1.30	0.50	0.40	2.60	0.23 (0-0.52)	2.34 (2.05-2.66)	28	G	R
β-globulins	g/L	11.26	10.00	3.10	7.50	20.00	4.20 (3.07-6.03)	16.17 (13.93-18.12)	26	G	R
γ-globulins	g/L	2.70	2.60	0.90	1.30	4.90	0.66 (0.13-1.23)	4.50 (3.85-5.09)	26	G	R
(P+A)/G		1.23	1.33	0.45	0.13	1.85	0.33 (0.02-0.67)	2.26 (1.99-2.51)	28	G	R
Young / Adults											
AST	U/L	273.90	246.00	87.20	149.00	404.00			13	G	
CK	U/L	2847.70	2587.90	1555.80	618.40	5157.50			11	G	
Uric acid	µmol/L	536.09	496.06	209.37	245.06	919.56			13	G	
Glucose	mmol/L	11.94	11.90	1.43	9.75	14.41			13	G	
Urea	mmol/L	3.15	2.75	1.97	1.28	7.60			12	G	
Tryglicerides	mmol/L	1.42	1.46	0.58	0.31	2.26			11	G	
GLDH	U/L	2.90	2.90	1.30	1.46	5.00			11	G	
ALKP	U/L	260.00	280.10	128.80	59.09	459.54			12	G	
Bile acids	µmol/L	12.30	8.90	11.00	1.89	34.48			12	G	
ALT	U/L	23.50	23.00	8.80	11.00	37.00			11	G	
Calcium	mmol/L	2.64	2.73	0.25	2.23	2.95			10	G	
Phosphorus	mmol/L	1.73	1.78	0.56	0.87	2.60			12	G	

* Values significantly different between chicks and juveniles/adults ($P < 0.01$). CI indicates confidence interval; RI. reference interval; n. sample size; G. Gaussian distribution; NG. no Gaussian distribution; R. robust method; RT. robust method after Box-Cox transformation.

Table 7. Continued.

Variable	Units	Descriptive statistics					Reference Interval with 90% CI		Reference Value Advisor		
		Mean	Median	SD	Minimum	Maximum	Lower limit (RI)	Upper limit (RI)	n	Distribution	Method
Amylase	U/L	746.30	770.20	96.40	582.70	893.30			11	G	
GGT	U/L	2.20	1.00	2.10	1.00	8.00			12	NG	
Creatinine	μmol/L	32.71	32.71	5.30	24.75	45.08			11	G	
Cholesterol	mmol/L	8.04	8.20	3.00	5.09	14.11			12	G	
Magnesium	mmol/L	0.87, 1.05, 0.85, 0.86, 0.86, 1.05, 0.41, 1.01, 0.99							9		
Sodium	mmol/L	152.40, 158.70, 157.90, 155.30, 155.00, 146.20, 156.50, 151.70							8		
Potassium	mmol/L	2.33, 1.78, 2.82, 2.86, 3.00, 2.10, 2.24, 2.81							8		
Chloride	mmol/L	113.30, 119.50, 118.50, 116.10, 117.00, 107.20, 116.80, 113.30							8		
Chloride	mmol/L	244.06, 254.88, 256.69, 252.59, 254.46, 230.28, 248.39, 244.23							8		
Fibrinogen	μmol/L	250.00	200.00	143.40	100.00	600.00			10	NG	
Total Protein	g/L	34.60	34.60	4.20	27.20	42.20			12	G	
Prealbumin	g/L	3.00	3.00	1.90	0.00	6.30			12	G	
Albumin	g/L	16.20	16.20	1.50	13.20	18.90			11	G	
α-globulins	g/L	1.40	1.40	0.60	0.60	2.40			10	G	
β-globulins	g/L	10.30	10.50	3.30	5.80	14.90			12	G	
γ-globulins	g/L	2.80	2.40	1.30	1.20	5.80			12	G	
(P+A)/G		1.40	1.20	0.70	0.58	2.65			12	G	

CI indicates confidence interval; RI. reference interval; n. sample size; G. Gaussian distribution; NG. no Gaussian distribution; R. robust method; RT. robust method after Box-Cox transformation.

DISCUSSION

Studies of avian plasma chemistry are of value to ecologists and veterinarians, especially for the management of threatened species. An increasing number of studies of avian plasma chemistry have examined aspects of the biochemistry and physiology of birds including the influence of age. The objective of this study was to determine baseline data of 29 blood biochemistry parameters of Tawny Owl, Little Owl, Scops Owl, Long-eared Owl and Barn Owl in different age classes while minimizing the pre-analytical and analytical variation.

In general, the concentration of the biochemical parameters of this species were within reference ranges documented for other species of diurnal raptors, but CK, AST, GLDH, uric acid were slightly higher (Fudge, 2000).

It is very difficult to make comparisons between different blood levels of plasma enzymes in health, because the tissue distribution of these enzymes varies considerably between species (Franson *et al.*, 1985) and concentrations can be influenced by different physiological and methodological variables (Lumeij, 1997).

In adults of Tawny Owl and Barn Owl, higher concentrations of CK have been observed already. In Barn Owls, Franson *et al.*, in 1985 obtained a creatin kinase (CK) range of 644-1310 U/L and Ammersbach *et al.*, in 2015 of CK=158-3415.

Most avian species have an AST upper limit of 230 U/L and our values in Strigiformes were higher. Stress and exercise cause an increase of CK and AST concentrations in blood and it is higher during the capture and handling of wild species (Franson *et al.*, 1985; Bailey *et al.*, 1999). Therefore the higher values of CK and AST concentrations could be due to a particular response in these owl species in the procedures of capture and handling. These procedures are inevitable in the blood sample extraction therefore this change in the blood values of CK and AST should be considered and included in the reference intervals (Scope *et al.*, 2002).

GLDH is an enzyme located into hepatocytes. Although values upper than 5 UI/L have been associated with severe hepatic injury in racing pigeons (Lumeij and de Brujine, 1985), our results show that healthy Strigiformes have high concentrations. The GLDH is an enzyme slightly investigated in raptors, and the reason of this increase in these species is unknown.

Raptors have a RI of uric acid concentration approximately 50% higher than granivorous and frugivorous species (Gylstorff and Grimm, 1987) and the blood levels show a close relationship with composition of diet and it increases with increasing the proportion of protein (Lumeij, 1997). Thus, the observed increase in these owls species agree with these affirmations and it could be explained by the characteristic diet of the birds in our study.

Inter-species variability in blood biochemistry has been documented in other phylogenetic groups of birds (Lumeij and Overduin, 1990). In our study, statistically significant differences were found between four of the five species investigated. This result confirm the actual rule: interpretation of results of blood biochemistry in a particular species can only be performed with reference values of that particular species (Amersbach *et al.*, 2015). Cholesterol levels did not show inter-species variability which may be due to the uniform diet ingested by all animals given the demonstrated relationship between this metabolite and feed composition (Lumeij, 1997).

Albumin has very important role in controlling oncotic pressure in biological systems, the fluid volume of the intracellular and extracellular compartment is determined by the relative osmolality (Kohn and DiBartola, 2000). The fact that these two parameters did not show inter-specific variability may be due to a uniform mechanism for maintaining water balance within the Strigiforme order. This hypothesis was supported by the results of the comparative study on four genera of parrots where differences between all values of biochemical blood parameters except plasma osmolarity were reported (Lumeij and Overduin, 1990).

The concentrations of the analysed parameters in these owls species were within RIs documented for the order of Strigiformes (Amersbach *et al.*, 2015).

Only the blood chemistry of adults of Tawny Owl (Spagnolo *et al.*, 2008) and Barn Owl (Tatum *et al.*, 2000; Szavo *et al.*, 2014; Ammersbach *et al.*, 2015) have been studied previously. Our results in adult specimens of Tawny Owl showed significant differences from those obtained by the mentioned author mainly in the concentrations of uric acid, Urea, alkaline phosphatase, phosphorus, GGT, prealbumin, alpha and gamma globulins. In adults of Barn owl, our values showed clear differences with those obtained by Szabo *et al.*, 2014 mainly in GLDH, alkaline phosphatase and GGT concentrations and bile acids levels and with those reported by Ammersbach *et al.*, 2015 in AST and GGT. Respect to plasma protein fractions provided by the study of Tatum *et al.*, 2000 the differences with our own results were mainly in prealbumin and alpha globulins. The variability in biochemical parameters of the same specie between different studies has been well documented in other birds (Smith and Bush 1978; Montesinos *al.*, 1997; Dujowich *et al.*, 2005; Haefele *et al.*, 2005; Low *et al.*, 2006; Limiñana *et al.*, 2009). We attribute this variation to differences in the preanalytic phase classified into 2 categories: the genetic and physiological differences between the populations sampled, and the handling and processing of samples by different laboratory techniques used (Braun *et al.*, 2014). This variability supports the assumption that RIs generation should be a systematic process, with recognition of reference population definition, sample handling, method standardization, and the use of valid statistical methods (Cray, 2015).

The reference values by age classes for Tawny Owl, Little Owl, Scops Owl and Barn Owl are presented. It is widely confirmed in the literature that the age of the bird influences its blood chemistry (Viñuela *et al.*, 1991; Wyk *et al.*, 1998; Haefele *et al.*, 2005). Comparisons between age classes obtained from this study are similar to findings from Dujowich *et al.*, in 2005 in captive California condors (*Gymnogyps californianus*) where differences were concentrated basically on condors less than 6 months, and chicks of Egyptian Vulture (*Neophron percnopterus ginnianus*) (Dobado-Berrios *et al.*, 1998). It requiring separate and interpret it as a separate group and young and adults are similar.

Of all parameters analysed only alkaline phosphatase, calcium and phosphorus showed differences in all species between age classes. These findings are comparable to those observed in nestling of Egyptian vultures (Dobado-Berrios *et al.*, 1998), free living spoonbills (*Platalea leucorodia*) (De le Court *et al.*, 1995), pigeons guillemots (*Cephus*

columba) (Seiser *et al.*, 2000), black vultures (*coragyps atratus*) (Villegas *et al.*, 2002) and free-living European starlings (*Sturnus vulgaris*) (Juráni *et al.*, 2004).

ALKP is an enzyme closely associated with the metabolism of calcium and phosphorus. This enzyme takes part in chondrogenic and osteoblastic activities and is associated with growth and secondary ossification of bones in birds (Viñuela *et al.*, 1991). Its activity is subject to hormonal control, and may therefore function as a key mechanism in the regulation of growth in birds (Viñuela and Ferrer, 1997). We observed higher ALKP concentration in chicks than juveniles and adults. Similarly, it was found in pigeons guillemots (Seiser *et al.*, 2000) and black vultures (Villegas *et al.*, 2002). The best evidence about lower activity of alkaline phosphatase in adults birds was given by a study of Dobado-Berrios and Ferrer (1998) on Spanish imperial eagles. Regression curves of alkaline phosphatase in nestlings, subadults and adults demonstrated an age-related decrease in this enzyme activity.

Calcium and phosphorous levels reflect an intense osteoblastic activity and bone metabolism required for somatic growth in nestlings (Viñuela *et al.*, 1991). In pigeons guillemots, calcium and phosphorous concentration in plasma were substantially higher in nestlings when compared with adults (Seiser *et al.*, 2000). Similarly, the nestlings of black kite (*Milvus migrans*) and red kites (*milvus milvus*) (Viñuela *et al.*, 1991) and Spanish imperial eagles (*aquila adalberti*) (Dobado-Berrios and Ferrer, 1997) showed higher levels of calcium and phosphorous than adults birds.

Therefore the higher alkaline phosphatase, calcium and phosphorus concentrations observed in chicks of these owls species are associated with the process bone mineralization and osteoblast activity during the growth period.

