



**HAL**  
open science

# Apports de la thromboélastométrie rotative dans l'exploration des désordres de l'hémostase chez le chien : application à la leptospirose

Anthony Barthélemy

## ► To cite this version:

Anthony Barthélemy. Apports de la thromboélastométrie rotative dans l'exploration des désordres de l'hémostase chez le chien : application à la leptospirose. Santé. Université de Lyon, 2017. Français. NNT : 2017LYSE1055 . tel-01581948

**HAL Id: tel-01581948**

**<https://theses.hal.science/tel-01581948>**

Submitted on 5 Sep 2017

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



N°d'ordre NNT : xxx

**THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON**  
opérée au sein de  
**l'Université Claude Bernard Lyon 1**  
**Ecole Doctorale Interdisciplinaire Sciences-Santé**  
**N°205**

**Spécialité de doctorat : Sciences de la vie et de la santé**

Soutenue publiquement le 04/04/2017, par :  
**Anthony BARTHÉLEMY**

---

**Apports de la thromboélastométrie  
rotative dans l'exploration des  
désordres de l'hémostase chez le Chien.  
Application à la leptospirose**

---

Devant le jury composé de :

MORANGE Pierre, PU-PH, Université de Marseille  
BOUZAT Pierre, PU-PH, Université de Grenoble  
DAVID Jean-Stéphane, PU-PH, Université Lyon 1  
LEFRANT Jean-Yves, PU-PH, Université de Nîmes

Rapporteur  
Rapporteur  
Examineur  
Examineur

BONNET-GARIN Jeanne-Marie, Professeur, VetAgro Sup  
GOY-THOLLOT Isabelle, IR Hors Classe, VetAgro Sup

Directrice de thèse  
Co-directrice de thèse

ALLAOUCHICHE Bernard, PU-PH, Université Lyon 1

Invité



# UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

## Président de l'Université

Président du Conseil Académique

Vice-président du Conseil d'Administration

Vice-président du Conseil Formation et Vie Universitaire

Vice-président de la Commission Recherche

Directeur Général des Services

**M. le Professeur Frédéric FLEURY**

M. le Professeur Hamda BEN HADID

M. le Professeur Didier REVEL

M. le Professeur Philippe CHEVALIER

M. Fabrice VALLÉE

M. Alain HELLEU

## ***COMPOSANTES SANTE***

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux

Faculté d'Odontologie

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation

Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine

Directeur : M. le Professeur J. ETIENNE

Directeur : Mme la Professeure C. BURILLON

Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS

Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA

Directeur : M. X. PERROT

Directeur : Mme la Professeure A-M. SCHOTT

## ***COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE***

Faculté des Sciences et Technologies

Département Biologie

Département Chimie Biochimie

Département GEP

Département Informatique

Département Mathématiques

Département Mécanique

Département Physique

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives

Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon

Polytech Lyon

Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique

Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1

Ecole Supérieure du Professorat et de l'Education

Institut de Science Financière et d'Assurances

Directeur : M. F. DE MARCHI

Directeur : M. le Professeur F. THEVENARD

Directeur : Mme C. FELIX

Directeur : M. Hassan HAMMOURI

Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE

Directeur : M. le Professeur G. TOMANOV

Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID

Directeur : M. le Professeur J-C PLENET

Directeur : M. Y. VANPOULLE

Directeur : M. B. GUIDERDONI

Directeur : M. le Professeur E.PERRIN

Directeur : M. G. PIGNAULT

Directeur : M. le Professeur C. VITON

Directeur : M. le Professeur A. MOUGNIOTTE

Directeur : M. N. LEBOISNE



## ***RESUME***

La thromboélastométrie (TEM) rotative est un examen évaluant les propriétés viscoélastiques du sang dans des conditions de faible cisaillement. La TEM est capable d'apprécier dynamiquement la fonction hémostatique globale d'un patient depuis la formation du caillot à sa lyse. Le profil obtenu par cette technique peut être classé en hypercoagulable, normal ou hypocoagulable. Les études de ce travail révèlent que le sexe et la stérilisation n'affectent pas la valeur des différents paramètres TEM. L'âge est associé à l'apparition de profils hypercoagulables et à une diminution de l'activité fibrinolytique chez le beagle en bonne santé. La présence d'une inflammation évoluant à bas bruit semble impliquée dans ce processus. L'âge devrait être considéré comme un facteur de complications thromboemboliques chez le Chien. Par ailleurs, la TEM semble peu sensible dans le monitoring biologique des effets anticoagulants de l'énoxaparine sodique, une héparine à bas poids moléculaire, chez le beagle en bonne santé. Enfin, la TEM s'avère utile dans la description et la caractérisation des désordres de l'hémostase chez des chiens souffrant de leptospirose. Un profil hypocoagulable est associé à la présence de saignements et les paramètres TEM sont significativement différents entre les chiens avec et sans coagulation intravasculaire disséminée. Certains paramètres et indices TEM ont une valence pronostique à l'admission de ces chiens, un profil hypocoagulable étant associé à une augmentation du taux de mortalité.

## ***MOTS CLES***

Chien

Coagulation

Hémorragies

Hémostase

Leptospirose

Thromboélastométrie / Thromboélastographie

Thrombose

## ***SUMMARY***

Rotational thromboelastometry (TEM) can be used to assess the viscoelastic properties of clot formation in whole blood under low shear conditions, which provides information on global hemostatic function from the beginning of clot formation through fibrinolysis. The shape of the TEM profile defines a patient's hemostatic condition as normal, hypercoagulable, or hypocoagulable. First, the studies of this work emphasize that sex and neutered status does not affect the values of TEM parameters. The second study demonstrated an age-related hypercoagulable profile that was associated with decreased fibrinolysis ability in healthy Beagles. Low-grade inflammation seemed to be involved in this process. The incidence of thromboembolic diseases remains to be established in old dogs, but age should be considered a primary risk factor. Third, TEM is insensitive to detect the biological activities of a particular low molecular weight heparin, sodium enoxaparin, in healthy Beagles. Finally, TEM is useful for the description of hemostatic disorders in dogs with naturally occurring leptospirosis. A hypocoagulable profile is associated with bleeding diatheses and the measured TEM parameters are significantly different between dogs with and without disseminated intravascular coagulation. Some measured TEM parameters and calculated indices are associated with outcomes: a hypocoagulable profile is correlated with a higher mortality rate.

## ***KEY WORDS***

Coagulation

Dogs

Hemorrhage

Hemostasis

Leptospirosis

Thromboelastometry / Thromboelastography

Thrombosis

Ce travail a été réalisé,

- au sein de l'équipe **APCSe**

*Agressions Pulmonaires et Circulatoires dans le sepsis*

- au sein de l'unité **SIAMU**

*Soins Intensifs – Anesthésiologie – Médecine d'Urgence*

A VetAgro Sup, Campus Vétérinaire de Lyon, Université de Lyon, Marcy l'Etoile, FRANCE.

The logo for APCSe, featuring the text 'APCSe' in a bold, red, sans-serif font with a white outline, set against a light orange gradient background.The logo for Siamu, featuring the word 'Siamu' in a blue, cursive script font, with a yellow horizontal line underneath.

**VetAgro Sup**  
Campus Vétérinaire de Lyon

## ***REMERCIEMENTS***

Je tiens à remercier chaleureusement le Dr Isabelle Goy-Thollot sans qui ce travail n'aurait pu se faire. Je te remercie pour la confiance que tu m'as accordée tout au long de ces dix dernières années. Je te remercie pour ton mentorat sans faille.

Je tiens à remercier sincèrement le Professeur Jeanne-Marie Bonnet-Garin pour avoir encadré ce travail, pour ses conseils toujours avisés et pertinents, pour sa bonne humeur constante.

Je tiens à remercier les Membres du Jury qui ont accepté de juger ce travail.

Je tiens à remercier toutes celles et ceux qui ont contribué à ce travail.

A ma famille, mes amis et mes collègues.

A Céline

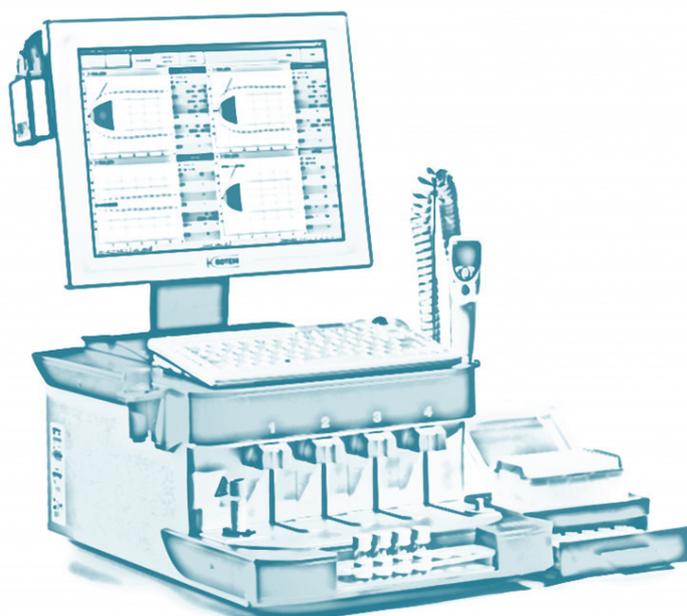
A Juliette et à Mathieu

« À rebours de tout  
Du bon sens s'en fout  
Rêver d'enfreindre et mettre en terre  
Ignorer et tout foutre en l'air  
Pour gagner les cimes  
Tout simplement vivre »

MF

***A***PPORTS DE LA  
***THROMBOELASTOMETRIE***  
***ROTATIVE DANS L'EXPLORATION***  
***DES DESORDRES DE***  
***L'HEMOSTASE CHEZ LE CHIEN.***

***A***PPPLICATION A LA  
***LEPTOSPIROSE.***



## ***TABLE DES MATIERES***

<b>RESUME</b> .....	5
<b>SUMMARY</b> .....	6
<b>REMERCIEMENTS</b> .....	8
<b>TABLE DES MATIERES</b> .....	10
<b>LISTE DES FIGURES</b> .....	14
<b>LISTE DES TABLEAUX</b> .....	15
<b>LISTE DES ABREVIATIONS</b> .....	17
<b>GLOSSAIRE</b> .....	19
<b>INTRODUCTION</b> .....	20
<b>PARTIE 1. PRESENTATION DE LA TECHNIQUE DE THROMBOELASTOMETRIE ROTATIVE. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE DE SES APPORTS EN MEDECINE VETERINAIRE.</b> .....	21
<b>I. TECHNIQUE THROMBOELASTOGRAPHIQUE</b> .....	22
<b>A. PRINCIPE HISTORIQUE</b> .....	22
<b>B. MODIFICATIONS APORTEES PAR LA THROMBOELASTOMETRIE ROTATIVE</b> .	22
1. Modifications techniques .....	22
2. Avantages et inconvénients techniques du ROTEM par rapport à la TEG .....	24
<b>C. APPORTS ET LIMITES DES EXAMENS VISCOELASTIQUES</b> .....	25
1. Apports .....	25
2. Limites .....	26
<b>II. LE TRACE, LES PARAMETRES ET LES INDICES THROMBO-ELASTOMETRIQUES.</b>	26
<b>A. LE TRACE</b> .....	26
<b>B. LES PARAMETRES THROMBOELASTOMETRIQUES</b> .....	27
1. Le temps de coagulation .....	27
2. Le temps de formation du caillot .....	28
3. L'angle $\alpha$ .....	28
4. La fermeté maximale du caillot et les amplitudes .....	28
5. Les index de lyses .....	29
6. La lyse maximale .....	29
<b>C. LES INDICES THROMBOELASTOMETRIQUES</b> .....	29
1. Les indices de mesure de l'élasticité du caillot .....	29
a. Calcul de l'élasticité du caillot .....	29
b. Elasticité maximale du caillot et application .....	30

c.	Le module de résistance élastique aux contraintes de cisaillement .....	31
2.	L'indice du potentiel thrombodynamique.....	32
3.	L'indice de coagulation.....	32
III.	LES DIFFERENTS PROFILS THROMBOELASTOMETRIQUES ET LEUR INTERPRETATION.....	33
A.	LES DIFFERENTS PROFILS.....	33
B.	INTERPRETATION DES PROFILS INTEM ET EXTEM.....	35
1.	Mise en évidence d'un profil hypercoagulable .....	35
2.	Mise en évidence d'un profil hypocoagulable .....	36
3.	Mise en évidence d'un profil hyperfibrinolytique .....	37
C.	INTERPRETATION DU PROFIL FIBTEM .....	37
D.	INTERPRETATION DU PROFIL HEPTEM.....	38
E.	INTERPRETATION DU PROFIL APTEM .....	39
IV.	UTILISATION EN PRATIQUE CLINIQUE VETERINAIRE.....	40
A.	RECOMMANDATIONS D'UTILISATION DU ROTEM EN MEDECINE VETERINAIRE 40	
1.	La comparabilité des deux systèmes.....	41
2.	La récolte des échantillons sanguins et la manipulation.....	41
3.	Les méthodes d'activation des tests.....	41
4.	Les définitions et la communication des données.....	42
5.	Les tests non standards.....	42
B.	DESCRIPTION DES MODIFICATIONS VISCOELASTIQUES SANGUINES DANS DIVERSES MALADIES ET ENTITES MEDICALES.....	43
C.	DESCRIPTION DES MODIFICATIONS VISCOELASTIQUES SANGUINES DANS DES MODELES EXPERIMENTAUX.....	46
D.	DESCRIPTION DES MODIFICATIONS VISCOELASTIQUES SANGUINES INDUITES PAR DIFFERENTES DROGUES OU FLUIDES .....	46
E.	AUTRES APPLICATIONS .....	49
	<b>PARTIE 2. ETABLISSEMENT DES VALEURS USUELLES DES PARAMETRES THROMBOELASTOMETRIQUES. INFLUENCE DU SEXE ET DE L'AGE.</b> .....	51
I.	ETABLISSEMENT DES VALEURS USUELLES ET INFLUENCE DU SEXE .....	52
A.	MATERIELS ET METHODES .....	52
1.	Animaux.....	52
2.	Récolte des échantillons sanguins.....	52
3.	Analyses.....	52
4.	Répétabilité intra-essai.....	53
5.	Analyses statistiques .....	53

B. RESULTATS.....	54
C. DISCUSSION.....	57
II. INFLUENCE DE L'AGE SUR LA COAGULATION ET LES CYTOKINES PRO- INFLAMMATOIRES CHEZ LE CHIEN PAR APPROCHE THROMBOELASTOMETRIQUE .	59
A. RATIONNEL.....	59
B. MATERIELS ET METHODES .....	60
1. Animaux.....	60
2. Récolte des échantillons sanguins.....	60
3. Analyses.....	60
4. Analyses statistiques .....	61
C. RESULTATS.....	62
1. Comparaison entre les groupes .....	62
2. Corrélation entre les variables TEM et les paramètres sanguins .....	65
a. Corrélations linéaires simples.....	65
b. Corrélations multiples.....	67
D. DISCUSSION .....	68
<b>PARTIE 3. APPLICATIONS CLINIQUES DE LA THROMBOELASTOMETRIE ROTATIVE</b> .....	71
I. EVALUATION DE L'ACTIVITE ANTICOAGULANTE DE L'ENOXAPARINE SODIQUE CHEZ LE BEAGLE EN BONNE SANTE .....	72
A. RATIONNEL.....	72
B. MATERIELS ET METHODES .....	73
1. Protocole et recueil des échantillons.....	73
2. Analyses de laboratoire.....	74
3. Analyses statistiques .....	74
C. RESULTATS.....	75
1. Temps de coagulation .....	75
2. Paramètres des profils thromboélastométriques .....	76
3. Génération de thrombine.....	77
4. Activité anti-Xa.....	77
5. Activité de l'antithrombine et fibrinogénémie.....	78
D. DISCUSSION .....	79
II. SAIGNEMENTS ET DESORDRES HEMOSTATIQUES ET THROMBOELASTOMETRIQUES DANS LA LEPTOSPIROSE CHEZ LE CHIEN .....	83
A. RATIONNEL.....	83
B. MATERIELS ET METHODES .....	84

1. Critères d'inclusion et critères d'exclusion.....	84
2. Recueil des données médicales.....	85
3. Recueil des échantillons sanguins et urinaires.....	86
4. Analyses sanguines.....	86
5. Définition des profils de coagulation.....	86
6. Analyses statistiques.....	87
<b>C. RESULTATS.....</b>	<b>87</b>
1. Caractéristiques de la population.....	87
2. Signes cliniques de diathèse hémorragique.....	90
3. Hospitalisation et devenir.....	90
4. Données hématologiques, hémostatiques et thromboélastométriques.....	90
5. Comparaisons entre les chiens avec et sans diathèse hémorragique.....	91
6. Comparaisons entre les chiens avec et sans CIVD.....	93
7. Comparaisons entre les chiens avec un profil hypercoagulable, normocoagulable et hypocoagulable.....	95
8. Comparaisons entre les chiens survivants et non survivants.....	97
9. Résultats nécropsiques et histologiques.....	99
a. Observations macroscopiques.....	99
b. Observations histologiques.....	100
<b>D. DISCUSSION.....</b>	<b>103</b>
<b>CONCLUSION.....</b>	<b>111</b>
<b>PERSPECTIVES.....</b>	<b>113</b>
<b>REFERENCES.....</b>	<b>115</b>
<b>TRAVAUX DE THESE.....</b>	<b>131</b>

## LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1.</b> Principe schématique du ROTEM.....	23
<b>Figure 2.</b> Conversion par détection optique des mouvements de l'axe du ROTEM en tracé .....	24
<b>Figure 3.</b> Tracé théorique et paramètres obtenus par la thromboélastométrie rotative.....	27
<b>Figure 4.</b> Courbe théorique de l'élasticité du caillot en fonction de son amplitude.....	30
<b>Figure 5.</b> Superposition de profils exTEM hypercoagulable ( <i>profil gris</i> ), normal ( <i>profil bleu</i> ) et hypocoagulable ( <i>profil rouge</i> ) .....	35
<b>Figure 6.</b> Profil exTEM hypercoagulable .....	36
<b>Figure 7.</b> Profil exTEM hypocoagulable.....	36
<b>Figure 8.</b> Profil exTEM hyperfibrinolytique.....	37
<b>Figure 9.</b> Superposition d'un profil fibTEM ( <i>profil rose</i> ) et d'un profil exTEM ( <i>profil bleu</i> ).....	38
<b>Figure 10.</b> Profil fibTEM hypocoagulable.....	38
<b>Figure 11.</b> Comparaison des profils hepTEM et inTEM .....	39
<b>Figure 12.</b> Comparaison des profils exTEM et apTEM.....	40
<b>Figure 13.</b> Exemples de profils exTEM chez un jeune et un vieux beagle.....	64
<b>Figure 14.</b> Exemples de profils inTEM chez un jeune et un vieux beagle .....	64
<b>Figure 15.</b> Exemples de profils fibTEM chez un jeune et un vieux beagle .....	65
<b>Figure 16.</b> Protocole expérimental .....	73
<b>Figure 17.</b> Comparaison de la distribution des paramètres de l'exTEM entre les chiens avec et sans CIVD.....	94
<b>Figure 18.</b> Comparaison de la distribution des paramètres du fibTEM entre les chiens avec et sans CIVD.....	95
<b>Figure 19.</b> Comparaison de la distribution de la numération plaquettaire et des paramètres hémostatiques entre les chiens avec un profil hypocoagulable, normocoagulable et hypercoagulable	96
<b>Figure 20.</b> Comparaison de la distribution du MCF et du G de l'exTEM et du CT du fibTEM entre les chiens survivants et les chiens non survivants.....	98
<b>Figure 21.</b> Courbes de Kaplan-Meier des chiens en fonction de leur profil thromboélastométrique ...	99
<b>Figure 22.</b> Hémorragies intra-alvéolaires sévères ( <i>grossissement x40</i> ).....	101
<b>Figure 23.</b> Présence de thrombi au sein des vaisseaux pulmonaires ( <i>grossissement x40</i> ).....	101
<b>Figure 24.</b> Hémorragies intra-glomérulaires sévères ( <i>flèches noires</i> ) à l'origine d'une rupture de la capsule glomérulaire ( <i>flèche blanche</i> ) ( <i>grossissement x20</i> ) .....	102
<b>Figure 25.</b> Hémorragies sous-épicaudiques ( <i>grossissement x40</i> ).....	102

## ***LISTE DES TABLEAUX***

<b>Tableau 1.</b> Comparaison des caractéristiques techniques et du prix de la TEG et du ROTEM .....	25
<b>Tableau 2.</b> Résumé des différents profils thromboélastométriques .....	34
<b>Tableau 3.</b> Recensement des maladies et entités médicales décrites par les examens viscoélastiques chez le Chien.....	44
<b>Tableau 4.</b> Recensement des modèles expérimentaux pour lesquels ont été utilisés les examens viscoélastiques chez le Chien.....	46
<b>Tableau 5.</b> Recensement des drogues et fluides utilisés pour évaluer leurs effets sur les propriétés viscoélastiques sanguines chez le Chien.....	47
<b>Tableau 6.</b> Valeurs usuelles des paramètres de l'exTEM .....	54
<b>Tableau 7.</b> Valeurs usuelles des paramètres de l'inTEM .....	54
<b>Tableau 8.</b> Valeurs usuelles des paramètres du fibTEM .....	55
<b>Tableau 9.</b> Résultats des paramètres des profils exTEM, inTEM et fibTEM en fonction du sexe et de la stérilisation .....	55
<b>Tableau 10.</b> Coefficients de variation intra-essai des profils exTEM, inTEM et fibTEM .....	56
<b>Tableau 11.</b> Comparaison des paramètres hématologiques, hémostatiques et biochimiques entre les jeunes et les vieux beagles .....	62
<b>Tableau 12.</b> Comparaison de la concentration plasmatique des cytokines (en pg/mL) entre les jeunes et les vieux beagles .....	63
<b>Tableau 13.</b> Comparaison des paramètres de l'exTEM entre les jeunes et les vieux beagles.....	63
<b>Tableau 14.</b> Comparaison des paramètres de l'inTEM entre les jeunes et les vieux beagles .....	64
<b>Tableau 15.</b> Comparaison des paramètres du fibTEM entre les jeunes et les vieux beagles.....	65
<b>Tableau 16.</b> Corrélations linéaires entre les paramètres de l'exTEM et le taux d'hématocrite, les numérations leucocytaire et plaquettaire, la fibrinogénémie et la globulinémie .....	66
<b>Tableau 17.</b> Corrélations linéaires entre les paramètres de l'inTEM et le taux d'hématocrite, les numérations leucocytaire et plaquettaire, la fibrinogénémie et la globulinémie .....	66
<b>Tableau 18.</b> Corrélations linéaires entre les paramètres du fibTEM et le taux d'hématocrite, les numérations leucocytaire et plaquettaire, la fibrinogénémie et la globulinémie .....	66
<b>Tableau 19.</b> Equations mathématiques générées par le modèle multivarié à régression ascendante ...	67
<b>Tableau 20.</b> Evolution du PT et de l'aPTT au cours de la période d'étude .....	75
<b>Tableau 21.</b> Evolution des paramètres de l'exTEM (moyenne et SD) au cours de la période d'étude .	76
<b>Tableau 22.</b> Evolution des paramètres du fibTEM (moyenne et SD) au cours de la période d'étude ..	76
<b>Tableau 23.</b> Evolution des paramètres de l'inTEM (moyenne et SD) au cours de la période d'étude..	76
<b>Tableau 24.</b> Evolution des paramètres de l'hepTEM (moyenne et SD) au cours de la période d'étude	77
<b>Tableau 25.</b> Evolution de l'ETP au cours de la période d'étude.....	77

<b>Tableau 26.</b> Evolution de l'activité anti-Xa au cours de la période d'étude .....	78
<b>Tableau 27.</b> Evolution de la fibrinogénémie et de l'activité de l'antithrombine au cours de la période d'étude .....	78
<b>Tableau 28.</b> Description des sérogroupes identifiés par la MAT sur la base des titres sérologiques à l'admission $\geq 800$ pour les sérovars non vaccinaux ou $\geq 1600$ pour les sérovars vaccinaux (des sérogroupes <i>Icterohaemorrhagiae</i> et <i>Canicola</i> ) .....	89
<b>Tableau 29.</b> Comparaison des paramètres hémostatiques et hématologiques entre les chiens avec et sans diathèse hémorragique .....	91
<b>Tableau 30.</b> Comparaison des paramètres de l'exTEM entre les chiens avec et sans diathèse hémorragique .....	92
<b>Tableau 31.</b> Comparaison des paramètres du fibTEM entre les chiens avec et sans diathèse hémorragique .....	92
<b>Tableau 32.</b> Comparaison du score APPLEfast entre les chiens avec un profil hypercoagulable, normal et hypocoagulable .....	97
<b>Tableau 33.</b> Comparaison des paramètres hémostatiques et hématologiques entre les chiens survivants et les chiens non survivants.....	97
<b>Tableau 34.</b> Comparaison des paramètres de l'exTEM entre les chiens survivants et les chiens non survivants .....	98
<b>Tableau 35.</b> Comparaison des paramètres du fibTEM entre les chiens survivants et les chiens non survivants .....	98

## ***LISTE DES ABREVIATIONS***

<b>A10</b>	Amplitude 10 minutes après le CT
<b>AIAT</b>	Alanine aminotransférase
<b>ANOVA</b>	Analyse de variance ( <i>analysis of variance</i> )
<b>apTEM</b>	Thromboélastométrie avec aprotinine
<b>aPTT</b>	Temps de thromboplastine activé partiel ( <i>activated partial thromboplastin time</i> )
<b>CE</b>	Elasticité du caillot ( <i>clot elasticity</i> )
<b>CI</b>	Indice de coagulation ( <i>coagulation indice</i> )
<b>CIVD</b>	Coagulation intravasculaire disséminée
<b>CFT</b>	Temps de formation du caillot ( <i>clot formation time</i> )
<b>CRP</b>	Protéine C réactive ( <i>C-reactive protein</i> )
<b>CT</b>	Temps de coagulation ( <i>clotting time</i> )
<b>CV</b>	Coefficient de variation
<b>EDTA</b>	Acide éthylène diamine tétra-acétique ( <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i> )
<b>ETP</b>	Potentiel endogène de la thrombine ( <i>endogenous thrombin potential</i> )
<b>exTEM</b>	Thromboélastométrie extrinsèque
<b>fibTEM</b>	Thromboélastométrie évaluant la fonctionnalité du fibrinogène
<b>G</b>	Module de résistance élastique aux contraintes de cisaillement ( <i>shear elastic modulus strength</i> )
<b>GB</b>	Globules blancs
<b>GI</b>	Indice global ( <i>global indice</i> )
<b>GM-CSF</b>	<i>Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>
<b>HBPM</b>	Héparines à bas poids moléculaires
<b>hepTEM</b>	Thromboélastométrie avec héparinase
<b>HFN</b>	Héparines non fractionnées
<b>IC 95%</b>	Intervalle de confiance à 95%
<b>IL</b>	Interleukine
<b>inTEM</b>	Thromboélastométrie intrinsèque
<b>IP-10</b>	<i>Interferon-inducible protein-10</i>
<b>KC</b>	<i>Keratinocyte chemoattractant</i>
<b>Li30</b>	Indice de lyse 30 minutes après le CT ( <i>lysis index</i> )

<b>MAT</b>	Test de microagglutination ( <i>microagglutination test</i> )
<b>MCE</b>	Elasticité maximale du caillot ( <i>maximum clot elasticity</i> )
<b>MCF</b>	Fermeté maximale du caillot ( <i>maximum clot firmness</i> )
<b>MCP-1</b>	<i>Monocyte chemoattractant protein-1</i>
<b>ML</b>	Lyse maximale ( <i>maximum lysis</i> )
<b>naTEM</b>	Thromboélastométrie native
<b>NA</b>	Non applicable
<b>ND</b>	Non déterminé
<b>NFS</b>	Numération et formule sanguines
<b>OR</b>	<i>Odd ratio</i>
<b>PAL</b>	Phosphatases alcalines
<b>PCR</b>	Réaction en chaîne par polymérase ( <i>polymerase chain reaction</i> )
<b>PDF</b>	Produits de dégradation du fibrinogène et de la fibrine
<b>PROVETS</b>	Partenariat sur la standardisation des tests viscoélastiques rotatifs ( <i>partnership on rotational viscoelastic test standardization</i> )
<b>PT</b>	Temps de prothrombine ( <i>prothrombin time</i> )
<b>ROTEM</b>	Thromboélastométrie rotative ( <i>rotational thromboelastometry</i> )
<b>SD</b>	Ecart type ( <i>standard deviation</i> )
<b>SIAMU</b>	Soins intensifs – Anesthésiologie – Médecine d’urgence
<b>TEG</b>	Thromboélastographie / thromboélastographique
<b>TEM</b>	Thromboélastométrie / thromboélastométrique
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	<i>Tumor necrosis factor <math>\alpha</math></i>
<b>TPI</b>	Indice du potentiel thrombodynamique ( <i>thrombodynamic potential index</i> )
<b>TT</b>	Temps de thrombine

## **GLOSSAIRE**

- ▶ **Contrainte de cisaillement** : application d'une force de direction perpendiculaire à la section transversale d'un matériau (ou force appliquée de manière parallèle ou tangentielle à une face d'un matériau)
  
- ▶ **Elasticité** : capacité d'un matériau solide à revenir à sa forme initiale après avoir été déformé.
  
- ▶ **Etat d'hypercoagulabilité** : condition médicale caractérisée par une tendance anormalement accrue du sang à coaguler, consécutive à un déséquilibre entre les facteurs procoagulants et anticoagulants de l'organisme, et associée à des signes cliniques de thrombose.
  
- ▶ **Potentiel endogène de la thrombine** : quantité de thrombine générée après activation de l'hémostase *in vitro* par le facteur tissulaire comme déclencheur et les phospholipides comme substitut plaquettaire.
  
- ▶ **Rhéologie** : étude de la déformation et de l'écoulement de la matière sous l'effet d'une contrainte appliquée.
  
- ▶ **Triade de Virchow** : ensemble de paramètres traditionnellement évoqué pour expliquer les mécanismes physiopathologiques conduisant à la formation de thrombi. Ces paramètres sont les lésions ou un dysfonctionnement de l'endothélium vasculaire, des modifications du flux sanguin (stase ou turbulences) et un état d'hypercoagulabilité.
  
- ▶ **Viscoélasticité** : terme utilisé pour décrire des matériaux ayant des propriétés d'élasticité et de viscosité. Lorsqu'une contrainte est appliquée à un matériau viscoélastique, un réarrangement moléculaire, également dénommé fluage, se produit.
  
- ▶ **Viscosité** : capacité d'un matériau à résister à la déformation progressive induite par des contraintes de cisaillement et/ou de traction.

## ***INTRODUCTION***

La thromboélastométrie (TEM) rotative est un examen évaluant les propriétés rhéologiques et viscoélastiques du sang, dans des conditions de faible cisaillement. La TEM est capable d'apprécier dynamiquement la fonction hémostatique globale d'un patient, incluant la contribution des cellules et des facteurs protéiques plasmatiques, depuis la formation du caillot à sa lyse (Kol et Borjesson, 2010 ; McMichael et Smith, 2011). La TEM est une technique améliorée du thromboélastographe, appareil inventé à la fin de la première moitié du XX<sup>ème</sup> siècle (Hartert, 1960). Depuis 20 ans, elle a été couramment utilisée en médecine humaine pour le monitoring de la fonction hémostatique des patients (transplantations, chirurgies cardiaques ou orthopédiques...) ou la détection de coagulopathies (coagulation intravasculaire disséminée (CIVD), coagulopathie traumatique, surdosage d'anticoagulants...). Depuis 10 ans, son utilisation augmente exponentiellement en médecine vétérinaire et a surtout été appliquée à la description des anomalies hémostatiques de diverses maladies et conditions médicales.

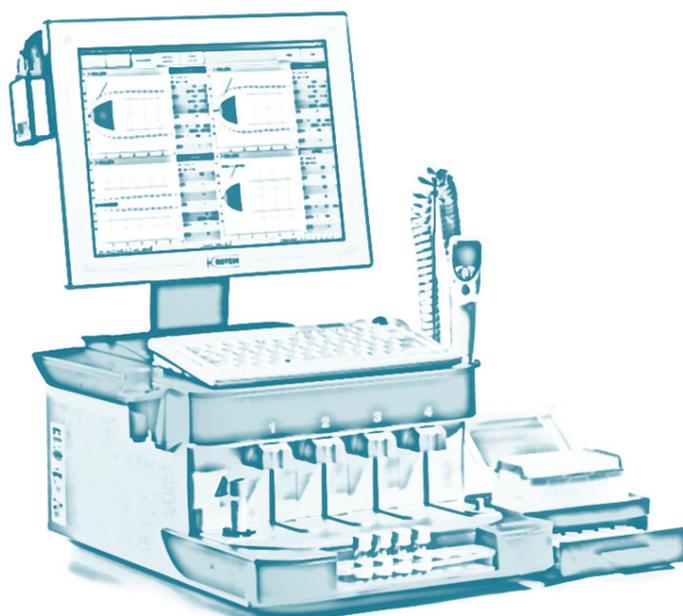
Dans une première partie, nous rappellerons les principes techniques de cette méthode et les clefs de son interprétation, et nous recenserons les apports de la thromboélastométrie rotative en médecine vétérinaire dans la description des désordres hémostatiques de nombreuses maladies et conditions médicales chez le Chien et dans la détermination des effets de différents médicaments et fluides sur les propriétés viscoélastiques sanguines.