In the Strigidae family (Tawny owl, Little owl and Scops owl), the concentration of sodium and plasma gamma globulins also significantly increased with age. The lower concentration of plasma gamma globulins in chicks has been observed in free-living European starlings (Juráni *et al.*, 2004). The birds are physiologically equipped to produce antibodies from the 7-10 days old and consumption of passive maternal antibodies usually occurs at 28 days of life (Macari and Gonzales, 2003). This age is approximately

the same to that of group of chicks in our study, and this observed increase in young and adult's concentration can match with the development of active immunity (Conrado *et al.*, 2007).

Regarding the lower concentration of sodium in chicks than juveniles and adults, it has been observed in juvenile eclectus parrots (*Eclectus roratus*) by Clubb *et al.*, in 1991 too. Sodium is present mainly in the extracellular fluid and is primarily responsible for determining the volume of the extracellular fluid and its osmotic pressure (Hochleithner, 1994). We think this difference between chicks and juveniles/adults can be due to differences in state of hydration.

The other biochemical parameters showed significant differences in terms of age. This variability followed a different pattern depending on the species. This heterogeneity among the findings obtained by analysing blood chemistry with respect to age in a species of the same phylogenetic group has been previously documented (Bailey *et al.*, 1999; Dolka *et al.*, 2014). Our study was made by the same methodological protocol, therefore we believe that this variability may be due to genetic and metabolic variability between species and by the interaction with others biologic factors that influence blood chemistry. These factors are the sex and the differences in body size between species. In booted eagle (*Hieraaetus pennatus*), Casado *et al.*, in 2002 observed the interaction of age/sex affected plasma mean levels of creatine kinase, glucose, AST, uric acid and urea. Mean levels decreased with age, with adult females having the lowest concentrations. Besides, it has been suggested creatine kinase levels and glucose in plasma are inversely related to weight (Polo, 1995; Ferrer and Dobado-Berrios, 1998) and metabolic rate (Ferrer and Dobado-Berrios, 1998). In most species of owls, the females are larger than males, although the differences between the sexes are subtle and biometric ranges overlap (Baker, 1993) and there is a great variability of sizes between the species. In our study these parameters were uncontrolled and the effect was unknown. It is an explanation because the other biochemical parameters showed significant differences in terms of age between species.

This is the first study to establish biochemical RIs of Tawny Owl, Little Owl, Scops Owl, Long-eared Owl and Barn Owl determined by the same and specified methods by age classes. Differences between age classes were concentrated on chicks so this finding necessitated an independent reference interval for this age cohort. Any difference was observed in hematological parameters between juveniles and adults, and their values were grouped into one category.

We recommend that our results are used to guide the analysis of blood biochemistry of the species investigated, especially for populations of young animals housed in similar environmental conditions in centers of fauna recovery.

STUDY III

**Comparison of the novel semi-direct method
using manual Romanowsky-based Diff-Quick
stain with the Natt & Herrick method to WBC
count in birds**

ABSTRACT

Based on the staining affinity of heterophils and eosinophils in the step two of Diff-Quick stain, it has been proposed to test a novel modified semi-direct method for total leukocyte count (MSDTLC). This method performed well, with high precision, but it has been only compared with the estimated leukocyte count based on Romanowsky-stained blood smear. The purpose of this study was to compare this MSDTLC with the direct method of Natt & Herrick and to study the intra and inter-observer precision in samples from two species of birds with a different differential leukocyte counts, 20 samples. 10 of Tawny Owl (*Strix aluco*) and 10 of Griffon Vulture (*Gyps fulvus*) were used to calculate the WBC count by the two methods. A good correlation was observed. $r = 0.89$; no constant and/or proportional error was found. The Bias was 2.06 (95 % CI -6.44 to 10.57). The intra-observer imprecision of MSDTLC was higher (in tawny owl CV = 18.3% and griffon vulture CV = 14.3%) than the Natt & Herrick method. but the inter-observer imprecision was lower (in tawny owl CV = 24% and griffon vulture = 7%) than the Natt & Herrick method. The techniques did not produce equivalent results. MSDTLC method recently proposed by Aroch *et al.*, 2013 allowed reliable counting of both heterophils and eosinophils in tawny owl and griffon vultures blood samples and showed high precision and therefore could be used as an alternative of other semi-direct counting methods when direct hemocytometer method is not available.

INTRODUCTION

Total leukocyte count (TLC) is considered an important parameter of the complete blood cell (CBC) count as it allows to assess the defensive role of the individual, to evaluate the bird's health and disease state, to monitor the evolution of a pathological process and the responses to therapy and to help to establish the prognosis (Campbell and Ellis, 2007).

In birds, the absence of a validated and accurate automated technology to carry out a TLC due to the presence of nucleated red cells and thrombocytes forces the use of manual techniques based on estimates from Romanowsky-stained blood smear and/or direct or semi-direct hemocytometer counts (Walberg, 2001). These methods are based on the principle of diluting blood samples in a dye solution and to calculate the TLC per microliter (Dein *et al.*, 1994).

Estimation of cell numbers from blood films is considered a less accurate method for TLC than direct or semi-direct methods and should be used only when quantitative counts are unavailable (Weiss, 1984).

Direct hemocytometer count with Natt and Herrick's stain solution (Natt and Herrick, 1952) and semi-direct hemocytometer count with the commercial eosinophil Unopette 5877 (Costello, 1970) (Becton-Dickinson, Rutherford, NJ, USA) or Leukopet (VetLab Laboratory, Miami, FL, USA) based on the selective count of the heterophils and eosinophils combined with manual differential leucocyte count (DLC), are the most widely used methods in avian hematology to count TLC.

Both direct and semi-direct methods for TLC are complexes and time consuming. The direct method requires good differentiation between lymphocytes and thrombocytes and is complicated with presence of stained erythrocytes in the hemocytometer (Ammersbach *et al.*, 2015). The disadvantage of semi-direct method is that the determination of total leukocyte count depends on the DLC and it becomes

progressively less accurate with increasing proportion of mononuclears to granulocytes (Campbell and Ellis, 2007).

A modified semi-direct method for TLC (MSDTLC) in non - mamalian blood using the eosin-based dye solution that Romanowsky-based quick staining solutions include had been proposed recently (Aroch *et al.*, 2013). The investigators advocate that the method performed well, with high precision, allowing reliable counting of both heterophils and eosinophils in avian blood samples, but the results were only compared with those obtained from the blood smear.

The aim of the present study was to compare the MSDTLC above mentioned and the direct hemocytometer counting method with Natt and Herrick's stain solution in blood from two species of birds with different blood leukocyte counts, to assess it intra and inter accuracy and the agreement between methods.

Our hypothesis were two: the methods compared in this study will have a poor agreement, and the differences between the direct hemocytometer counting method with Natt and Herrick's stain solution and MSDTLC along with the variability that exists in the leukocyte blood counts of two different species of birds would cause differences in precision between methods.

MATERIALS AND METHODS

Animals

The study was conducted between 2010 and 2012 using 10 blood samples from Tawny Owl (*Strix aluco*) and 10 blood samples from Griffon Vultures (*Gyps fulvus*).

Tawny Owls were orphan wild chicks of unknown sex which came from a captive breeding programme at the Torreferrusa wildlife recovery center located in north-east of Spain (3° 19'-0 ° E y 42° 51'-40 31N). The animals were housed in individual cages located indoor on a substrate specialized of lawn. The diet of the birds was rats, mice,

quail and one-day-old chickens. Chicks were force feed with whole rat meat shredded until the time that the bird would self-feed.

The Griffon Vultures were adults of unknown sex and wild origin. The diet is based on cadavers of wild (mainly *Rupicabra pyrenaica*, *Cervus elaphus* and *Sus scrofa*) and domestic ungulates (*Ovis aries*, *Capra hircus*, *Bos Taurus*, *Equus caballus*, *His scrofa* var. dom.). They were captured between 2011 and 2012 in Navarra (625671.50 E, 4689727.54 N) (Spain) with portable trap with fixed lateral panels, 10x10 cm superior mesh nest and self-locking swinging doors (dimensions 5.2x5.2 m). In order to capture them we used a bait of cadavers of beef into the trap.

Blood samples collection

Blood samples were obtained from the right jugular vein of tawny owls manually restrained, using disposable needles 25G and 1 ml plastic syringes. The time of blood extraction was between 9 and 11 a.m. From each griffon vulture physically restrained, 10 ml of blood were collected from the ulnar vein wing using disposable needles 21G.

Microtainers tubes (Becton-Dickinson and Co., Franklin Lakes. NJ. USA) were used for tawny owls, and tubes of 4ml for griffon vulture. In both species EDTAK₃ (1.5 mg/ml blood) was the anticoagulant. Samples were maintained in a portable icebox until the arrival at the laboratory.

Any animal with signs of disease, unhealed injuries, anorexia, or weight loss was excluded from the study. The samples were free of hemolysis and lipemia and were analyzed in the first 24 hours after the extraction. After sampling, blood smears were prepared immediately and later stained using Wright's stain (Merck, Darmstadt, Germany). Differential count were evaluated microscopically (at X100 magnification) by counting 200 cells.

Total leucocyte count

TLC for each bird was counted using two methods: direct hemocytometer count with Natt and Herrick's solution and the semi-direct hemocytometer count with eosin-based stain solution that the Romanowsky-base quick stain solution Diff-Quik (Química Aplicada, Tarragona, España) contains combined with manual DLC in Wright's- stained blood smears.

Direct leucocyte count was carried out adding 10 μ l of blood to 990 μ l of Natt and Herrick's solution. After 5 minutes TLC was obtained by counting all the leukocytes, which stain in dark blue, in the nine large squares of the hemacytometer chamber using the following formula:

$$\text{TLC (cell/ } \mu\text{l)} = (\text{blue cells in the nine large squares of the hemacytometer} * 1.1) * 100$$

(dilution factor)

TLC value of each animal was calculated from the average of two counts obtained in both grids of the chamber and only were selected the results that did not differ by more than 10% (Campbell and Ellis, 2007).

MSDTLC was achieved adding 10 μ l of blood to 990 ml of 1:10 Diff-Quik's buffered eosin solution with distillate water. Within 15 minutes of staining, all orange stained cells were counted in 9 large squares in both sides of the hemocytometer's grid area. The formula used to calculate the total number of heterophils and eosinophils (THEC) was:

$$\text{THEC (cell/} \mu\text{l)} = (\text{orange cells in the nine large squares of the hemacytometer} * 1.1) * 100$$

(dilution factor)

A DLC in Wright's-stained blood smears were performed and the percentage of heterophils and eosinophils was obtained. The TLC was calculated as follows:

$$\text{TLC} = \text{THEC (cell/} \mu\text{l)} / (\% \text{ heterophils} + \% \text{ eosinophils}) * 100.$$

TLC value of each animal was calculated from the average of two counts obtained in both grids of the chamber and again only were selected the results that did not differ by more than 10% (Campbell and Ellis, 2007).

Statistical methods

Imprecision of MSDTLC method using the eosin-based dye solution that Romanowsky-based quick stain solution Diff-Quik contains (Method 1) and the direct hemocytometer count method with Natt and Herrick's stain solution (Method 2) was calculated from the coefficient of variation ($CV = SD \times 100 / \text{mean}$) analysis. The intra-observer imprecision was obtained from six samples replicates three times each one analyzed by one technician (SA), $n = 18$. The inter-observers imprecision was obtained from the coefficient of variation from 20 samples replicates two times each one analyzed by two different technicians (SA and RC), $n = 40$

The combined inherent imprecision of different methods was calculated CV both

$$\text{methods} = \sqrt{(CV^2 \text{method1} + CV^2 \text{method2})}$$

Method comparison was conducted by the Pearson's correlation coefficient (r). An r value of 0.90 to 1.0 was considered very high correlation; 0.70 to 0.89 was high correlation; 0.50 to 0.69 moderate correlation; 0.30 to 0.49, low correlation and 0 to 0.29, little, if any correlation (Zady, 2000). Weighted Deming fit linear regression analysis was used to detect constant and proportional error with their 95% confidence intervals (CI). The constant error is represented by the intercept of the regression line and should be different from 0 to be significant, whereas the proportional bias is represented by the slope of the regression line and should be different from 1 to be significant include in the (Greenacre *et al.*, 2008).

Because it is not possible in non-mammalian blood samples to perform an automated total leukocyte count and therefore to have a "gold standard" method the inherent errors and inaccuracy of the direct hemocytometer count with Natt and Herrick's stain solution must be accepted instead. Analysis of differences was made by Bland Altman test. Agreement was considered good when the bias (mean of the differences) was small, the 95% confidence intervals for the bias were narrow and no outliers were present (no values fell outside the limits of agreement) (Papasouliotis *et al.*, 2006). Acceptance limits represent the acceptability based on inherent imprecision of both methods. If <95% of differences for WBC were within the calculated acceptance limits.

this was considered sufficient evidence to reject the null hypothesis that there was no difference in the results generated by the two counting methods employed (Harr *et al.* 2011).

The statistical analysis was done by the free trial of Analyse-it Method Validation program (Leeds. United Kingdom).

RESULTS

Data of intra and inter-observers imprecision are presented in Table 1. Intra-observer imprecision of MSDTLC using the eosin-based dye solution that Romanowsky-based quick stain Diff-Quik solution includes was higher than that of the direct hemocytometer count with Natt and Herrick's stain solution. For both of the avian species, inter-observers imprecision values were lower when MSDTLC method other than direct hemocytometer count with Natt and Herrick's stain solution was employed. The agreement between white blood cells counting techniques is presented in Table 2. Total Pearson's correlation coefficient was $r = 0.89$; it was $r=0.72$ for tawny owl and $r= 0.86$ for vultures. In the Deming fit regression, when we analyzed two species ($n = 20$) we didn't observed a constant error, bias = - 1.08 with a 95% CI (-10.18 to 8.02) or proportional ($p=0.73$), bias = 1.03 with a 95% CI (0.65 to 1.4). For tawny owl we didn't observed a constant error (bias = -2.57), with a 95% CI (-24.41 to 19.27) or proportional (bias = 1.14), with a 95% CI (-0.12 to 2.4). For vultures we didn't observed a constant error (bias = -3.76) with a 95% CI (-23.33 to 18.81) or proportional (bias =1.1), with a 95% CI (0.4 to 1.8).

In Agreement Bland-Altman test, the agreement was fair ($p=0.05$), when we analysed the two of the species ($n = 20$) 18 of 20 bias for WBC were in the acceptance limits (-6.41 to 10.57) (Graphic 1). When we analysed by specie in tawny owl 9/10 bias were in the acceptance limits (-6.5 to 13.06), (Graphic 2). And in griffon vulture 10/10 bias was in the acceptance limits (-5.79 to 7.54) (Graphic 3).

Table 1. Inherent imprecision intra-observer, inter-observer and combined imprecision for total white blood cell counts's Method 1 and Method 2 by species.

	n	CV_{Method1}	CV_{Method2}	Combined imprecision
intra-observer				
Total	18	16.30%	8.50%	18.38%
Tawny Owl	9	18.30%	9.30%	20.50%
Griffon Vulture	9	14.30%	7.60%	16.20%
inter-observer				
Total	40	14.00%	22.00%	26.08%
Tawny Owl	20	24.00%	35.00%	42.44%
Griffon Vulture	20	7.00%	10.00%	12.21%

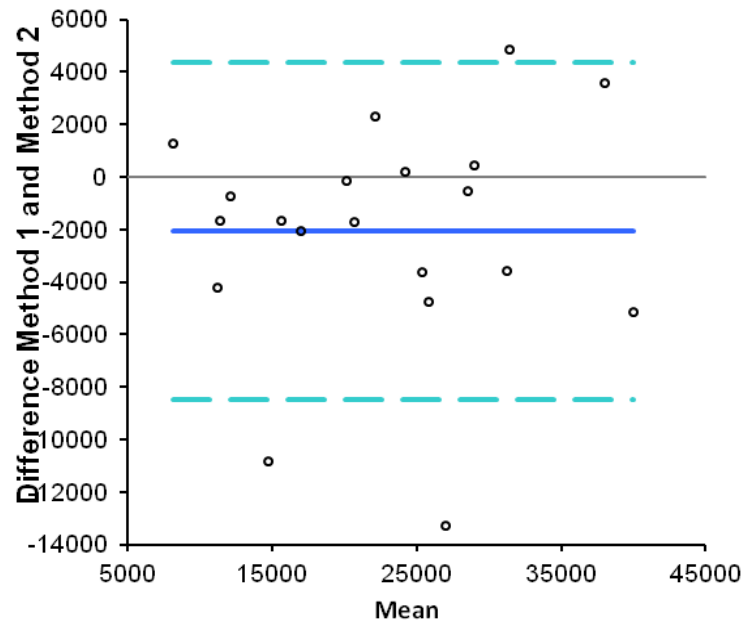
Abbreviations: CV indicates coefficient of variation; Method 1 = MSDTLC using the eosin-based dye solution that Romanowsky-based quick stain solution Diif-Quik includes; Method 2= direct hemocytometer count with Natt and Herrick's stain solution.

Table 2. Agreement between MSDTLC method using the eosin-based dye solution that Romanowsky-based quick stain solution Diff-Quik includes and direct hemocytometer count method with Natt and Herrick's stain solution for total samples and by species.

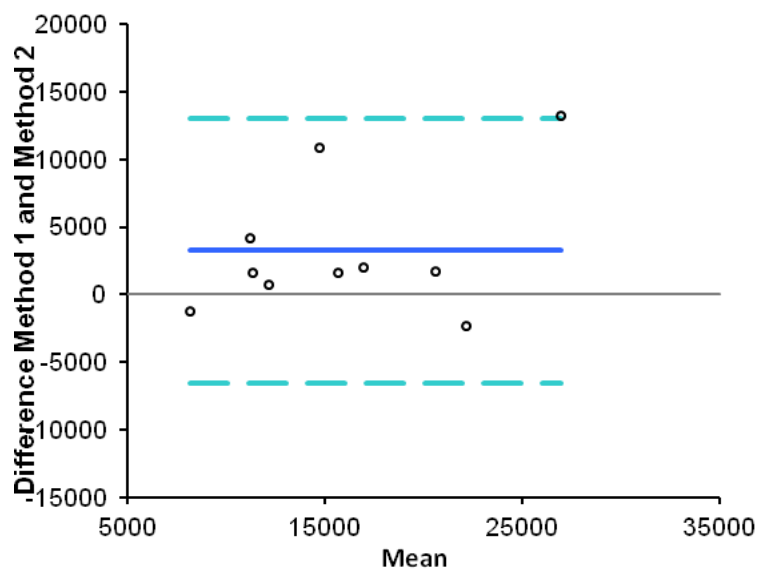
	PEARSON		REGRESSION ANALYSIS			DIFFERENCE PLOT IMPRECISION ANALYSIS		
	r	Intercept	95% CI	Slope	95% CI	Mean difference	95% CI	Diff. inside AL
Total	0.89	-1.08	-10.17 to 8.02	1.03	0.65 to 1.4	2.06	-0.03 - 4.09	18/20
Tawny owl	0.72	-2.57	-24.41 to 19.27	1.14	-0.12 to 2.4	3.25	-0.33 - 6.83	9/10
Griffon vulture	0.86	-3.76	-23.33 to 18.81	1.10	0.40 to 1.80	0.88	-1.55 - 3.31	10/10

Abbreviations: r: Pearson's correlation coefficient. CI: interval confidence; Diff. inside AL: differences inside acceptance limits.

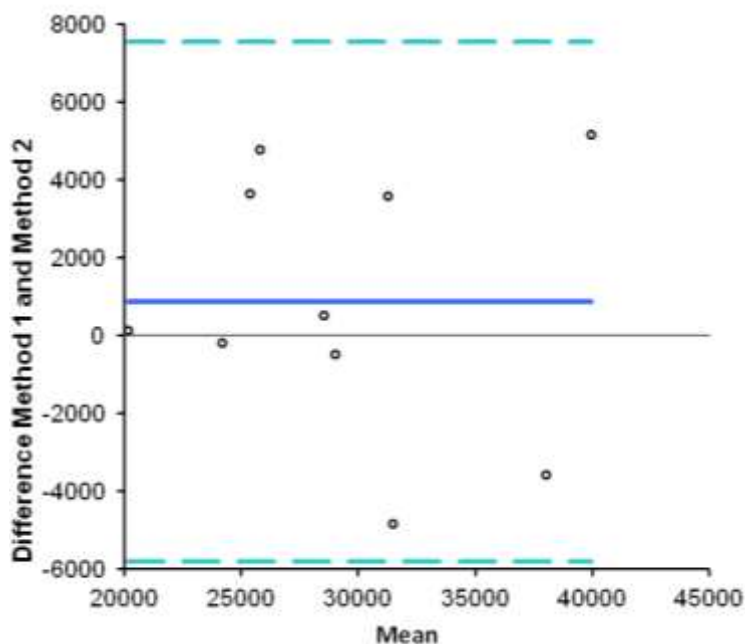
Graphic 1. Bland-Altman Plot for total samples showing the Bias (blue line) and Limits of agreement (blue dotted line). Method 1 = MSDTLC using the eosin-based dye solution that Romanowsky-based quick stain solution Diff-Quik includes; Method 2= direct hemocytometer count with Natt and Herrick's stain solution



Graphic 2. Bland-Altman plot for Tawny Owl showing the Bias (blue line) and Limits of agreement (blue dotted line). Method 1 = MSDTLC using the eosin-based dye solution that Romanowsky-based quick stain solution Diff-Quik includes; Method 2= direct hemocytometer count with Natt and Herrick's stain solution.



Graphic 3. Bland-Altman plot for Griffon Vulture showing the Bias (blue line) and Limits of agreement (blue dotted line) Method 1 = MSDTLC using the eosin-based dye solution that Romanowsky-based quick stain solution Diff-Quik includes; Method 2= direct hemocytometer count with Natt and Herrick's stain solution.



DISCUSSION

Direct hemocytometer white blood cell counting method with Natt and Herrick's stain solution is complex and time-consuming procedure for avian blood study. One of the most employed counting methods in non-mammalian species blood has been until now Unopette 5877 kit. This is a semi-direct hemocytometer counting method which uses phloxine –B dye as staining reagent; heterophils and eosinophils stain positively. Total white blood cell count can be obtained combining total number of these cells per microliter with a manual differential leucocyte count in Romanowsky-stained blood smears. Nowadays the production and marketing of the system however has ceased.

Aroch *et al.*, 2013 recently studied the precision of a MSDTLC using the diluted commercially-available eosin-base dye included in Romanowsky base quick stain in 13

psittacine birds. The authors concluded that the method performed well, with high precision and allows reliable counting of heterophils and eosinophils in avian blood samples. Nevertheless the authors did not compare the method with others.

The aim of this study was to compare the MSDTLC method recently proposed with the direct hemocytometer count method with Natt and Herrick's stain solution for counting the white blood cell in two species of birds with different blood leukocyte counts, to assess it intra and inter-observers imprecision and the agreement between both methods.

Intra and inter- observers CVs reported here for both counting methods are acceptable according to that accepted for manual total leukocyte count methods in non-mammalian species (reported CV of 20-40%) (Vap *et al.*, 2012). Higher intra-observer precision was obtained in both species using the direct hemocytometer count regarding the MSDTLC method. This could be due to the experience of the technician who conducted the study who is more accustomed to perform the direct hemocytometer counting since it is this which is usually performed in the lab.