Ensuite, dans une seconde partie, nous présenterons les valeurs usuelles définies dans notre institution et étudierons les effets du sexe, de l'âge et des constituants cellulaires et plasmatiques sur ces valeurs.

Enfin, dans une troisième partie, nous présenterons deux applications pratiques de la thromboélastométrie rotative au travers de deux études : le monitoring de l'héparinothérapie à bas poids moléculaire (énoxaparine sodique) chez le beagle en bonne santé et la caractérisation des désordres hémostatiques chez des chiens souffrant de leptospirose.

# ***PARTIE 1.***

## ***PRESENTATION DE LA TECHNIQUE DE THROMBOELASTOMETRIE ROTATIVE. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE DE SES APPORTS EN MEDECINE VETERINAIRE.***



## **I. TECHNIQUE THROMBOELASTOGRAPHIQUE**

### **A. PRINCIPE HISTORIQUE**

Le principe de la thromboélastographie (TEG) a été inventé par Hartert en 1948 et avait pour but d'enregistrer les modifications de viscosité du sang total ou du plasma pendant la formation d'un caillot (Hartert, 1960).

Historiquement, le thromboélastographe était composé de deux éléments principaux, une cuve et un axe. La rotation de la cuve (mouvement oscillatoire de 4,45°) entraînait la rotation de l'axe, initialement immobile, induisant des turbulences sanguines au sein de la cuve permettant la formation progressive du caillot (mise en œuvre des paramètres physiologiques de la triade de Virchow (Wolberg et al., 2012)). Le test était réalisé à 37°C grâce au maintien de la cuve dans un bain-marie. Les mouvements de la goupille fixée à l'axe étaient enregistrés de façon mécanique sur un moniteur sous forme d'un tracé de thromboélastographie (Hartert, 1960 ; Rugeri et al., 2006 ; Kol et Borjesson, 2010 ; McMichael et Smith, 2011).

Le principal intérêt de cette technique était alors une approche globale qualitative de la coagulation (Hartert, 1960). Cependant, outre une approche insuffisamment discriminante des désordres de l'hémostase et en raison de très nombreuses contraintes techniques dont la sensibilité très importante du thromboélastographe aux chocs et vibrations, cette technique n'a été utilisée, pendant plusieurs décennies, que dans le domaine de la recherche (Rugeri et al., 2006).

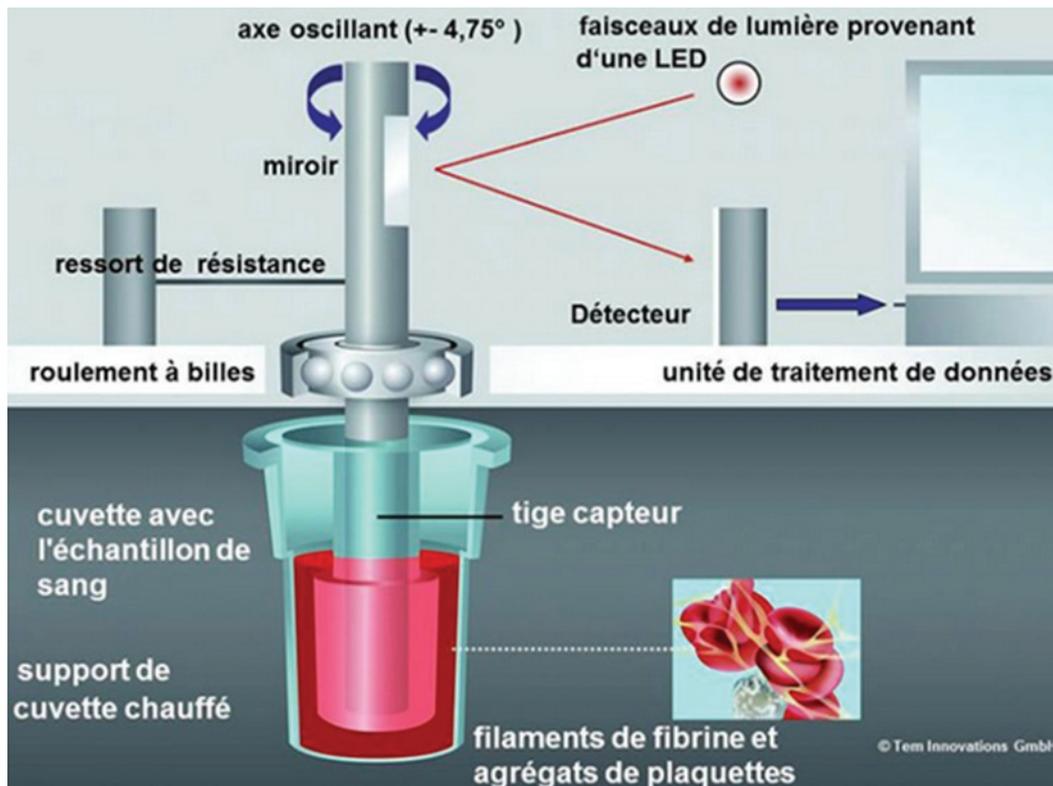
### **B. MODIFICATIONS APPORTEES PAR LA THROMBOELASTOMETRIE ROTATIVE**

#### **1. Modifications techniques**

Depuis les années 1980, des modifications techniques (affranchissement des vibrations, miniaturisation du système, ...) ont permis de remettre au goût du jour cette technique. Depuis 1996, deux automates et techniques brevetés sont en concurrence : la thromboélastographie (TEG<sup>®</sup>, Haemoscope Corporation, Niles, Etats-Unis) et la TEM rotative (ROTEM<sup>®</sup>, Pentapharm GmbH, Munich, Allemagne) (Kol et Borjesson, 2010).

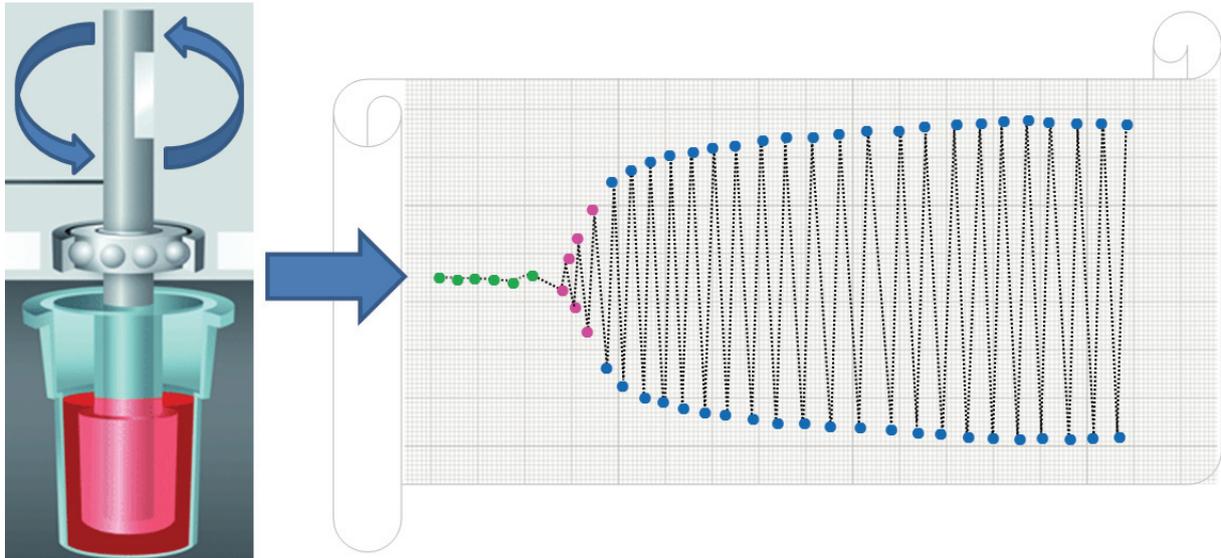
Le ROTEM utilise le même principe de base que le thromboélastographe historique en permettant l'obtention d'un graphique représentant la formation du caillot et sa lyse.

L'échantillon de sang citraté (300  $\mu$ L) est incubé à une température déterminée par l'opérateur, le plus souvent 37 °C, dans une cuvette au-dessus de laquelle se trouve un axe relié à un système de détection optique. L'angle de rotation est de 4,75°. Le mouvement initié par la goupille fixée à l'axe entraîne des contraintes de faible cisaillement, et, à mesure que se forme la fibrine, le mouvement de l'axe est entravé [Figure 1] (Savry et al., 2005 ; Rugeri et al., 2006 ; Jackson et al., 2009 ; Kol et Borjesson, 2010 ; McMichael et Smith, 2011).



**Figure 1.** Principe schématique du ROTEM  
(d'après <https://www.rotem.de/fr/>)

Tant que le sang reste liquide, le mouvement de l'axe est libre. Lorsque le sang commence à coaguler, le caillot qui se forme progressivement limite la rotation de cet axe. Plus le caillot devient ferme (augmentation de ses propriétés viscoélastiques), plus les résistances augmentent, et plus l'axe est entravé (Whiting et al., 2015). Les mouvements rotatifs alternatifs de l'axe sont détectés par un système optique et leurs variations sont numérisées et traduites en un diagramme [Figure 2] (Savry et al., 2005).



**Figure 2.** Conversion par détection optique des mouvements de l'axe du ROTEM en tracé

## 2. Avantages et inconvénients techniques du ROTEM par rapport à la TEG

L'utilisation d'un système de roulement à billes pour la transduction fait que le ROTEM est moins sensible aux mouvements et aux vibrations artéfactuelles (Savry et al., 2005 ; Jackson et al., 2009 ; McMichael et Smith, 2011), rendant la variabilité moins importante que pour la TEG (Anderson et al., 2014).

La présence de 4 canaux permet l'analyse simultanée de 4 échantillons.

Le ROTEM a également été conçu pour être robuste et facilement transportable au chevet du patient.

La présence d'une pipette électronique permet de diminuer la variabilité inter-opérateurs et rend l'utilisation de l'appareil plus facile pour le personnel non spécialisé (Anderson et al., 2014).

Cependant, le ROTEM est plus coûteux que la TEG, et les résultats de ces deux automates ne peuvent être comparés directement (Jackson et al., 2009 ; McMichael et Smith, 2011 ; McMichael et al., 2014b).

Le **tableau 1** compare les différences techniques et le prix entre la TEG et le ROTEM.

Caractéristique	TEG	ROTEM
Pipetage	Manuel	Automatisé
Cuvette	En mouvement	Fixe
Axe	Fixe	En mouvement
Angle de rotation	4,45° / 5 secondes	4,75° / 6 secondes
Détection	Transduction de l'axe	Impédance de rotation
Température	24 à 40°C	30 à 40°C
Régulation de la température	Cuvette réchauffée	Bloc métallique de soutien réchauffé
Intérieur de la cuvette	Lisse	Rigide (épaisseur de 0,6 à 0,9 mm)
Matériau de la cuvette	Cryolithe (polymère acrylique)	Polyméthylméthacrylate
Prix de l'automate	18 000 à 26 000€	28 000 à 32 000 €

**Tableau 1.** Comparaison des caractéristiques techniques et du prix de la TEG et du ROTEM  
(adapté de McMichael et al., 2014b ; Whiting et DiNardo, 2014)

## C. APPORTS ET LIMITES DES EXAMENS VISCOELASTIQUES

### 1. Apports

Le plus grand avantage offert par les tests viscoélastiques est l'évaluation globale de l'hémostase sur sang total et, par conséquent, l'évaluation des cellules et des protéines plasmatiques à la fonction hémostatique (Hartert, 1960). Ces tests fournissent une image globale du processus hémostatique qui est un processus extrêmement complexe *in vivo*. Ces tests explorent ainsi la vitesse de génération de la thrombine, le processus d'activation puis d'agrégation plaquettaire en présence de fibrinogène et d'hématies, ainsi que les interactions fibrinoplaquettaires (Kawasaki et al., 2004). Les résultats de ces tests apparaissent cliniquement plus pertinents que ceux des tests réalisés seulement sur du plasma (Savry et al., 2005 ; McMichael et Smith, 2011).

Le second avantage est la relative rapidité d'obtention des résultats. Les informations les plus pertinentes sont disponibles dans les 30 minutes suivant l'initiation du test, et elles peuvent être disponibles au chevet du patient (Savry et al., 2005 ; Rugeri et al., 2006 ; Jackson et al., 2009 ; McMichael et Smith, 2011). Plusieurs études en médecine humaine ont mis en évidence que les modifications des paramètres TEG ou TEM étaient les plus prédictives de pertes sanguines anormales, notamment en période postopératoire de chirurgie cardiaque (Spies et al., 1987 ; Cammerer et al., 2003).

Ces tests permettent de mettre en évidence un profil hypercoagulable ce qui constitue, à l'heure actuelle, le premier objectif de réalisation de ces tests en médecine vétérinaire (*cf IV. B*).

## **2. Limites**

Malgré leurs apports décrits précédemment, la limite majeure de ces examens reste, paradoxalement, l'interprétation de leurs résultats. Cette interprétation est complexe car ces tests qui évaluent l'hémostase dans sa globalité imposent un nouveau mode de réflexion quant aux modifications hémostatiques mises en évidence. L'interprétation repose avant tout sur une analyse qualitative d'un tracé défini par des paramètres quantitatifs. Bien que ces examens viscoélastiques offrent une approche dynamique multifactorielle de l'hémostase et un complément intéressant aux tests analytiques usuels, ils ne semblent pas pouvoir actuellement les remplacer (McMichael et Smith, 2011).

En médecine vétérinaire, la seconde limite est le prix de ces automates qui rendent leur rentabilité financière difficile, expliquant que seuls quelques centres universitaires vétérinaires ou très grosses cliniques privées disposent de ces analyseurs.

## **II. LE TRACE, LES PARAMETRES ET LES INDICES THROMBO-ELASTOMETRIQUES**

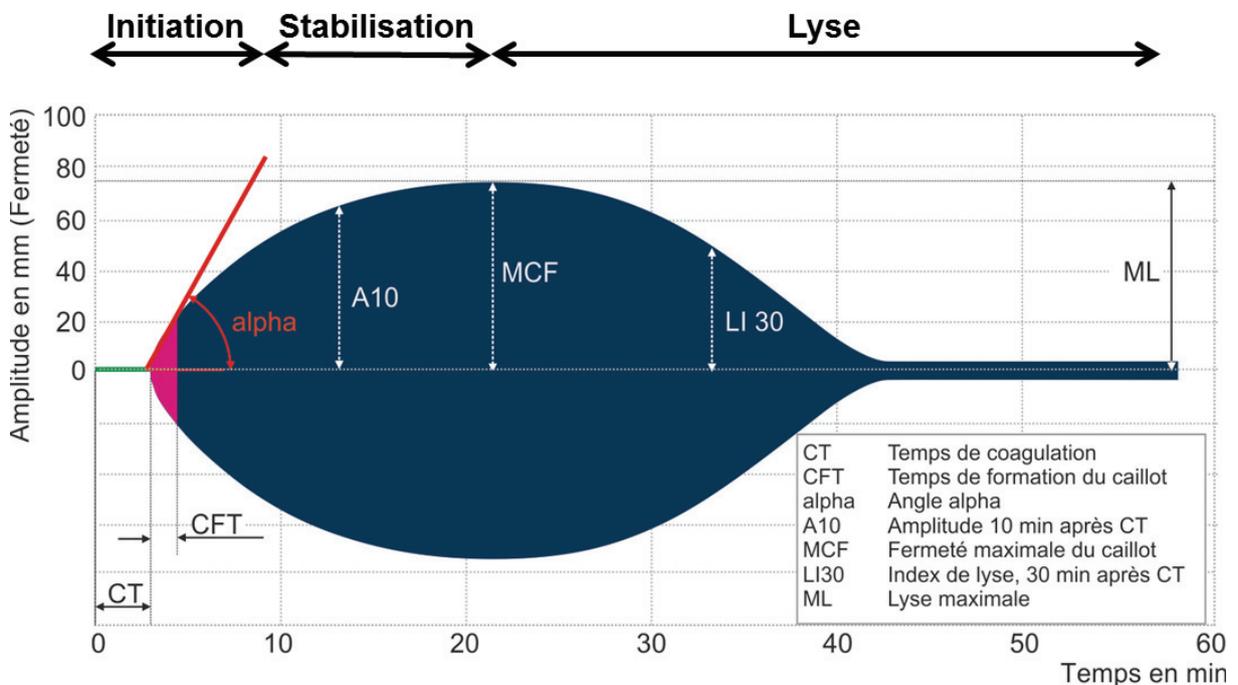
### **A. LE TRACE**

Au cours de l'analyse, l'enregistrement des forces de cisaillement se traduit graphiquement par un diagramme, en temps réel, de l'amplitude (ou fermeté) du caillot (ordonnée, exprimée en mm) en fonction du temps (abscisse, exprimée en minutes) (Savry et al, 2005). Historiquement, ce diagramme en forme de diapason est constitué de deux courbes symétriques l'une de l'autre par rapport à l'axe du temps [**Figure 3**] (Hartert, 1960).

Ce tracé, également appelé thromboélastomètre pour le ROTEM ou thromboélastogramme pour la TEG, permet l'évaluation complète de la fonction hémostatique sur sang total ou plasma et se caractérise par trois phases distinctes [**Figure 3**] (Donahue et Otto, 2005) :

- la première phase appelée initiation (ou précoagulation) correspond au temps entre le début de l'analyse et la formation des premiers brins de fibrine ; la fin de cette phase se caractérise par la divergence du tracé en deux courbes ;
- la seconde phase appelée stabilisation correspond au temps entre la fin de l'initiation et la séparation maximale des deux courbes ; cette phase représente la formation du caillot ;
- et enfin, la troisième phase appelée lyse correspond au temps de convergence progressive des deux courbes jusqu'à la fin du test ou la convergence complète des deux courbes ; cette phase décrit la fibrinolyse.

Ce tracé est composé de temps et points remarquables [Figure 3] dont la description se trouve ci-dessous.



**Figure 3.** Tracé théorique et paramètres obtenus par la thromboélastométrie rotative

(adapté de <https://www.rotem.de/fr/>)

## B. LES PARAMETRES THROMBOELASTOMETRIQUES

### 1. Le temps de coagulation

Le temps de coagulation (CT, *coagulation time*) représente le temps nécessaire pour atteindre une fermeté de caillot de 2 mm. Il est exprimé en secondes. Il correspond à la phase d'initiation de la coagulation jusqu'à l'apparition des premiers filaments de fibrine et de plaquettes activées (Kawasaki et al., 2004).

Le paramètre TEG équivalent est R (*reaction time*).

Chez le chien, les facteurs contribuant le plus à la valeur du CT sont le taux d'hématocrite et les concentrations plasmatiques en facteurs V, VII, IX et X (Smith et al, 2012).

## **2. Le temps de formation du caillot**

Le temps de formation du caillot (CFT, *clot formation time*) représente le temps entre la fin du CT et l'obtention d'une amplitude de 20 mm. Il est exprimé en secondes. Il correspond à la rapidité d'apparition de la fibrine et des liaisons des filaments de fibrine au sein du caillot (Kawasaki et al., 2004). Ce seuil d'amplitude de 20 mm (définissant la borne supérieure du CFT) correspond à la divergence maximale obtenue dans un plasma pauvre en plaquettes d'un individu en bonne santé (Donahue et Otto, 2005).

Le paramètre TEG équivalent est K.

Chez le chien, les facteurs contribuant le plus à la valeur du CFT sont le taux d'hématocrite, la numération plaquettaire et les concentrations plasmatiques en fibrinogène et en facteur V (Smith et al, 2012).

## **3. L'angle $\alpha$**

L'angle  $\alpha$  est défini comme l'angle formé par la tangente à la courbe de coagulation au point 2 mm et la ligne de base. Il est exprimé en degré. Il décrit la cinétique de formation du caillot.

Il est défini par le même nom sur la technique TEG.

Chez le chien, les facteurs contribuant le plus à la valeur de l'angle  $\alpha$  sont le taux d'hématocrite, la numération plaquettaire et les concentrations plasmatiques en fibrinogène et en facteurs V et IX (Smith et al, 2012).

## **4. La fermeté maximale du caillot et les amplitudes**

La fermeté maximale du caillot (MCF, *maximum clot firmness*) représente l'amplitude maximale du caillot. Elle est exprimée en mm. Elle mesure la solidité finale du caillot et est l'expression de ses propriétés viscoélastiques ultimes. Elle dépend principalement du fibrinogène et des plaquettes (Solomon et al., 2015a). A ce stade, les hématies sont étroitement liées entre elles par les filaments de fibrine (Kawasaki et al., 2004).

Le paramètre TEG équivalent est MA (*maximum amplitude*).

Chez le chien, les facteurs contribuant le plus à la valeur du MCF sont le taux d'hématocrite, la numération plaquettaire et la concentration plasmatique en fibrinogène (Smith et al., 2012).

Les amplitudes à 5, 10, 15 et 20 minutes (A5, A10, A15, A20) représentent la fermeté du caillot 5, 10, 15 et 20 minutes après le CT. Elles sont utilisées pour prédire le MCF à un stade antérieur pour permettre des décisions thérapeutiques anticipées (Whiting et al., 2015). Elles ne sont malheureusement que très peu rapportées en médecine vétérinaire.

### **5. Les index de lyse**

Les index de lyse à 30, 45 et 60 minutes (Li30, Li45, Li60) représentent le rapport entre la valeur de l'amplitude du caillot mesurée à 30, 45 et 60 minutes après le CT à celle du MCF. Ils sont exprimés en %. Ils décrivent la progression de la fibrinolyse à ces temps précis.

Les paramètres TEG équivalents sont Ly30, Ly45 et Ly60 (*lysis index*).

### **6. La lyse maximale**

La lyse maximale (ML, *maximum lysis*) représente la fibrinolyse maximale détectée pendant l'analyse. Elle est définie comme le rapport entre la plus faible amplitude après l'atteinte du MCF et le MCF. Elle est exprimée en %.

## **C. LES INDICES THROMBOELASTOMETRIQUES**

### **1. Les indices de mesure de l'élasticité du caillot**

#### **a. Calcul de l'élasticité du caillot**

Il est généralement admis que l'amplitude du caillot (A) à un temps donné peut donner l'élasticité du caillot (CE, *clot elasticity*) selon la formule (Hochleitner et al., 2015 ; Solomon et al., 2015b) :

$$CE = (100 \times A) / (100 - A)$$

Le CE s'exprime sans unité.

Hartert affirmait que la contribution de la viscosité du sang à l'amplitude du caillot était négligeable, et ainsi, la transformation de l'amplitude du caillot comme mesure du CE pouvait être valide (Hartert, 1960).

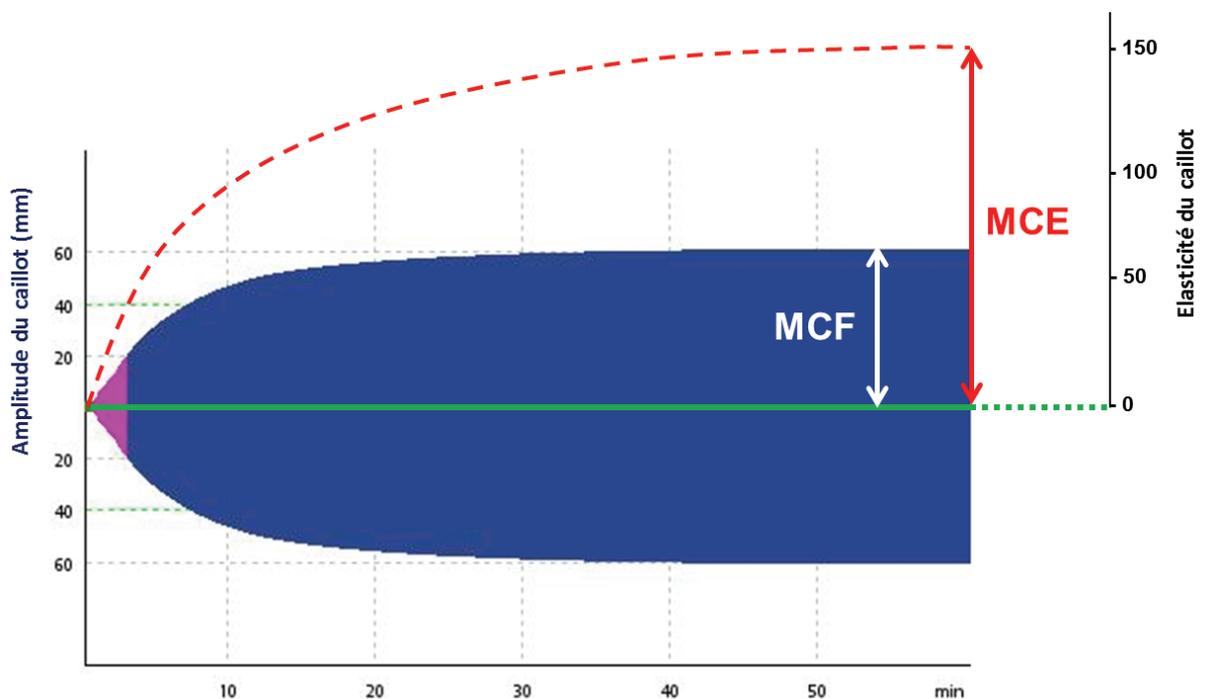
Cependant, des études plus récentes suggèrent que la viscosité du sang et le CE contribuent tous deux à l'amplitude du caillot (Evans et al., 2008). En raison de ces nouvelles données, la mesure du CE ne peut être assurée avec précision par les tests viscoélastiques (Hochleitner et al., 2015) car l'amplitude des contraintes de faible cisaillement appliquées par le dispositif change au cours de la formation du caillot (Evans et al., 2008).

### b. Élasticité maximale du caillot et application

L'élasticité maximale du caillot (MCE, *maximum clot elasticity*) est définie par le CE quand l'amplitude de ce dernier est maximale et correspond au MCF. Elle se calcule par la formule suivante :

$$MCE = (100 \times MCF) / (100 - MCF)$$

La **figure 4** décrit la courbe théorique du CE en fonction de l'amplitude de ce dernier.



**Figure 4.** Courbe théorique de l'élasticité du caillot en fonction de son amplitude  
(adapté de Salomon et al., 2015b)

La courbe pointillée rouge correspond à l'élasticité du caillot au cours du temps.

Le MCE peut être calculé sur tous les profils TEM (*cf III*). Une de ces principales applications consiste à « estimer » la contribution des plaquettes à l'élasticité du caillot en comparant le MCE des profils exTEM et fibTEM selon la formule suivante (Hochleitner et al., 2015) :

$$\text{MCE}_{\text{plaquettes}} = \text{MCE}_{\text{exTEM}} - \text{MCE}_{\text{fibTEM}}$$

### c. Le module de résistance élastique aux contraintes de cisaillement

Le module de résistance élastique aux contraintes de cisaillement (*shear elastic modulus strength*) ou G est calculé à partir du MCE selon la formule (Hartert et Schaeder, 1962) :

$$G = 50 \times \text{MCE} = (5000 \times \text{MCF}) / (100 - \text{MCF})$$

En toute rigueur, le G devrait s'exprimer sans unité. Cependant, il est le plus souvent exprimé en dynes/cm<sup>2</sup> (1 dyne/cm<sup>2</sup> = 0,1 N/m<sup>2</sup> = 0,1 Pa). Alors qu'il n'appartient pas aux unités du Système International, le dyne est fréquemment utilisé dans la littérature scientifique pour l'évaluation viscoélastique du caillot (Solomon et al., 2015b).

Cet indice a été proposé initialement par Hartert et Schaeder (Hartert et Schaeder, 1962). Ces derniers ont identifié une valeur de G égale à 5000 dynes/cm<sup>2</sup> pour un caillot formé dans un plasma riche en plaquettes et ayant une amplitude de 50 mm (Hartert et Schaeder, 1962). Une étude humaine récente suggère de remplacer cette valeur de 5000 par 4466 (Hochleitner et al., 2015).

En médecine vétérinaire, ce module est fréquemment utilisé pour caractériser les profils TEG et TEM en profil normal, hypercoagulable ou hypocoagulable (Goggs et al., 2014a ; Hanel et al., 2014). Cependant, aucune étude n'a validé l'utilisation du G pour cette caractérisation.

Une augmentation de la valeur de G indique un profil hypercoagulable alors qu'une diminution de sa valeur est en faveur d'un profil hypocoagulable (les valeurs usuelles de G devant être préalablement établies par chaque laboratoire).

## 2. L'indice du potentiel thrombodynamique

L'indice du potentiel thrombodynamique (TPI, *thrombodynamic potential index*) est un indice permettant l'évaluation globale de la coagulation et se calcule à partir du MCE selon la formule suivante (Raby, 1975) :

$$\text{TPI} = \text{MCE} / \text{CFT} = (100 \times \text{MCF}) / (100 - \text{MCF}) / \text{CFT}$$

Le TPI s'exprime sans unité.

Cet indice a été proposé pour la première fois par Raby pour décrire les effets des héparines (Raby, 1975). Son utilisation a ensuite été validée par les travaux de Cohen et al. (Cohen et al., 1977). Contrairement au G, le TPI n'est que peu décrit en médecine humaine (Lippi et al., 1985 ; Nates et al., 2007 ; Durila et al., 2015 ; Lisboa et al., 2015). Il a été utilisé dans ces études précédentes dans le but systématique de mettre en évidence un profil TEG ou TEM hypercoagulable (Lippi et al., 1985 ; Nates et al., 2007 ; Durila et al., 2015 ; Lisboa et al., 2015). Aucune étude n'a pour le moment décrit son utilisation chez les carnivores domestiques.

Une augmentation de la valeur du TPI indique un profil hypercoagulable alors qu'une diminution de sa valeur est en faveur d'un profil hypocoagulable (les valeurs usuelles du TPI devant être préalablement établies par chaque laboratoire).

## 3. L'indice de coagulation

L'indice de coagulation (CI, *coagulation index*) est également un indice permettant l'évaluation globale de la coagulation, mais, à la différence des précédents indices présentés, il prend en compte les quatre paramètres TEG ou TEM majeurs. Chez le chien, la formule suivante a été proposée pour le calculer (Sinnott et Otto, 2009) :

$$\text{CI} = 0,1227 \text{ CT} + 0,0092 \text{ CFT} + 0,1655 \text{ MCF} - 0,0241 \alpha - 5,0220$$

Le CI s'exprime sans unité.

Cet indice a été proposé pour la première fois par Caprini et al. pour comparer les caractéristiques hémostatiques globales entre des individus normaux et des patients souffrant de cancer (Caprini et al., 1976). Certains auteurs estiment que le CI est un meilleur indice que

le TPI et le G pour qualifier les profils TEG ou TEM car ces derniers ne prennent pas en compte les temps enzymatiques de la cascade de coagulation (Nates et al., 2007).

Trois études de médecine vétérinaire ont décrit cet indice pour qualifier les profils TEG de chiens souffrant d'anémie hémolytique à médiation immune (Sinnott et Otto, 2009) et de néphropathie exsudative (Donahue et al., 2011), ainsi que pour comparer les résultats TEG avec les lésions thrombotiques à l'examen nécropsique (Thawley et al., 2016). Il faut cependant noter que la seconde étude utilise la formule validée chez l'Homme (Donahue et al., 2011). Actuellement, cet indice a toujours été décrit dans des études reposant sur l'utilisation de la TEG.

Un CI supérieur à 4 suggère un profil hypercoagulable alors qu'un CI inférieur à -4 suggère un profil hypocoagulable (Donahue et al., 2011 ; Thawley et al., 2016).

### **III. LES DIFFERENTS PROFILS THROMBOELASTOMETRIQUES ET LEUR INTERPRETATION**

Selon l'activateur ajouté au cours de la manipulation pré-analytique, différents profils TEM peuvent être décrits.

#### **A. LES DIFFERENTS PROFILS**

Le profil exTEM permet l'évaluation de l'hémostase en initiant celle-ci par la voie extrinsèque. L'activateur est le facteur tissulaire.

Le profil inTEM permet l'évaluation de l'hémostase en initiant celle-ci par la voie intrinsèque (phase de contact). L'activateur est l'acide ellagique. Le profil inTEM se caractérise par un allongement du CT par rapport au profil exTEM.

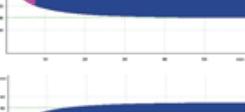
Le profil fibTEM permet l'évaluation de la fonctionnalité du fibrinogène en initiant l'hémostase par la voie extrinsèque. Les activateurs sont le facteur tissulaire et la cytochalasine D, un puissant inhibiteur de l'agrégation plaquettaire. Le profil fibTEM se caractérise par des amplitudes et un MCF plus bas par rapport au profil exTEM.

Le profil hepTEM permet l'évaluation de l'hémostase en initiant celle-ci par la voie intrinsèque (activation par l'acide ellagique) tout en inhibant l'activité des héparines par ajout d'héparinase.

Le profil apTEM permet l'évaluation de la fibrinolyse (activation de l'hémostase par le facteur tissulaire) par ajout d'un antifibrinolytique, l'aprotinine.

Le profil naTEM correspond au profil natif, c'est-à-dire sans ajout d'activateur. Sa durée de réalisation est donc beaucoup plus longue que les autres profils. A la connaissance de l'auteur de ce manuscrit, aucune étude en médecine vétérinaire n'a décrit ce profil.