For both species the MSDTLC method showed a major precision between technicians than the direct hemocytometer count being higher in vultures than in owls. Semi-direct counting methods are more precise than the direct hemocytometer count and provide more reproducible values between laboratories (Walton. 2001).

We have obtained a higher Pearson's correlation coefficient ($r = 0.89$) between the counting methods employed in our work than that obtained by Ammersbach *et al.*, (2015) when comparing different manual blood cell counting techniques. These authors employed only blood samples of Strigiformes. In these species lymphocytes are very abundant and direct hemocytometer count with Natt and Herrick's stain solution was more difficult to perform due to the similar staining properties of lymphocytes and thrombocytes. This differentiation is important as lymphocytes should be included into the count while thrombocytes should not. We have employed not only owls blood samples but vultures blood samples. Griffon vulture has high number of heterophils and eosinophils which can be easily identified, decreasing the error of direct hemocytometer

count method as well as a higher white blood cell count than owls. It has been observed that agreement between techniques is improved with high counts of WBC (Ammersbach *et al.*, 2015).

Constant or proportional errors were not observed in any of investigated species and therefore it suggested a random error and that no corrective formula could be applied to approximate the results of methods (Walton. 2001).

When we analyzed two species (n = 20) substantial disagreements were evidenced between the MSDTLC using the eosin-based dye solution that Romanowsky-based quick stain solution Diff-Quik includes and the direct hemocytometer count with Natt and Herrick's stain solution based on inherent imprecision of both methods. 17 of 20 samples for WBC were in the acceptance limits therefore, we considered this was not sufficient evidence to reject the null hypothesis and that there was difference in the results generated by two methods. However differences by species were observed in the degree of agreement between methods. The differences in the acceptance limits were 9/10 in tawny owl and 10/10 in griffon vulture.

In avian hematology, the semi-direct leukocyte count methods are commonly used at laboratory more popular because it use is simple; the cells are quickly distinguishing and the method provides more reproducible values between laboratories. In addition to direct leukocyte count is complex and requires an experienced technician and estimation counts on blood smears are very imprecise. The results of this study showed that MSDTLC and the direct hemocytometer count with Natt and Herrick's stain solution were not equivalent. MSDTLC method recently proposed by Aroch *et al.*, 2013 allowed reliable counting of both heterophils and eosinophils in tawny owl and griffon vultures blood samples and showed high precision and therefore could be used as an alternative of other semi-direct counting methods when direct hemocytometer method is not available.

Discusión general

Las amenazas a la biodiversidad como son la disminución y fragmentación del hábitat, el cambio climático, la invasión de especies halóctonas y la sobreexplotación del medio ambiente convierten a las rapaces nocturnas en pacientes habituales de los centros de recuperación de fauna silvestre. La última evaluación de BirdLife Internacional reveló que el 64% de las especies de aves de presa en Europa se encuentran en un estado desfavorable (BirdLife Internacional, 2004). Este estado alarmante de sus poblaciones ha obligado a protegerlas legalmente por el Real Decreto 139/2011, de 4 de Febrero de 2011 cuyo objeto es desarrollar y en concreto regular, entre otros objetivos, las características, contenido y procedimientos de inclusión, cambio de categoría y exclusión de especies en el Listado de Especies Silvestres en Régimen de Protección Especial y en el Catálogo Español de Especies Amenazadas. En el anexo de este Real Decreto 139/2011, las rapaces nocturnas se incluyen como “vulnerables” en la categoría del Catálogo Español de Especies Amenazadas”.

El uso de la hematología y la bioquímica sanguínea en estas especies, constituye una ayuda en el diagnóstico de sus enfermedades, el establecimiento del pronóstico y el control del progreso del tratamiento (Campbell y Ellis, 2007). Además, su empleo en los centros de recuperación de fauna salvaje ayuda a detectar las enfermedades subclínicas, permite valorar el estado previo a la liberación y ayuda en la toma de decisiones para nuevas admisiones en función de las posibilidades de supervivencia de los animales.

El estado de salud, las deficiencias nutricionales entre poblaciones o los estados de inmunosupresión debido a factores estresantes de las poblaciones silvestres de las rapaces, pueden ser también valorados mediante la hematología y la bioquímica sanguínea (Wyk *et al.*, 1998, Cooper 2002). A causa de que las rapaces se encuentran en la cima de muchas cadenas tróficas, su estado de salud también puede reflejar la salud global de los ecosistemas (Cooper 2002). Alteraciones en sus parámetros hematológicos y bioquímicos pueden indicar cambios en la calidad del hábitat y en la disponibilidad de alimento o pueden reflejar la exposición a agentes contaminantes o toxinas (Hoffman *et al.*, 1985; Bowerman *et al.*, 2000; Seiser *et al.*, 2000).

A pesar de lo dicho, el desarrollo de estas disciplinas en las rapaces todavía no ha alcanzado su máximo potencial, ya que para ello se requiere la obtención de los intervalos de referencia (IR) de cada especie, y un conocimiento de cómo los estímulos fisiológicos y patológicos alteran la respuesta individual (Smith y Bush, 1978).

Muchas investigaciones se han centrado en determinar los intervalos de referencia hematológicos y bioquímicos de muchas especies de aves en general y de rapaces en particular, cuyos resultados están disponibles en bases de datos como son ISIS (www.ISIS.org) y LYNX (Bennett *et al.*, 1991).

Nuestro trabajo constituye el primer estudio que establece los intervalos de referencia de hematología y bioquímica sanguínea en el mochuelo y el autillo europeo y amplía los publicados previamente por otros investigadores sobre el búho chico (Ammersbach *et al.*, 2015), el cárabo (Spagnolo *et al.*, 2008) y la lechuza común (Cooper, 1976; Smith y Bush, 1978; Szavo *et al.*, 2014; Ammersbach *et al.*, 2013, 2015).

Los valores obtenidos en nuestro estudio presentaron diferencias respecto a previamente publicados en el búho chico, cárabo y la lechuza común, poniendo en evidencia las dificultades que en especial pueden aparecer durante la obtención de los IRs hematológicos y bioquímicos en fauna salvaje.

Uno de los factores que condiciona la obtención de IRs precisos es la selección de los individuos de referencia, es decir aquellos escogidos para realizar el estudio, en base a criterios bien definidos. Se asume que estos individuos de referencia son sanos y sin embargo, la salud es relativa y carece de una definición precisa y cuantificable, puesto que la definición de la Organización Mundial de la Salud no es transferible a los animales (Geffré *et al.*, 2009). Las especies de vida silvestre tienden a enmascarar cualquier signo de enfermedad, lo que dificulta la identificación de animales enfermos y hace que sea más difícil establecer el estado de salud a partir de los criterios que el estudio establezca. Este hecho plantea la posibilidad de incluir ejemplares enfermos como individuos de referencia para el estudio (Walton, 2001).

El tamaño muestral es otro factor importante a la hora de establecer IRs. En algunas poblaciones animales (animales exóticos y de vida libre) es muy difícil alcanzar el

número mínimo recomendado; sin embargo se recomienda que sea tan alto como sea posible (Geffré *et al.*, 2009). Los estudios de Cooper en 1975 y Smith y Bush, en 1978 sobre la lechuza común, y el trabajo de Spagnolo *et al.*, realizado en 2008 sobre el cárabo común no presentaban un tamaño muestral adecuado y por tanto las conclusiones sobre los valores de referencia de estos trabajos no son representativas del total de la especie. Los resultados de nuestro trabajo, presentados aquí, se han obtenido a partir de un número de individuos superior a de los estudios previamente citados por lo que pueden aproximarse más a los del total de la especie ya que cuanto menor es el tamaño muestral, mayor es el grado de incerteza en la estimación de los límites de referencia.

Para reducir la variación que no se deba a la variabilidad inter o intra-individuos es importante prestar atención a los efectos adversos potenciales de los factores biológicos y preanalíticos (especie; subespecie; edad; sexo; nivel de ejercicio; dieta; localización geográfica; altitud; fotoperiodo; estrés; tipo, método de recogida y manejo de la muestra). Las muestras obtenidas de los individuos se han de analizar utilizando métodos rigurosamente controlados y con procedimientos de control de calidad apropiados (Friedrichs, *et al.*, 2012). La interacción que puede establecerse entre todos los factores mencionados sobre los valores hematológicos y bioquímicos sanguíneos en las aves, desemboca en una gran variabilidad de resultados que dificulta la comparación entre estudios (Cray, 2015).

En base a lo mencionado nuestro trabajo valoró el efecto de la edad sobre los resultados de los parámetros hematológicos y bioquímicos sanguíneos de las cinco especies de rapaces nocturnas ibéricas estudiadas. El análisis estadístico entre las clases de edad ($P < 0.01$), mostró que es necesario aportar un intervalo de referencia independiente para los pollos y que sin embargo, los individuos juveniles y los adultos pueden agruparse en una misma categoría.

Los resultados de nuestro estudio muestran que dentro del orden de las Estrigiformes se produce un incremento con la edad en el recuento total de eritrocitos, valor hematocrito y en las concentraciones de hemoglobina. Por el contrario, la concentración de fósforo y la actividad de la fosfatasa alcalina disminuyeron con la

edad. Adicionalmente, dentro de la familia Strigidae (cárabo común, mochuelo y autillo europeo) se observó un incremento en las concentraciones de gamma globulina y sodio, y un descenso de la cifra total de leucocitos y de la concentración de calcio con la edad.

Estos resultados son comparables a los hallazgos observados en otras especies de aves (Hawkey. *et al.*, 1984; De le Court *et al.*, 1995; Montesinos *et al.*, 1997; Dobado-Berrios *et al.*, 1998; Seiser *et al.*, 2000; Lanzarot *et al.*, 2001; Howlett. *et al.*, 2002; Villegas *et al.*, 2002; Gayathri *et al.*, 2004; Juráni *et al.*, 2004; Haefele *et al.*, 2005; Moreira dos Santos *et al.*, 2009; Jones *et al.*, 2014) y han sido asociados a las modificaciones características que acontecen durante la fase de pollo de las aves como son la preparación al vuelo (Montesinos *et al.*, 1997; Lanzarot *et al.*, 2001), la mineralización ósea (Ferrer *et al.*, 1999) y el comienzo de la inmunidad activa (Karesh *et al.*, 1997; Conrado *et al.*, 2007).

No hemos observado una tendencia común dentro del grupo de aves estudiadas respecto a la edad, en el recuento diferencial leucocitario que podría haber sido enmascarada por la imprecisión inherente de la metodología manual (Vap *et al.*, 2012) en la realización de estos recuentos. En hematología aviar, debido a las limitaciones metodológicas con las técnicas automatizadas que impiden que haya una técnica de referencia, los recuentos leucocitarios totales y diferenciales se deben obtener por métodos manuales (Campbell y Ellis, 2007). Un estudio realizado por Kjelgaard-Hansen en 2006 sobre muestras sanguíneas de perros y gatos, demostró que en un recuento leucocitario obtenido sobre la extensión sanguínea tras contar 200 células, ya sólo el coeficiente de variación del muestreo excedía el coeficiente de variación máximo en todos los tipos celulares excepto para los neutrófilos. En base a esta afirmación, nuestros recuentos leucocitarios diferenciales se realizaron sobre 200 células y con una técnica imprecisa al no disponer, como hemos mencionado de una técnica de referencia.