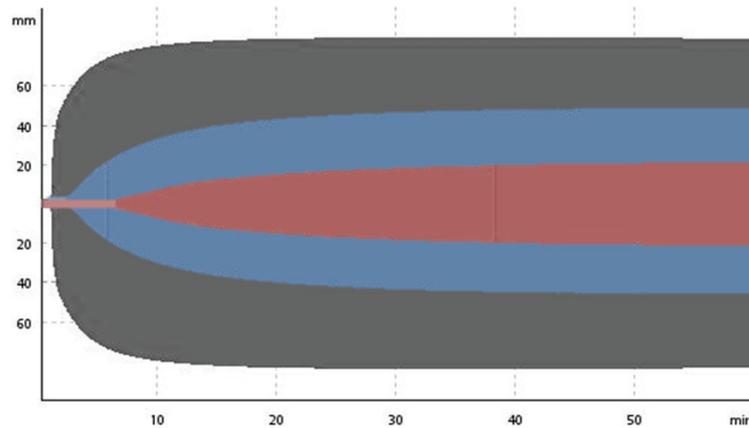
Le **tableau 2** résume les caractéristiques de ces différents profils TEM.

Profil	Activateur / inhibiteur	Rôles	Tracé normal
exTEM	Facteur tissulaire	Évaluation de la formation du caillot, de la polymérisation de la fibrine et de la fibrinolyse par la voie extrinsèque	
inTEM	Acide ellagique	Évaluation de la formation du caillot, de la polymérisation de la fibrine et de la fibrinolyse par la voie intrinsèque	
fibTEM	Facteur tissulaire + Cytochalasine D	Évaluation de la fonctionnalité du fibrinogène et de sa polymérisation par la voie extrinsèque	
hepTEM	Acide ellagique + Héparinase	Évaluation de la formation du caillot, de la polymérisation de la fibrine et de la fibrinolyse par la voie intrinsèque chez un patient hépariné	
apTEM	Facteur tissulaire + Aprotinine	Évaluation de la fibrinolyse par la voie extrinsèque	
naTEM	Aucun	Évaluation de la formation du caillot, de la polymérisation de la fibrine et de la fibrinolyse	

**Tableau 2.** Résumé des différents profils thromboélastométriques

## B. INTERPRETATION DES PROFILS INTEM ET EXTEM

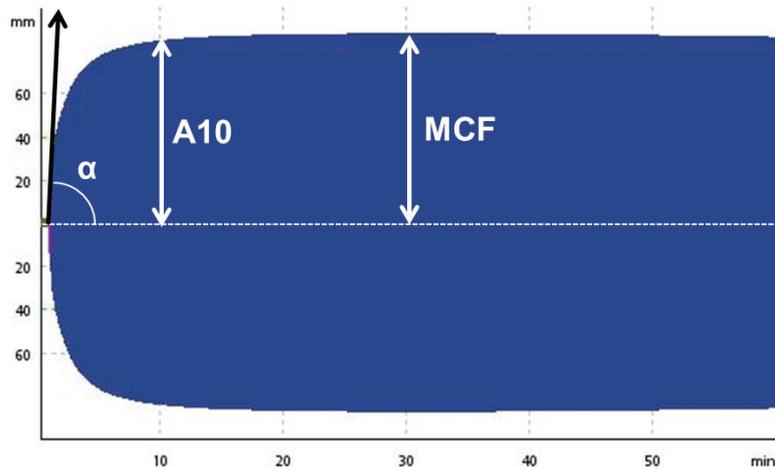
Classiquement, les profils exTEM et inTEM se définissent en profil hypercoagulable, normal ou hypocoagulable [Figure 5] associés ou non à une hyperfibrinolyse. Un profil normal se caractérise par l'ensemble des paramètres dans les valeurs usuelles définies préalablement par chaque laboratoire.



**Figure 5.** Superposition de profils exTEM hypercoagulable (*profil gris*), normal (*profil bleu*) et hypocoagulable (*profil rouge*)

### 1. Caractérisation d'un profil hypercoagulable

Il n'existe actuellement aucune définition consensuelle d'un profil hypercoagulable (Goggs et al., 2014a ; Hanel et al., 2014). Cette caractérisation repose le plus souvent sur la valeur des quatre paramètres mesurés (CT, CFT angle  $\alpha$  et MCF) ou sur la valeur de G (Hanel et al., 2014). Un profil hypercoagulable peut se définir par un raccourcissement du CT ou du CFT, ou une augmentation de l'angle  $\alpha$  ou du MCF, ou, par une augmentation de la valeur de G (Hanel et al., 2014). La **figure 6** illustre un exemple de profil exTEM hypercoagulable.

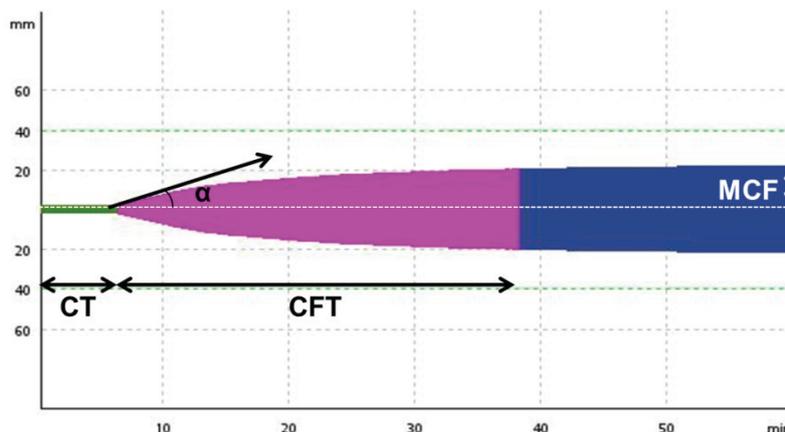


**Figure 6.** Profil exTEM hypercoagulable

*Ce profil se caractérise par un raccourcissement du CT et du CFT, et une augmentation de l'angle  $\alpha$  et du MCF. A noter que la valeur du MCF est presque équivalente à celle de l'A10.*

## 2. Caractérisation d'un profil hypocoagulable

Il n'existe actuellement aucune définition consensuelle d'un profil hypocoagulable (Goggs et al., 2014a ; Hanel et al., 2014). Cette caractérisation repose le plus souvent sur la valeur des quatre paramètres mesurés (CT, CFT, angle  $\alpha$  et MCF) ou sur la valeur de G (Hanel 2014). Un profil hypocoagulable peut se définir par un allongement du CT ou du CFT, ou une diminution de l'angle  $\alpha$  ou du MCF, ou, par une diminution de la valeur de G (Hanel et al., 2014). La **figure 7** illustre un exemple de profil exTEM hypocoagulable.

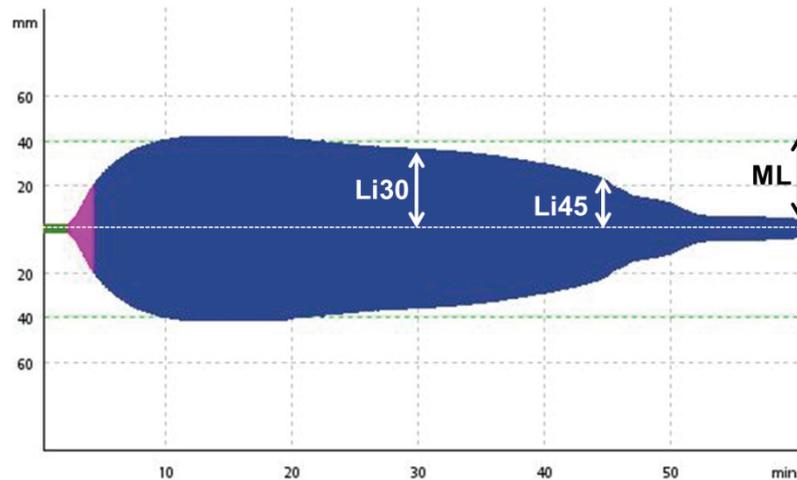


**Figure 7.** Profil exTEM hypocoagulable

*Ce profil se caractérise par un allongement du CT et du CFT, et une diminution de l'angle  $\alpha$  et du MCF*

### 3. Caractérisation d'un profil hyperfibrinolytique

Il n'existe actuellement aucune définition consensuelle d'un profil hyperfibrinolytique (Goggs et al., 2014a ; Hanel et al., 2014). Classiquement, il se définit par une diminution des indices de lyse (Li30, Li45 ou Li60) et/ou par une augmentation du ML [Figure 8].



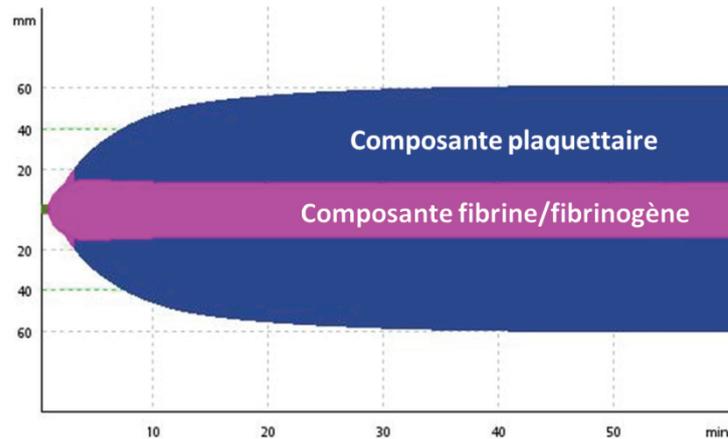
**Figure 8.** Profil exTEM hyperfibrinolytique

*Ce profil se caractérise par une diminution des index de lyse (Li30, Li45 et Li60) et une augmentation du ML*

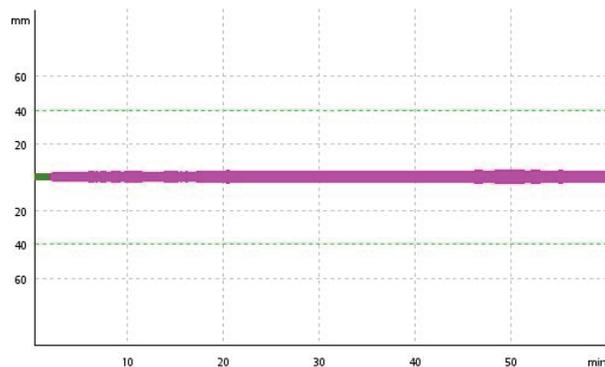
### C. INTERPRETATION DU PROFIL FIBTEM

Contrairement aux autres profils, un profil fibTEM normal ne se caractérise pas par l'ensemble des paramètres. Il repose sur le CT, le MCF (et les diverses amplitudes A5, A10...), les index de lyse (Li30, Li45, et Li60) et le ML, le CFT tendant vers l'infini et l'angle  $\alpha$  tendant vers 0.

Etant activé par le facteur tissulaire, le profil fibTEM devrait, en toute rigueur, s'interpréter en comparant ses valeurs avec celles du profil exTEM. L'activité plaquettaire étant inhibée sur le fibTEM, ce profil permet de mettre en évidence la contribution de la composante fibrine/fibrinogène sur l'hémostase [Figure 9]. Une diminution des paramètres du profil fibTEM diagnostique la présence d'une hypofibrinogénémie et/ou d'une défaillance de la fonctionnalité du fibrinogène (avec défaut de la polymérisation du fibrinogène) [Figure 10] (Solomon et al., 2015a).



**Figure 9.** Superposition d'un profil fibTEM (*profil rose*) et d'un profil exTEM (*profil bleu*)  
*Cette superposition met en évidence les contributions respectives des composantes plaquettaire et fibrine/fibrinogène au caillot (adapté de Solomon et al., 2015a)*



**Figure 10.** Profil fibTEM hypocoagulable

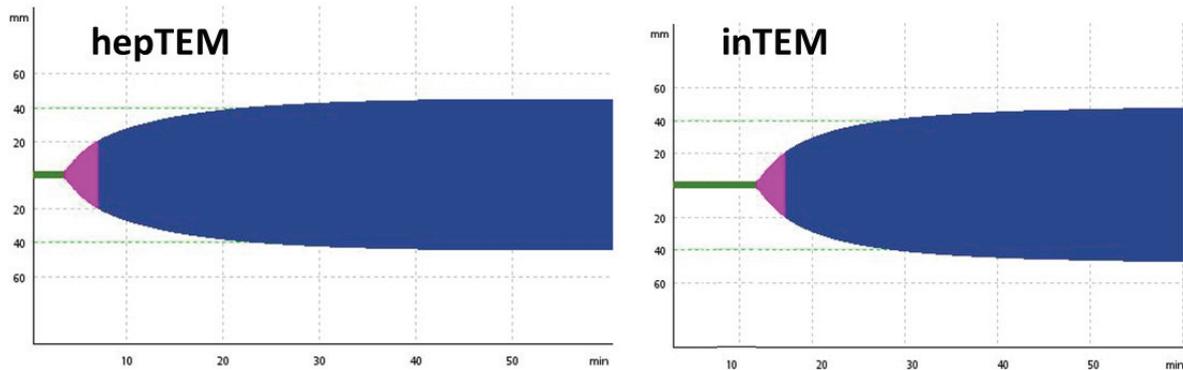
*La faible amplitude observée sur ce profil est en faveur d'une hypofibrinogénémie et/ou d'un défaut de polymérisation du fibrinogène ou de la fibrine*

#### **D. INTERPRETATION DU PROFIL HEPTM**

Le profil hepTEM est réalisé en cas de suspicion de coagulopathie induite par l'héparinothérapie (à haut poids moléculaire). Le profil hepTEM utilise une activation par l'acide ellagique avec ajout d'héparinase et son interprétation repose sur la comparaison de ses valeurs avec celles du profil inTEM :

- Si les paramètres des deux profils sont similaires, le déficit hémostatique n'est pas en lien avec l'héparinothérapie.

- Si le profil inTEM est hypocoagulable (caractérisé le plus souvent par un allongement du CT) mais que le profil hepTEM s'avère normal, le déficit hémostatique est causé par l'héparinothérapie [Figure 11].



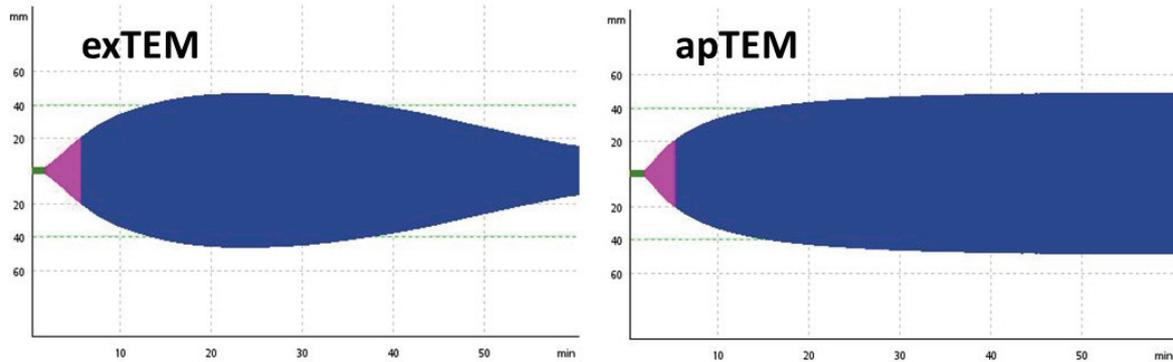
**Figure 11.** Comparaison des profils hepTEM et inTEM

*Le CT est significativement plus long sur le profil inTEM que sur le profil hepTEM. Cette différence est en faveur d'une coagulopathie induite par l'héparinothérapie.*

## E. INTERPRÉTATION DU PROFIL APTEM

Le profil apTEM est réalisé pour confirmer une hyperfibrinolyse. Le profil apTEM utilise une activation par le facteur tissulaire avec ajout d'aprotinine et son interprétation repose sur la comparaison des valeurs de ses paramètres fibrinolytiques avec celles du profil exTEM :

- Si une fibrinolyse est présente sur le profil exTEM mais absente sur le profil apTEM, l'hyperfibrinolyse est vraie et doit être traitée (utilisation d'un antifibrinolytique notamment) [Figure 12].
- Si une fibrinolyse est présente sur les deux profils, l'hyperfibrinolyse peut être en lien avec une erreur préanalytique.



**Figure 12.** Comparaison des profils exTEM et apTEM

*La mise en évidence d'une hyperfibrinolyse sur le profil exTEM et non sur le profil apTEM confirme une hyperfibrinolyse primitive*

#### IV. UTILISATION EN PRATIQUE CLINIQUE VETERINAIRE

##### A. RECOMMANDATIONS D'UTILISATION DU ROTEM EN MEDECINE VETERINAIRE

En 2014, ont été publiées dans le numéro 24 du *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care* des recommandations d'experts quant à l'utilisation des tests viscoélastiques en médecine vétérinaire. Ces experts se sont réunis sous l'acronyme PROVETS pour partenariat sur la standardisation des tests viscoélastiques rotatifs (*Partnership on Rotational ViscoElastic Test Standardization*). Ces recommandations avaient pour but de standardiser la réalisation des examens TEG et TEM afin de réaliser, à l'avenir, des méta-analyses à partir des résultats des différentes études originelles. Ces recommandations ont été publiées sous la forme d'un éditorial et de cinq articles distincts ayant pour thème :

- la comparabilité des deux systèmes (TEG et ROTEM) (McMichael et al., 2014b),
- la récolte des échantillons sanguins et la manipulation (Flatland et al., 2014),
- les méthodes d'activation des tests (deLaforcade et al., 2014),
- les définitions et la communication des données (Hanel et al., 2014), et
- les tests non standards (Brainard et al., 2014).

Les paragraphes suivants détaillent les principales recommandations extraites de ces articles.

### **1. La comparabilité des deux systèmes**

Les résultats des deux automates ne sont pas directement comparables et l'extrapolation des résultats d'un automate à l'autre doit être évitée (McMichael et al., 2014b).

### **2. La récolte des échantillons sanguins et la manipulation**

Les experts recommandent la réalisation d'une phlébotomie jugulaire au moyen d'aiguilles de calibre 21 gauges au minimum pour la récolte du sang. Ce dernier doit être conservé dans du citrate de sodium concentré à 3,2% tamponné dans un rapport strict de 1:9 (concentration finale de 10,8 mM de citrate). Les auteurs conseillent également de défausser, lors de la récolte, un volume sanguin (le volume n'est cependant pas précisé). Les échantillons sanguins doivent ensuite être maintenus à température ambiante pendant 30 minutes et non réfrigérés avant l'analyse (Flatland et al., 2014).

### **3. Les méthodes d'activation des tests**

L'utilisation systématique et standardisée d'activateurs est recommandée. Les experts suggèrent qu'au minimum deux profils distincts soient réalisés par patient pour évaluer complètement son système hémostatique.

Les directives du fabricant concernant l'utilisation systématique des contrôles de qualité doivent être respectées. La pipette automatique doit être utilisée pour le ROTEM. Les essais en double ne sont pas nécessaires lorsque les activateurs sont utilisés. Il n'y a pas suffisamment de preuves pour recommander une quantité précise de sang devant être prélevée pour la réalisation des tests. Les auteurs préconisent de suivre les directives de chaque fabricant.

Pour la pratique clinique, tous les tests doivent être menés suffisamment longtemps pour obtenir toutes les valeurs pertinentes. A des fins de recherche, tous les tests doivent être menés suffisamment longtemps pour obtenir les valeurs des paramètres de la fibrinolyse.

Il n'y a pas suffisamment de preuves pour recommander l'utilisation de températures spécifiques pour chaque espèce. La réalisation des tests à une température de 37°C est préconisée. Chez les patients souffrant d'hypothermie ou d'hyperthermie marquée, les experts recommandent de réaliser les essais à la température centrale du patient et à 37°C pour évaluer les effets de la température sur le système de coagulation (deLaforcade et al., 2014).

#### **4. Les définitions et la communication des données**

Les quatre paramètres (CT, CFT, angle  $\alpha$  et MCF) doivent toujours être rapportés, permettant ainsi le calcul post-hoc de G si nécessaire. La communication de la valeur de G en plus du MCF est encouragée pour permettre aux auteurs d'évaluer et de comparer l'utilité clinique de ces deux paramètres. La communication systématique de ces quatre paramètres vise à faciliter la réalisation de méta-analyses dans le futur.

Il n'y a pas suffisamment de preuves pour recommander comment une hypercoagulabilité, une hypocoagulabilité et une hyperfibrinolyse doivent être définies chez le Chien et chez le Chat. Toutes les études doivent systématiquement préciser comment ces trois conditions ont été définies. Les experts recommandent également de communiquer, au minimum, les valeurs contemporaines d'hématocrite, de fibrinogénémie et de numération plaquettaire.

Il n'y a pas suffisamment de preuves pour recommander comment une hypofibrinolyse doit être définie chez le Chien et chez le Chat. Il est possible que les essais standards TEG et TEM soient incapables de détecter une hypofibrinolyse.

Tous les centres utilisant les tests viscoélastiques doivent établir leurs propres valeurs de référence. Ces valeurs usuelles ne sont pas interchangeables du ROTEM à la TEG et inversement. L'âge et la race doivent être pris en compte lors de l'établissement de ces valeurs usuelles. Au sein d'un même centre, les protocoles de prélèvement d'échantillons, la manipulation des échantillons et la réalisation de l'analyse doivent être standardisés et rédigés sous forme de procédure (Hanel et al., 2014).

*L'auteur remarque que ces recommandations n'intègrent pas la nécessité de rapporter les différentes amplitudes (A5, A10, A15, ...). Ces dernières sont largement utilisées dans les essais cliniques humains pour anticiper la valeur du MCF afin de définir des algorithmes thérapeutiques décisionnels les plus précoces possibles. Leur utilisation en médecine vétérinaire permettrait de faire évoluer ces tests viscoélastiques de la description du déséquilibre hémostatique du patient vers un véritable outil de monitoring à visée thérapeutique.*

#### **5. Les tests non standards**

Ces recommandations concernent essentiellement la TEG. La seule recommandation ayant pour objet le ROTEM est la suivante : il n'y a pas suffisamment de preuves chez le Chien et chez le Chat pour recommander systématiquement l'utilisation des tests étudiant la

fonctionnalité du fibrinogène (fibTEM) à des fins cliniques. Si ce dernier est utilisé, il est préconisé de ne pas utiliser de l'abciximab pour inhiber l'activité plaquettaire (Brainard et al., 2014).

## **B. DESCRIPTION DES MODIFICATIONS VISCOELASTIQUES SANGUINES DANS DIVERSES MALADIES ET ENTITES MEDICALES**

Les modifications TEG et TEM ont été décrites dans près d'une trentaine de maladies et entités médicales chez le Chien, recensées dans le **tableau 3**.

Les pourcentages de profils hypercoagulables, normaux et hypocoagulables précisés dans chaque étude sont donnés à titre indicatif. En toute rigueur, la comparaison de ces pourcentages entre ces différentes études ne devrait être faite étant donnée l'hétérogénéité des définitions utilisées pour classer ces profils. Il convient également de rappeler que la TEM ou la TEG ne sont capables de mettre en évidence qu'un profil hypercoagulable ou hypocoagulable et non un état hypercoagulable ou hypocoagulable. *Sensu stricto*, un état hypercoagulable ne peut se définir que par l'observation d'un profil TEM ou TEG hypercoagulable associé à des signes cliniques et/ou biologiques de thrombose alors qu'un état hypocoagulable ne peut se définir que par l'observation d'un profil TEM ou TEG hypocoagulable associé à des signes cliniques et/ou biologiques de saignements (Hanel et al., 2014). Pour l'auteur de ce manuscrit, cette distinction est cruciale à rappeler car de nombreuses études citées dans le **tableau 3** ne respectent pas ces terminologies.

Nature de l'affection	Maladie ou condition médicale	Référence	Auto-mate	Nombre de chiens malades	% avec un profil hyper-coagulable	% avec un profil normal	% avec un profil hypo-coagulable	
Hématologique	Anémie hémolytique à médiation immune	Hamzianpour et Chan, 2016	TEG	27	70%	30%	0%	
		Goggs et al., 2012	TEG	30	100%	0%	0%	
		Fenty et al., 2011	TEG	11	100%	0%	0%	
		Sinnott et Otto, 2009	TEG	39	85%	15%	0%	
		O'Marra et al., 2012	TEG	10	0%	0%	100%	
		CIVD	Wiinberg et al. 2008	TEG	50	44%	34%	22%
Infectieuse	Hémophilie A	Othman et al., 2009	TEG	13	0%	0%	100%	
	Angiostrongylose	Adamantos et al., 2015	TEG	18	0%	6%	94%	
	Blastomycose	McMichael et al., 2015	TEM	23	100%	0%	0%	
	Leishmaniose	Bruno et al., 2015b	TEM	29	100%	0%	0%	
	Parvovirose	Otto et al., 2000	TEG	9	100%	0%	0%	
	Péritonite septique	Bentley et al., 2013	TEG	27	ND	ND	ND	
	Piroplasmose	Liebenberg et al., 2013	TEG	19	0%	100%	0%	
	Spirocerose	Pazzi et al., 2014	TEG	39	100%	0%	0%	
	Tumorale	Carcinome	Vilar Saavedra et al., 2011	TEG	32	53%	ND	ND
		Lymphome multicentrique	Kol et al., 2015	TEG	27	63%	7%	30%
Néoplasies diverses		Bucknoff et al., 2014	TEG	10	ND	ND	ND	
		Andreassen et al., 2012	TEG	71	66%	30%	4%	
		Kristensen et al., 2008	TEG	36	50%	33%	17%	
Endocrinienne	Hypercorticisme	Park et al., 2013	TEG	19	100%	0%	0%	
		Kol et al., 2013	TEG	23	96%	ND	ND	
		Rose et al., 2013	TEG	15	80%	20%	0%	
		Klose et al., 2011	TEG	28	100%	0%	0%	

**Tableau 3.** Recensement des maladies et entités médicales décrites par les examens viscoélastiques chez le Chien

Nature de l'affection	Maladie ou condition médicale	Référence	Auto-mate	Nombre de chiens malades	% avec un profil hyper-coagulable	% avec un profil normal	% avec un profil hypo-coagulable
Agression tissulaire	Post-opératoire stérilisation	Moldal et al., 2012	TEG	42	ND	ND	ND
	Post-opératoire orthopédique	Saavedra et al., 2011	TEG	21	ND	ND	ND
		Bruno et al., 2015a	TEM	34	0%	100%	0%
Affection hépatique	Traumatisme	Hollowaychuk et al., 2014	TEG	40	ND	ND	ND
	Maladie hépatique aiguë	Abelson et al., 2013	TEG	30	33%	67%	0%
		Kelley et al., 2016	TEG	21	10%	38%	52%
Autres	Obstruction biliaire	Mayhew et al., 2013	TEG	10	100%	0%	0%
	Shunt portosystémique congénital	Kelley et al., 2013	TEG	21	43%	57%	0%
		Entéropathie exsudative	Goodwin et al., 2011	TEG	15	100%	0%
Autres	Envenimation ophidienne	Armentano et al., 2014	TEG	38	5%	26%	69%
		Nagel et al., 2014	TEG	18	ND	ND	ND
	Hémoabdomens spontanés	Fletcher et al., 2016	TEG	28	ND	ND	ND
		White et al., 2016	TEG	76	89%	ND	ND
	Néphropathie exsudative	Lennon et al., 2013	TEG	28	96%	ND	ND
		Thromboembolie pulmonaire	Goggs et al., 2014b	TEG	12	ND	ND

**Tableau 3 (suite).** Recensement des maladies et entités médicales décrites par les examens viscoélastiques chez le Chien  
(*ND, non déterminé*)

### C. DESCRIPTION DES MODIFICATIONS VISCOELASTIQUES SANGUINES DANS DES MODELES EXPERIMENTAUX

Les altérations TEG et TEM ont été décrites dans quelques modèles expérimentaux de situation pathologique chez le Chien. Le **tableau 4** recense ces modèles expérimentaux.

Modèle expérimental	Référence	Auto-mate	Type d'étude	Effets viscoélastiques
Anémie	Brooks et al., 2014	TEG	<i>In vitro</i>	Profil hypercoagulable
	McMichael et al., 2014a	TEM	<i>In vitro</i>	Profil hypercoagulable
Choc hémorragique	Lynch et al., 2016a	TEG	<i>In vivo</i>	Diminution R, MA et G, mais restant dans les valeurs usuelles
Hypothermie	Taggart et al., 2012	TEG	<i>In vitro</i>	Augmentation K et diminution angle $\alpha$
Endotoxémie	Eralp et al., 2011	TEG	<i>In vivo</i>	Diminution MA et angle $\alpha$
Effort	Bauer et al., 2012	TEG	<i>In vivo</i>	Absence d'effet

**Tableau 4.** Recensement des modèles expérimentaux pour lesquels ont été utilisés les examens viscoélastiques chez le Chien

### D. DESCRIPTION DES MODIFICATIONS VISCOELASTIQUES SANGUINES INDUITES PAR DIFFERENTS MEDICAMENTS OU SOLUTES

Les altérations TEG et TEM ont également été décrites après l'utilisation de différents médicaments et solutés chez le Chien. Le **tableau 5** recense les substances et solutés dont les effets viscoélastiques sanguins ont été évalués. Notons que près de la moitié de ces études a été réalisée *in vitro*. La signification clinique de leurs résultats reste par conséquent à établir *in vivo*. De plus, l'annotation « absence d'effet » doit être interprétée sur deux plans : soit le médicament n'a effectivement pas d'effet sur les propriétés viscoélastiques sanguines, soit la TEM ou la TEG ne sont pas assez sensibles pour détecter cet effet s'il est présent.

Classe	Molécule	Référence	Auto- mate	Type d'étude	Chiens	Effets viscoélastiques
Antiagrégants plaquettaires	Aspirine	Brainard et al., 2007	TEG	<i>In vivo</i>	M	Absence d'effet
	Aspirine + prednisone	O'Kell et al., 2012	TEG	<i>In vivo</i>	S	Absence d'effet
Anti- fibrinolytiques	Acide tranexamique	Kelmer et al., 2015	TEG	<i>In vivo</i>	S	Augmentation Ly30
		Kakiuchi et al., 2014	TEM	<i>In vivo</i>	S	Diminution des indices de lyse
	Acide ε- aminocaproïque	Fletcher et al., 2014	TEG	<i>In vitro</i>	NA	Diminution des indices de lyse
		Marin et al., 2012	TEG	<i>In vivo</i>	NA	Diminution des indices de lyse
		Brainard et al., 2007	TEG	<i>In vivo</i>	S	Diminution R et K
Anti- inflammatoires non stéroïdiens	Carprofène	Brainard et al., 2007	TEG	<i>In vivo</i>	M	Diminution MA et angle α
	Deracoxib	Brainard et al., 2007	TEG	<i>In vivo</i>	M	Augmentation MA et CI
	Dypirone	Zanuzzo et al., 2015	TEM	<i>In vivo</i>	S	Absence d'effet
	Meloxicam	Zanuzzo et al., 2015	TEM	<i>In vivo</i>	S	Absence d'effet
		Brainard et al., 2007	TEG	<i>In vivo</i>	M	Absence d'effet
Anti- inflammatoires stéroïdiens	Meloxicam + dypirone	Zanuzzo et al., 2015	TEM	<i>In vivo</i>	S	Absence d'effet
	Prednisone	O'Kell et al., 2012	TEG	<i>In vivo</i>	S	Augmentation MA et diminution Ly60
		Rose et al., 2011	TEG	<i>In vivo</i>	S	Profil hypercoagulable
	Héparines	Daltéparine	Lynch et al., 2014	TEG	<i>In vivo</i>	M
Brainard et al., 2012			TEG	<i>In vivo</i>	S	Profil hypocoagulable
Héparine non fractionnée		Jessen et al., 2008	TEG	<i>In vitro</i>	NA	Profil hypocoagulable
		Pittman et al., 2010	TEG	<i>In vivo</i>	S	Profil hypocoagulable

**Tableau 5.** Recensement des médicaments et solutés utilisés pour évaluer leurs effets sur les propriétés viscoélastiques sanguines chez le Chien  
(*M, malade ; NA, non applicable ; S, sain*)

Classe	Molécule ou soluté	Référence	Auto- mate	Type d'étude	Chiens	Effets viscoélastiques
Solutés	Colloïdes	Morris et al., 2016	TEG	<i>In vitro</i>	NA	Profil hypocoagulable
		Wurlod et al., 2015	TEM	<i>In vitro</i>	NA	Absence d'effet jugé significatif
		Gauthier et al., 2015	TEG	<i>In vivo</i>	S + M	Profil hypocoagulable
		Falco et al., 2012	TEM	<i>In vitro</i>	NA	Profil hypocoagulable
	Cristalloïdes hypertoniques	Adamik et al., 2015	TEM	<i>In vitro</i>	NA	Profil hypocoagulable
		Wurlod et al., 2015	TEM	<i>In vitro</i>	NA	Absence d'effet jugé significatif
	Cristalloïdes isotoniques	Morris et al., 2016	TEG	<i>In vitro</i>	NA	Profil hypocoagulable
	Emulsions lipidiques	Tonkin et al., 2013	TEG	<i>In vitro</i>	NA	Diminution MA
		Adamik et al., 2015	TEM	<i>In vitro</i>	NA	Profil hypocoagulable
	Plasma frais congelé	Morris et al., 2016	TEG	<i>In vitro</i>	NA	Absence d'effet
Autres	Acépromazine	Conner et al., 2012	TEG	<i>In vivo</i>	S	Absence d'effet
	Dextrose	Gonzales et al., 2011	TEG	<i>In vivo</i>	S	Absence d'effet jugé significatif
	Sulfate de magnésium	Rioja et al., 2012	TEG	<i>In vivo</i>	S	Absence d'effet
	Sulfate de protamine	Bailey et Koenigshof, 2014	TEG	<i>In vitro</i>	NA	Profil hypocoagulable

**Tableau 5 (suite).** Recensement des médicaments et solutés utilisés pour évaluer leurs effets sur les propriétés viscoélastiques sanguines chez le Chien

(M, malade ; NA, non applicable ; S, sain)

La mention « absence d'effet jugé significatif » correspond à l'absence d'effet biologique et/ou clinique jugé pertinent par les auteurs des études ciblées.

## E. AUTRES APPLICATIONS

Les examens viscoélastiques ont été utilisés pour caractériser les particularités hémostatiques de quelques races : les greyhounds et les bouledogues. Les greyhounds sains présentaient un profil hypocoagulable en comparaison avec des races non greyhounds (Vilar et al., 2008). Les bouledogues français sains présentaient un profil hypercoagulable en comparaison avec d'autres races non brachycéphales (Hoareau et Mellema, 2015). Les auteurs émettaient l'hypothèse que ceci pouvait être vraisemblablement en lien avec le syndrome brachycéphale des bouledogues et l'hypoxémie chronique induite par ce dernier (Hoareau et Mellema, 2015).

Les effets de la nature du prélèvement sanguins sur les résultats TEG ont également été évalués. La localisation du prélèvement veineux (veine jugulaire ou veine saphène latérale) n'influait pas les résultats TEG (Walker et al., 2012). Au contraire, le mode de prélèvement (aspiration classique ou récolte via un tube de type Vacutainer®) pouvait induire des modifications viscoélastiques (Walker et al., 2012). La qualité de la ponction veineuse (atraumatique ou traumatique) pouvait influencer les valeurs du R (Garcia-Pereira et al., 2012).

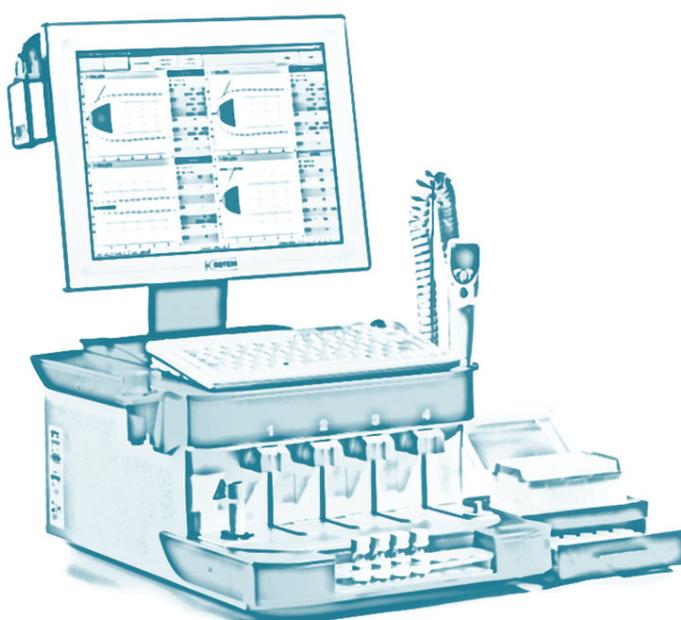
Une étude a évalué rétrospectivement les données TEG de chiens présentant une diminution du temps de prothrombine (PT) et du temps de thromboplastine activé partiel (aPTT) (Song et al., 2016). Aucune corrélation n'a été trouvée entre les temps de coagulation et les paramètres TEG alors que les chiens présentaient significativement plus de signes avérés ou suspectés de complications thrombotiques que les chiens contrôles. Une autre étude a évalué les résultats TEG avec les données de l'examen nécropsique et notamment les lésions compatibles avec un phénomène thrombotique (Thawley et al., 2016). Aucune association n'a été trouvée entre les données des examens viscoélastiques et la présence de thrombose *post-mortem*.

Enfin, une dernière étude a comparé les propriétés viscoélastiques d'échantillons de plasma frais congelé et de plasma congelé (stocké pendant 5 ans) (Urban et al., 2013). Aucune différence des paramètres TEG n'a été observée entre ces deux types de plasma.



## ***PARTIE 2.***

### ***ETABLISSEMENT DES VALEURS USUELLES DES PARAMETRES THROMBOELASTOMETRIQUES. INFLUENCE DU SEXE ET DE L'AGE.***



# **I. ETABLISSEMENT DES VALEURS USUELLES ET INFLUENCE DU SEXE**

## **A. MATERIELS ET METHODES**

### **1. Animaux**

Cette étude a été approuvée par le comité d'éthique de VetAgro Sup, campus vétérinaire de Lyon (#1266). Cinquante-trois chiens appartenant à des étudiants ou des membres du personnel ont été recrutés. Ces chiens ont été considérés en bonne santé sur la base de leurs antécédents médicaux et de l'examen clinique.

Les critères d'inclusion étaient un examen clinique normal et les résultats de la numération et formule sanguines (NFS) et du bilan biochimique dans les valeurs usuelles. Les critères d'exclusion comprenaient l'historique d'une maladie récente et/ou l'administration de tout médicament durant les trois semaines précédant le début de l'étude.

### **2. Récolte des échantillons sanguins**

Une prise de sang veineuse jugulaire unique a été réalisée sur chaque chien en utilisant une aiguille de 23 gauges reliée à une seringue de 10 mL. L'échantillon de sang veineux total a ensuite été réparti dans l'ordre suivant dans :

- un tube citraté pour la réalisation du bilan d'hémostase et des profils TEM (4 mL ; chaque tube contenant 3,2% de citrate de sodium tamponné dans un rapport strict sang/citrate de 1:9 pour une concentration finale de citrate de 10,8 mmol/L),
- un tube EDTA (acide éthylène diamine tétra-acétique) pour la réalisation de la NFS (3 mL), et
- un tube hépariné pour la réalisation des analyses biochimiques (3 mL).

### **3. Analyses**

Le profil hématologique comportait la numération des hématies, le taux d'hématocrite, l'hémoglobininémie, et la numération des globules blancs (GB) et des plaquettes. Le panel biochimique était constitué de l'activité sérique des alanines aminotransférases (AlAT) et des phosphatases alcalines (PAL), ainsi que de l'albumininémie, l'urémie, la créatininémie, la glycémie, la protidémie totale et la globulinémie. La NFS et le bilan biochimique ont été

effectués respectivement par les analyseurs automatisés suivants : Xt-2000iV (Sysmex) et Konelab 30i (Thermo Fisher).

Le bilan d'hémostase incluait le temps de prothrombine (PT) et le temps de thromboplastine activé partiel (aPTT). Les temps de coagulation ont été mesurés en accord avec les recommandations du fabricant (Coag Dx, IDEXX).

La thromboélastométrie rotative (ROTEM®, Pentapharm GmbH) a été réalisée exactement 30 minutes après le prélèvement sanguin veineux, en accord avec les instructions du fabricant et les recommandations récentes du groupe PROVETS (Flatland et al., 2014). L'examen a été réalisé pour une durée totale de 60 minutes. Les échantillons de sang citraté (300 µL) ont été pré-réchauffés à 37°C et ont été ajoutés aux réactifs fournis par le fabricant à l'aide de la pipette électronique reliée à l'automate. Trois profils TEM ont été conduits (inTEM, exTEM, et fibTEM).

#### **4. Répétabilité intra-essai**

Deux chiens mâles castrés âgés respectivement de 3 et 5 ans ont été inclus. Une prise de sang veineuse jugulaire unique a été réalisée sur chaque chien en utilisant une aiguille de 23 gauges reliée à une seringue de 10 mL. L'échantillon de sang a ensuite été placé dans un tube citraté, identique à celui décrit précédemment. Trois profils TEM ont été conduits (inTEM, exTEM, et fibTEM), exactement 30 minutes après la prise de sang, en suivant la méthodologie détaillée dans le paragraphe précédent. L'automate étant pourvu de quatre canaux, les prélèvements sanguins ont été répartis (300 µL) dans chaque canal afin de réaliser l'analyse en 4 exemplaires. Les coefficients de variation (CV) intra-essai ont ensuite été calculés selon la formule :  $CV = SD/moyenne$ , formule dans laquelle SD représente l'écart type (*standard deviation*).

#### **5. Analyses statistiques**

Tous les résultats sont présentés par leur moyenne et leur SD. La normalité de la distribution et l'homogénéité des variances ont été examinées par le test de Shapiro-Wilk. Les valeurs usuelles sont définies par les percentiles 0,025 et 0,975 de chaque paramètre. L'influence du sexe sur les différents paramètres est évaluée par un test exact de Fisher. Une valeur de  $P < 0,05$  est considérée comme statistiquement significative. Toutes les analyses ont été réalisées à l'aide d'un logiciel du commerce (XLSTAT v2012, Addinsoft).

## B. RESULTATS

Cinquante-trois chiens (11 beagles, 8 border collies, 8 croisés, 6 bergers Australiens, 3 labradors retrievers, 3 golden retrievers, 2 huskies, 2 bergers allemands, 2 cockers spaniel, 1 american staffordshire terrier, 1 jack russel terrier, 1 berge d'appenzell, 1 springer spaniel anglais, 1 shih-tzu, 1 samoyède et 1 west highland white terrier) ont été inclus dans l'étude. L'âge médian était de 2,5 ans (intervalle, 1 à 9,5 ans). La population comprenait 23 mâles (dont 16 entiers et 7 castrés) et 30 femelles (dont 20 entières et 10 stérilisées). Tous les chiens avaient un examen clinique normal et des paramètres hématologiques, biochimiques et hémostatiques dans les valeurs usuelles.

Les valeurs usuelles des paramètres de l'exTEM, de l'inTEM et du fibTEM sont respectivement détaillées dans les **tableaux 6, 7 et 8**. Les valeurs usuelles établies pour les deux indices de coagulation, G et TPI, sont respectivement de 4025 à 11129 dynes/cm<sup>2</sup> et 0,38 à 2,81.

	CT (s)	A10 (mm)	CFT (s)	MCF (mm)	$\alpha$ (°)	Li45 (%)	Li60 (%)	ML (%)
Moyenne	51,45	43,55	149,92	56,32	62,75	98,28	94,02	11,85
SD	11,61	7,97	44,75	6,74	6,59	4,23	7,70	12,21
Limite basse à 2,5%	33,00	32,59	78,50	44,60	51,00	88,30	72,60	0,00
Limite haute à 97,5%	69,70	59,00	230,70	69,00	74,70	100,00	100,00	41,00

**Tableau 6.** Valeurs usuelles des paramètres de l'exTEM

	CT (s)	A10 (mm)	CFT (s)	MCF (mm)	$\alpha$ (°)	Li45 (%)	Li60 (%)	ML (%)
Moyenne	153,13	44,21	118,85	57,08	68,51	99,92	97,72	7,32
SD	32,60	7,05	49,30	6,57	6,86	0,33	2,61	8,25
Limite basse à 2,5%	108,58	29,50	57,30	41,50	49,95	99,00	92,20	0,00
Limite haute à 97,5%	198,00	57,70	269,56	68,70	78,71	100,00	100,00	28,40

**Tableau 7.** Valeurs usuelles des paramètres de l'inTEM

	CT (s)	A10 (mm)	CFT (s)	MCF (mm)	$\alpha$ (°)	Li45 (%)	Li60 (%)	ML (%)
Moyenne	52,30	7,23	NA	8,38	NA	80,49	78,62	29,00
SD	18,63	3,04	NA	3,35	NA	10,64	11,85	10,63
Limite basse à 2,5%	32,00	3,00	NA	3,0	NA	64,20	60,30	11,90
Limite haute à 97,5%	98,00	12,70	NA	14,0	NA	100,00	100,00	47,70

**Tableau 8.** Valeurs usuelles des paramètres du fibTEM

(NA, non applicable)

Aucune différence significative n'a été mise en évidence pour les paramètres TEM des trois profils conduits entre les mâles et les femelles. La prise en compte de la stérilisation dans cette comparaison ne modifiait pas cette conclusion [Tableau 9].

Sexe	Catégorie	CT (s)	A10 (mm)	CFT (s)	MCF (mm)	
exTEM	Mâles	Tous	51 ± 11	44 ± 9	151 ± 50	56 ± 8
		Intacts	50 ± 10	45 ± 10	149 ± 52	57 ± 8
		Castrés	53 ± 13	41 ± 7	156 ± 48	54 ± 6
	Femelles	Toutes	52 ± 12	43 ± 7	149 ± 41	57 ± 6
		Intactes	54 ± 12	44 ± 8	145 ± 42	57 ± 7
		Stérilisées	47 ± 11	42 ± 6	158 ± 38	56 ± 4
inTEM	Mâles	Tous	162 ± 39	44 ± 9	129 ± 65	56 ± 8
		Intacts	160 ± 25	44 ± 10	133 ± 76	57 ± 9
		Castrés	167 ± 32	43 ± 5	120 ± 31	55 ± 5
	Femelles	Toutes	146 ± 25	45 ± 6	111 ± 32	58 ± 5
		Intactes	147 ± 27	45 ± 6	111 ± 35	59 ± 5
		Stérilisées	144 ± 24	45 ± 4	110 ± 25	56 ± 5
fibTEM	Mâles	Tous	52 ± 20	8 ± 4	NA	9 ± 4
		Intacts	53 ± 22	8 ± 4	NA	9 ± 4
		Castrés	51 ± 15	7 ± 3	NA	7 ± 4
	Femelles	Toutes	52 ± 18	7 ± 2	NA	8 ± 3
		Intactes	53 ± 19	7 ± 2	NA	9 ± 3
		Stérilisées	52 ± 18	6 ± 2	NA	8 ± 2

**Tableau 9.** Résultats (moyenne et SD) des paramètres des profils exTEM, inTEM et fibTEM en fonction du sexe et de la stérilisation

(NA, non applicable)

Sexe	Catégorie	$\alpha$ (°)	Li45 (%)	Li60 (%)	ML (%)	
exTEM	Mâles	Tous	63 ± 8	99 ± 3	94 ± 7	13 ± 10
		Intacts	63 ± 8	98 ± 3	93 ± 8	15 ± 10
		Castrés	63 ± 7	99 ± 2	97 ± 4	7 ± 10
	Femelles	Toutes	63 ± 6	98 ± 5	94 ± 8	11 ± 14
		Intactes	63 ± 6	97 ± 6	92 ± 9	13 ± 14
		Stérilisées	61 ± 7	99 ± 1	97 ± 4	8 ± 14
inTEM	Mâles	Tous	68 ± 9	100 ± 1	97 ± 3	9 ± 10
		Intacts	67 ± 10	100 ± 1	97 ± 4	10 ± 10
		Castrés	68 ± 5	100 ± 1	98 ± 3	6 ± 9
	Femelles	Toutes	69 ± 5	100 ± 1	98 ± 2	6 ± 7
		Intactes	69 ± 6	100 ± 1	98 ± 2	6 ± 5
		Stérilisées	70 ± 4	100 ± 1	99 ± 2	6 ± 9
fibTEM	Mâles	Tous	NA	84 ± 9	83 ± 10	24 ± 9
		Intacts	NA	82 ± 9	83 ± 11	25 ± 10
		Castrés	NA	90 ± 8	85 ± 11	24 ± 6
	Femelles	Toutes	NA	78 ± 11	75 ± 12	32 ± 11
		Intactes	NA	78 ± 11	76 ± 10	32 ± 9
		Stérilisées	NA	77 ± 10	73 ± 14	34 ± 14

**Tableau 9 (suite).** Résultats (moyenne et SD) des paramètres des profils exTEM, inTEM et fibTEM en fonction du sexe et de la stérilisation  
(NA, non applicable)

Les CV intra-essai sont détaillés dans le **tableau 10**. Ils étaient respectivement de 4,6% et de 11,7% pour le G et le TPI.

	CT	A10	CFT	MCF	$\alpha$	Li45	Li60	ML
exTEM	24,3%	4,1%	10,8%	2,1%	3,9%	0,0%	0,5%	21,5%
inTEM	9,6%	6,0%	18,2%	3,0%	4,8%	0,0%	0,5%	35,0%
fibTEM	17,4%	9,2%	NA	9,7%	NA	5,3%	6,0%	29,3%

**Tableau 10.** Coefficients de variation intra-essai des profils exTEM, inTEM et fibTEM  
(NA, non applicable)

## C. DISCUSSION

Les valeurs usuelles décrites dans cette étude sont proches de celles précédemment établies en médecine vétérinaire pour les profils inTEM et exTEM (Smith et al., 2010) et pour les trois profils (Falco et al., 2012). Dans notre étude, les valeurs usuelles ont été établies en accord avec les recommandations de la Fédération Internationale de Chimie Clinique (IFCC) qui suggère qu'au moins 40 individus soient inclus dans la population de référence pour fournir un calcul précis des percentiles 0,025 et 0,975 (Solberg, 1987).

Cette étude est la première à démontrer que la stérilisation n'a pas d'effet sur les valeurs des paramètres TEM. De plus, nos résultats mettent en évidence qu'il n'y a pas de différence significative des paramètres TEM entre les mâles et les femelles. Ces résultats sont similaires à ceux d'une étude précédente réalisée chez le Chien visant à établir les valeurs usuelles des paramètres TEG (Bauer et al., 2009). Les deux autres études vétérinaires ayant établi des valeurs usuelles pour les paramètres TEM n'ont pas précisé si une différence existait entre les femelles et les mâles (Smith et al., 2010 ; Falco et al., 2012). En médecine humaine, certaines études suggèrent que les femmes présentent un profil plus hypercoagulable que les hommes (Scarpelini et al., 2009 ; Subramanian et al., 2014). Néanmoins, dans notre étude, nous n'avons pas pris en compte le stade du cycle sexuel des femelles entières, ce qui aurait pu donner des résultats différents. Ces résultats pourraient également être différents chez des chiens malades.

Les valeurs usuelles des index de lyse comprennent les valeurs de 100% pour les Li45 et Li60 et la valeur de 0% pour le ML. Ces résultats suggèrent, comme préalablement mentionné (Hanel et al., 2014), que les examens viscoélastiques semblent peu sensibles pour mettre en évidence une hypofibrinolyse. Une étude humaine suggère de rajouter de l'activateur tissulaire du plasminogène dans le réactif pour augmenter cette sensibilité (Kuiper et al., 2016).

Les CV intra-essai révèlent des valeurs acceptables ( $\leq 10\%$ ) pour l'ensemble des valeurs à l'exception du CT sur l'exTEM et le fibTEM, du CFT sur l'inTEM et du ML sur les trois profils. A l'exception de ceux du CT, ces CV sont relativement proches de ceux précisés dans une étude humaine (Anderson et al., 2014) et vétérinaire (Falco et al., 2012). Dans notre étude, le CT apparaît comme un paramètre hautement variable et dépendant grandement des manipulations pré-analytiques. Ce résultat pose la question de la pertinence de l'interprétation du CT dans la classification des profils TEM. Le ML correspond à la lyse maximale du caillot

en fin d'analyse. Les hauts CV lui étant associés pourraient s'expliquer par le fait que certaines analyses n'aient pu être conduites exactement pendant 60 minutes. L'autre hypothèse est que ce paramètre n'est pas influencé par l'utilisation des activateurs des trois profils conduits dans cette étude (Smith et al., 2010), ce qui suggère le recours au profil apTEM pour déterminer avec plus de précision le ML. Dans tous les cas, ce résultat souligne que les index de lyse tels que le Li45 et le Li60 sont plus sensibles et spécifiques sur les profils exTEM, inTEM et fibTEM que le ML pour mettre en évidence une hyperfibrinolyse.

***En conclusion, cette étude a permis d'établir des valeurs usuelles des paramètres TEM pour les profils exTEM, inTEM et fibTEM chez le Chien.***

***Le sexe et la stérilisation n'influencent pas la valeur de ces paramètres.***

***La TEM apparaît comme un examen peu sensible pour mettre en évidence une hypofibrinolyse chez des chiens en bonne santé. Des études ultérieures sur une population composée de chiens malades sont nécessaires pour confirmer ce manque de sensibilité.***

## **II. INFLUENCE DE L'AGE SUR LES TAUX DE CYTOKINES PRO-INFLAMMATOIRES ET SUR LA COAGULATION PAR APPROCHE THROMBOELASTOMETRIQUE CHEZ LE CHIEN**

### **A. RATIONNEL**

Le processus de vieillissement s'accompagne chez l'Homme d'altérations hémostatiques à l'origine d'un état d'hypercoagulabilité, caractérisé par une augmentation graduelle des facteurs procoagulants et une diminution progressive des facteurs anticoagulants (Mari et al., 1995 ; Javorschi et al., 1998 ; Ferrucci et al., 2005 ; Conway, 2011). Ce processus est également associé à un état antifibrinolytique caractérisé par une augmentation progressive des inhibiteurs fibrinolytiques et par une diminution des facteurs fibrinolytiques (Mari et al., 1995 ; Conway, 2011). Ces modifications sont exacerbées par la présence d'éléments prédisposants tels que l'immobilité, les chirurgies orthopédiques et le cancer (Mari et al., 1995 ; Anderson and Spencer, 2003 ; Golomb et al., 2014), mais également par le développement d'une inflammation évoluant à bas bruit et se caractérisant par une augmentation des concentrations sériques en cytokines pro-inflammatoires (Inadera et al., 1999 ; Ferrucci et al., 2005 ; Seidler et al., 2010 ; Sivro et al., 2013). Ainsi, en médecine humaine, le vieillissement est considéré comme un facteur de risque majeur et indépendant d'apparition de maladies thromboemboliques (Mari et al., 1995 ; Anderson and Spencer, 2003 ; Conway, 2011).

L'apparition d'un profil hypercoagulable chez l'Homme âgé a été mis en évidence par méthode TEG dans quelques études humaines (Ng, 2004 ; Roeloffzen et al., 2010). A la connaissance des auteurs, cette approche originale n'a jamais été utilisée pour déterminer l'influence de l'âge sur le système de coagulation chez le chien.

L'objectif principal de cette étude était de comparer les profils TEM de deux groupes de chiens d'âge distinct. Notre hypothèse était que les vieux chiens avaient un profil plus hypercoagulable et une activité fibrinolytique plus réduite que les jeunes chiens. L'objectif secondaire de cette étude était d'identifier l'influence des paramètres sanguins dans ces modifications hémostatiques en insistant sur la variation des cytokines pro-inflammatoires pour mettre en évidence ou non l'influence d'une activité inflammatoire.

## **B. MATERIELS ET METHODES**

### **1. Animaux**

Cette étude a été approuvée par le comité d'éthique de VetAgro Sup, campus vétérinaire de Lyon (#1266). Elle a inclus 20 beagles d'expérimentation répartis en deux groupes :

- 10 vieux chiens entiers d'âge supérieur à 10 ans ; 9 mâles et 1 femelle,
- 10 jeunes chiens entiers d'âge inférieur à 3 ans ; 5 mâles et 5 femelles.

Ces chiens ont été considérés en bonne santé sur la base d'un examen clinique complet. Les critères d'exclusion étaient l'historique d'une maladie récente ou l'administration de tout médicament durant les trois semaines précédant l'étude.

### **2. Récolte des échantillons sanguins**

Une prise de sang veineuse jugulaire unique a été réalisée sur chaque chien en utilisant une aiguille de 23 gauges reliée à une seringue de 10 mL. L'échantillon de sang veineux total a ensuite été réparti dans l'ordre suivant dans :

- un tube citraté pour la réalisation du bilan d'hémostase et des profils TEM (4 mL ; chaque tube contenant 3,2% de citrate de sodium tamponné dans un rapport strict sang/citrate de 1:9 pour une concentration finale de citrate de 10,8 mmol/L),
- un tube EDTA pour la réalisation de la NFS et de la mesure des concentrations sériques des cytokines pro-inflammatoires (3 mL),
- un tube hépariné pour la réalisation des analyses biochimiques (3 mL).

### **3. Analyses**

Le profil hématologique comportait la numération des hématies, le taux d'hématocrite, l'hémoglobininémie, et la numération des GB et des plaquettes. Le panel biochimique était constitué de l'activité sérique des ALAT et des PAL, ainsi que de l'albuminémie, l'urémie, la créatininémie, la glycémie, la protidémie totale, la globulinémie et les concentrations sériques de la protéine C réactive (CRP). La NFS et le bilan biochimique ont été respectivement effectués respectivement par les analyseurs automatisés suivants : Xt-2000iV (Sysmex) et Konelab 30i (Thermo Fisher). Les résultats ont été vérifiés par un vétérinaire pathologiste clinique diplômé du Collège Américain de Pathologie Clinique.

Pour le dosage des cytokines pro-inflammatoires, l'échantillon de sang récolté dans le tube EDTA était centrifugé durant 10 minutes à 2000 g dans les 30 minutes suivant la prise de

sang. Le plasma était ensuite extrait et conservé à -20°C dans un tube en polypropylène (durée de conservation inférieure à 1 mois). Les cytokines dosées étaient les suivantes : le GM-CSF (*granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*), l'interféron  $\gamma$ , les interleukines (IL) 2, 6, 7, 8, 10, 15 et 18, l'IP-10 (*interferon-inducible protein-10*), le KC (*keratinocyte chemoattractant*), le MCP-1 (*monocyte chemoattractant protein-1*) et le TNF $\alpha$  (*tumor necrosis factor  $\alpha$* ). Leur concentration sérique a été mesurée par une méthode multiplex spécifique au chien (CCYTOMAG-90K, EMD Millipore), en utilisant un analyseur automatique (Bio-Plex 200, Bio-Rad).

Le bilan d'hémostase incluait le PT, l'aPTT et la concentration sérique en fibrinogène. Les temps de coagulation ont été mesurés en accord avec les recommandations du fabricant (Coag Dx, IDEXX). La fibrinogénémie a été dosée en utilisant la méthode de Clauss (STart, Stago).

La thromboélastométrie rotative (ROTEM®, Pentapharm GmbH) a été réalisée exactement 30 minutes après le prélèvement sanguin veineux, en accord avec les instructions du fabricant et les recommandations récentes du groupe PROVETS (Flatland et al., 2014). L'examen a été réalisé par le même opérateur pour les 20 chiens de l'étude pour une durée totale de 60 minutes. Les échantillons de sang citraté (300  $\mu$ L) ont été pré-réchauffés à 37°C et ont été ajoutés aux réactifs fournis par le fabricant à l'aide de la pipette électronique reliée à l'automate. Trois profils TEM ont été conduits (inTEM, exTEM, et fibTEM).

#### **4. Analyses statistiques**

Tous les résultats sont présentés par leur médiane et leur intervalle. La normalité de la distribution et l'homogénéité des variances ont été examinées par le test de Shapiro-Wilk. Les comparaisons entre les deux groupes ont été réalisées par un test paramétrique (test  $t$  de Student) ou non paramétrique (Test  $U$  de Mann-Whitney) par approche bilatérale, en fonction de la normalité ou non de leur distribution. Les relations entre les paramètres TEM et les paramètres sanguins ont été évaluées par relation linéaire en calculant les coefficients de détermination de Spearman ( $r^2$ ). Une valeur de  $P < 0,05$  était considérée comme statistiquement significative. Enfin, une régression ascendante multiple (inclusion si  $P < 0,05$  ; exclusion si  $P > 0,1$ ) a été utilisée afin d'identifier les facteurs indépendants associés aux modifications des paramètres TEM entre les 2 groupes. Toutes les analyses ont été réalisées à l'aide d'un logiciel du commerce (XLSTAT v2012, Addinsoft).

## C. RESULTATS

L'âge des beagles est significativement différent entre les deux groupes ( $P < 0.001$ ). Les jeunes chiens ont moins de 3 ans (médiane de 25,5 mois ; intervalle : 21 à 35 mois) et les vieux chiens ont plus de 10 ans (médiane de 132,5 mois ; intervalle : 128 à 148 mois).

### 1. Comparaison entre les groupes

Le taux d'hématocrite et la numération blanche sont significativement diminués chez les vieux chiens. La fibrinogénémie est significativement augmentée chez les vieux chiens alors que le PT est plus court. La protidémie totale et la globulinémie sont significativement augmentées chez les vieux Beagles alors que l'albuminémie est significativement plus basse [Tableau 11].

	Jeunes beagles ( $n = 10$ )		Vieux beagles ( $n = 10$ )		<i>P</i>
	Médiane	Intervalle	Médiane	Intervalle	
Hématocrite (L/L)	0,48	0,44 - 0,55	0,42	0,40 - 0,48	<b>0,001</b>
Leucocytes ( $10^9/L$ )	10,8	8,2 - 12,4	6,6	4,3 - 15,2	<b>0,003</b>
Plaquettes ( $10^9/L$ )	392	307 - 534	488	149 - 664	0,391
Fibrinogène (g/L)	2,36	1,86 - 2,73	3,59	2,78 - 4,42	<b>&lt; 0,001</b>
PT (s)	15	12 - 15	12	12	<b>&lt; 0,001</b>
aPTT (s)	85	76 - 90	88	82 - 94	0,052
Urée (mmol/L)	6,9	3,2 - 9,9	7,8	5,8 - 8,5	0,762
Créatinine ( $\mu\text{mol/L}$ )	66	49 - 85	64,5	49 - 75	0,710
Glucose (mmol/L)	5,4	4,0 - 6,4	4,7	3,8 - 5,6	<b>0,021</b>
AIAT (U/L)	58,5	28 - 117	40,5	23 - 95	0,096
PAL (U/L)	78	36 - 98	113,5	50 - 476	0,104
Protéines totales (g/L)	51	47 - 56	61,5	55 - 71	<b>&lt; 0,001</b>
Albumine (g/L)	29	26 - 32	24,5	18 - 29	<b>0,002</b>
Globulines (g/L)	22	19 - 26	37	32 - 48	<b>&lt; 0,001</b>
CRP (mg/L)	4,5	4 - 9	4	4 - 5	0,059

**Tableau 11.** Comparaison des paramètres hématologiques, hémostatiques et biochimiques entre les jeunes et les vieux beagles

Toutes les concentrations plasmatiques en cytokines, à l'exception de celles d'IP-10 et d'IL-15, tendent à être augmentées chez les vieux chiens. Néanmoins, seule l'augmentation de MCP-1 est significative [Tableau 12].

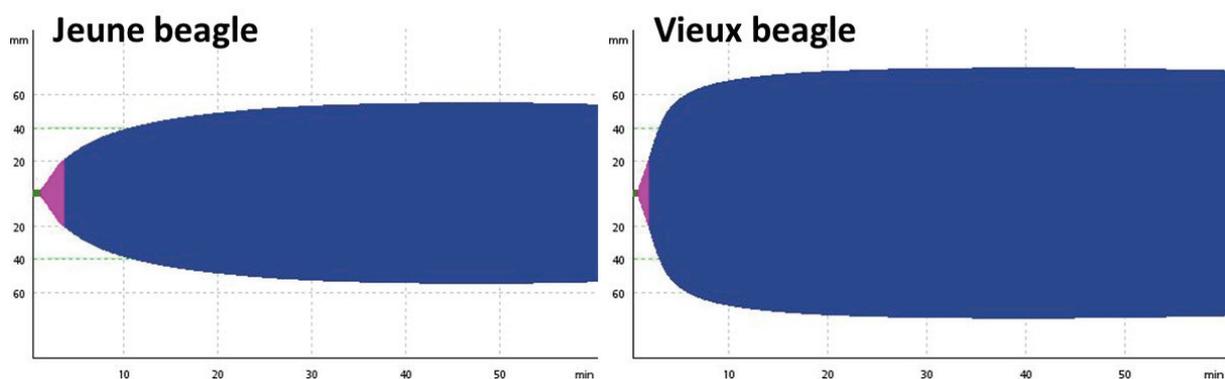
	Jeunes beagles (n = 10)		Vieux beagles (n = 10)		P
	Médiane	Intervalle	Médiane	Intervalle	
KC	509	80 - 1067	433	212 - 1944	0,970
GM-CSF	29,9	16,6 - 150,6	84,6	9,2 - 300,2	0,230
IFN $\gamma$	13,6	13,6 - 63,7	13,6	13,6 - 90,9	0,949
Interleukine-2	19,6	3,5 - 141,0	30,9	3,5 - 208,9	0,403
Interleukine-6	48,2	3,7 - 78,5	41,3	3,7 - 331,0	0,519
Interleukine-7	7,5	7,5 - 114,0	61,7	7,5 - 225,8	0,174
Interleukine-8	4086	22 - 7866	3788	1087 - 18803	0,791
Interleukine-10	31,5	3,2 - 72,7	4,5	3,2 - 50,3	1,000
Interleukine-15	9,0	9,0 - 2311,7	241,2	89,0 - 996,7	0,225
Interleukine-18	9,5	5,8 - 127,7	46,6	5,8 - 363,0	0,150
IP-10	20,7	8,5 - 121,6	24,5	8,5 - 504,0	0,138
MCP-1	197,5	138,2 - 240,4	301,2	190,0 - 3440,5	<b>0,002</b>
TNF $\alpha$	6,1	6,1 - 17,1	14,0	6,1 - 77,3	0,052

**Tableau 12.** Comparaison de la concentration plasmatique des cytokines (en pg/mL) entre les jeunes et les vieux beagles

Sur l'exTEM, le CT, le CFT et le ML sont significativement plus bas chez les vieux beagles alors que l'A10, le MCF, l'angle  $\alpha$  et le Li60 sont significativement plus hauts. Les indices globaux de coagulation, G et TPI, sont significativement plus importants chez les vieux beagles [Tableau 13, Figure 13].