La gran diversidad de resultados observada en el resto de parámetros hematológicos y bioquímicos en función de la edad entre las cinco especies comparadas, la atribuimos a la complejidad del proceso de crecimiento que conlleva numerosas interacciones entre

el sistema endocrino y otros factores de tipo genético, nutricional y ambiental (Kjelgaard-Hansen *et al.*, 2006) que no fueron controlados en este estudio. Entre los factores más importantes destacamos el estrés, el sexo y el tamaño corporal.

El estrés producido por las actividades de captura y manejo, así como por ciertas interacciones sociales y ambientales es uno de los estímulos más relevantes capaz de provocar variaciones en los parámetros sanguíneos en las aves salvajes mantenidas en cautividad. El estrés altera el recuento leucocitario (Gross y Siegel, 1983) produciendo leucocitosis, heterofilia, linfocitosis o linfopenia (Fudge, 2000). A nivel de la bioquímica sanguínea incrementa los niveles de las enzimas CK y AST. Estos incrementos pueden variar en función de la metodología empleada (Franson *et al.*, 2009) y/o el periodo de tiempo transcurrido posterior a la captura (Bailey *et al.*, 1999). El incremento observado en nuestro estudio en los valores de la actividad de la CK y la AST apoya esta afirmación.

Respecto a la interacción edad/sexo y edad/tamaño corporal, Casado *et al.*, en 2002 observaron en águilas calzadas (*Hieraetus pennatus*) que la actividad de la CK y las concentraciones de glucosa, ácido úrico y urea descendían con la edad y que las hembras adultas era el grupo que presentaba los valores más bajos de estos parámetros. Polo, (1995) y Ferrer y Dobado-Berrios, (1998) han sugerido que la actividad y la concentración plasmática de la CK y la glucosa, respectivamente son inversamente proporcionales al peso y a la tasa metabólica. Dentro del orden de las Estrigiformes en general, y entre las cinco especies investigadas en particular, existe una gran variabilidad de tamaños corporales, desde el autillo con un peso comprendido entre los 60-145 g, hasta el cárabo común con un intervalo de peso de 336-695 g y dentro de la misma especie, las hembras suelen ser mayores que los machos (Baker, 1993).

En el cárabo común, el mochuelo europeo, autillo europeo y la lechuza común, las diferencias en el recuento total de eritrocitos y leucocitos, el valor hematocrito, las concentraciones de hemoglobina, fósforo, calcio, gamma globulina y sodio junto a la actividad de la fosfatasa alcalina, entre pollos y juveniles/adultos se estabilizaron cuando los individuos alcanzaron la longitud de tarso de adulto. Este resultado

confirma la relación de las variaciones hematológicas y bioquímicas sanguíneas al periodo de crecimiento de las aves. En el autillo europeo no se observó esta tendencia y, aunque desconocemos su causa, sospechamos que puede deberse a particularidades propias de esta especie.

La gran variabilidad observada en los valores de gran parte de los parámetros bioquímicos que han sido analizados bajo las mismas condiciones pre-analíticas y analíticas, en las cinco especies de aves tan estrechamente emparentadas desde el punto de vista filogenético, pone en evidencia que dentro del orden Estrigiforme, los IRs de la gran mayoría de parámetros hematológicos y bioquímicos son específicos de especie. A su vez, las similitudes encontradas entre las concentraciones de colesterol, albúmina y osmolaridad plasmática del cárabo común, mochuelo europeo, autillo europeo y lechuza confirman la existencia de parámetros uniformes dentro del grupo, lo que permiten la extrapolación de sus valores a otras especies afines cuyos intervalos de referencia aún no han sido establecidos. Sería interesante realizar nuevos estudios que profundicen en el conocimiento de la fisiología de éste y otros grupos filogenéticos con el objetivo de detectar si la uniformidad entre la concentración de albúmina y la osmolaridad plasmática, se debe a una homología en el proceso de homeostasis hídrica dentro de un mismo orden de aves.

Una vez expuestas las dificultades que existen en la obtención de IRs en todas las especies, pero aún más en animales de la fauna salvaje aconsejamos que los IRs de los parámetros hematológicos y bioquímicos aportados en nuestro estudio se utilicen como guía de referencia para las especies investigadas, especialmente para poblaciones de animales alojados en condiciones ambientales similares en centros de recuperación de fauna salvaje.

En la segunda parte de este trabajo de tesis doctoral quisimos valorar la modificación propuesta por Arock *et al.*, 2013 de un método semi-directo de recuento total leucocitario ya existente y determinar su grado de relación con el método directo hemocitométrico de Natt y Herrick, que tradicionalmente se emplea en la sangre aviar, en los laboratorios.

En hematología aviar, la ausencia de una metodología automatizada validada (Lilliehöök *et al.*, 2004) para el recuento total y diferencial de leucocitos debido a la presencia de núcleo de eritrocitos y trombocitos, obliga a la gran mayoría de laboratorios a emplear técnicas manuales hemocitométricas directas o semidirectas o bien a realizar estimaciones del número total de leucocitos a partir de la extensión sanguínea.

La estimación del TLC es laboriosa, imprecisa y requiere experiencia en la identificación de los tipos leucocitarios de las aves (Zinkl, 1986). Las técnicas manuales hemocitométricas, aunque más precisas también tienen sus limitaciones. El método directo de Natt and Herrick requiere a un técnico experimentado que lleve a cabo una correcta diferenciación de los linfocitos de pequeño tamaño y los trombocitos (Ammersbach *et al.*, 2015). Los métodos semi-directos requieren adicionalmente al recuento de heterófilos y eosinófilos en cámara, la realización de un recuento diferencial leucocitario. A pesar de que son más precisos que el método directo, se vuelve progresivamente más inexacto conforme aumenta la proporción de mononucleares sobre los granulocitos (Campbell y Ellis, 2007).

Las técnicas semi-directas son las más populares en los laboratorios ya que los heterófilos y eosinófilos que se tiñen con la floxina B son fácilmente distinguibles y proporcionan valores de TLC más reproducibles entre laboratorios (Walton, 2001). En la actualidad, el *kit* que permitía estos recuentos semi-directos, no está disponible en el mercado y recientemente se ha propuesto una modificación del método semi-directo (MSDTLC, Aroch *et al.*, 2013) para realizar el recuento total de leucocitos. El método MSDTLC utiliza el colorante eosinofílico del segundo paso de la tinción rápida tipo Romanowsky, Diff Quick, muy popular y ampliamente utilizada en todos los laboratorios. A pesar de que los autores de este trabajo concluían que el método funcionaba bien, presentaba una alta precisión y permitía un recuento fiable de heterófilos y eosinófilos en 13 especies aviares, el método no había sido comparado con otros reconocidos en hematología aviar.

En base a ello, nuestro estudio comparó la modificación propuesta del método semi-directo con el método directo de Natt y Herrick y calculó la imprecisión intra e inter

observador para ambos métodos y el acuerdo entre ellos, en dos especies de aves con diferencias en sus recuentos diferenciales.

La mayor precisión entre observadores obtenida en nuestro trabajo con el método MSDTLC coincide con los resultados publicados previamente por otros investigadores que señalan que los métodos semi-directos basados en el recuento de heterófilos y eosinófilos obtenido en la cámara, unido al recuento diferencial sobre la extensión sanguínea, son más objetivos y ofrecen resultados más reproducibles entre laboratorios (Ammersbach *et al.*, 2015). Concretamente, el valor del CV entre técnicos para el método MSDTLC ha sido en nuestro estudio del 7% en el buitre leonado, coincidiendo con el descrito por Dein *et al.*, 1994 (CV 6.8%) con el uso del sistema Unopette 5877 (Becton – Dickinson, Rutherford, NJ).

Cuando se analizaron las dos especies conjuntamente, se observó que a pesar de que los métodos guardaban una alta correlación, el error aleatorio era muy alto y por tanto la comparación entre métodos debe interpretarse con precaución. El error cometido con el método directo de Natt y Herrick, se basa en la diferenciación correcta entre los linfocitos de pequeño tamaño y los trombocitos (Ammersbach *et al.*, 2015); el error cometido con el método semi - directo MSDTLC, se basa en la obtención de los porcentajes de heterófilos y eosinófilos por estimación sobre la extensión sanguínea (Kjelgaard-Hansen *et al.*, 2006).

El grado de correlación entre métodos, especialmente en el buitre leonado, fue superior al obtenido por Ammersbach *et al.*, (2015) con muestras sanguíneas de 13 especies de estrigiformes. La explicación podría deberse al alto porcentaje de heterófilos y eosinófilos que presenta el buitre, hecho que reduce el error por estimación en el método MSDTLC, unido al bajo porcentaje de pequeños linfocitos, que rebaja el error asociado al método directo de Natt y Herrick. En segundo lugar, esta especie presenta recuentos leucocitarios totales elevados y este hecho mejora la concordancia entre métodos (Ammersbach *et al.*, 2015).

Los resultados presentados aquí muestran que el método modificado de recuento leucocitario total, MSDTLC recientemente propuesto, permite un recuento fiable tanto de heterófilos como de eosinófilos en las muestras sanguíneas de cárabo común y de

buitre leonado, muestra una alta precisión y por tanto puede ser empleado como alternativa de otros métodos semi-directos, cuando el método hemocitométrico directo no está disponible.

Conclusiones

1. Los Intervalos de Referencia de la mayoría de los parámetros hematológicos y bioquímicos descritos en este trabajo son específicos de especie y por tanto se deben utilizar tan solo como una guía de referencia para las especies aviares estudiadas, sometidas a condiciones semejantes a los animales de nuestro estudio.
2. En las cinco especies aviares estudiadas; cárabo común, mochuelo común, autillo europeo, búho chico y la lechuza común, la edad de los animales influye en los valores hematológicos y bioquímicos; por ello, los pollos deben ser considerados en grupo diferente al de individuos juveniles y adultos.
3. Las similitudes observadas entre las concentraciones de albúmina y la osmolaridad plasmática en las especies estudiadas cárabo común, mochuelo europeo, autillo europeo y la lechuza común, sugieren la hipótesis de un mecanismo uniforme en la homeostasis hídrica dentro del orden de las Estrigiformes.
4. El método MSDTLC recientemente propuesto por Aroch *et al.*, 2013 permite el recuento fiable de leucocitos en las aves y muestra una alta precisión.
5. En aves con un alto número de leucocitos, heterófilos y eosinófilos es más recomendable el método MSDTLC para realizar el recuento total leucocitario a la estimación sobre la extensión de sangre, si el método hemocitométrico directo y un técnico experimentado no están disponibles.

Bibliografía

Acierno MJ, Mitchell MA, Freeman DM, Schuster PJ, Sanchez-Migallon D, Tully TN. Determination of plasma osmolality and agreement between measured and calculated values in healthy adult Hispaniolan Amazon parrots (*Amazon ventralis*). *AJVR*. 2009;70:1151-1154.

Alonso-Alvarez C, Velando A, Ferrer M, Veira. Changes in Plasma Biochemistry and Body Mass During Incubation in the Yellow-legged Gull. *Waterbirds*. 2002;25:253-258.

Ammersbach M, Beaufrère H, Gionet A, Hoff B. Normal Hematologic parameters on 11 species of owls. *Vetcom*. 2013;52:23-25.

Ammersbach M, Beaufrère H, Gionet Rollick A, Tully. Laboratory blood analysis in Strigiformes-Part I: hematologic reference intervals and agreement between manual blood cell counting techniques. *Vet Clin Pathol*. 2015;44: 94–108.

Ammersbach M, Beaufrère H, Gionet Rollick A, Tully T. Laboratory blood analysis in Strigiformes-Part II: plasma biochemistry reference intervals and agreement between Abaxis Vetscan V2 and the Roche Cobas c501. *Vet Clin Pathol*. 2015;44:128-40.

Aroch I, Targan N, Gancz AY. A novel modified Semi-direct Method for Total Leucocyte Count in Birds. *Israel J Vet Med*. 2013;68:111-118.

Artacho P, Soto-Gamboa M, Verdugo C, Nespolo R. Using haematological parameters to infer the Elath and nutritional status an endangered Black-necked swan population. *Comp Biochem Phys A*. 2007;147:1060–1066.

Awadhiya RP, Vegad JL, Kolte GN. Demonstration of the phagocytic activity of chicken thrombocytes using colloidal carbon. *Res Vet Sci*. 1980;29:120-122.

Bailey TA, Wernery U, Howlett J, Naldo J, Samour JH. Age-related plasma chemistry and kori bustard in the United Arab Eemirates. *J Wildlife Dis*. 1999;35:31-37.

Balasch J, Musquera S, Palacios L, Jimenez L, Palomeque J. Comparative hematology of

some falconiforms. *Condor*. 1976;78:258-273.

Baucells J, Vila P. Els rapinyaires nocturns a Osona. Contribució al seu coneixement i conservació. *Ausa*. 2002;150:707-724.

Beaman M, Madge S. *Guía de identificación. Aves de Europa, norte de África y Próximo Oriente*. Barcelona: Ed. Omega; 1998.

Bell DJ, Freeman BM. *Physiology and Biochemistry of the Domestic Fowl*. New York: Academic Press; 1971.

Bennet PM, Gascoyne SC, , Hart MG , Kirwoo JK, Hawkey CM. Development of LYNX: a computer application for disease diagnosis and health monitoring in wild animals, birds and reptiles. *Vet. Rec*. 1991;128:496–499

Bertram EM. Characterization of duck thrombocytes. *Res Vet Sci*. 1988;64:267-270.

Bezzel E. *Guía de Aves: Picos, Búhos, Rapaces, Palomas, Gallináceas y otros*. Madrid: Ed. Pirámide S. A;1988.

BirdLife International. *Birds in Europe: Population estimates, Trends and Conservation Status*. Cambridge: BirdLife International; 2004: 374 p.

Bhagat CI, Garcia-Webb P, Fletcher E Beilby JP. Calculated vs measured plasma osmolalities revisited. *Clin Chem*. 1984;30:1703-1705.

Bland J, Altman D. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Biochem Clin*. 1987;11:399-404.

Bounous DI, Wyant PS, Gibbs PS, Kilburn JV, Quist CF. Normal hematologic and serum biochemical reference intervals for juvenile wild turkeys. *J Wildlife Dis*. 2000;36:393-396.

Boweman WW, Sitickleje JE, Sikarskie JG, Giesy JP. Hematology and serum chemistries of nestling Bald Eagles (*Haliaeetus leucocephalus*) in the lower peninsula of MI, USA. *Chemosphere*. 2000;41:1575–1579.

Braun JP, Bourges-Abella N, Geffré A, Concordet D, Trumel C. The preanalytic phase in veterinary clinical pathology. *Vet Clin Pathol*. 2015;44:8-25.

Campbell T, Ellis C. Hematology of birds. In: Campbell T, Ellis C, eds. *Avian and Exotic Animal Hematology and Cytology*. 3rd ed. Oxford, UK: Wiley-Blackwell; 2007: 3-50.

Campo JL, Prieto MT, Dávila SG. Effects of housing and cold stress on heterophil-to-lymphocyte ratio, fluctuating asymmetry and tonic immobility duration of chickens. *Poultry Sci*. 2008;87:621-626.

Carlson HC, Sweeney PR, Tokaryk JM. Demonstration of phagocytic and trephocytic activities of chicken thrombocytes by microscopy and vital staining techniques. *Avian Dis*. 1968;12:700.

Carpenter FL. Bird hematocrits: effects of high altitude and strength of flight. *Comp Biochem Physiol A*. 1975;50:415-417.

Casado E, Balbontin J, Ferrer M. Plasma chemistry in booted Eagle (*Hieraetus pennatus*) during breeding season. *Comp Biochem Phys A*. 2002;131:233-241.

Catálogo Nacional de Especies Amenazadas (online). Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino, 2011. Disponible en:

http://www.mma.es/portal/secciones/biodiversidad/especies_amenazadas/catalogo_especies/acceso_catalogo.htm.

Chan FT, Lin PI, Chang GR, Wang HC, Hsu TH. Hematocrit and plasma chemistry values in adult collared scops owls (*Otus lettia*) and crested serpent eagles (*Spilornis cheela hoya*). *J Vet Med Sci*. 2012;74:893-898.

Clark P, Boardman WS, Raidal SR. *Atlas of clinical avian hematology*. Oxford, United Kingdom: Willey-Blackwell; 2009.

Claver J, Quaglia A. Comparative Morphology, Development, and Function of Blood Cells in No mammalian Vertebrates. *J Exot Pet Med*. 2009;18:87-97.

Clubbs SL, Schubot RM, Joiner K. Hematologic and serum biochemical reference intervals in juvenile cockatoos. *J Association Avian Vet*. 1990;5:158-161.

Clubbs SL, Schubot RM, Joiner K. Hematologic and serum biochemical reference intervals in juvenile eclectus parrots (*Eclectus roratus*). *J Avian Med Surg*. 1991;4:218-225.

Conrado A, Lopes ST dos A, Martins DB, Duarte MF, Mortari AC, Flores ML, Barasuól L. Eletroforese das proteínas plasmáticas em emas (*Rhea americana*) de diferentes faixas etárias. *Ciência Rural, Santa Maria*. 2007;37:1033-1038.

Cooper JE. Haematological investigations in east African birds of prey. *J Wildlife Dis* 1976;11:389-394.

Cooper JE. Methods of investigation and treatment. In J.E. Cooper, eds. *Birds of prey: health and disease*. 3rd Ed. Oxford, United Kingdom: Blackwell Publishing; 2002:28-70.

Costello RT. A unopette for eosinophil counts. *Am J Clin Pathol*. 1970;54:249-250.

Cramp S. *The Birds of the Western Palearctic*, Vol. IV. Oxford: Oxford University Press; 1985.

Cray C, Tatum LM. Applications of Protein Electrophoresis in Avian Diagnostics. *J Avian Med Surg*. 1998;12:4-10.

Cray C, Zaias J. Laboratory procedures. *Vet Clin Exot Anim*. 2004;7:487-518.

Cray C, Rodriguez M, Zaias J. Protein electrophoresis of psittacine plasma. *Vet Clin Pathol.* 2007;36:64-72.

Cray C. Reference intervals in avian and exotic hematology. *Vet Clin NAm: Exotic Animal Practice.* 2015;18:105-116.

Davis AK, Maney DL, Maerz JC. The use of leukocyte profiles to measure stress in vertebrates: a review for ecologists. *Funct Ecol.* 2008;22:760-772.

Dawson RD, Bortolotti G. Variation in hematocrit and total plasma proteins of nestling american kestrel in the wild (*Falco sparverius*). *Comp Biochem Physiol A.* 1997;3:383-390.

Dein F, Wilson A, Fischer D, Langenberg P. Avian leucocyte counting using the hemocytometer. *J Zoo Wildl Med.* 1994;25:432-437.

Del Hoyo J, Elliott A, Sargatal J. *Handbook of birds of the World. Vol 5. Barn-owls to Hummingbirds.* Barcelona: Lynx Ed; 1999.

Del Moral JC, Molina B, Bermejo A, Palomino D. Atlas de las aves en invierno en España 2007-2010. Madrid:Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente-SEO/BirdLife; 2012.

Delibes M, Brunet P, Mánez M. Datos sobre la alimentación de la Lechuza común (*Tyto alba*), el Búho chico (*Asio otus*) y el Mochuelo común (*Atiense noctua*) en una misma localidad de Castilla la Vieja. *Ardeola.* 1983;30:57-63.

Dobado-Berrios PM, Ceballos O, Donázar JA. Effects of age and captivity on plasma chemistry values of Egyptian Vulture. *Condor.* 1998;100:719-725.

Dolka B, Włodarczyk R, Zbikowski, Dolka I. Hematological parameters in relation to age, sex and biochemical values for mute swans (*Cygnus olor*). *Vet Res Commun.* 2014;38: 93-100.

Driver EA. Hematological and blood chemical values of mallard, *Anas platyrhynchos*, drakes before, during and after remige moult. *J Wildlife Dis.* 1981;17:413-421.

Dujowich M, Mazet JK, Zuba JR. Hematological and Biochemical references ranges for captive califonia condors (*Gymnogyps californianus*). *J Zoo Wildlife Med.* 2005;36:590-597.

Escandell V. *Seguimiento de Aves Nocturnas en España. Programa NOCTUA. Informe 2006-2013.* Madrid: SEO/BirdLife; 2013.

Estrada J, Pedrocchi V, Brotons L, Herrando S. 2004. *Atlas dels ocells nidificants de Catalunya 1999-2002.* Barcelona: Institut Català d'Ornitologia (ICO)/Lynx edicions; 2004: 638 p.

Fairbrother A, O'Loughlin D. Differential white blood cell values of the mallard (*Anas platyrhynchos*) across different ages and reproductive states. *J Wildlife Dis.* 1990;26:76-82.

Ferrer M, García-Rodríguez J, Carrillo C, Castroviejo J. Hematocrit and blood chemistry values in captive raptors. *Comp Biochem Phys A.* 1987;87: 1123-1127.

Flatland B, Freeman KP, Friedrichs KR, Vap LM, Getzy KM, Evans EW, Harr KE. ASVCP quality assurances guidelines: control of general analytical factors in veterinary laboratories. *Vet Clin Pathol.* 2010;39:264-277.

Foldenauer U, Borjarl RJ, Deb A *et al.*, Hematology and plasma biochemical values of Spinx's macaws (*Cyanopsitta spixii*). *J Avian Med Surg.* 2007;21: 275-282.

Franson JC, Murray HC, Bunck C. Enzyme activities in plasma, kidney, liver, and muscle of five avian species. *J Wildlife Dis.* 1985;21:33-39.

Franson JC, Hoffman DJ, Schmutz JA. Plasma biochemistry values in emperor geese (*Che canagica*) in Alaska: Comparisons among age, sex, incubation and molt. *J Zoo Wildlife Med.* 2009;40:321-327.

Friedrichs RF, Harr KE, Freeman KP, Szlodovits B, Walton RM, Barnhart KF, Blanco-Chavez J. ASVCP reference interval guidelines: determination of de novo reference intervals in veterinary species and other related topics. *Vet Clin Pathol.* 2012;41:441-453.

Fudge AM. Laboratory reference ranges for selected avian, mammalian, and reptilian species. In: Fudge AM, (ed) *Laboratory medicine: Avian and Exotic Pets*. Philadelphia, PA: WB Saunders; 2000: 376-400.

Gayathri KL, Shenoy KB, Hedge SN. Blood profile of pigeons (*Columba livia*) during growth and breeding. *Comp Biochem Phys A.* 2004;138:187-192.

Gayathri KL, Hedge SN. Alteration in haematocrit values and plasma proteins fractions during the breeding cycle of female pigeons (*Columba livia*). *Animal Reprod Science.* 2006;91:133-141.

Geffré A, Friedrichs K, Harr K, Concordet D, Trumel C, Braun J. Reference values: a review. *Vet Clin Pathol.* 2009;38:288-298.

Goldstein DL, Skadhauge E. Renal and extrarenal regulation of body fluid composition. In Whittow GC, ed. *Sturkie's Avian Physiology*. San Diego, California: Academic Press; 2000: 265-298.

Greenacre CG, Flatland B, Souza MJ, Fry MM. Comparison of Avian Biochemical Test Results With Abaxis VetScan and Hitachi 911 Analyzers. *J Avian Med and Surg.* 2008;22:291-299.

Gross WB, Siegel H. Evaluation of the heterophil/lymphocyte ratio as a measure of stress in chickens. *Avian dis.* 1983;34:759-761.