	Jeunes beagles (n = 10)		Vieux beagles (n = 10)		P
	Médiane	Intervalle	Médiane	Intervalle	
CT (s)	46,5	36 - 63	35	32 - 39	< <b>0,001</b>
A10 (mm)	57	48 - 62	67,5	60 - 74	< <b>0,001</b>
CFT (s)	92,5	77 - 119	62,5	48 - 89	< <b>0,001</b>
MCF (mm)	66	57 - 71	74,5	69 - 79	< <b>0,001</b>
$\alpha$ (°)	71,5	66 - 75	78,5	73 - 81	< <b>0,001</b>
Li45 (%)	100	75 - 100	100	99 - 100	0,234
Li60 (%)	97	66 - 99	98	97 - 99	<b>0,009</b>
ML (%)	10	2 - 53	4	1 - 9	<b>0,019</b>
G (dynes/cm <sup>2</sup> )	9719	6628 - 12241	14615	11129 - 18810	< <b>0,001</b>
TPI	2,0	1,1 - 3,2	4,9	2,5 - 7,8	< <b>0,001</b>

**Tableau 13.** Comparaison des paramètres de l'exTEM entre les jeunes et les vieux beagles

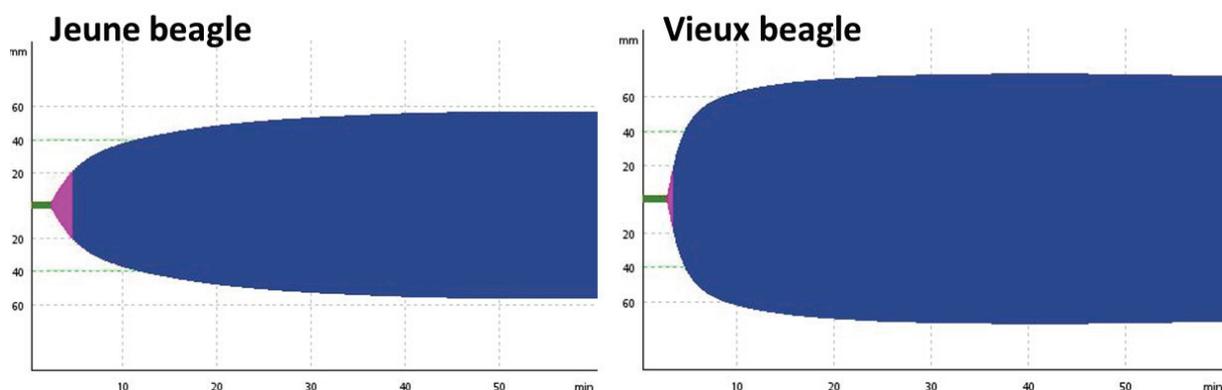


**Figure 13.** Exemples de profils exTEM chez un jeune et un vieux beagle

Sur l'inTEM, le CFT et le ML sont significativement plus bas chez les vieux chiens alors que l'A10, le MCF, l'angle  $\alpha$  et le Li60 sont significativement plus hauts [Tableau 14, Figure 14].

	Jeunes beagles (n = 10)		Vieux beagles (n = 10)		P
	Médiane	Intervalle	Médiane	Intervalle	
CT (s)	175,5	115 - 198	166	120 - 244	0,638
A10 (mm)	53,5	43 - 63	64,5	60 - 71	< 0,001
CFT (s)	72,5	47 - 103	51	34 - 66	0,005
MCF (mm)	65	60 - 70	72,5	69 - 77	< 0,001
$\alpha$ (°)	75,5	70 - 80	80	76 - 83	0,004
Li45 (%)	100	99 - 100	100	99 - 100	1,000
Li60 (%)	97	95 - 99	99	97 - 100	0,002
ML (%)	7	2 - 16	3	1 - 7	0,004

**Tableau 14.** Comparaison des paramètres de l'inTEM entre les jeunes et les vieux beagles

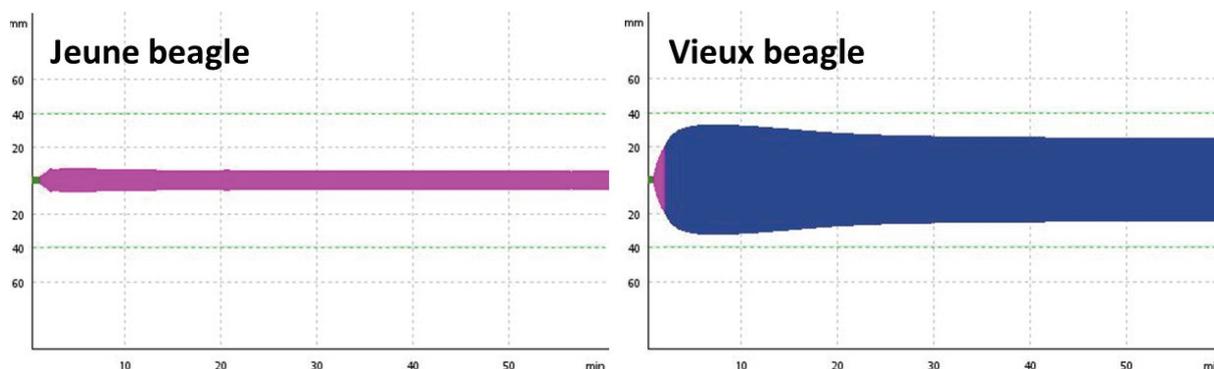


**Figure 14.** Exemples de profils inTEM chez un jeune et un vieux beagle

Sur le fibTEM, le ML est significativement plus bas chez les vieux beagles alors que l'A10, le MCF, l'angle  $\alpha$  et le Li45 sont significativement plus hauts. Le CFT n'a pu être mesuré chez aucun jeune chien (valeurs tendant vers l'infini) alors qu'il a pu être mesuré chez tous les vieux chiens. De manière similaire, l'angle  $\alpha$  n'a pu être mesuré que chez 4 jeunes beagles (valeurs tendant vers 0 pour les autres jeunes) [Tableau 15, Figure 15].

	Jeunes beagles (n = 10)		Vieux beagles (n = 10)		P
	Médiane	Intervalle	Médiane	Intervalle	
CT (s)	37	31 - 66	33,5	31 - 43	0,111
A10 (mm)	10	8 - 18	22,5	13 - 41	< 0,001
CFT (s)	NA	NA	65	51 - 110	NA
MCF (mm)	12	8 - 19	25	14 - 42	< 0,001
$\alpha$ (°)	NA	NA	81	75 - 83	NA
Li45 (%)	77	68 - 94	86	76 - 94	0,039
Li60 (%)	77	64 - 95	86,5	75 - 96	0,055
ML (%)	29	11 - 40	16	7 - 25	0,003

**Tableau 15.** Comparaison des paramètres du fibTEM entre les jeunes et les vieux beagles  
(NA, non applicable)



**Figure 15.** Exemples de profils fibTEM chez un jeune et un vieux beagle

## 2. Corrélations entre les variables TEM et les paramètres sanguins

### a. Corrélations linéaires simples

Les paramètres hématologiques, hémostatiques et biochimiques corrélés significativement aux variables TEM par régression linéaire simple sont le taux d'hématocrite, les numérations leucocytaire et plaquettaire, la fibrinogénémie et la globulinémie. L'ensemble des variables de l'exTEM (à l'exception du CT pour la numération plaquettaire) est significativement associé à ces paramètres [Tableau 16].

	Hématocrite		Leucocytes		Plaquettes		Fibrinogène		Globulines	
	$r^2$	$P$	$r^2$	$P$	$r^2$	$P$	$r^2$	$P$	$r^2$	$P$
CT	0,443	<b>0,002</b>	0,520	<b>&lt; 0,001</b>	0,023	0,524	0,406	<b>0,003</b>	0,602	<b>&lt; 0,001</b>
A10	0,642	<b>&lt; 0,001</b>	0,322	<b>0,010</b>	0,208	<b>0,044</b>	0,596	<b>&lt; 0,001</b>	0,512	<b>&lt; 0,001</b>
CFT	0,584	<b>&lt; 0,001</b>	0,223	<b>0,037</b>	0,211	<b>0,043</b>	0,542	<b>&lt; 0,001</b>	0,423	<b>0,002</b>
MCF	0,587	<b>&lt; 0,001</b>	0,299	<b>0,014</b>	0,226	<b>0,035</b>	0,561	<b>&lt; 0,001</b>	0,523	<b>&lt; 0,001</b>
$\alpha$	0,637	<b>&lt; 0,001</b>	0,244	<b>0,028</b>	0,217	<b>0,039</b>	0,530	<b>&lt; 0,001</b>	0,421	<b>0,002</b>

**Tableau 16.** Corrélations linéaires entre les paramètres de l'exTEM et le taux d'hématocrite, les numérations leucocytaire et plaquettaire, la fibrinogénémie et la globulinémie

Sur l'inTEM, A10 et MCF sont significativement corrélés aux numérations plaquettaire et leucocytaire, au taux d'hématocrite, à la fibrinogénémie et à la globulinémie. CFT et l'angle  $\alpha$  sont seulement corrélés au taux d'hématocrite, à la numération plaquettaire et à la fibrinogénémie. Le CT n'est corrélé à aucun paramètre sanguin [Tableau 17].

	Hématocrite		Leucocytes		Plaquettes		Fibrinogène		Globulines	
	$r^2$	$P$	$r^2$	$P$	$r^2$	$P$	$r^2$	$P$	$r^2$	$P$
CT	0,006	0,738	0,041	0,392	0,114	0,145	0,001	0,891	<0,001	0,919
A10	0,552	<b>&lt; 0,001</b>	0,238	<b>0,031</b>	0,296	<b>0,014</b>	0,508	<b>&lt; 0,001</b>	0,412	<b>0,003</b>
CFT	0,320	<b>&lt; 0,001</b>	0,110	<b>0,152</b>	0,325	<b>0,010</b>	0,297	<b>0,014</b>	0,192	0,054
MCF	0,600	<b>&lt; 0,001</b>	0,268	<b>0,021</b>	0,246	<b>0,027</b>	0,628	<b>&lt; 0,001</b>	0,469	<b>0,001</b>
$\alpha$	0,293	<b>&lt; 0,001</b>	0,096	<b>0,183</b>	0,375	<b>0,005</b>	0,309	<b>0,012</b>	0,191	0,055

**Tableau 17.** Corrélations linéaires entre les paramètres de l'inTEM et le taux d'hématocrite, les numérations leucocytaire et plaquettaire, la fibrinogénémie et la globulinémie

Sur le fibTEM, A10 et MCF sont significativement corrélés à la numération plaquettaire, au taux d'hématocrite, à la fibrinogénémie et à la globulinémie. Le CT est seulement corrélé à la globulinémie [Tableau 18].

	Hématocrite		Leucocytes		Plaquettes		Fibrinogène		Globulines	
	$r^2$	$P$	$r^2$	$P$	$r^2$	$P$	$r^2$	$P$	$r^2$	$P$
CT	0,111	0,151	0,051	0,337	0,005	0,770	0,020	0,547	0,228	<b>0,035</b>
A10	0,461	<b>0,001</b>	0,186	<b>0,059</b>	0,312	<b>0,011</b>	0,559	<b>&lt; 0,001</b>	0,456	<b>0,001</b>
MCF	0,512	<b>&lt; 0,001</b>	0,181	<b>0,062</b>	0,273	<b>0,019</b>	0,527	<b>&lt; 0,001</b>	0,426	<b>0,002</b>

**Tableau 18.** Corrélations linéaires entre les paramètres du fibTEM et le taux d'hématocrite, les numérations leucocytaire et plaquettaire, la fibrinogénémie et la globulinémie

## b. Corrélations multiples

A partir d'un modèle multivarié à régression ascendante, l'âge apparaît comme un facteur indépendant du CT, de l'A10 et du MCF sur l'exTEM, de l'A10 et du MCF sur l'inTEM, et de l'A10 sur le fibTEM [Tableau 19].

	Equation	$r^2$	$P$
exTEM	1/CT (s) $0,02 + 7.76 \times 10^{-3} + [\text{catégorie âge}]$	0,644	< 0,001
	A10 (mm) $84,16 - 73,76 \times \text{HT} + 0,02 \times \text{Plq} + 7,3 \times [\text{catégorie âge}]$	0,823	< 0,001
	CFT (s) $-110,71 + 419,29 \times \text{HT}$	0,653	< 0,001
	MCF (mm) $102,29 - 76,65 \times \text{HT} + 5,06 \times [\text{catégorie âge}]$	0,733	< 0,001
	$\alpha$ (°) $117,01 - 93,28 \times \text{HT}$	0,689	< 0,001
inTEM	CT (s) $207,71 - 0,08 \times \text{Plq}$	0,081	0,225
	A10 (mm) $54,29 + 0,02 \times \text{Plq} - 11,3 \times [\text{catégorie âge}]$	0,739	< 0,001
	CFT (s) $-82,31 + 318,87 \times \text{HT}$	0,437	0,002
	MCF (mm) $59,93 + 0,01 \times \text{Plq} + 6,95 \times [\text{catégorie âge}]$	0,756	< 0,001
	$\alpha$ (°) $94,12 - 48,5 \times \text{HT} + 0,01 \times \text{Plq}$	0,547	0,001
fibTEM	Ln (CT-30) (s) $1,89 - 0,59 \times [\text{catégorie âge}]$	0,121	0,133
	Ln A10 (mm) $3,3 + 1,27 \times 10^{-3} \times \text{Plq} - 0,05 \times \text{Alb} + 0,5 \times [\text{catégorie âge}]$	0,868	< 0,001
	MCF (mm) $26,85 + 0,02 \times \text{Plq} + 4,81 \times \text{Fib} - 10,2 \times \text{Alb}$	0,863	< 0,001

**Tableau 19.** Equations mathématiques générées par le modèle multivarié à régression ascendante

(HT = Hématocrite (L/L) ; Plq = Plaquettes ( $10^9/L$ ) ; Alb = Albumine (g/L) ; Fib = Fibrinogène (g/L) ; [catégorie âge] = 0 si âge < 3 ans ; [catégorie âge] = 1 si âge > 10 ans)

## D. DISCUSSION

Cette étude est la première à démontrer l'apparition d'un profil hypercoagulable avec l'avancement de l'âge chez le Chien. Les vieux chiens ont un taux de formation de fibrine plus rapide que les jeunes comme l'atteste la diminution du CT et l'augmentation de l'A10. De plus, le caillot formé présente de plus fortes propriétés viscoélastiques comme l'attestent la diminution du CFT et l'augmentation de l'angle  $\alpha$  et du MCF. Tous les vieux chiens de cette étude ont un profil hypercoagulable caractérisé par l'augmentation significative des indices de coagulation globale (TPI et G). Ces résultats sont similaires à ceux observés chez l'Homme (Ng, 2004 ; Roeloffzen et al., 2010).

L'âge apparaît comme un facteur indépendant contribuant à l'apparition d'un profil hypercoagulable chez le Chien. Cependant, d'autres mécanismes concurrents peuvent également être impliqués. Plusieurs études rapportent une relation entre la diminution du taux d'hématocrite et l'apparition d'un profil hypercoagulable chez des hommes (Iselin et al., 2001 ; Shibata et al., 2003 ; Ng, 2004 ; Roeloffzen et al., 2010) et des chiens (Smith et al., 2012 ; Brooks et al., 2014 ; McMichael et al., 2014b) en bonne santé. Nos résultats sont concordants avec ceux de ces études précédentes, même si, malgré une diminution, les taux d'hématocrite des vieux chiens restent dans les valeurs usuelles. Une telle diminution du taux d'hématocrite en lien avec l'âge a déjà été rapportée dans la littérature vétérinaire (Strasser et al., 1997). La diminution du taux d'hématocrite apparaît comme un facteur indépendant contribuant à l'apparition d'un profil hypercoagulable chez le vieux chien, mais sa signification physiopathologique reste à déterminer. Il faut tout de même noter que le rôle des érythrocytes dans l'hémostase a largement été décrit, notamment par l'exposition de phospholipides membranaires procoagulants (Zwaal et al., 1993 ; Peyrou et al., 1999). Cependant, une étude récente suggère que l'observation d'un profil hypercoagulable chez un chien ayant une diminution de son taux d'hématocrite pourrait être de nature artéfactuelle (McMichael et al., 2014b).

Les plaquettes jouent également un rôle dans l'hypercoagulabilité associée à l'âge (Bastyr et al., 1990 ; Gleeurup and Winther, 1995). Plusieurs études réalisées chez l'Homme ont mis en évidence une augmentation de l'activité plaquettaire avec l'âge en observant une diminution du temps de saignement (Jørgensen et al., 1980 ; Reilly et al., 1986), une augmentation de la concentration des marqueurs d'activation plaquettaire tels que la  $\beta$ -thromboglobuline (Bastyr et al., 1990) ou le *platelet factor 4* (Jørgensen et al., 1980), et une plus grande affinité pour

l'adénosine diphosphate et le collagène (Bastyr et al., 1990 ; Gleerup and Winther, 1995). L'augmentation de l'activité plaquettaire avec l'âge semblerait impliquer les phospholipides membranaires (Bastyr et al., 1990). Dans notre étude, la numération plaquettaire médiane est similaire entre les jeunes et vieux chiens. Cependant, cette numération apparaît comme un facteur indépendant de l'apparition d'un profil hypercoagulable par l'analyse multivariée. La numération plaquettaire est corrélée à la majorité des paramètres TEM à l'exception du CT sur les trois profils, tout comme l'avait précédemment observé Smith et al. (Smith et al., 2012). Mais nous n'avons pas évalué l'activité plaquettaire.

Le développement d'une inflammation évoluant à bas bruit et caractérisée par une augmentation de la concentration sanguine en fibrinogène, en cytokines pro-inflammatoires et en globulines pourrait également être la cause de l'apparition d'un profil hypercoagulable avec l'avancement de l'âge chez le Chien, comme observé chez l'Homme (Javorschi et al., 1998 ; Inadera et al., 1999 ; Ferrucci et al., 2005 ; Seidler et al., 2010 ; Sivro et al., 2013). L'augmentation de la fibrinogénémie a été corrélée au développement d'un profil hypercoagulable chez l'Homme (Nielsen et al., 2005) et chez le Chien (Smith et al., 2012). Cette corrélation peut se justifier par le fait que le fibrinogène joue plusieurs rôles essentiels dans l'hémostase en étant le substrat direct sur lequel repose le clou plaquettaire, en permettant le pontage entre les plaquettes et en augmentant la viscosité sanguine (Cavestri et al., 1992 ; Laharrague et al., 1993 ; Feher et al., 2006). Nos résultats indiquent que la fibrinogénémie est augmentée chez le vieux chien, ce qui est en accord avec les résultats d'une étude précédente (Mercier et al., 2010). L'augmentation de la fibrinogénémie est un facteur indépendant d'apparition d'un profil hypercoagulable.

Le dosage des cytokines pro-inflammatoires révèle que toutes les concentrations augmentent avec l'âge, à l'exception de celles d'IP-10 et d'IL-15, mais que seule l'augmentation de MCP-1 est significative. De plus, la globulinémie augmente significativement chez les vieux chiens. Ces observations peuvent supporter l'hypothèse de l'évolution d'une inflammation liée à l'âge et à l'origine d'un profil hypercoagulable chez le Beagle âgé. L'augmentation de la concentration plasmatique de MCP-1 en lien avec une inflammation évoluant à bas bruit, telle que celle rencontrée dans les insuffisances cardiaques congestives débutantes, a déjà été rapportée chez le Chien (Zois et al., 2012). Chez l'Homme, le vieillissement est associé à une augmentation des concentrations circulantes des marqueurs inflammatoires (Ferrucci et al., 2005 ; Sivro et al., 2013) tels que MCP-1 (Inadera et al., 1999 ; Seidler et al., 2010).

Concomitamment à l'observation de profils hypercoagulables, les résultats de cette étude montrent également que l'âge influence les capacités fibrinolytiques avec une activité fibrinolytique plus lente et moins intense chez les vieux chiens. Ces résultats sont en accord avec ceux précédemment observés chez l'Homme (Gleerup and Winther, 1995 ; Mari et al., 1995). Chez l'Homme, le vieillissement affecte le système fibrinolytique à travers la diminution des concentrations en plasminogène (Dolan et al., 1994) et l'augmentation des concentrations en inhibiteur de l'activateur du plasminogène-1 (Gleerup and Winther, 1995 ; Yamamoto et al., 2005) et en complexes plasmine-antiplasmine (Mari et al., 1995). Les mécanismes exacts à l'origine de ces modifications de l'activité fibrinolytique n'ont pas encore été élucidés chez le Chien, mais la diminution de cette activité pourrait contribuer à la survenue d'évènements thrombotiques chez les vieux chiens.

Quelques limites sont inhérentes à cette étude. La première est la faible taille de la population étudiée induisant une diminution de la puissance des tests statistiques utilisés. La seconde est la variabilité du dosage des cytokines dans les deux groupes. Enfin, cette étude a été réalisée chez des beagles de laboratoire vivant en chenil dans des conditions similaires. Il est difficile de déterminer si nos résultats peuvent être extrapolés aux autres races avec des conditions de vie plus hétérogènes.

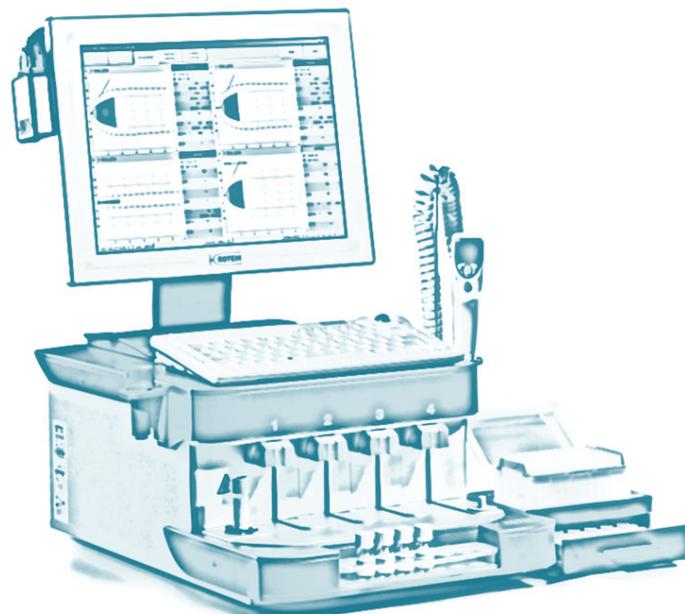
*En conclusion, les résultats de cette étude révèlent l'apparition de profils hypercoagulables et une diminution de l'activité fibrinolytique en association avec l'âge chez le Beagle en bonne santé.*

*L'augmentation de la fibrinogénémie et la diminution du taux d'hématocrite semblent être les facteurs majeurs contribuant en l'observation de tels profils hypercoagulables chez le vieux Beagle en bonne santé.*

*La présence d'une inflammation évoluant à bas bruit semble également impliquée, mais les relations existant entre l'augmentation de la concentration plasmatique des cytokines pro-inflammatoires et l'observation d'un profil hypercoagulable nécessitent la réalisation d'études supplémentaires.*

*L'incidence des maladies thrombotiques reste à établir chez le Chien, mais, à la vue des résultats de cette étude, l'âge devrait être considéré comme un facteur de risque.*

***PARTIE 3.***  
***APPLICATIONS***  
***CLINIQUES DE LA***  
***THROMBOELASTOMETRIE***  
***ROTATIVE***



# **I. EVALUATION DE L'ACTIVITE ANTICOAGULANTE DE L'ÉNOXAPARINE SODIQUE CHEZ LE BEAGLE EN BONNE SANTE**

## **A. RATIONNEL**

L'utilisation des héparines à bas poids moléculaire (HBPM) a été adoptée comme le standard dans la prévention de la thrombose chez l'Homme et, plus récemment, chez le Chien et le Chat (Breuhl et al., 2009 ; Vargo et al., 2009 ; Panek et al., 2015). En comparaison avec les héparines non fractionnées (HNF), les HBPM ont une meilleure biodisponibilité et une clairance dose-dépendante (Vargo et al., 2009).

En médecine vétérinaire, le choix des doses d'HBPM utilisées chez le Chien repose principalement sur les profils pharmacocinétiques réalisés chez l'Homme ou sur des données empiriques. Cependant, il a été montré que les profils pharmacocinétiques de l'énoxaparine sodique chez le chien en bonne santé différaient des profils humains, rendant difficile l'extrapolation des doses utilisées chez l'Homme (Lunsford et al., 2009 ; Kidd et al., 2013).

Les résultats de plusieurs études ont montré que les HBPM avaient une meilleure efficacité antithrombotique que celle des HNF chez le Chien (Mestre et al., 1985 ; Morris et al., 2000). D'autres études ont échoué à montrer un effet anticoagulant des HBPM utilisées à faible dose en se basant sur la mesure de l'activité anti-Xa chez des chiens en état critique (Scott et al., 2009 ; Lynch et al., 2014). Dans un modèle canin de CIVD, de fortes doses d'HBPM étaient requises pour augmenter l'activité anti-Xa dans la cible thérapeutique (Mischke et al., 2005). Cependant Lunsford et al. ont mis en évidence des effets anticoagulants significatifs de l'énoxaparine sodique à la dose de 80 UI/kg (soit 0,8 mg/kg) par voie sous-cutanée (SC) quatre fois par jour chez des chiens en bonne santé (Lunsford et al., 2009). Cette étude a été réalisée chez des greyhounds, race connue pour avoir des particularités hématologiques (taux d'hématocrite notamment plus élevé) et hémostatiques (profil TEG hypocoagulable) différentes des autres races (Vilar et al., 2008 ; Lunsford et al., 2009).

L'objectif de cette étude était de décrire les effets anticoagulants de l'administration SC d'énoxaparine sodique à la dose de 80 UI/kg (soit 0,8 mg/kg) quatre fois par jour chez des beagles en bonne santé en utilisant un large panel de tests de coagulation, incluant la TEM. A notre connaissance, cette étude est la première à évaluer les effets préventifs de l'énoxaparine

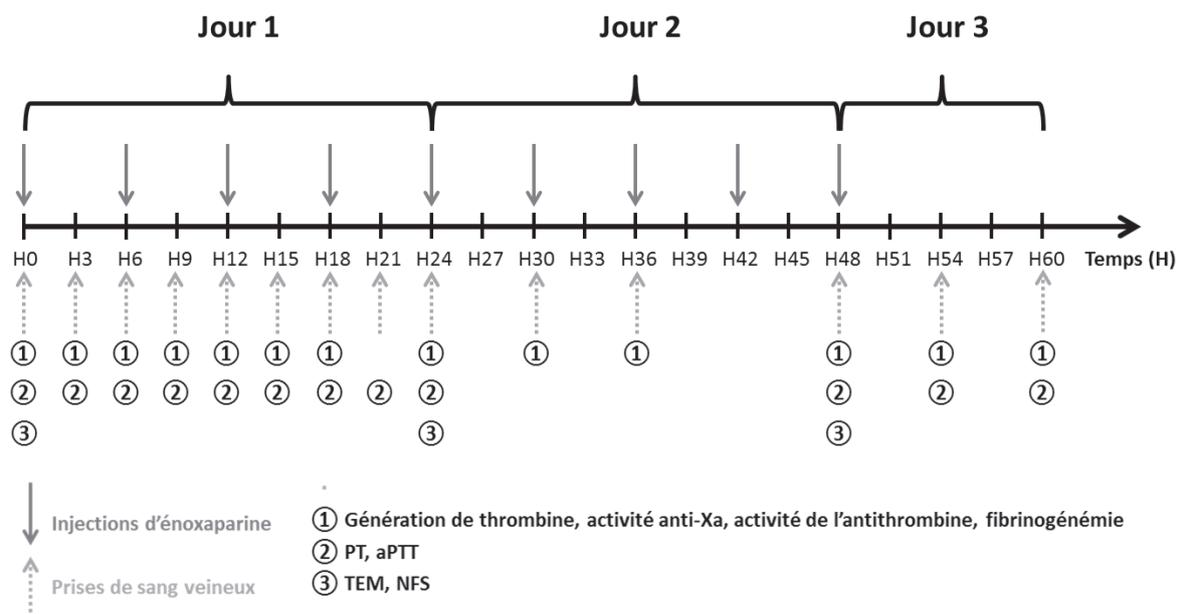
sodique chez des chiens en bonne santé, autres que des greyhounds, à travers une évaluation globale et mécanistique de la coagulation.

## B. MATERIELS ET METHODES

Cette étude a été approuvée par le Comité d’Ethique de VetAgro Sup, campus vétérinaire de Lyon (#1363). Elle a été réalisée chez huit chiens beagles adultes en bonne santé. Tous les chiens étaient des mâles entiers, âgés de 1 à 2 ans et pesant entre 9 et 11 kg. Ces chiens ont été considérés en bonne santé sur la base de leur examen clinique et les résultats de la NFS et du bilan biochimique sanguin.

### 1. Protocole et recueil des échantillons

Neuf injections SC d’énoxaparine sodique (Lovenox®, Sanofi-Aventis) ont été administrées toutes les 6 heures pendant 48 heures. Les échantillons sanguins ont été recueillis juste avant la première injection (heure 0 = h0) et à h3, h6, h9, h12, h15, h18, h24, h30, h36, h48, h54 and h60. Une prise de sang jugulaire atraumatique a été réalisée sur chaque chien avec une seringue reliée à une aiguille de 22 gauges. Le sang a ensuite été disposé dans un tube citraté pour la réalisation du bilan d’hémostase et du ROTEM, dans un tube EDTA pour la réalisation de la NFS et dans un tubé hépariné pour la réalisation du bilan biochimique. La **figure 16** décrit le protocole d’étude et les analyses sanguines réalisées à chaque point.



**Figure 16.** Protocole expérimental

Afin de déterminer les activités anti-Xa et de l'antithrombine, la fibrinogénémie et la génération de thrombine, un plasma pauvre en plaquettes a immédiatement été préparé après la prise de sang par une centrifugation initiale à 2000 g pendant 15 minutes, à 20°C. Le surnageant a ensuite été précautionneusement prélevé et centrifugé à nouveau à 2000 g pendant 15 minutes, à 20°C. Ce nouveau surnageant a été prélevé, placé dans un tube Eppendorf et stocké immédiatement à -80°C jusqu'à la réalisation des analyses (un mois et demi après).

## **2. Analyses de laboratoire**

Le panel biochimique réalisé à h0 était constitué de l'activité sérique des AIAT et des PAL, ainsi que de l'albuminémie, l'urémie, la créatininémie, la glycémie, la protidémie totale, la globulinémie et les concentrations sériques en CRP. Les NFS ont été réalisées à h0, h24 et h48. Le bilan biochimique et la NFS ont été effectués respectivement par les analyseurs automatisés suivants : Xt-2000iV (Sysmex) et Konelab 30i (Thermo Fisher). Les résultats ont été vérifiés par un vétérinaire pathologiste clinique diplômé du Collège Américain de Pathologie Clinique. PT et apTT ont été mesurés à l'aide d'un automate (Coag Dx, IDEXX) sur tous les prélèvements sanguins les premières 18 heures puis à h24, h48, h54 et h60.

Quatre profils TEM ont été réalisés (inTEM, exTEM, fibTEM et hepTEM) selon les instructions du fabricant et les recommandations PROVETS (Flatland et al., 2014).

La fibrinogénémie, l'activité anti-Xa et l'activité de l'antithrombine ont été mesurées sur les plasmas pauvres en plaquette à l'aide d'un automate dédié (Destiny Max, Diagnostica Stago). La génération de thrombine a également été mesurée à l'aide d'un analyseur dédié (Fluorocan, Diagnostica Stago), selon les recommandations précédemment décrites chez le Chien (Conversy et al., 2013 ; McMichael et al., 2014b), afin de déterminer le potentiel endogène de la thrombine (ETP, *endogenous thrombin potential*), qui se réfère à la quantité totale de thrombine générée au cours du temps (en nM/min).

## **3. Analyses statistiques**

Tous les résultats sont présentés par leur moyenne et leur écart-type (SD) pour les variables normales et par leur médiane et leur intervalle pour les autres. La normalité et l'homogénéité des variances ont respectivement été examinées par un test de Shapiro-Wilk et un test de Bartlett. Pour les variables à distribution normale, une analyse de la variance (ANOVA) suivie d'un test de comparaisons multiples (test post-hoc de Tukey) a été réalisée.

Pour les variables à distribution non normale, une approche non paramétrique a été utilisée à l'aide d'un test de Friedman (activité anti-Xa, fibrinogénémie, activité de l'antithrombine, PT et aPTT) ou d'un test de Kruskal-Wallis (paramètres de l'hepTEM et de la NFS). Afin de mettre en évidence l'activité de l'HBPM, le test de Wilcoxon a été utilisé pour comparer les paramètres de l'inTEM et de l'hepTEM. Toutes les analyses ont été réalisées à l'aide d'un logiciel du commerce (XLSTAT v2012, Addinsoft).

## C. RESULTATS

Durant la période d'étude, tous les paramètres cliniques sont restés normaux chez tous les chiens, et aucune complication hémorragique n'a été mise en évidence. Les résultats des NFS et bilans biochimiques sont dans les valeurs usuelles de l'espèce pour tous les chiens.

### 1. Temps de coagulation

Aucune modification significative du PT et de l'aPTT n'est observée pendant toute la durée du protocole [Tableau 20].

		Heures de prélèvement (après la 1 <sup>ère</sup> injection)					
		h0	h3	h6	h9	h12	h15
PT (s)	Moyenne	15,0	14,3	14,6	14,8	14,5	14,5
	SD	2,1	1,0	0,5	1,0	1,4	1,4
aPTT (s)	Moyenne	101,3	99,8	101,3	99,9	98,8	98,4
	SD	6,2	8,1	14,2	11,5	6,9	7,1

		Heures de prélèvement (après la 1 <sup>ère</sup> injection)					P globale
		h18	h24	h48	h54	h60	
PT (s)	Moyenne	13,8	14,6	14,6	15,4	14,5	0,67
	SD	1,2	1,4	1,4	1,1	1,4	
aPTT (s)	Moyenne	99,8	101,3	102,8	99,8	100,8	0,99
	SD	9,2	5,6	8,5	10,7	9,1	

**Tableau 20.** Evolution du PT et de l'aPTT au cours de la période d'étude

## 2. Paramètres des profils thromboélastométriques

Les paramètres des quatre profils TEM conduits ne diffèrent pas significativement de leur valeur de base après les injections d'énoxaparine [Tableaux 21, 22, 23 et 24]. De plus, tous les paramètres sont restés dans les valeurs de référence établies préalablement dans notre institution (*cf infra*). Aucune différence n'est observée dans la comparaison entre les paramètres de l'inTEM et ceux de l'hepTEM.