Gylstorff I, Grimm F. Vogelkrankheiten. *Stuttgart Eugen Ulmer* 1987;133-146.

Haefele HJ, Sindor I, Evers DC, Hoyt DE, Pokras MA. Hematologic and physiologic references ranges for free-ranging adult and young common loons (*Gavia immer*). *J Zoo Wildlife Med.* 2005;36:385-390.

Hannon SJ. Plasma calcium as an indicator of reproductive condition in female Blue Grouse. *Ca. J. Zool.* 1979;57:463-465.

Harmon BG. Avian heterophils in inflammation and disease resistance. *Poultry Sci.* 1988;77:972-977.

Harper JE, Lowe B. Hematology Values in a Colony of Budgerigars (*Melopsittacus undulates*) and Changes Associated with Aging. *J Nutr.* 1998;128:2639-2640.

Harr K. Clinical chemistry of companion avian species: a review. *Vet Clin Pathol.* 2002;31:140-151.

Hauptmanova, KM, Maly M, Literak I. Changes of haematological parameters in common pheasant throughout the year. *Vet Med.* 2006;1:29-34.

Hawkey C, Hart MG, Samour H. Age-related Haematological changes and Haemopathological responses in Chilean flamingos (*Phoenicopterus chiliensis*). *Avian Pathol.* 1984;13:223-229.

Hernández M. Blood chemistry in raptors. *Proc European Assoc Vet.* 1991;411-419.

Hochleithner M. Blutchemische Untersuchungen beim adulten und juvenile Wellensittich (*Melopsittacus undulates*). *Inaug Diss Wein.* 1989

Hochleithner M. Biochemistries. In: Ritchie, B.W.; Harrison, G.J. and Harrison, L.R eds. *Avian Medicine: principles and application.* Florida: Wingers Publishing; 1994: 223-245.

Hooffman DJ, Franson JC, Patte OH, Bunck CM, Murray HC. Biochemical and hematological effects of lead ingestion in nestling American Kestrels (*Falco sparverius*). *Comp Biochem Phys A*. 1985;80C:431-439.

Hörak P, Jenni-Eiermann S, Ots I, Tegelmann L. Health and reproductive: the sex-specific clinical profile of great tits (*Parus major*) in relation to breeding. *Can J Zool* 1988;76:2235-2244.

Howlett JC, Samour JH, Bailey TA, Naldo JL. Age-related haematology changes in captive-reared bust houbara, white-bellied and rufous-crested bustards. *J Wildlife Dis*. 2002;38:804-816.

Huff G, Huff W, Rath N, Donoghue A, Anthony N, Nestor K. Differential Effects of Sex and Genetics on Behavior and Stress Response of Turkeys. *Poultry Scienc*. 2007;86: 1294-1303.

Hunter S, Powers L. Raptor hematocrit values. *Condor*. 1980;82:226-227.

Hume R. *Guía de campo de las Aves de España y de Europa*. Barcelona: Ediciones Omega S.A;2007:208-219.

Itoh N. Some hematological values in budgerigars. *J. Rakuno. Gakuen Univ*. 1992;17:61-64.

Jain NC. Hematologic Techniques. In: Jain, N. C. ed. *Shalm's Veterinary Hematology* 4^o edition. Philadelphia, Lea and Febiger; 1986.

Jennings IB. Hematology. In PH Beynon, NA Forbes, NH Harcourt-Brown. Eds. *BSAVA manual of pigeons, raptors and waterfowl*. United Kingdom: BSAVA Publishing, Cheltenham; 1996: 68–78.

Jimenez A, Barrera R, Sanchez J, Cuenca R, Rodriguez J, Andres, S, Mañe MC. Clinical haematology of the great bustard (*Otus tarda*). *Avian Pathol*. 1991;20:675-680.

Jones MP, Arheart KL, Cray C. Reference Intervals, Longitudinal Analyses, and Index of individuality of commonly measured laboratory variables in captive bald eagles (*Haliaeetus leucocephalus*). *J Avian Med and Surg.* 2014;28:118-126.

Joseph V. Raptor hematology and chemistry evaluation. *Vet Clin N Am Exotic Anim. Pract.* 1999;2:689-699.

Juraní M, Výboth, Zeman M, Lamosova, Kost'ál L, Blazicek P. Post-hatching dynamics of plasma biochemistry in free-living European starlings (*Sturnus vulgaris*). *Comp Biochem Phys A.* 2004;138:89-95.

Karesh WB, Del Campo A, Braselton E, Puche H, Cook R A. Health evaluation of free-ranging and hand-reared macaws (*Ara spp.*) in Peru. *J Zoo Wildlife Med.* 1997;28:368-377.

Kaneko JJ. Serum protein and dysproteinemias. In: Kaneko JJ ed. *Biochemistry of Domestic animals*. San Diego, CA: Academic Press; 1997:149-163.

Kjelgaard-Hansen M, Lundorff A. Is the inherent imprecision of manual leucocyte differential counts acceptable for quantitative purpose? *Vet Clin Pathol.* 2006;35:268-270.

Klemm KM, Klein MJ. Biochemical markers of bone metabolism. In: McPherson RA, Pincus MR, eds. *Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods*. Philadelphia, Pa: Saunders Elsevier; 2006.

Kohn CW, Dibartola SP. *Composition and distribution of body fluids in dogs and cats*. In Dibartola S.P. ed. *Fluid therapy in small animal practice*. Philadelphia: WB Saunders Co; 2000:3-25.

Kocan RM, Pitts SM. Blood values of the canvasback duck by age, sex and season. *J Wildlife Dis.* 1976;12:341-346.

Kolmstetter CM, Ramsay EC. Effects of Feeding on plasma Uric Acid and Urea Concentrations in Blackfooted Penguins (*Spheniscus demersus*). *J Avian Med Surg.* 2000;14:177-179.

Lanzarot MP, Montesinos A, San Andrés MI, Rodríguez C, Barahona MV. Hematological, protein electroforesis and cholinesterase values of free-living nestling peregrine falcons in Spain. *J Wildlife Dis.* 2001;37:172-177.

Lavin S, Cuenca R, Marco I, Velarde R, Viñas L. Hematology and blood chemistry of the Marsh Harrier (*Circus aeruginosus*). *Comp Biochem Phys A.* 1992;3:493-495.

Latimer KS, Rakich, PM. Avian cytology. *Vet Clin N Amer.* 2007;10:131-154.

Lewandowski AH, Campbell TW, Harrison GJ. Clinical chemistry. In Harrison G. Harrison I. eds. *Clinical Avian Medicine and Surgery*. Philadelphia: WB Saunders;1986.

Lilliehöök I, Wall H, Tauson R, Tvedten H. Differential leukocyte counts determined in chicken blood using the Cell-Dyn 3500. *Vet Clin Pathol.* 2004;33:133-138.

Limiñana R, Lopez-Olvera JR, Gallardo M, Fordham M, Urios V. *J Zoo Wildlife Med.* 2009;40:687-695.

López JL, Lázaro E, Fernández A. Comparación de las dietas de *Strix aluco*, *Asio otus* y *Tyto alba* en un mismo biotopo de la provincia de Madrid. *Ardeola.* 1977;23:189-221.

Low M, Eason D, Elliott G, McInnes K, Paul-Murphy J. Hematologic and Biochemical References Ranges for the Kapapo (*Strigops habroptilus*): Generation and Interpretation in a Field-based Wildlife Recovery program. *J Avian Med Surg.* 2006;20:80-88.

Lumeij JT. The influence of blood sample treatment on plasma potassium concentration in avian blood. *Avian Pathol.* 1985;14:257-260.

Lumeij TJ, de Brujine JJ. Blood chemistry reference values in Racing pigeons. *Avian*

Pathol. 1985;14:401-408.

Lumeij JT, Overduin LM. Plasma Chemistry references values in Psittaciformes. *Avian Pathol.* 1990;19:235-244.

Lumeij JT, Maclean B. Total protein determination in pigeon plasma and serum: comparison of refractometric methods with the biuret method. *J Avian Med Surg.* 1996;10:150-152.

Lumeij JT, Remple JD, Remple CJ Riddle K. Plasma chemistry in peregrine falcons (*Falco peregrinus*): reference values and physiological variations of importance for interpretation. *Avian Patho.* 1998;27:129-132.

Lumeij JT. Avian Clinical Biochemistry. In: Kaneko JJ, Harvey JW, Bruss ML. eds. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. 6th Edition. San Diego, Calif: Academic Press; 2008:839-872.

Lundorff A, Kjølgaard-Hansen M. Method comparison in clinical laboratory. *Vet Clin Pathol.* 2006;35:276-286.

Macari, M. Gonzales, E. Manejo da incubação. *Jaboticabal: Facta.* 2003;537p.

Machado CC, Silva LFN, Ramos PRR, et al. Seasonal influence on hematologic values and hemoglobin electrophoresis in Brazilian Boa constrictor amarali. *J Zoo Wildl Med* 2006; 37:487–91.

Manzanares A. *Guía de campo de las rapaces de España*. Barcelona: Ed. Omega S.A; 1986.

Marchesi L, Sergio L. Distribution, density, diet and productivity of the Scops Owl Otus in the Italian Alps. *Ibis.* 2005;147:176-187.

Martínez JA, Zuberogoitia I, Alonso R. *Guía para la identificación de la edad y el sexo de las Rapaces Nocturnas Ibéricas*. Madrid:Montícola ediciones;2002.

Martínez JA, Zuberogoitia I. Effects of the habitat loss on perceived and actual abundance of the Little Owl *Athene noctua* in Eastern Spain. *Ardeola*. 2004;5:215-219.

Martínez JA, Zuberogoitia I. Habitat preferences for Long-eared Owls *Asio otus* and Little Owls *Athene noctua* in semi-arid environments at three spatial scales. *Bird Study*. 2004;51:163-169.

Martínez JA, Zuberogoitia I. Hábitat preferences and causes of population decline for Barn Owls *Tyto alba*: a multi-scale approach. *Ardeola*. 2004;51:303-317.

Martínez JA, Zuberogoitia JE, Martínez J, Zabala JF, Calvo. Patterns of territory settlement by Eurasian scops-owls (*Otus scops*) in altered semi-arid lands-cape. *J. Arid Environ*. 2006;69: 400-409.

Maxwell M, Burns R. Blood eosinophilia in adult bantams naturally infected with *Trichostrongylus tenuis*. *Res Vet Sci*. 1985;39:122-3.

Mihailov R, Lasheva V, Lashev L. Some hematological values in Japanese quails. *BJVM*. 1999;2:137-139.

Millar HT, Simpsom JG, Stalker AL. An evaluation of the heat precipitation method of fibrinogen estimation. *J Clinic Pathol*. 1971;24:827-830.

Miller MJR. Hemograms for nutritional condition of migrant bald eagles tested for exposure to lead. *J Wildlife Dis*. 2001;37:481-488.

Mikkola H. *Owls of Europe*. London: Poyser, Carlton;1983.

Mitchell MA, Kettlewell PJ, Maxwell MH. Indicators of physiological stress in broiler chickens during road transportation. *Anim Welfare*. 1992;1:91-103.

Mitchell E, Johns J. Avian hematology and related disorders. *North Am Exot Anim Prac*. 2008;11:501-522.

Molina-López RA, Casal J, Darwich L. Specie-specific outcomes of wild Raptors attended at a wildlife Rehabilitation centre in Catalonia (1997-2005). *J Anim Sci.* 2014;9:19-27.

Montesinos, A, Sainz, A, Pablos MV, Mazzuccheill Tesouro MA. Hematological and plasma biochemical reference intervals in young white storks. *J Wildlife Dis.* 1997;33:405-412.