	Jour 1	Jour 2	Jour 3	P globale
CT (s)	45,3 (± 6,8)	53,9 (± 12,1)	50,5 (± 11,1)	0,25
CFT (s)	111,3 (± 22,6)	104,1 (± 25,9)	104,5 (± 24,2)	0,30
MCF (mm)	61,1 (± 3,5)	63,6 (± 8,0)	63,4 (± 5,3)	0,49
A10 (mm)	48,3 (± 4,9)	49,4 (± 6,1)	50,5 (± 5,4)	0,31
$\alpha$ (°)	68,5 (± 4,7)	70,4 (± 5,3)	70,9 (± 5,3)	0,19
G (dynes/cm <sup>2</sup> )	7853 (± 181)	8736 (± 434)	8661 (± 280)	0,49
TPI	1,41 (± 0,58)	1,68 (± 1,25)	1,66 (± 0,66)	0,43

**Tableau 21.** Evolution des paramètres de l'exTEM (moyenne et SD) au cours de la période d'étude

	Jour 1	Jour 2	Jour 3	P globale
CT (s)	54,4 (± 20,1)	63,5 (± 20,1)	49,6 (± 12,6)	0,08
CFT (s)	NA	NA	NA	NA
MCF (mm)	6,9 (± 3,3)	6,9 (± 3,4)	8,5 (± 4,4)	0,31
$\alpha$ (°)	NA	NA	NA	NA

**Tableau 22.** Evolution des paramètres du fibTEM (moyenne et SD) au cours de la période d'étude

(NA, non applicable)

	Jour 1	Jour 2	Jour 3	P globale
CT (s)	151,4 (± 9,2)	153,3 (± 12,2)	156,8 (± 9,7)	0,63
CFT (s)	72,1 (± 9,1)	77,3 (± 22,2)	76,8 (± 24,6)	0,84
MCF (mm)	64,7 (± 3,7)	64,0 (± 4,5)	64,6 (± 4,9)	0,77
A10 (mm)	54,7 (± 3,4)	54,6 (± 6,0)	55,8 (± 4,9)	0,72
$\alpha$ (°)	75,6 (± 2,3)	74,8 (± 4,5)	74,5 (± 4,6)	0,85

**Tableau 23.** Evolution des paramètres de l'inTEM (moyenne et SD) au cours de la période d'étude

	Jour 1	Jour 2	Jour 3	P globale
CT (s)	148,4 (± 11,7)	141,6 (± 21,7)	134,9 (± 38,3)	0,43
CFT (s)	63,2 (± 11,7)	61,1 (± 14,4)	71,1 (± 35,6)	0,43
MCF (mm)	67,3 (± 5,6)	66,2 (± 3,9)	59,1 (± 22,3)	0,43
A10 (mm)	55,9 (± 4,6)	56,2 (± 5,2)	57,6 (± 5,6)	0,43
$\alpha$ (°)	77,1 (± 2,3)	78,0 (± 2,5)	76,6 (± 4,9)	0,43

**Tableau 24.** Evolution des paramètres de l'hepTEM (moyenne et SD) au cours de la période d'étude

### 3. Génération de thrombine

Les valeurs de l'ETP à h0 varient entre 156,3 et 462,3 nM/min. Six heures après la troisième injection d'énoxaparine (h18), une augmentation significative de l'ETP est observée ( $P = 0,02$ ). Cette augmentation est transitoire. Aucune autre valeur de l'ETP ne diffère significativement de celle de base [Tableau 25].

ETP (nM/min)	Heures de prélèvement (après la 1 <sup>ère</sup> injection)						
	h0	h3	h6	h9	h12	h15	h18
Moyenne	309,3	245,6	378,7	248,0	315,4	391,3	472,5
SD	85,0	59,9	77,3	77,8	56,2	79,5	76,4
P vs. h18	<b>0,02</b>	<b>&lt; 0,01</b>	0,27	<b>&lt; 0,01</b>	<b>&lt; 0,01</b>	0,57	1,00

ETP (nM/min)	Heures de prélèvement (après la 1 <sup>ère</sup> injection)						P globale
	h24	h30	h36	h48	h54	h60	
Moyenne	278,1	279,0	304,4	292,6	295,2	330,6	
SD	46,4	47,0	55,3	52,4	64,0	43,7	<b>&lt; 0,01</b>
P vs. h18	<b>0,02</b>	<b>&lt; 0,01</b>	0,27	<b>&lt; 0,01</b>	<b>&lt; 0,01</b>	<b>&lt; 0,01</b>	

**Tableau 25.** Evolution de l'ETP au cours de la période d'étude

### 4. Activité anti-Xa

Quatre des 8 chiens ont une activité anti-Xa dosable avant la première injection d'énoxaparine, mais cette activité est faible et inférieure à 0,5 U/mL.

Par comparaison avec la valeur de base, une augmentation significative de l'activité anti-Xa est observée 3 heures après les deuxième et troisième injections ( $P < 0,01$ ). La valeur maximale ( $0,40 \pm 0,17$  U/mL) est observée 3 heures après la seconde injection (h9).

Chez 3 chiens, l'activité anti-Xa a atteint la marge ciblée de 0,5 à 2 U/mL, marge validée en médecine humaine pour déterminer l'efficacité anticoagulante des héparines, 3 heures

après la seconde injection (h9), et 3 heures avant (h12) et après (h15) la troisième injection [Tableau 26].

Anti-Xa (U/mL)	Heures de prélèvement (après la 1 <sup>ère</sup> injection)						
	h0	h3	h6	h9	h12	h15	h18
Moyenne	0,15	0,21	0,03	0,40	0,23	0,35	0,18
SD	0,18	0,10	0,08	0,17	0,27	0,11	0,15
<i>P vs. h0</i>	1,00	0,32	0,12	< 0,01	0,72	< 0,01	0,98

Anti-Xa (U/mL)	Heures de prélèvement (après la 1 <sup>ère</sup> injection)						<i>P</i> globale
	h24	h30	h36	h48	h54	h60	
Moyenne	0,14	0,14	0,22	0,17	0,16	0,05	< 0,01
SD	0,12	0,12	0,11	0,12	0,11	0,08	
<i>P vs. h0</i>	0,95	0,75	0,25	0,85	0,87	0,12	

**Tableau 26.** Evolution de l'activité anti-Xa au cours de la période d'étude

### 5. Activité de l'antithrombine et fibrinogénémie

Aucune modification significative de l'activité de l'antithrombine et de la fibrinogénémie n'est observée pendant toute la durée du protocole [Tableau 27].

		Heures de prélèvement (après la 1 <sup>ère</sup> injection)						
		h0	h3	h6	h9	h12	h15	h18
Fibrinogène (g/L)	Moyenne	2,53	2,54	2,69	2,51	3,10	2,78	2,56
	SD	0,64	1,08	0,97	1,16	0,84	0,99	0,6
Antithrombine (%)	Moyenne	108,8	105,5	105,3	107,9	107,9	108,0	110,4
	SD	8,35	7,71	11,67	6,81	9,82	6,07	4,69

		Heures de prélèvement (après la 1 <sup>ère</sup> injection)						<i>P</i> globale
		h24	h30	h36	h48	h54	h60	
Fibrinogène (g/L)	Moyenne	2,94	2,6	2,7	2,75	2,39	2,74	0,99
	SD	1,03	1,00	1,07	0,91	1,22	1,09	
Antithrombine (%)	Moyenne	107,8	109,8	111,3	107,5	109,9	104,5	
	SD	7,8	4,6	2,7	8,6	3,5	10,7	

**Tableau 27.** Evolution de la fibrinogénémie et de l'activité de l'antithrombine au cours de la période d'étude

## D. DISCUSSION

Les HBPM ont progressivement remplacé les HNF pour de nombreuses entités médicales chez l'Homme, mais la dose et la fréquence d'administration appropriées pour la prévention des phénomènes thrombotiques restent débattues en médecine vétérinaire (Lunsford et al., 2009). L'information majeure de notre étude est que l'utilisation d'énoxaparine sodique à la dose de 80 UI/kg quatre fois par jour par voie SC ne révèle aucune activité anticoagulante stable et durable chez le Beagle en bonne santé et que cette dose ne devrait pas être considérée comme une dose préventive pour les phénomènes thrombotiques. A notre connaissance, cette étude est la première à investiguer les effets des HBPM à travers une approche globale et mécanistique en utilisant de nombreux examens hémostatiques incluant la TEM et la génération de thrombine. Ces méthodes, récemment introduites en médecine vétérinaire, permettent de mettre en évidence un profil hypercoagulable pouvant justifier la mise en place précoce d'un traitement anticoagulant (Allegret et al., 2011).

Seules quelques études ont validé l'utilisation d'HBPM dans la prévention des phénomènes thrombotiques en médecine vétérinaire (Sinnott et al., 2009 ; Vargo et al., 2009). La dose de 80 UI/kg quatre fois par jour par voie SC a été proposée par plusieurs auteurs et experts dans ce but précis (Lunsford et al., 2009 ; Scott et al., 2009). Lunsford et al. ont mis en évidence un effet anticoagulant de l'énoxaparine sodique à cette dose chez des greyhounds en bonne santé pour maintenir une activité anti-Xa entre 0,5 et 2 U/mL (Lunsford et al., 2009). Cependant, le greyhound est connu pour avoir des particularités hémostatiques propres à savoir une tendance à une hypocoagulabilité physiologique (Vilar et al., 2008 ; Lunsford et al., 2009). Compte tenu de ces résultats, notre étude visait à évaluer cette dose chez des chiens en bonne santé autres que greyhounds, et n'a trouvé aucune activité anticoagulante pertinente chez des chiens en bonne santé sans particularité hémostatique connue et mise en évidence par le bilan préalable.

Durant le traitement avec l'énoxaparine, les chiens n'ont présenté aucun signe de saignement. Cette observation est en accord avec celle d'études précédentes (Lunsford et al., 2009 ; Scott et al., 2009). L'administration d'HNF à haute dose est connue pour être associée à des complications hémorragiques (Scott et al., 2009). Cependant, l'utilisation d'HBPM, dont la pharmacocinétique apparaît plus reproductible, réduit ces risques de complications (Mischke et al., 2005 ; Lunsford et al., 2009).

Dans cette étude, la numération plaquettaire et la fibrinogénémie sont restées constantes au cours du protocole expérimental. L'apparition d'une thrombopénie de consommation associée ou non à une hypofibrinogénémie a été documentée lors de l'utilisation d'HNF et de HBPM en médecine humaine (Velagic et al., 2014). Cette thrombopénie induite par l'utilisation d'héparine se développe habituellement 5 à 10 jours après l'introduction du traitement (Velagic et al., 2014). La durée de traitement de 2 jours dans notre étude pourrait être considérée comme trop courte pour induire l'apparition de cette complication.

La TEM et la TEG sont des examens permettant de mesurer les propriétés viscoélastiques du clou durant sa formation dans le sang total (Kol et Borjesson, 2010). Chez l'Homme, la TEG a été utilisée comme méthode de monitoring de traitements à base d'HBPM et pourrait offrir plus d'avantages que la mesure de l'activité anti-Xa (Lynch et al., 2014). Dans une précédente étude rétrospective, les auteurs ont montré que la TEG, avant mise en place d'un traitement anticoagulant, pouvait aider à identifier les chiens nécessitant un monitoring plus étroit (Lynch et al., 2014). La sensibilité de la TEM aux HBPM reste encore débattue. Fenyvesi et al. ont déterminé que les HBPM n'avaient pas d'effets sur le profil exTEM mais en avaient sur le profil inTEM (Fenyvesi et al., 2005). Dans notre étude, pour augmenter la sensibilité de la TEM à détecter les effets de l'héparinothérapie, des profils hepTEM ont été réalisés. Cependant, aucun paramètre de l'hepTEM n'a été modifié suite aux injections d'énoxaparine dans notre protocole. Nos résultats pourraient s'interpréter soit par une absence d'effet anticoagulant de l'énoxaparine sodique à cette dose et à cette fréquence chez le Beagle en bonne santé, soit par l'absence de sensibilité de la TEM pour détecter l'effet anticoagulant de l'énoxaparine, soit par les deux.

Pour évaluer les désordres hémostatiques potentiels des chiens recevant l'énoxaparine, les temps de coagulation (PT et aPTT) ont été mesurés pendant la période d'étude. Nos résultats n'ont montré aucun changement significatif dans ces temps. Cependant, ces tests hémostatiques standards, largement répandus, ont une faible sensibilité et une faible spécificité pour la détection de faibles perturbations de la coagulation (Sinnott et al., 2009 ; Allegret et al., 2011). De plus, l'influence de l'héparine sur les temps de coagulation est principalement due à l'action de l'antithrombine (Licari et Kovacic, 2009). Cette action résulte d'une double liaison à l'antithrombine et à la thrombine. Les HNF peuvent former cette double liaison contrairement aux HBPM. L'effet anticoagulant des HBPM n'est ainsi que peu en lien avec l'activité de l'antithrombine. Pour cette raison, les temps de coagulation, seuls, ne

semblent pertinents pour surveiller les effets anticoagulants des HNF (Mestre et al., 1985 ; Mischke et al., 2005 ; Licari et Kovacic, 2009 ; Allegret et al., 2011).

La génération de thrombine, et particulièrement la mesure de l'ETP, paraissent utiles pour évaluer les risques de saignement ou de thrombose associés à des maladies ou chirurgies ou lors de traitement antithrombotique ou hémostatique (Hemker et al., 2006). Cette méthode a récemment été validée chez le Chien (Allegret et al., 2011). Les résultats de notre étude ne mettent en évidence aucune diminution significative de la génération de thrombine après l'administration d'énoxaparine sodique. A h0, l'ETP varie entre 156,28 et 462,3 nm/min, ce qui illustre la variation initiale de la quantité de thrombine générée par les animaux. Ces variations indiquent que l'état hémostatique peut varier entre deux individus et au fil du temps (Allegret et al., 2011). Une augmentation significative de l'ETP est observée chez tous les chiens 6 heures après la troisième injection d'héparine (h18) signant l'apparition d'un profil hypercoagulable transitoire. Cette observation est conforme aux résultats d'une étude précédente, qui suggère l'existence d'un phénomène de « rebond de l'activité de l'héparine » ou d'un effet « paradoxal » de la thrombine (Allegret et al., 2011). Ce phénomène, documenté en médecine humaine (Becker et al., 1995), pourrait être consécutif à différentes voies médiées par l'héparine telles que la diminution d'inhibition de la voie du facteur tissulaire, de la protéine C et des plaquettes (Allegret et al., 2011). Nos résultats suggèrent que, malgré l'absence d'activité anticoagulante pertinente à la dose utilisée, l'énoxaparine semble induire ce processus chez des beagles en bonne santé.

La mesure de l'activité anti-Xa est le *gold standard* pour évaluer les effets anticoagulants des HBPM en médecine humaine et vétérinaire (Scott et al., 2009 ; Vargo et al., 2009). L'activité anticoagulante des HBPM est principalement due à l'inhibition du facteur Xa et est considérée comme efficace lorsque l'activité anti-Xa est mesurée entre 0,5 et 2 U/ml chez le Chien (Lunsford et al., 2009). En accord avec les résultats de cette étude (Lunsford et al., 2009), nous avons respecté un intervalle de temps de 3 heures entre chaque injection d'énoxaparine et la mesure de l'activité anti-Xa. Cependant, seule une augmentation significative mais temporaire de l'activité anti-Xa a été observée 3 heures après la deuxième et la troisième injection. Cet effet a été transitoire et ne peut être considéré comme cliniquement significatif pour prévenir les événements thrombotiques chez le Chien.

Nos résultats sont discordants à ceux des travaux de Lunsford réalisés chez des greyhounds sains (Lunsford et al., 2009). Cette différence peut s'expliquer par les particularités hémostatiques des greyhounds qui présentent un profil hypocoagulable

physiologique, vraisemblablement en lien avec des taux d'hématocrite plus élevés que les autres races (Vilar et al., 2008). Le protocole d'injection d'énoxaparine sodique proposé par Lunsford (Lunsford et al., 2009) et utilisé en médecine vétérinaire (Panek et al., 2015) ne semble pas être suffisant dans notre étude pour obtenir une activité anticoagulante pertinente chez les races autres que les greyhounds.

Notre étude présente plusieurs limites. La première est la faible taille de la population étudiée induisant une diminution de la puissance des tests statistiques utilisés, bien que les travaux de Lunsford, portant sur une population de sept greyhounds, aient pu mettre en évidence une activité anticoagulante significative de l'énoxaparine sodique (Lunsford et al., 2009). La seconde limite est la répartition sexuelle de notre population, composée exclusivement de mâles. La troisième concerne le protocole expérimental et les intervalles de temps entre les injections d'énoxaparine sodique et la réalisation des examens sanguins. Il est possible que des intervalles de temps plus courts aient pu mettre en évidence des résultats différents. Enfin, cette étude a été réalisée chez des jeunes beagles adultes en bonne santé. Nos résultats doivent donc être extrapolés avec prudence aux autres races, aux chiens âgés et aux chiens malades.

***En conclusion, nos travaux montrent que des administrations d'énoxaparine sodique à la dose de 80 UI/kg (ou 0,8 mg/kg) par voie SC quatre fois par jour sont sans danger, mais ne permettent pas de maintenir une activité anti-Xa dans l'intervalle thérapeutique défini entre 0,5 et 2 U/mL chez le Beagle en bonne santé. Nos résultats remettent en question l'efficacité de ce protocole chez les chiens non greyhounds et supportent le suivi de l'activité anti-Xa chez les chiens recevant une HBPM.***

***La signification clinique d'un profil hypercoagulable transitoire mis en évidence par la mesure de l'ETP reste à élucider.***

***La détermination d'un protocole d'administration d'HBPM efficace chez les chiens sains et gravement malades reste un défi majeur en médecine vétérinaire et justifie la réalisation d'études complémentaires.***

## **II. SAIGNEMENTS, DESORDRES HEMOSTATIQUES ET THROMBOELASTOMETRIQUES ASSOCIES A LA LEPTOSPIROSE CHEZ LE CHIEN**

### **A. RATIONNEL**

La leptospirose est une zoonose réémergente de distribution mondiale causée par des membres du genre *Leptospira* (Bharti et al., 2003). Les manifestations cliniques de la leptospirose varient d'une maladie bénigne à une défaillance multiorganique potentiellement mortelle (Bharti et al., 2003). La leptospirose est communément associée à une insuffisance rénale avec tubulopathie, un dysfonctionnement hépatique, une atteinte pulmonaire, et, moins fréquemment, un syndrome hémorragique (Bharti et al., 2003 ; Major et al., 2014). Dans plusieurs études rétrospectives réalisées chez le Chien, ce syndrome hémorragique a été caractérisé par l'apparition d'une hématurie (avec une fréquence de 6 à 31%) (Rentko et al., 1992 ; Birnbaum et al., 1998 ; Adin et Cowgill, 2000 ; Mastroilli et al., 2007 ; Geisen et al., 2007), de méléna (3 à 9%) (Birnbaum et al., 1998 ; Goldstein et al., 2006 ; Mastroilli et al., 2007), de pétéchies (11,5 à 12,5%) (Gratzl et al., 1956 ; Mastroilli et al., 2007), d'une épistaxis (19%) (Mastroilli et al., 2007), d'hémochésie (3%) (Birnbaum et al., 1998) et de saignements spontanés (2,5%) (Miller et al., 2007).

Bien que le potentiel hémorragique de la leptospirose ait été observé par Weil dès 1886 (Weil, 1886), les causes et mécanismes à l'origine des saignements n'ont pas été clairement identifiés. Premièrement, la leptospirose est supposée causer une vascularite systémique à l'origine des lésions tissulaires et saignements (Medeiros et al., 2010). L'inflammation de la paroi vasculaire peut être la conséquence de l'invasion directe du leptospire (Martinez-Lopez et al., 2010 ; Medeiros et al., 2010 ; Zhang et al., 2012) ou en lien avec un processus immunitaire (Wagenaar et al., 2007 ; Ko et al., 2009 ; Schuller et al., 2015a, 2015b). Ensuite, la thrombopénie est une anomalie biologique largement documentée dans la leptospirose (fréquence de 14 à 58% dans la leptospirose canine) (Birnbaum et al., 1998 ; Adin et Cowgill, 2000 ; Goldstein et al., 2006 ; Mastroilli et al., 2007 ; Kohn et al., 2010 ; Tangeman et al., 2013). Les mécanismes à l'origine de cette thrombopénie ne sont que partiellement connus (Wagenaar et al., 2007). La thrombopénie observée lors de leptospirose peut être le résultat d'une diminution de la thrombopoïèse (Nicodemo et al., 1990 ; Somers et al., 2003) ou d'une augmentation de la consommation en plaquettes en lien avec une cause dysimmunitaire ou

non (Davenport et al., 1989 ; Turgut et al., 2002 ; Wagenaar et al., 2007 ; Kohn et al., 2010), une phagocytose par les cellules de Kupffer (Yang et al., 2006), ou une combinaison de ces causes (Wagenaar et al., 2007). Enfin, la leptospirose est décrite comme une cause fréquente de CIVD (Bharti et al., 2003 ; Mastrorilli et al., 2007 ; Wagenaar et al., 2007 ; Chierakul et al., 2008 ; Wagenaar et al., 2010 ; Major et al., 2014). Dans deux études rétrospectives partiellement focalisées sur les désordres de l'hémostase dans la leptospirose canine, une CIVD a été diagnostiquée chez 7 sur 16 chiens (Mastrorilli et al., 2007) et 38 sur 209 chiens (Major et al., 2014). L'apparition d'une CIVD n'était pas associée à un assombrissement du devenir (mort ou euthanasie) dans la première étude (Mastrorilli et al., 2007), au contraire de la seconde étude (Major et al., 2014). Les analyses multivariées conduites dans deux études prospectives humaines n'ont pas permis d'identifier la CIVD comme un facteur indépendant d'apparition de saignements, et aucune association significative n'a été trouvée entre les scores de CIVD et la présence d'une diathèse hémorragique (Chierakul et al., 2008 ; Wagenaar et al., 2010). Dans ces deux études, la CIVD n'était pas associée à une péjoration du pronostic (Chierakul et al., 2008 ; Wagenaar et al., 2010).

L'objectif de cette étude était de décrire les signes cliniques de diathèse hémorragique et les données hématologiques, hémostatiques et TEM observés lors de leptospirose chez le Chien. A la connaissance des auteurs, aucune étude n'a, à ce jour, documenté l'utilisation de la TEM dans la description des désordres de l'hémostase dans la leptospirose, que ce soit chez l'Homme ou chez le Chien.

## **B. MATERIELS ET METHODES**

Les chiens admis au SIAMU (Soins Intensifs – Anesthésiologie – Médecine d'Urgence) de VetAgro Sup, campus vétérinaire de Lyon, entre janvier 2013 et juin 2015, avec un diagnostic de leptospirose, étaient éligibles à l'inclusion dans cette étude prospective observationnelle et à cohorte unique. Le consentement des propriétaires a été obtenu avant l'enrôlement dans l'étude.

### **1. Critères d'inclusion et critères d'exclusion**

Les chiens ont été suspectés d'être atteint de leptospirose s'ils présentent des signes cliniques compatibles avec la maladie (insuffisance rénale aiguë, glycosurie sans

hyperglycémie associée, hépatite aiguë, syndrome hémorragique et gastro-entérite hémorragique), et si d'autres causes étaient exclues ou semblaient peu probables.

Le diagnostic définitif de leptospirose s'est reposé sur la présence d'au moins un des trois critères suivants :

- un titre sérologique  $\geq 800$  pour les sérovars non vaccinaux ou  $\geq 1600$  pour les sérovars vaccinaux (des sérogroupes *Icterohaemorrhagiae* et *Canicola*) sur le test de micro-agglutination (MAT) (Fraune et al., 2013 ; Schuller et al., 2015),
- une augmentation par quatre des titres MAT convalescents, ou
- un résultat PCR positif sur les urines ou le sang.

Les tests sérologiques ont été réalisés au Laboratoire des Leptospires (VetAgro Sup, campus vétérinaire de Lyon, 1 avenue Bourgelat, Marcy l'Etoile, France). Vingt-quatre sérovars représentant les 13 sérogroupes suivants ont été testés : *Icterohaemorrhagiae*, *Australis*, *Autumnalis*, *Ballum*, *Bataviae*, *Canicola*, *Grippotyphosa*, *Hebdomadis*, *Panama*, *Pomona*, *Pyrogenes*, *Sejroe* et *Tarassovi*.

Les chiens ont été exclus de l'étude si les analyses sanguines n'avaient pu être réalisées au moment de l'admission, ou si un anticoagulant (HBPM, HNF ou antiagrégant plaquettaire (clopidogrel ou aspirine)) avait été donné par le vétérinaire référent dans le mois précédant l'admission.

## **2. Recueil des données médicales**

Les données médicales collectées pour chaque cas suspect incluaient le signalement, le type de consultation (consultation primaire ou référée), le statut vaccinal vis-à-vis de la leptospirose, les traitements précédents (anticoagulants, antibiotiques, glucocorticoïdes et anti-inflammatoires non stéroïdiens), les signes cliniques de diathèse hémorragique, la durée d'évolution des signes cliniques, la durée de l'hospitalisation, le devenir (survie, mort naturelle ou euthanasie) et les résultats nécropsiques éventuels.

Les signes cliniques utilisés pour définir la diathèse hémorragique étaient l'hémochésie, le méléna, l'hématémèse, l'hématurie macroscopique, l'épistaxis, l'hémoptysie, la présence d'hématomes muqueux ou cutanés, la présence de saignements spontanés muqueux ou cutanés et les pétéchies. Le même clinicien (l'auteur) a réalisé tous les examens cliniques de chaque chien suspect à l'admission.

### **3. Recueil des échantillons sanguins et urinaires**

Lors de l'admission, a été réalisée sur chaque chien suspect une prise de sang à partir de la veine saphène latérale en utilisant une seringue reliée à une aiguille de 21 gauges. Le sang prélevé a ensuite été réparti dans les tubes suivants : tube citraté pour la réalisation du bilan d'hémostase et de la TEM, tube EDTA pour la réalisation de la NFS et de la PCR sur sang et un tube sec pour la réalisation de la sérologie leptospirose. Les tubes citratés contenaient 3,2% de citrate de sodium tamponné dans un rapport strict sang/citrate de 1/9 pour une concentration finale de citrate de 10,8 mmol/L.

Les urines ont été récoltées par cystocentèse échoguidée et conservées dans deux tubes secs pour la réalisation des analyses urinaires (densité et bandelette urinaires) et de la PCR sur urines.

### **4. Analyses sanguines**

Les analyses sanguines incluaient une NFS, un bilan d'hémostase et la TEM. Ces examens ont été réalisés tels que décrits dans les études précédentes de ce manuscrit.

Si une anémie était présente, la lecture du frottis sanguin a été réalisée par une technicienne spécialisée pour déterminer manuellement le comptage réticulocytaire afin de discriminer les anémies régénératives ( $> 100 \times 10^9/L$ ) des anémies hyporégénératives (entre 40 et  $100 \times 10^9/L$ ) arégénératives ( $< 40 \times 10^9/L$ ).

Le bilan d'hémostase se composait du PT, de l'aPTT, du temps de thrombine (TT), de la fibrinogénémie, et de la concentration sérique en PDF et D-dimères.

Deux profils TEM ont été conduits pendant une heure (exTEM et fibTEM). Les paramètres TEM pris en compte étaient ceux cités dans les études précédentes de ce manuscrit.

### **5. Définition des profils de coagulation**

Le diagnostic de CIVD (Mastrorilli et al., 2007) reposait sur la présence, au moment de l'admission, d'au moins trois critères parmi les suivants : une thrombopénie ( $< 200 \times 10^9/L$ ), un allongement du PT ( $> 10$  s), un allongement de l'aPTT ( $> 20$  s), un allongement du TT ( $> 25$  s), une hypofibrinogénémie ( $< 1,5$  g/L), une augmentation de la concentration sérique en PDF ( $> 20$  µg/mL), ou une augmentation de la concentration sérique en D-dimères ( $> 0,8$  µg/mL).

En se basant sur les profils exTEM, un profil hypercoagulable était défini par des valeurs de  $G > 11\,129$  dynes/cm<sup>2</sup> et de  $TPI > 2,81$ , et un profil hypocoagulable par des valeurs de  $G < 4\,025$  dynes/cm<sup>2</sup> et de  $TPI < 0,38$ .

Enfin, un score APPLFast a été calculé chez chaque chien pour grader la sévérité de la maladie (Hayes et al., 2010).

## 6. Analyses statistiques

Tous les résultats sont présentés par leur médiane et leur intervalle. La normalité est évaluée par un test *omnibus* d'Agostino et de Pearson. Les comparaisons entre survivants et non survivants, entre chiens avec et sans CIVD, et entre chiens avec et sans diathèse hémorragique sont réalisés à l'aide d'un test *t* de Student pour les données à distribution normale et d'un test *U* de Mann-Whitney pour les données à distribution non normale. Les comparaisons des chiens entre profils hyper-, normo- et hypocoagulables sont réalisées à l'aide d'une analyse de la variance. Les données qualitatives sont comparées à l'aide d'un test exact de Fisher et par le calcul des *odd ratios* (OR) associés à leur intervalle de confiance à 95% (IC 95%). La survie est évaluée par la réalisation de courbes de Kaplan-Meier et les différences de mortalité entre les groupes sont comparées par un test du *log rank*. Toutes les analyses statistiques sont réalisées à l'aide d'un logiciel commercial (Prism 6, GraphPad Software). Une valeur de  $P \leq 0,05$  est considérée comme significative.

## C. RESULTATS

### 1. Caractéristiques de la population

Entre janvier 2013 et juin 2015, une leptospirose est diagnostiquée chez 45 chiens. Dix chiens sont exclus de l'étude en raison de l'impossibilité de réaliser la TEM au moment de l'admission. Trente-cinq chiens sont restés inclus dans l'étude.

L'infection leptospirosique est diagnostiquée sur la base des résultats de la MAT chez 30 chiens (titres sérologiques d'admission chez 25 chiens et séroconversion chez 5 chiens), de la PCR chez 3 chiens (PCR sur sang et urines positives chez 1 chien et PCR sur sang positives chez 2 chiens), et de la combinaison des résultats de la MAT et d'une PCR sur urines positives chez 2 chiens. Trente-quatre chiens (97%) sont vaccinés contre la leptospirose dans l'année précédente. Ces chiens avaient reçu exclusivement des vaccins bivalents contre les sérogroupes *Icterohaemorrhagiae* et *Canicola* (Nobivac® lepto, MSD Santé Animale ;

Canigen®, Virbac France ; Eurican®, Merial). Sur la base des titres sérologiques observés à l'admission, les sérogroupes les plus représentés sont *Australis*, *Autumnalis* et *Panama* [Tableau 28].

L'âge médian est de 5 ans (intervalle, 4 mois à 12 ans) pour un poids médian de 29,4 kg (5,8 à 58,7 kg). La répartition sexuelle est la suivante : 26 mâles (75%), dont 23 entiers (66%) et 3 castrés (9%), et 9 femelles (25%), dont 4 entières (11%) et 5 stérilisées (14%).

Trente-deux chiens (91%) sont de race pure et appartiennent à 22 races différentes. Les races les plus représentées sont les bergers allemands (4/35, 11%), les jack russel terriers (3/35, 9%), les golden retrievers (3/35, 9%) et les labrador retrievers (3/35, 9%).

Trente-deux chiens (91%) sont référés. Vingt-trois chiens (66%) ont reçu des antibiotiques avant l'admission (amoxicilline et acide clavulanique chez 7 chiens, enrofloxacin chez 3 chiens, amoxicilline chez 3 chiens, pénicilline G chez 1 chien, oxytétracycline chez 1 chien, métronidazole chez 1 chien, et diverses combinaisons de ces antibiotiques chez 7 chiens). Trois chiens (9%) ont reçu des glucocorticoïdes avant l'admission (dexaméthasone chez 2 chiens et méthylprednisolone chez 1 chien). Deux chiens (6%) ont reçu du meloxicam avant l'admission. Aucun chien de l'étude n'a reçu d'anticoagulant par le vétérinaire référent.

Sérogroupe	Sérovar	Tous (n = 35)	Avec diathèse hémorragique (n = 8)	Sans diathèse hémorragique (n = 27)	Avec un profil hypercoagulable (n = 14)	Avec un profil normal (n = 14)	Avec un profil hypocoagulable (n = 7)
<i>Icterohemorrhagiae</i>	<i>Icterohemorrhagiae</i>	3	0	3	0	1	2
	<i>Copenhagani</i>	6	1	5	3	2	1
<i>Australis</i>	<i>Australis</i>	13	1	12	1	6	6
	<i>Bratislava</i>	13	2	11	1	6	6
	<i>Munchen</i>	18	2	16	9	8	1
<i>Autumnalis</i>	<i>Autumnalis</i>	4	0	4	1	3	0
	<i>Bim</i>	10	1	9	1	6	3
<i>Ballum</i>	<i>Castellonis</i>	0	0	0	0	0	0
	<i>Bataviae</i>	0	0	0	0	0	0
<i>Canicola</i>	<i>Canicola</i>	0	0	0	0	0	0
	<i>Grippotyphosa</i>	3	2	1	0	1	2
<i>Hebdomadis</i>	<i>Vanderhoedoni</i>	2	0	2	0	1	1
	<i>Hebdomadis</i>	0	0	0	0	0	0
	<i>Kremastos</i>	0	0	0	0	0	0
<i>Panama</i>	<i>Mangus</i>	11	2	9	1	6	4
	<i>Panama</i>	2	0	2	0	2	0
<i>Pomona</i>	<i>Mozdok</i>	1	0	1	0	0	1
	<i>Pomona</i>	1	0	1	0	1	0
<i>Pyrogenes</i>	<i>Pyrogenes</i>	2	1	1	1	0	1
	<i>Sejroe</i>	0	0	0	0	0	0
<i>Sejroe</i>	<i>Saxkoebing</i>	0	0	0	0	0	0
	<i>Haradjo</i>	0	0	0	0	0	0
<i>Tarassovi</i>	<i>Tarassovi</i>	0	0	0	0	0	0

**Tableau 28.** Description des sérogroupes identifiés par la MAT sur la base des titres sérologiques à l'admission  $\geq 800$  pour les sérovars non vaccinaux ou  $\geq 1600$  pour les sérovars vaccinaux (des sérogroupes *Icterohaemorrhagiae* et *Canicola*)

## **2. Signes cliniques de diathèse hémorragique**

Le temps médian entre l'apparition des signes et l'admission au SIAMU est de 4 jours (1 à 30 jours). Huit chiens (23%) présentent une diathèse hémorragique à l'admission. Parmi ces 8 chiens, 5 présentent une combinaison de deux signes de diathèse hémorragique et 1 présente une association de trois signes. Les signes cliniques de diathèse hémorragique incluent une hémochésie (3/35, 9%), une hématurie macroscopique (3/35, 9%), du méléna (2/35, 6%), de l'hématémèse (2/35, 6%), des saignements muqueux spontanés (2/35, 6%, 1 saignement gingival et 1 hémorragie sclérale), de l'hémoptysie (1/35, 3%), des pétéchies (1/35, 3%) et la présence d'hématomes cutanés (1/35, 3%).

## **3. Hospitalisation et devenir**

Le temps d'hospitalisation médian est de 7 jours (0 à 21 jours). Vingt-deux chiens (63%) ont survécu. Treize chiens (37%) sont morts pendant l'hospitalisation. Six chiens sont décédés de mort naturelle (4 chiens suite à une détresse respiratoire ne répondant pas aux traitements de support mis en place et 2 chiens durant une séance d'hémodiafiltration). Sept chiens ont été euthanasiés. Les raisons du choix d'euthanasie sont les suivantes : le développement d'une détresse respiratoire majeure avec hémoptysie et épistaxis chez 2 chiens, la présence d'une intussusception chez 2 chiens, la détérioration sévère de l'état général en lien avec l'évolution de la maladie chez 2 chiens et l'impossibilité d'introduire un cathéter veineux central de dialyse en raison de la présence d'un volumineux thrombus dans chaque veine jugulaire chez 1 chien.

## **4. Données hématologiques, hémostatiques et thromboélastométriques**

Des anomalies hématologiques sont observées chez 32 chiens (91%). Elles incluent une anémie (30/35, 86%, avec toutes un comptage réticulocytaire  $< 40 \times 10^9/L$ ), une thrombopénie (21/35, 60%), une leucocytose (6/35, 17%), une leucopénie (2/35, 6%) et une discrète augmentation du taux d'hématocrite (1/35, 3%).

Des anomalies du bilan d'hémostase sont observées chez 29 chiens (83%). Elles incluent une hyperfibrinogénémié (15/35, 43%), un allongement de l'aPTT (8/35, 23%), une hypofibrinogénémié (7/35, 20%), un allongement du PT (5/35, 14%), un allongement du TT (5/35, 14%) et une augmentation de la concentration sérique en PDF (4/35, 11%). La concentration sérique en D-dimères n'a pu être réalisée que chez les 23 derniers chiens inclus et s'avère augmentée chez 9 chiens (39%).

Les anomalies du bilan d'hémostase associées à la présence de la thrombopénie conduisent à un diagnostic de CIVD chez 8 chiens (23%).

Les anomalies des paramètres de l'exTEM incluent une augmentation de l'angle  $\alpha$  (19/35, 54%), de l'A10 (14/35, 40%), du MCF (10/35, 29%), du CT (8/35, 23%) et du CFT (7/35, 20%), et une diminution du CFT (16/35, 46%), de l'A10 (7/35, 20%), de l'angle  $\alpha$  (7/35, 20%) et du MCF (7/35, 20%). Les valeurs de G et du TPI sont augmentées chez 14 chiens (40%) et diminuées chez 7 chiens (20%). Ces valeurs permettent de définir un profil hypercoagulable chez 14 chiens (40%), un profil normocoagulable chez 14 chiens (40%) et un profil hypocoagulable chez 7 chiens (20%).

Les anomalies des paramètres du fibTEM incluent une augmentation de l'A10 (20/35, 57%), du MCF (19/35, 54%), du CT (5/35, 14%) et du ML (1/35, 3%), et une diminution de l'A10 (3/35, 9%), du MCF (3/35, 9%) et du CT (1/35, 3%).

## 5. Comparaisons entre les chiens avec et sans diathèse hémorragique

Aucun sérotype n'a été identifié comme étant spécifiquement associé à la présence d'une diathèse hémorragique [Tableau 28]. Les 8 chiens (23%) avec une diathèse hémorragique ont une numération plaquettaire plus faible ( $P = 0,037$ ) et une concentration en D-dimères plus élevée ( $P = 0,015$ ) que les chiens sans diathèse hémorragique [Tableau 29].

	Valeurs usuelles	Chiens avec diathèse hémorragique ( $n = 8$ )		Chiens sans diathèse hémorragique ( $n = 27$ )		$P$
		Médiane	Intervalle	Médiane	Intervalle	
PT (s)	6 - 10	8,2	6,7 - 12,9	7,4	6,5 - 69,2	0,102
aPTT (s)	10 - 20	18,3	12,9 - 180,0	14,5	9,6 - 180,0	0,116
TT (s)	10 - 25	17,4	12,8 - 60,0	15,0	6,2 - 60,0	0,336
Fibrinogène (g/L)	1,5 - 4,0	1,6	0,9 - 7,3	3,4	0,9 - 6,0	0,512
PDF ( $\mu\text{g/mL}$ )	< 20	5 - 20	< 5 - > 20	< 5	< 5 - > 20	NA
D-dimères ( $\mu\text{g/mL}$ ) ( $n = 23$ )	< 0,8	1,6 ( $n = 7$ )	0,4 - 2,8	0,6 ( $n = 16$ )	0,3 - 1,5	<b>0,015</b>
Hématocrite (L/L)	0,37 - 0,54	0,25	0,16 - 0,60	0,30	0,09 - 0,45	0,121
Leucocytes ( $\times 10^9/\text{L}$ )	6 - 17	12,3	6,0 - 23,6	12,7	2,1 - 29,8	0,798
Plaquettes ( $\times 10^9/\text{L}$ )	200 - 500	107	38 - 273	189	77 - 460	<b>0,037</b>

**Tableau 29.** Comparaison des paramètres hémostatiques et hématologiques entre les chiens avec et sans diathèse hémorragique  
(*NA, non applicable*)

La comparaison des profils exTEM met en évidence un allongement significatif du CT ( $P = 0,047$ ) et du CFT ( $P = 0,014$ ), et une diminution de l'A10 ( $P = 0,007$ ), de l'angle  $\alpha$  ( $P = 0,025$ ), du MCF ( $P = 0,006$ ), du TPI ( $P = 0,009$ ) et du G ( $P < 0,001$ ) chez les chiens avec diathèse hémorragique par rapport à ceux sans diathèse hémorragique [Tableau 30].

	Valeurs usuelles	Chiens avec diathèse hémorragique ( $n = 8$ )		Chiens sans diathèse hémorragique ( $n = 27$ )		$P$
		Médiane	Intervalle	Médiane	Intervalle	
CT (s)	33 - 70	79	34 - 3600	40	33 - 2025	<b>0,047</b>
CFT (s)	78 - 231	291	20 - 3600	67	18 - 3600	<b>0,014</b>
A10 (mm)	33 - 59	22	0 - 72	57	0 - 75	<b>0,007</b>
$\alpha$ (°)	51 - 75	33	0 - 86	79	0 - 87	<b>0,025</b>
MCF (mm)	45 - 69	30	5 - 77	67	5 - 80	<b>0,006</b>
Li45 (%)	88 - 100	100	99 - 100	100	97 - 100	0,746
ML (%)	0 - 41	1	0 - 16	5	0 - 17	0,133
TPI	0,38 - 2,81	0,09	0 - 16,74	2,61	0 - 20,90	<b>0,009</b>
G (dynes/cm <sup>2</sup> )	4025-11129	2239	0 - 16739	10151	0 - 20000	<b>&lt; 0,001</b>

**Tableau 30.** Comparaison des paramètres de l'exTEM entre les chiens avec et sans diathèse hémorragique

La comparaison des profils fibTEM entre les chiens avec et sans diathèse hémorragique ne permet pas de mettre en évidence de différence significative [Tableau 31].

	Valeurs usuelles	Chiens avec diathèse hémorragique ( $n = 8$ )		Chiens sans diathèse hémorragique ( $n = 27$ )		$P$
		Médiane	Intervalle	Médiane	Intervalle	
CT (s)	32 - 98	71	35 - 3600	42	27 - 3600	0,057
CFT (s)	NA	NA	NA	NA	NA	NA
A10 (mm)	3 - 13	5	0 - 35	17	0 - 36	0,078
$\alpha$ (°)	NA	NA	NA	NA	NA	NA
MCF (mm)	3 - 14	5	0 - 35	18	0 - 36	0,069
Li45 (%)	64 - 100	100	93 - 100	100	90 - 100	1
ML (%)	0 - 48	12	0 - 84	1	0 - 18	0,076

**Tableau 31.** Comparaison des paramètres du fibTEM entre les chiens avec et sans diathèse hémorragique

(NA, non applicable)

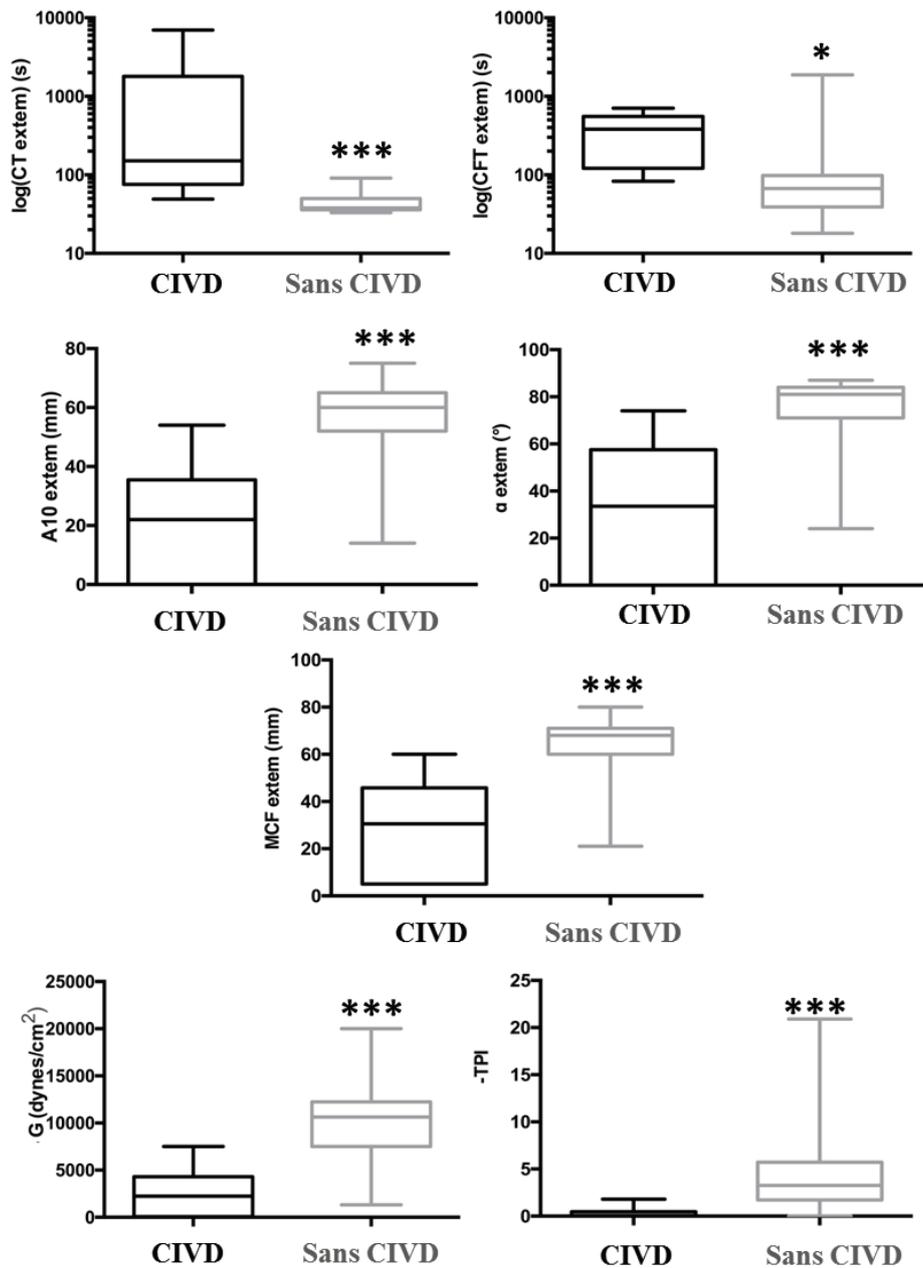
Parmi les 8 chiens présentant une diathèse hémorragique, 5 ont un profil hypocoagulable, 2 un profil normocoagulable, et 1 un profil hypercoagulable.

## 6. Comparaisons entre les chiens avec et sans CIVD

Une CIVD est diagnostiquée chez 8 chiens (23%) à l'admission. Quatre chiens ayant une CIVD (4/8, 50%) présentent une diathèse hémorragique : un chien présente des pétéchies gingivales et de l'hématémèse, un chien présente de l'hémochésie et une hématurie macroscopique, un chien a à la fois du méléna, de l'hématémèse et une hématurie macroscopique, et enfin, un chien présente du méléna et des saignements buccaux spontanés. Quatre chiens sans CIVD (4/27, 15%) présentent une diathèse hémorragique à l'admission : un chien a des hémorragies sclérales et de l'hémoptysie, un chien présente de l'hémochésie, un chien a de l'hémochésie associée à une hématurie macroscopique, et enfin, un chien présente des hématomes cutanés distribués sur l'ensemble du corps.

Le diagnostic d'une CIVD n'est pas associé à la présence d'une diathèse hémorragique ( $P = 0.161$ ). Plus spécifiquement, l'hématémèse et le méléna sont les seuls signes cliniques hémorragiques associés à la présence d'une CIVD (OR = 21,2 ; IC 95% = 0,9 – 496,2 ;  $P = 0,047$  pour chaque signe).

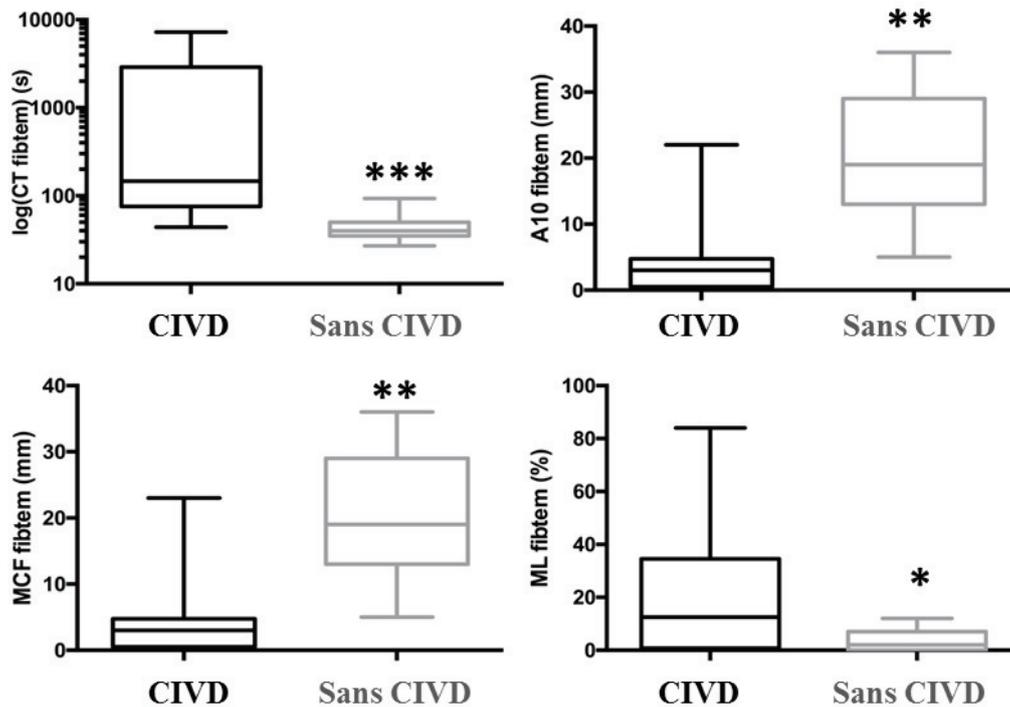
Sur les profils exTEM, le CT et le CFT sont significativement prolongés chez les chiens avec CIVD en comparaison avec ceux sans CIVD (respectivement,  $P < 0,0001$  et  $P = 0,005$ ), alors que l'A10, l'angle  $\alpha$  et le MCF sont significativement diminués ( $P < 0,0001$  pour chaque paramètre) [**Figure 17**]. Les indices G et TPI sont significativement diminués chez les chiens avec CIVD ( $P < 0,0001$  pour chaque indice) [**Figure 17**].



**Figure 17.** Comparaison de la distribution des paramètres de l'exTEM entre les chiens avec et sans CIVD

(\*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,001$ , \*\*\*  $P < 0,0001$ )

Sur les profils fibTEM, le CT et le ML sont significativement augmentés chez les chiens avec CIVD (respectivement,  $P < 0,0001$  et  $P = 0,041$ ), alors que l'A10 ( $P = 0,0002$ ) et le MCF ( $0,0002$ ) sont significativement diminués [Figure 18].



**Figure 18.** Comparaison de la distribution des paramètres du fibTEM entre les chiens avec et sans CIVD

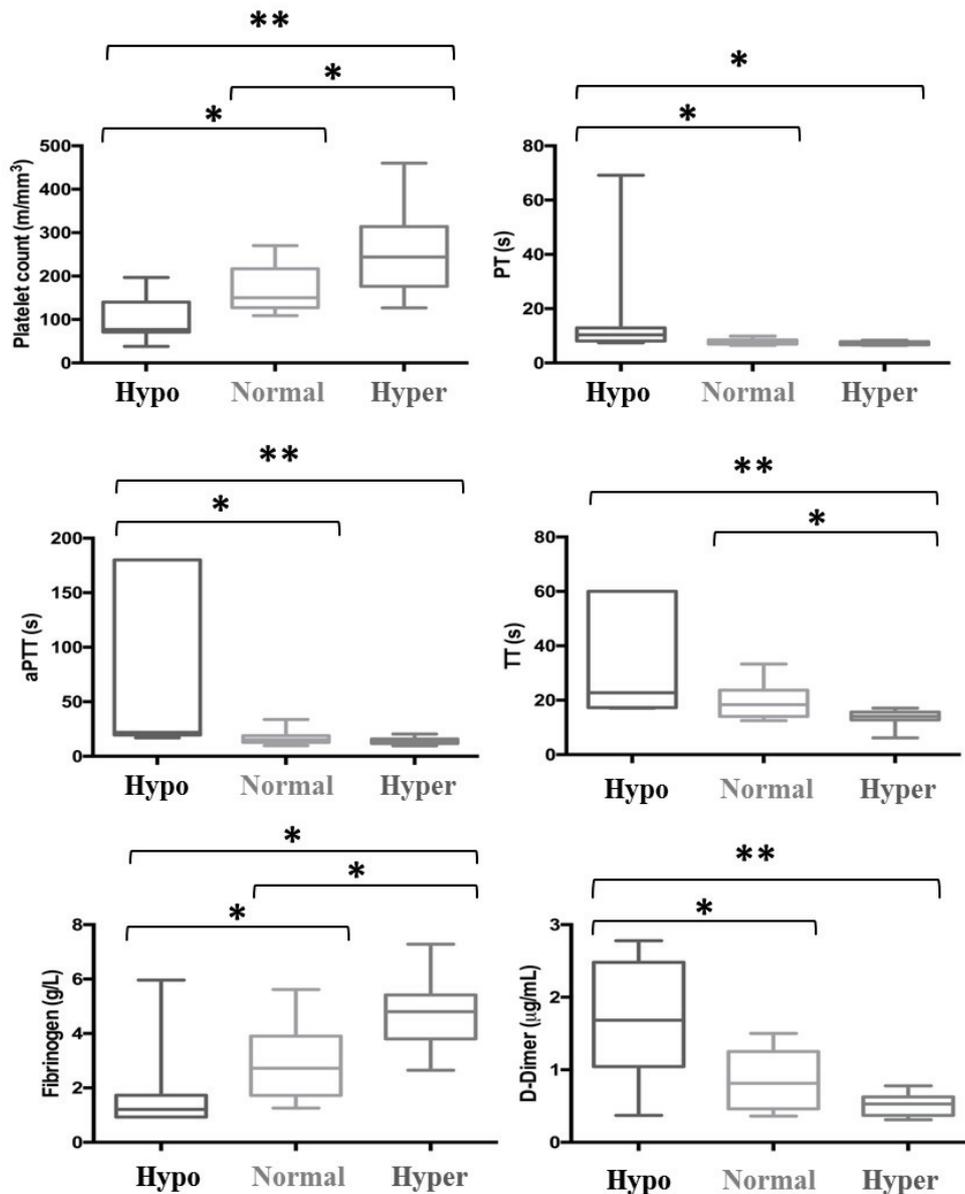
(\*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,001$ , \*\*\*  $P < 0,0001$ )

Parmi les 8 chiens avec CIVD, 6 (75%) présentent un profil hypocoagulable et 2 (25%) un profil normocoagulable. Parmi les 27 chiens sans CIVD, 14 (52%) présentent un profil hypercoagulable, 12 (44%) un profil normocoagulable, et 1 (4%) un profil hypocoagulable. Le seul chien avec un profil hypocoagulable et n'ayant pas de CIVD présente une thrombopénie sévère ( $38 \times 10^9/L$ ) associée à une augmentation majeure de la concentration sérique en D-dimères ( $2,78 \mu g/mL$ ).

### 7. Comparaisons entre les chiens avec un profil hypercoagulable, normocoagulable et hypocoagulable

Aucun sérotype n'a été identifié comme étant spécifiquement associé avec un profil hypercoagulable, normal ou hypocoagulable [Tableau 28]. Les chiens avec un profil hypocoagulable présentent plus fréquemment une diathèse hémorragique que les chiens avec un profil normocoagulable et hypercoagulable (OR = 9,17 ; IC 95% = 1,15 – 73,3 ;  $P = 0,026$ ). Une hématurie macroscopique est observée plus fréquemment chez les chiens avec un profil hypocoagulable que chez les autres (OR = 22,56 ; IC 95% = 1,97 – 524,8 ;  $P = 0,026$ ).

La **figure 19** illustre les différences entre les paramètres de la NFS et le profil d'hémostase des chiens avec un profil hypercoagulable, normal ou hypercoagulable.



**Figure 19.** Comparaison de la distribution de la numération plaquettaire et des paramètres hémostatiques entre les chiens avec un profil hypocoagulable, normocoagulable et hypercoagulable  
 (\*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,001$ )

La comparaison du score APPLEfast ne montre pas de différence entre les chiens en fonction de leur profil [Tableau 32].

	Tous les chiens (n = 35)	Avec un profil hypercoagulable (n = 14)	Avec un profil normal (n = 14)	Avec un profil hypocoagulable (n = 7)
Médiane	21	19,5	21,5	21
Intervalle	15 - 30	15 - 30	17 - 26	19 - 22
P	0,64			

**Tableau 32.** Comparaison du score APPLEfast entre les chiens avec un profil hypercoagulable, normal et hypocoagulable

## 8. Comparaisons entre les chiens survivants et non survivants

Aucune différence n'est observée entre les paramètres de la NFS ainsi qu'entre ceux du bilan d'hémostase classique des survivants et des non survivants [Tableau 33].

	Valeurs usuelles	Chiens survivants (n = 22)		Chiens non survivants (n = 13)		P
		Médiane	Intervalle	Médiane	Intervalle	
PT (s)	6 - 10	7,2	6,5 - 12,9	7,9	6,7 - 69,2	0,083
aPTT (s)	10 - 20	15,5	9,8 - 180,0	15,0	9,6 - 180,0	0,561
TT (s)	10 - 25	15,3	6,2 - 60,0	17,1	12,5 - 60,0	0,833
Fibrinogène (g/L)	1,5 - 4,0	4,1	0,9 - 7,3	2,8	1,0 - 5,6	0,134
PDF (µg/mL)	< 20	< 5	< 5 - > 20	5 - 20	< 5 - > 20	NA
D-dimères (µg/mL) (n = 23)	< 0,8	0,6 (n = 13)	0,3 - 1,6	0,9 (n = 10)	0,4 - 2,8	0,166
Hématocrite (L/L)	0,37 - 0,54	0,29	0,16 - 0,45	0,29	0,09 - 0,60	0,609
Leucocytes (×10 <sup>9</sup> /L)	6 - 17	12,7	2,8 - 29,8	12,7	2,1 - 23,9	0,608
Plaquettes (×10 <sup>9</sup> /L)	200 - 500	192	76 - 422	175	38 - 460	0,535

**Tableau 33.** Comparaison des paramètres hémostatiques et hématologiques entre les chiens survivants et les chiens non survivants

(NA, non applicable)

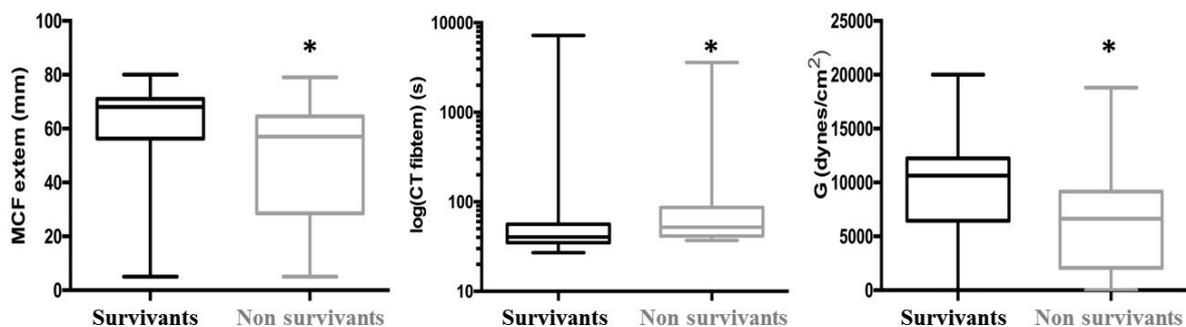
Le MCF de l'exTEM et le G sont significativement plus élevés chez les survivants [Tableau 34, Figure 20] alors que le CT du fibTEM est significativement plus court [Tableau 35, Figure 20] par rapport aux non survivants. Les aires sous la courbe sont respectivement de 0,715 pour le MCF de l'exTEM, 0,713 pour le G, et 0,592 pour le CT du fibTEM.

	Valeurs usuelles	Chiens survivants (n = 22)		Chiens non survivants (n = 13)		P
		Médiane	Intervalle	Médiane	Intervalle	
CT (s)	33 - 70	39	33 - 3600	53	36 - 2025	0,119
CFT (s)	78 - 231	67	20 - 3600	88	18 - 3600	0,130
A10 (mm)	33 - 59	62	0 - 75	52	0 - 75	0,099
$\alpha$ (°)	51 - 75	81	0 - 86	73	0 - 87	0,115
MCF (mm)	45 - 69	68	5 - 80	57	5 - 79	<b>0,035</b>
Li45 (%)	88 - 100	100	99 - 100	100	97 - 100	0,369
ML (%)	0 - 41	5	0 - 16	1,5	0 - 17	0,288
TPI	0,38 - 2,81	2,94	0 - 16,74	1,77	0 - 20,90	0,066
G (dynes/cm <sup>2</sup> )	4025-11129	10625	0 - 20000	6628	0 - 18810	<b>0,037</b>

**Tableau 34.** Comparaison des paramètres de l'exTEM entre les chiens survivants et les chiens non survivants

	Valeurs usuelles	Chiens survivants (n = 22)		Chiens non survivants (n = 13)		P
		Médiane	Intervalle	Médiane	Intervalle	
CT (s)	32 - 98	40,5	27 - 3600	52	37 - 3600	<b>0,045</b>
CFT (s)	NA	NA	NA	NA	NA	NA
A10 (mm)	3 - 13	16	0 - 36	14	3 - 32	0,186
$\alpha$ (°)	NA	NA	NA	NA	NA	NA
MCF (mm)	3 - 14	17	0 - 36	13	0 - 32	0,154
Li45 (%)	64 - 100	99	90 - 100	100	93 - 100	0,405
ML (%)	0 - 48	2	0 - 84	2	0 - 13	0,963

**Tableau 35.** Comparaison des paramètres du fibTEM entre les chiens survivants et les chiens non survivants  
(NA, non applicable)

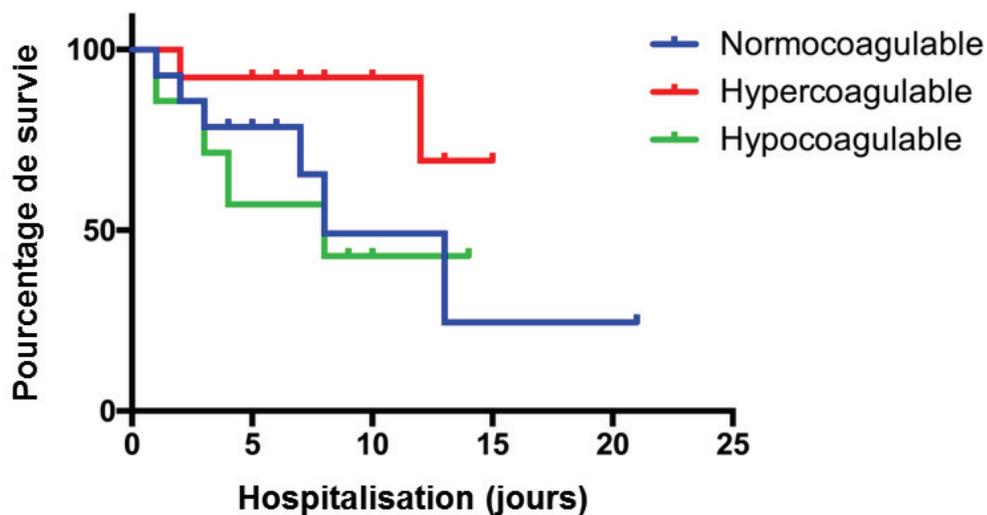


**Figure 20.** Comparaison de la distribution du MCF et du G de l'exTEM et du CT du fibTEM entre les chiens survivants et les chiens non survivants

La différence entre les taux de mortalité des chiens avec et sans diathèse hémorragique est très proche de la significativité (respectivement, 63% (5/8) et 30% (8/27) ;  $P = 0.051$ ).

Les taux de mortalité ne sont pas différents entre les chiens avec et sans CIVD ( $P = 0,433$ ).

Le taux de mortalité est plus faible chez les chiens avec un profil hypercoagulable que chez les chiens avec un profil hypocoagulable (respectivement, 21% (3/14) et 57% (4/7) ;  $P = 0,043$ ). Les taux de mortalité ne sont pas statistiquement différents entre les chiens avec un profil hypercoagulable et ceux avec un profil normal ( $P = 0,847$ ) et entre les chiens avec un profil hypocoagulable et ceux avec un profil normal ( $P = 0,195$ ) [Figure 21].



**Figure 21.** Courbes de Kaplan-Meier des chiens en fonction de leur profil thromboélastométrique

## 9. Résultats nécropsiques et histologiques

Un seul chien décédé (euthanasie 48 heures après son admission) a fait l'objet d'un examen nécropsique. Ce chien ne présentait pas de signes de diathèse hémorragique à l'admission. Ses anomalies hématologiques étaient une anémie sévère avec un taux d'hématocrite de 0,09 L/L et une thrombopénie marquée ( $117 \times 10^9/L$ ). Sa seule anomalie hémostatique était une augmentation de l'aPTT. Son profil TEM était normal.