Moreira dos Santos E, Paulillo AC, Santin Elizabeth, Dittrich RL, de Oliveira EG. Hematological and Serum Chemistry Values for the Ring-necked Pheasant (*Phasianus colchicus*): Variation with Sex and Age. *International J Poultry Sci.* 2007;6:137-139.

Moreira dos Santos E, Paulillo AC, Vieira Martins GR. Hematology of Bronze Turkey (*Meleagris gallopavo*): Variations with Age and Gender. *International J Poultry Sci.* 2009;8:752-754.

Mulley RC. Haematology and blood chemistry of the black duck *Anas superciliosa*. *J Wildlife Dis.* 1979;15:437-441.

Naidoo V, Diekmann M, Wolters K, Swan GE. Establishment of selected baseline blood chemistry and hematologic parameters in captive and wild-caught African White backed vultures (*Gyps africanus*). *J Wildlife Dis.* 2008;44:649-654.

Natt MP, Herrick CA. A new blood diluent for counting erythrocytes. *International J Poultry Sci.* 1952;31:735-738.

Nicolai J. *Aves Rapaces diurnas y nocturnas*. León, España: Gräfe und Vencer GMBH y Editorial Everest, S.A.; 1995.

Ochs CL, Dawson RD. Patterns of variation in leucocyte counts of female tree swallows, *Tachycineta bicolor*. Repeatability over time and relationships with condition and cost of reproduction. *Comp Biochem Physiol A.* 2007;150:326-331.

Ots I, Murumägi A, Hörak P. Hematological health state indices od reproducing gear

- tits: methodology and sources of natural variation. *Funct Ecol.* 1998;12:700-707.
- Owen JC, Moore FR. Seasonal differences in immunological condition of three species of thrushes. *The Condor* 2006;108:389-398.
- Padilla R, Huyvaert P, Merkel J, Miller E, Parker P. Hematology, plasma chemistry, serology, and Chlamydophila status of the waved albatross (*Phoebastria irrorata*) on the Galapagos Islands. *J Zoo Wildlife Med.* 2013;34:278-283.
- Palomeque J, Planas J. Dimensions of the erythrocytes of birds. *Ibis.* 1977;119:533-535.
- Papasouliotis K, Cue S, Crawford E, Pinches M, Dumont M, Burley K. Comparison of white blood cell differential percentages determined by the in-house LaserCyte hematology analyser and a manual method. *Vet Clin Pathol.* 2006;35, 295-302.
- Paz M, Veiga JP, Puerta M. White blood cell counts in house sparrows (*Passer domesticus*) before and after moult and after testosterone treatment. *Can J Zool.* 2001;79:145-148.
- Perrins C. *La gran enciclopedia de las aves.* Madrid: Ed. Libsa; 2006: 294-304.
- Phalen D, Taylor C, Phalen W, Bennett G. Hemograms and hematozoa of sharp-shinned (*Accipiter striatus*) and Cooper's hawks (*Accipiter cooperi*) captured during spring migration in northern New York. *J Wildlife Dis.* 1995;31:216-222.
- Polo FJ, Celdrán JF, Peinado VI, Viscor G, Palomeque J. Hematological values for four species of birds of prey. *The Condor.* 1992;94:1007-1013.
- Polo FJ, Celdrán JF, Viscor G, Palomeque J. Blood chemistry of captive herons, egrets, spoonbill, ibis and gallinule. *Comp Biochem Phys A.* 1994;107:343-347.
- Post J, Rebel MJ, Huurne AH. Automated Blood Cell Count. A sensitive and Reliable Method to Study Corticoesterone-Related Stress in Broilers. *Poultry Sci.* 2003;82:591-595.

Purroy FJ. *Atlas de las Aves de España (1975-1995)*. Barcelona: SEO/BirdLife. Lynx Edicions;1997.

Quillfeldt P, Gricelda R, Aguilar M, Masello J. Variability in leucocyte profiles in thin-billed prions *Pachyptila belcheri*. *Comp Biochem Phys A*. 2008;150:26-31.

Ritchie BW, Harrison GJ, Harrison LR eds. *Avian Medicine: Principles and Application*. Lake Worth, Fla: Wingers Publishing, Inc: 1994.

Román J, Ibáñez F. Alimentación invernal de la Lechuza Campestre y de la Lechuza Común en un área marismeña de Doñana. *Anuario Ornitológico de Doñana*. 2004;1: 211-216.

Rosenthal KL. Avian protein disorders. In Fudge AM. ed. *Laboratory medicine in exotic pets*. Philadelphia: WB Saunders Co; 2000: 171-221.

Samour J. *Avian Medicine*. 2nd Edition. London: Elsevier; 2008.

Sánchez JA, Sánchez MA, Calvo JF, Esteve MA. *Ecología de las aves de presa de la región de Murcia*. Murcia: Servicio de Publicaciones Universidad de Murcia; 1995.

Schalm's. *Veterinary Hematology Schalm's*. Weis DJ, Wardrop KJ. eds. 6th edition. Ames, Iowa, USA: Wiley-Blackwell; 2010.

Scholtz N, Halle I, Flachowsky G, Sauerwein H. Serum chemistry reference values in adult Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*) including sex-related differences. 2009. *Poultry Sci*. 2009;88:1186-1190.

Scope A, Filip T, Gabler C, Resch F. The influence of stress from transport and handling on hematologic and clinical chemistry blood parameters of racing pigeons (*Columbia livia domestica*). *Avian Dis*. 2002;46:224-229.

Scope A, Schwendenwein I, Frommlet F. Biological variation, individuality and critical differences of eight biochemical blood constituents in budgerigars (*Melopsittacus*

undulates). *Vet Record*. 2005; 159: 839-843.

Shave H, Howard V. A hematologic survey of captive waterfowl. *J Wildlife Dis*. 1976;12:195-201.

Seiser PE, Duffy LK, McGuire AD, Roby DD, Golet GH, Litzow MA. Comparison of pigeon guillemot (*Cephus Columba*), blood parameters from oiled and unoiled areas of Alaska eight years after the Exxon Valdez oil spill. *Mar Pollut Bull*. 2000;40:152-164.

Sergent N, Rogers T, Cunningham M. Influence of biological and ecological factors on hematological values in wild Little Penguins, *Eudyptula minor*. *Comparative Comp Biochem Phys A*. 2004;138:333-339.

Seyle H. A syndrome produced by diverse noxious agents. *Nature*. 1936;138-32.

Smith E, Bush M. Hematologic parameters on various species of strigiformes and falconiformes. *J Wildlife Dis*. 1978;14:447-450.

Smith SB, McWilliams SR, Guglielmo CG. Effect of diet composition on plasma metabolite profiles in a migratory songbird. *Condor*. 2006;109:48-58.

Spagnolo V, Crippa V, Marzia A, Sartorelli. Reference intervals for hematologic and biochemical constituents and protein electrophoretic fractions in captive common buzzards (*Buteo buteo*). *Vet Clin Pathol*. 2006;35:82-87.

Spagnolo V, Crippa V, Marzia A, Alberti I, Sartorelli P. Hematologic, biochemical, and protein electrophoretic values in captive tawny owls (*Strix aluco*). *Vet Clin Pathol*. 2008;37:225-228.

Sribhen C, Choothesa A, Songserm T, Issariyodom S, Sribhen K. Sex-based differences in plasma chemistry and cardiac marker test results in Siamese fighting fowl. *Vet Clin Pathol*. 2006;35:291-294.

Stevens L. *Avian Biochemistry and Molecular Biology*. Cambridge, UK: University Press;

1996.

Sturkie PD. Blood: physical characteristics, formed elements, hemoglobin and coagulation. In: Sturkie PD ed. *Avian Physiology*. New York: Springer-Verlag; 1976:53-75.

Szavo Z, Klein A, Jakab C. Hematologic and Plasma Biochemistry Reference Intervals of Healthy Adult Barn Owls (*Tyto alba*). *Avian Dis*. 2014;58:228-231.

Tatum L, Zaias J, Mealey, BK Cray C, Bossart GD. Protein electrophoresis as a diagnostic tool in raptor medicine. *J Zoo Wildlife Med*. 2000;31:497-502.

Van Nieuwenhuyse D, Genot JC, Johnson HH. The little Owl: conservation, ecology and behaviour of *Athene noctua*. Cambridge U.K:Cambridge University Press; 2008.

Vap LM, Harr KE, Arnold JE *et al*. ASVCP quality assurance guidelines: control of preanalytical and analytical factors for hematology for mammalian and nonmammalian species, hemostasis, and cross-matching in veterinary laboratories. *Vet Clin Pathol*. 2012; 41: 8-17.

Van der Heiden, N. Evaluation and interpretation of the avian hemogram. *Semin Avian Exotic Pet Med*. 1994;3:5-13.

Verdaguer, J. "Vertebrados" origen, organización, diversidad y biología. Barcelona: Ediciones Omega y Universitat de Barcelona; 2001.

Villegas A, Sánchez JM, Costillo E, Corbacho C. Blood chemistry and haematocrit of the Black Vulture (*Aegypius monachus*). *Comp Biochem Phys A*. 2002;132:489-497.

Viñuela J, Ferrer M, Recio F. Age-related variations in plasma levels of alkaline phosphatase, calcium and inorganic phosphorus in chicks of two species of raptors. *Comp Biochem Phys A*. 1991;99:49-54.

Viñuela J, Ferrer M. Regulation of growth in red kites and imperial eagles. *Wilson Bull*.

1997;109: 92-101.

Vleck CM, Vortalino N, Vleck D, Bucher TL. Stress, corticosterone and heterophil to lymphocyte ratios in free-living Adelie penguins. *Condor*. 2000;102:392-400.

Wagner EC, Stables CA, Williams TD. Hematological changes associated with egg production: direct evidence for changes in erythropoiesis but a lack of resource dependence? *J Exp Biol*. 2008;211:2960-2968.

Walberg J. White blood cell counting techniques in birds. *Semin Avian Exotic Pet Med*. 2001;10:72-76.

Walton R. Validation of Laboratory Tests and Methods. *Semin Avian Exotic Pet Med*. 2001; 10:59-65.

Weis DJ. Uniform evaluation and semiquantitative reporting of hematologic data in veterinary laboratories. *Vet Clin Pathol*. 1984;13:27-31.

Williams JL, Trainer DO. A hematological study of snow, blue and Canada geese. *J Wildlife Dis*. 1971;7:258-264.

Wimsatt J, Canon N, Pearce R, Vap, L, Getzy D. Assessment of novel avian renal disease markers for the detection of experimental nephrotoxicosis in pigeons (*Columbia livia*). *J Zoo Wildlife Med*. 2009;40:487-494.

Woerpel WR, Roskopf W. Clinical experiences with avian laboratory diagnostics. *Vet Clin N Amer*. 1984;14:249-286.

Wyk E, Bank H, Verdoon GH. Dynamics of haematology and blood biochemistry in free-living African whitebacked vulture (*Pseudogyps africanus*) nestlings. *Comp Biochem Phys A*. 1998; 120:495-508.

Zady MF. Z-STATS 12: Correlation and simple least squares regression. Westgard QC, Inc. [Http://www.westgard.com/lesson42.htm](http://www.westgard.com/lesson42.htm). Publied August 2000.

Zuberogoitia I, Torres JJ. *Aves Rapaces de Bizcaia*. Bilbao: Temas Vizcainos. BBK; 1997.

Zuberogoitia I, Campos LF. Hibridación de Lechuzas, *Tyto alba alba* y *T. a. guttata*, en el Norte de la Península Ibérica. *Est. Mus. Cienc. Nat. De Álava*. 1999;14:187-192.

Zuberogoitia I. La influencia de los factores meteorológicos sobre el éxito reproductor de la Lechuza común. *Ardeola*. 2000;47:49-56.