### a. Observations macroscopiques

Lors de l'examen nécropsique, les lésions macroscopiques sont dominées par des hémorragies affectant de nombreux organes : présence de sang en grande quantité dans la

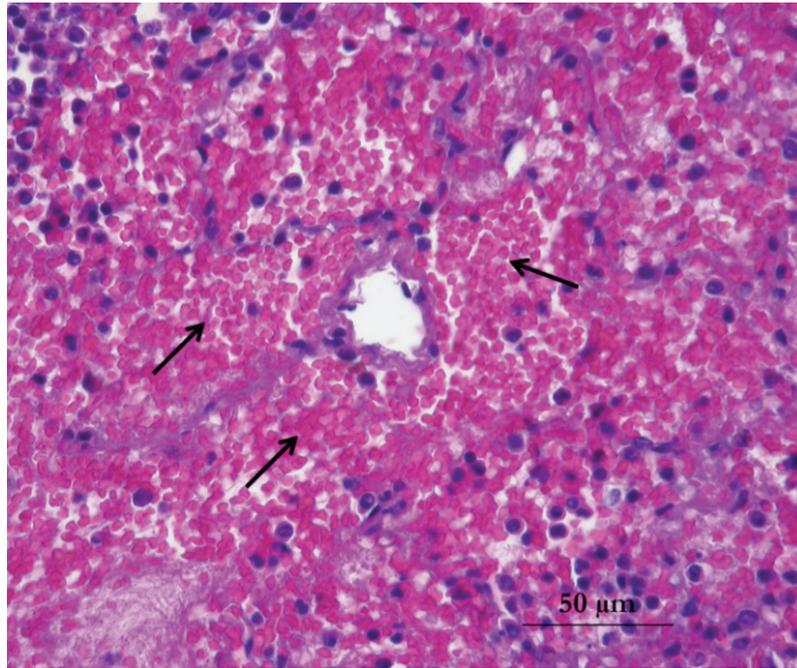
cavité buccale, nombreuses ecchymoses cutanées, suffusions de grandes tailles sur l'endocarde, hémorragies myocardiques, méléna, hémorragies multifocales dans les séreuses œsophagienne, duodénale et jéjunale, contenu biliaire hémorragique et multiples foyers hémorragiques sur la muqueuse vésicale associés à une hématurie franche, et hémorragies corticales et sous-corticales rénales. Des ulcères gastriques superficiels sont présents ainsi qu'une intussusception. L'examen macroscopique de l'appareil respiratoire montre une grande quantité de liquide séro-hémorragique dans les poumons et les voies respiratoires supérieures, de nombreux foyers hémorragiques pulmonaires et des nodules blanchâtres coalescents de pneumonie interstitielle.

### **b. Observations histologiques**

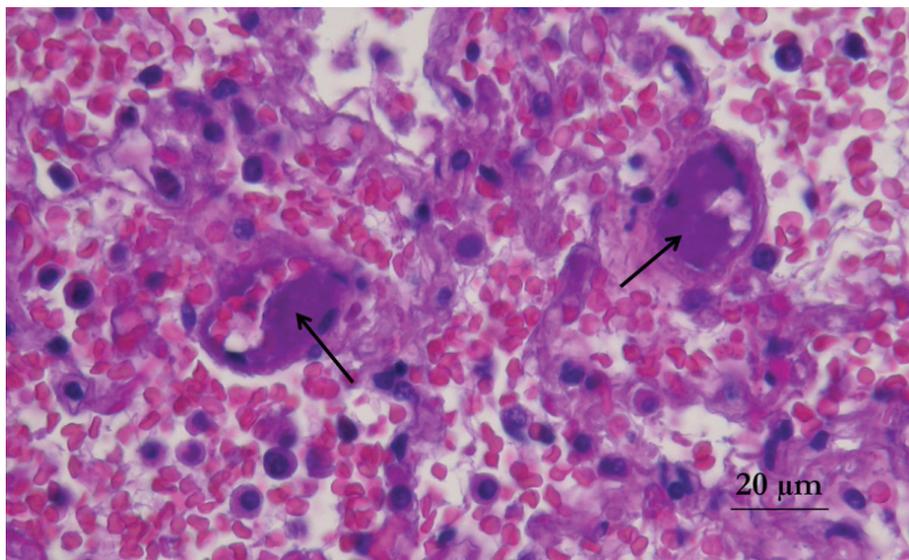
Les alvéoles pulmonaires sont le siège d'hémorragies extensives multifocales sévères [Figure 22], parfois associées à de l'œdème et à des dépôts de fibrine. Des thrombi fibrineux sont présents dans plusieurs capillaires alvéolaires et quelques veinules de petit calibre [Figure 23]. Une congestion des capillaires et une nécrose de la paroi des vaisseaux sont parfois observables. Il y a une fréquente perte des détails architecturaux des septa alvéolaires et perte de l'épithélium des bronchioles terminales. Des amas de neutrophiles non dégénérés associés à quelques macrophages alvéolaires remplissent les alvéoles et les bronchioles terminales de manière multifocale. Quelques petits groupes d'hémosidérophages avec observation d'érythrophagocytose sont visibles autour des bronchioles terminales.

Dans les reins, les tubules corticaux (surtout proximaux) et, dans une moindre mesure, médullaires présentent des lésions multifocales de nécrose sévère avec des cellules épithéliales au noyau pycnotique ou caryorrhctique et formation de cylindres protéiques et présence de débris cellulaires et minéralisés dans la lumière. Une quantité marquée de matériel granulaire rougeâtre est visible dans la lumière (hémoglobininurie vraisemblable). Plusieurs syncytia de cellules épithéliales sont visibles dans la paroi des tubules. Les glomérules contiennent plusieurs thrombi fibrineux et du matériel protéinacé est parfois visible dans la chambre glomérulaire. Un œdème et des agrégats lymphoplasmocytaires multifocaux, variant de léger à modéré, s'étendent dans l'interstitium. Des hémorragies intra-glomérulaires et interstitielles sévères sont présentes [Figure 24] ainsi que des infiltrats interstitiels inflammatoires multifocaux hétérogènes.

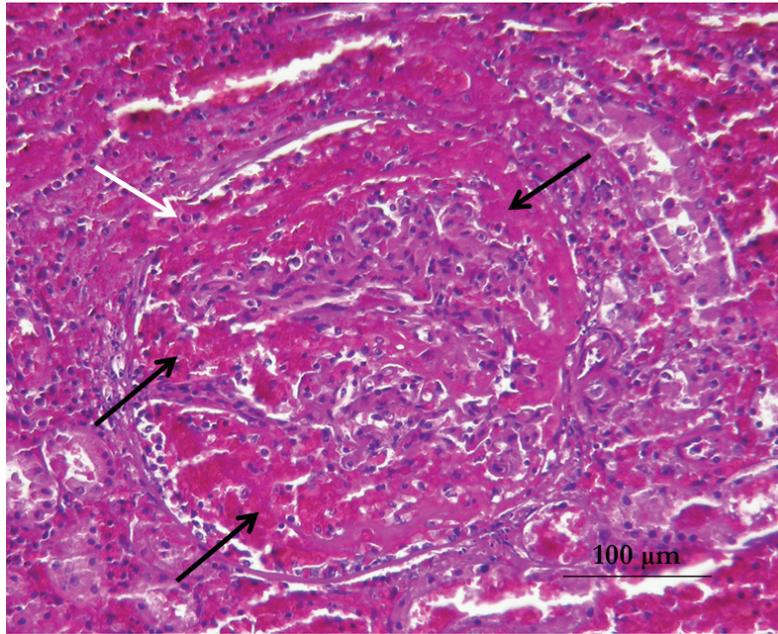
Dans le cœur, plusieurs hémorragies sont visibles en position sous-épicaudique et s'étendent dans l'endomysium sous-jacent [Figure 25].



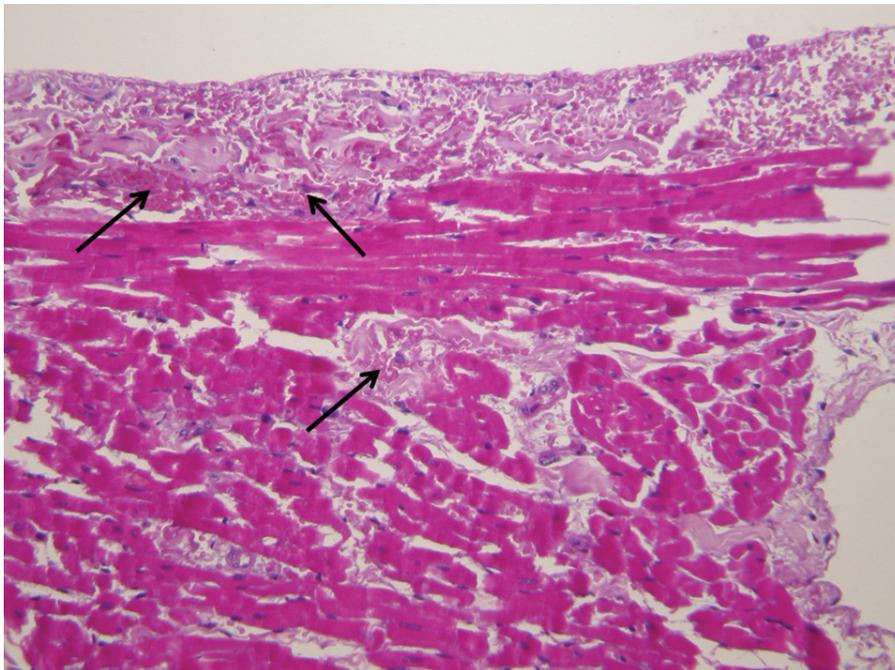
**Figure 22.** Hémorragies intra-alvéolaires sévères (*grossissement x40*)



**Figure 23.** Présence de thrombi au sein des vaisseaux pulmonaires (*grossissement x40*)



**Figure 24.** Hémorragies intra-glomérulaires sévères (*flèches noires*) à l'origine d'une rupture de la capsule glomérulaire (*flèche blanche*) (*grossissement x20*)



**Figure 25.** Hémorragies sous-épicardiques (*grossissement x40*)

## D. DISCUSSION

A la connaissance des auteurs, cette étude est la première à décrire les anomalies TEM en plus des anomalies hémostatiques rencontrées dans la leptospirose canine et à les comparer entre les chiens avec (23%) et sans diathèse hémorragique. Parmi la population globale, les anomalies hématologiques les plus fréquentes sont l'anémie (86%) et la thrombopénie (60%). Des anomalies hémostatiques sont présentes chez 83% des chiens. La présence d'une CIVD est diagnostiquée chez 23% et n'est pas un facteur pronostique négatif. La TEM permet de mettre en évidence un profil hypercoagulable chez 40% des chiens, un profil normocoagulable chez 40%, et un profil hypocoagulable chez 20%. Le taux de mortalité est plus faible chez les chiens avec un profil hypercoagulable que chez les chiens avec un profil hypocoagulable.

Huit chiens présentent de la diathèse hémorragique dans cette étude. La mise en évidence de saignements n'a été rapportée que de manière inconstante dans la leptospirose canine. Cette étude prospective, focalisée sur les désordres de l'hémostase associés à la leptospirose, apporte des informations supplémentaires sur l'expression clinique associée à ces désordres. Une étude précédente a rapporté une prévalence de complications hémorragiques de 18,2% chez le chien souffrant de leptospirose. Cependant, les complications hémorragiques faisaient référence à des anomalies sanguines et non cliniques (Major et al., 2014). La fréquence des signes cliniques d'hémorragie rapportée dans notre étude est similaire à celle d'études rétrospectives précédentes pour l'hématurie macroscopique (9% dans cette étude *versus* 6 à 31% dans des études précédentes) (Rentko et al., 1992 ; Birnbaum et al., 1998 ; Adin et Cowgill, 2000 ; Geisen et al., 2007 ; Mastroilli et al., 2007), et le méléna (6% *versus* 3 à 19%) (Birnbaum et al., 1998 ; Goldstein et al., 2006 ; Mastroilli et al., 2007), plus élevée pour l'hémochésie (9% *versus* 3%) (Birnbaum et al., 1998) et les saignements spontanés (6% *versus* 2,5%) (Miller et al., 2007), et plus faible pour les pétéchies (3% *versus* 11,5 à 12,5%) (Gratzl et al., 1956 ; Mastroilli et al., 2007). La fréquence de l'hématémèse (6% dans cette étude) et des hématomes cutanés (3%) n'a pas été rapportée dans ces études précédentes. Ces différences de fréquence peuvent être attribuées aux natures différentes de ces études (prospective *versus* rétrospective), à la distribution géographique différente (France *versus* Amérique du Nord, Italie, Allemagne et Autriche) et au fait que la population décrite dans cette étude est composée dans sa majorité de cas référés ayant potentiellement des signes cliniques plus sévères.

L'anémie est l'anomalie hématologique la plus rapportée dans notre étude avec une fréquence (86%) plus élevée que celle rapportée précédemment (18 à 53%) (Birnbbaum et al., 1998 ; Adin et Cowgill, 2000 ; Mastroilli et al., 2007 ; Kohn et al., 2010 ; Tangeman et al., 2013). Cette différence peut être expliquée par le fait que de nombreux chiens référés de cette population ont reçu une thérapeutique liquidienne avant leur admission et/ou sont anuriques (données non montrées) ce qui a pu contribuer à une hémodilution. De plus, la répétition des prises de sang a pu contribuer aux pertes sanguines (Lynch et al., 2016b). Les causes d'anémie dans la leptospirose sont multifactorielles et peu comprises. Le développement de cette anémie est souvent attribué aux pertes sanguines, notamment par les systèmes respiratoires et gastro-intestinaux et au développement d'un syndrome inflammatoire à réponse systémique (Schuller et al., 2015a, 2015b). En se fondant sur les critères précédemment publiés (Hauptman et al., 1997), un syndrome inflammatoire à réponse systémique est diagnostiqué chez 14 chiens (40%) de notre étude (données non montrées), parmi lesquels, 10 sont anémiés. En outre, un processus hémolytique à médiation immune contribuant à cette anémie a été également rapporté lors de leptospirose (Lee et al., 2000). Neuf chiens (26%) de notre étude sont ictériques à l'admission et tous sont anémiés (données non montrées). Il est cependant difficile de déterminer si cet ictère résulte d'un processus hémolytique, d'un dysfonctionnement hépatique ou d'une combinaison de ces deux entités. Enfin, une myélosuppression à l'origine de l'anémie rencontrée lors de leptospirose est également suspectée (Somers et al., 2003). Bien que le comptage réticulocytaire dans notre étude soit inférieur à  $40 \times 10^9/L$  pour chaque cas d'anémie, la présence seule de ce facteur ne peut supporter l'hypothèse d'une myélosuppression, d'autant plus qu'aucune ponction de moelle osseuse n'a été réalisée. Au bilan, les résultats de notre étude supportent une origine multifactorielle du développement de l'anémie lors de leptospirose.

La thrombopénie est une anomalie hématologique commune dans notre étude avec une fréquence (60%) légèrement supérieure à celle rapportée précédemment (14 à 58%) (Birnbbaum et al., 1998 ; Adin et Cowgill, 2000 ; Mastroilli et al., 2007 ; Goldstein et al., 2006 ; Kohn et al., 2010 ; Tangeman et al., 2013). Les mécanismes à l'origine de cette thrombopénie associée à la leptospirose sont peu connus. Elle peut être attribuée à une consommation excessive des plaquettes en lien avec leur activation, adhésion et agrégation à cause d'un endothélium vasculaire activé (Nicodemo et al., 1997), et en lien avec un processus dysimmunitaire (Davenport et al., 1989 ; Turgut et al., 2002 ; Wagenaar et al., 2007 ; Kohn et al., 2010) et/ou un syndrome hémophagocytaire (Yang et al., 2006 ; Issa et al.,

2015). Une myélosuppression pouvant être secondaire à un effet toxique direct des leptospire a également été documentée dans une étude (Somers et al., 2003). Cette thrombopénie pourrait expliquer partiellement les saignements observés lors de leptospirose. Dans notre étude, la numération plaquettaire est significativement plus faible chez les chiens présentant une diathèse hémorragique. En médecine humaine, la présence d'une thrombopénie est un facteur corrélé à la sévérité de la maladie et le seul facteur de risque biologique indépendant associé aux saignements (Chierakul et al., 2008 ; Wagenaar et al., 2010).

Une CIVD est présente chez 8 chiens (23%) de notre étude, parmi lesquels 4 présentent une diathèse hémorragique. Dans une étude rétrospective précédente, une CIVD, définie selon les mêmes critères utilisés dans notre étude, a été observée chez 7/16 chiens (44%) (Mastrorilli et al., 2007). Dans une seconde étude, une CIVD a été diagnostiquée chez 38/209 chiens (18%) (Major et al., 2014). Cependant, dans cette seconde étude, la présence d'une CIVD n'était basée que sur la présence d'au moins deux critères hémostatiques anormaux parmi ceux mesurés communément (numération plaquettaire, PT, aPTT et fibrinogénémie). Contrairement à la médecine humaine qui a développé et validé un score diagnostique de CIVD (Taylor et al., 2001 ; Bakhtiari et al., 2004), aucun critère consensuel de diagnostic de CIVD n'existe en médecine vétérinaire. Chez le chien, le diagnostic d'une CIVD repose souvent sur l'opinion d'experts ou la présence de trois ou plus anomalies hémostatiques, ce qui représente une approche sensible mais peu spécifique (Wiinberg et al., 2008). Les critères utilisés dans cette étude pour le diagnostic d'une CIVD ont été considérés subjectivement comme les plus appropriés.

La CIVD est fréquemment considérée comme une cause de saignements lors de leptospirose (Bharti et al., 2003 ; Mastrorilli et al., 2007 ; Chierakul et al., 2008 ; Wagenaar et al., 2007 ; Wagenaar et al., 2010 ; Major et al., 2014). Cependant, le lien entre CIVD et saignements dans les cas spontanés et expérimentaux de leptospirose sont peu clairs. La CIVD n'a été documentée que rarement chez les modèles présentant des saignements. Dans un modèle expérimental de leptospirose chez le Cochon d'Inde, aucun thrombus blanc ou rouge n'a été trouvé dans le foie, les poumons, ou les reins par examen microscopique, alors que les concentrations plasmatiques en PDF et D-dimères étaient significativement augmentés (Yang et al., 2006). Dans deux études prospectives humaines, une CIVD a été diagnostiquée chez 10/46 patients (22%) (Wagenaar et al., 2010) et 36/49 patients (73%) (Chierakul et al., 2008) ; le diagnostic de CIVD ayant été établi par le score de CIVD développé par le comité scientifique de la Société Internationale de Thrombose et d'Hémostase (Taylor et al., 2001).

Cependant, la CIVD n'est pas apparue comme un facteur indépendant associé à la présence d'une diathèse hémorragique (Chierakul et al., 2008) et aucune association significative n'a été observée entre les scores de CIVD et la présence d'une diathèse hémorragique (Chierakul et al., 2008 ; Wagenaar et al., 2010). Comme il est reporté dans notre étude, la CIVD n'a pas été identifiée comme un facteur pronostique associé à la mortalité (Mastrorilli et al., 2007 ; Chierakul et al., 2008 ; Wagenaar et al., 2010). Néanmoins, Major et al. ont trouvé que la CIVD était associée à un pronostic sombre (mort ou euthanasie) chez le chien (OR = 7,9 ; IC 95% = 3,4 – 18,4) (Major et al., 2014).

Dans notre étude, 40% des chiens présentent un profil hypercoagulable, 40% un profil normocoagulable et 20% un profil hypocoagulable. Nos résultats soulignent la complexité du déséquilibre hémostatique rencontré dans la leptospirose en documentant des éléments en faveur d'une hypercoagulabilité et d'une hypocoagulabilité. Plusieurs chiens présentent également une augmentation de leur activité fibrinolytique lors de l'admission. Cependant, presque aucun paramètre de fibrinolyse de la TEM n'est altéré (à l'exception du ML sur les profils fibTEM), ce qui pourrait représenter un manque de sensibilité de cette méthode pour identifier les altérations fibrinolytiques. Les résultats d'une étude précédente réalisée chez des chiens admis pour hémobdomen spontané montrent que l'ajout de 50 U/mL d'activateur tissulaire du plasminogène permet d'augmenter les capacités de l'examen TEG à détecter des différences minimales de fibrinolyse (Fletcher et al., 2016). De plus, parmi les chiens ayant un profil normocoagulable, la majorité présentent des altérations de l'hémostase primaire (thrombopénie) et secondaire. Des études supplémentaires sont nécessaires afin de caractériser cette population de chiens pour établir si ces derniers sont vraiment normocoagulables ou sont dans une phase transitoire entre des profils hypercoagulables et hypocoagulables.

L'observation de profils hypercoagulables était attendue dans cette étude car plusieurs facteurs peuvent expliquer l'apparition d'un état hypercoagulable lors de leptospirose. Premièrement et conformément à la triade de Virchow, les lésions de l'endothélium vasculaire sont considérées comme une cause majeure d'hypercoagulabilité (Wolberg et al., 2012). Or la leptospirose est fréquemment suspectée d'être à l'origine d'une vascularité systémique (Medeiros et al., 2010). Cette vascularite peut être la conséquence d'une invasion directe des leptospires (Martinez-Lopez et al., 2010 ; Medeiros et al., 2010 ; Zhang et al., 2012). L'adhésion des leptospires aux composés tissulaires de l'hôte est une étape nécessaire à l'infection et la pathogénèse (Wagenaar et al., 2007 ; Evangelista et al., 2014a ; Evangelista et

al., 2014b). L'attachement des leptospires aux cellules de l'hôte et aux composants de la matrice extracellulaire pourrait conduire à l'apparition d'interruptions dans la couche endothéliale permettant aux bactéries de franchir cette dernière (Martinez-Lopez et al., 2010). L'implication de mécanismes immunitaires est le plus souvent attribuée aux lipoprotéines membranaires qui déterminent les interactions des Spirochètes avec leur environnement (Kelesidis, 2014). Deuxièmement, une augmentation des facteurs plasmatiques procoagulants a été rapportée dans la leptospirose et pourrait contribuer à l'état d'hypercoagulabilité ; spécifiquement, les leptospires pathogènes sont capables d'exprimer du facteur tissulaire par les cellules mononucléaires (Miragliotta et Fumarola, 1983), de la sE-sélectine et du facteur de Von Willebrand (Goeijenbier et al., 2015), et induisent également une augmentation des concentrations plasmatiques en complexes thrombine-antithrombine (Chierakul et al., 2008) et en cytokines pro-inflammatoires (Wang et al., 2012 ; Reis et al., 2013 ; Wang et al., 2014). Enfin, la leptospirose pourrait conduire à une diminution de la concentration plasmatique de facteurs anticoagulants, notamment en stimulant la synthèse d'anticorps anticardiolipines contribuant à l'inhibition de la fonction du système de la protéine C (De Francesco Daher et al., 2002). De plus, une étude précédente a mis en évidence une diminution de l'activité de l'antithrombine chez des chiens souffrant de leptospirose (Mastrorilli et al., 2007).

Cependant, le nombre de profils TEM hypercoagulables observé dans cette étude pourrait être influencé par la fréquence élevée d'anémies. En effet, les résultats de plusieurs études suggèrent que la diminution du taux d'hématocrite pourrait induire artificiellement l'apparition d'un profil hypercoagulable (McMichael et al., 2014b ; Smith et al., 2012 ; Brooks et al., 2014 ; Barthélemy et al., 2015). En outre, 43% des chiens de notre étude présentent une hyperfibrinogénémie, anomalie hémostatique pouvant favoriser l'apparition d'un profil hypercoagulable (Smith et al., 2012). Trois chiens ont reçu des glucocorticoïdes avant leur admission dans notre établissement. Les résultats d'une étude précédente ont montré, par approche TEG, que l'administration chronique de prednisone chez des chiens croisés en bonne santé conduisait à une augmentation de la force du clou et une diminution de sa lyse (Flint et al., 2011). Dans notre étude, le chien ayant reçu de la méthylprednisolone présente un profil normocoagulable, et parmi les 2 chiens ayant reçu de la dexaméthasone, le premier présente un profil hypercoagulable et le second un profil hypocoagulable. L'administration préalable de glucocorticoïdes ne semble pas avoir influencé les résultats des tracés TEM dans notre étude. Un effectif plus important aurait néanmoins été nécessaire pour confirmer cette tendance. Enfin, 2 chiens ont reçu du meloxicam avant leur admission. Ces

chiens n'ont pas été exclus de notre étude en accord avec les résultats d'une étude précédente mettant en évidence l'absence d'effet hémostatique du meloxicam à travers les analyses hémostatiques réalisées (TEM et agrégométrie plaquettaire) (Zanuzzo et al., 2015).

Le taux de mortalité (37%) de notre étude est similaire à ceux rapportés précédemment qui sont de 17 à 52,5% (Rentko et al., 1992 ; Birnbaum et al., 1998 ; Adin et Cowgill, 2000 ; Goldstein et al., 2006 ; Geisen et al., 2007 ; Mastroilli et al., 2007 ; Miller et al., 2007 ; Kohn et al., 2010 ; Major et al., 2014 ). Le taux de mortalité est plus faible chez les chiens ayant un profil hypercoagulable que chez les chiens ayant un profil hypocoagulable, et le paramètre G est significativement plus élevé chez les survivants. Cette observation est supportée par les résultats de deux études précédentes qui montraient que les chiens ayant une CIVD (Wiinberg et al., 2008) ou une envenimation ophidienne (Armentano et al., 2014) et présentant un profil hypocoagulable avaient un taux de mortalité supérieur à ceux ayant un profil hypercoagulable. De manière intéressante, le score APPLEfast est presque similaire chez tous les chiens quel que soit leur profil TEM, comme rapporté dans une étude humaine lors de sepsis (Adamzik et al., 2011). Cette relation questionne le rôle de l'hémostase dans le processus inflammatoire en lien avec les états de sepsis. L'activation de la coagulation pourrait permettre une compartimentalisation des bactéries dans les microvaisseaux sanguins et réduire l'invasion bactérienne dans les tissus (Massberg et al., 2010). Inversement, l'hypocoagulabilité pourrait faciliter la dissémination bactérienne et, par conséquent, la mortalité (Massberg et al., 2010).

Notre étude présente plusieurs limites. En premier, les chiens appartiennent à une population référée et pourraient avoir des signes cliniques et biologiques plus sévères que ceux vus en première opinion. Il est ainsi difficile de confirmer si nos résultats peuvent être extrapolés à tous les chiens souffrant de leptospirose. La seconde limite concerne la faible taille de la population incluse, à l'origine d'une diminution de la puissance des différents tests statistiques. Enfin, la fréquence de présence de CIVD dans notre étude doit être interprétée avec précautions car le diagnostic de la CIVD n'a pas encore été standardisé chez le chien. Un modèle mathématique a été développé en médecine vétérinaire (Wiinberg et al., 2010). Cependant, l'application de ce modèle n'a pas été possible dans notre étude car elle repose sur des valeurs usuelles ayant été établies dans un laboratoire spécifique.

*En conclusion, les désordres de l'hémostase jouent un rôle important dans la présentation clinique des chiens ayant une leptospirose mais ce rôle n'est que peu caractérisé.*

*Les résultats de cette étude suggèrent que les saignements observés sont le résultat d'un déséquilibre dans la balance hémostatique avec des altérations de l'hémostase primaire et secondaire. Ce déséquilibre peut conduire au développement d'une CIVD qui est présente dans 23% des cas de cette étude prospective. Cependant, il est difficile de préciser quelles sont les cibles de ce déséquilibre hémostatique et quelles protéines sont impliquées. D'autres études seront nécessaires pour éclaircir ce questionnement.*

*Le taux de mortalité est plus faible chez les chiens ayant un profil hypercoagulable et la présence d'une CIVD n'est pas associée à une augmentation de ce dernier.*

*La TEM est utile dans l'identification de profils hypercoagulables et hypocoagulables chez des chiens souffrant de leptospirose. La mise en évidence d'un profil hypocoagulable pourrait servir d'indicateur pronostique précoce pour traiter un chien avec un traitement plus agressif.*



## *CONCLUSION*

La thromboélastométrie rotative (TEM), technique améliorée de la thromboélastographie, est un examen évaluant les propriétés viscoélastiques sanguines et capable d'apprécier dynamiquement la fonction hémostatique globale d'un patient. La TEM est utile pour la description des anomalies hémostatiques de diverses maladies et conditions médicales, et pour évaluer les effets sur les propriétés viscoélastiques sanguines de nombreux médicaments.

Ce travail a permis de mettre en évidence un certain nombre de résultats significatifs en médecine vétérinaire en lien avec l'utilisation de cet examen. Le premier résultat est l'apparition de profils hypercoagulables et une diminution de l'activité fibrinolytique chez le beagle en bonne santé en lien avec le vieillissement. Ce résultat suggère que l'âge devrait être considéré comme un facteur de risques de complications thrombotiques chez le Chien. Le second résultat est que le sexe et la stérilisation n'influencent pas la balance hémostatique chez des chiens en bonne santé, contrairement aux résultats obtenus dans de nombreuses études humaines. La troisième conclusion est que l'analyse du profil thromboélastométrique apparaît comme un indicateur pronostique précoce chez des chiens souffrant de leptospirose.

De même, ce travail a permis de confirmer une limite de cet examen viscoélastique : la thromboélastométrie rotative apparaît comme peu sensible pour mettre en évidence les effets anticoagulants des héparines à bas poids moléculaire.

Il convient cependant de noter une différence fondamentale de l'utilisation de cet examen entre la médecine humaine et la médecine vétérinaire. En médecine humaine, cet examen apparaît comme une aide précieuse à la prise en charge thérapeutique des patients, notamment en situation d'urgence ou en état critique. En médecine vétérinaire, ce test semble rester cantonné au domaine de la recherche, et sa pertinence clinique reste vraiment à établir. Il est à espérer que les futures études vétérinaires reposant sur son utilisation relèvent les applications cliniques et thérapeutiques immédiates de cet examen, pouvant être réalisé au chevet du patient, via notamment la publication d'algorithmes décisionnels.



## ***PERSPECTIVES***

A l'issue de ce travail, il apparaît que le domaine d'application des examens viscoélastiques est large et laisse la porte ouverte à la réalisation de nombreuses études en médecine vétérinaire.

Etant donnée l'absence de recommandations consensuelles quant à la définition d'un profil hypercoagulable ou d'un profil hypocoagulable, un premier travail pourrait être de déterminer la précision, la sensibilité et la spécificité des paramètres et indices TEM pour mettre en évidence un profil hypercoagulable ou hypocoagulable en fonction de critères de définition différents. Au moment d'écrire ce manuscrit, une étude rétrospective, réalisée sur la base de l'analyse de 182 profils exTEM de chiens présentés au SIAMU et ayant permis de calculer les sensibilités et spécificités des différents paramètres et indices TEM dans la caractérisation des profils TEM, a été soumis à *Veterinary Clinical Pathology*. Une autre étude prospective basée sur la caractérisation des profils TEM de chiens admis au SIAMU et présentant une CIVD est en cours de rédaction.

Dans l'étude développée en Troisième partie (II) concernant la description des anomalies hémostatiques et TEM dans la leptospirose chez le chien, les profils TEM ont été réalisés à l'admission. La majorité de ces chiens étant anurique, une prise en charge par hémodiafiltration a été réalisée au cours de l'hospitalisation. Il serait pertinent de décrire les modifications des paramètres TEM induits par ces séances d'épuration extrarénale chez le Chien. En effet, la circulation extracorporelle et l'exposition du sang à des surfaces étrangères (tubulures, membranes de dialyse) lors de l'épuration extrarénale peuvent induire des modifications de l'hémostase primaire et secondaire (Doria et al., 2014). Quelques études réalisées chez l'Homme mettent en évidence l'utilité des tests viscoélastiques dans la détection des modifications hémostatiques consécutives à l'hémodialyse, avec notamment l'observation d'une augmentation de la fermeté du clou (Matika et al., 2014 ; Wand et al., 2015) et d'une diminution de l'activité fibrinolytique (Matika et al., 2014). De plus, l'utilisation de ces tests pourrait également permettre de contribuer à monitorer les effets de l'héparinothérapie mise en œuvre au cours de l'hémodiafiltration afin de lutter contre la formation d'un clou au sein de la circulation extracorporelle (Shinoda et al., 1990 ; Yang et al., 2013). A la connaissance des auteurs, aucune étude visant à déterminer les modifications hémostatiques et TEM après une ou plusieurs séances d'hémodialyse n'a été réalisée chez le

Chien sain ou malade. Cette étude est en cours de réalisation dans notre Unité de recherche (APCSe) et est le sujet d'un Master 2 de « Physiologie appliquée aux conditions extrêmes ».

Une autre perspective serait d'évaluer la pertinence de l'A10 en remplacement du MCF pour caractériser les profils TEM chez le Chien, pour pouvoir définir un profil TEM plus rapidement, notamment dans le cas de l'urgence ou des soins intensifs. Cette étude pourrait reposer sur l'analyse rétrospective de profils exTEM réalisés dans notre Unité.

Enfin, la dernière perspective, sans doute la plus pertinente pour l'auteur de ce manuscrit, serait de créer un algorithme décisionnel thérapeutique sur la base des paramètres TEM chez le Chien dans diverses entités médicales, et ce, à partir des paramètres TEM les plus rapidement obtenus (CT, CFT, A5, A10, ...).

## REFERENCES

- Abelson AL, O'Toole TE, Johnston A, et al., 2013. **Hypoperfusion and acute traumatic coagulopathy in severely traumatized canine patients.** *J Vet Emerg Crit Care* 23, 395-401.
- Adamantos S, Waters S, Boag A, 2015. **Coagulation status in dogs with naturally occurring *Angiostrongylus vasorum* infection.** *J Small Anim Pract* 56, 485-490.
- Adamik KN, Butty E, Howard J, 2015. **In vitro effects of 3% hypertonic saline and 20% mannitol on canine whole blood coagulation and platelet function.** *BMC Vet Res* 11, 242.
- Adamzik M, Langemeier T, Frey UH, et al., 2011. **Comparison of thrombelastometry with simplified acute physiology score II and sequential organ failure assessment scores for the prediction of 30-day survival: a cohort study.** *Shock* 35, 339-342.
- Adin CA, Cowgill LD, 2000. **Treatment and outcome of dogs with leptospirosis: 36 cases (1990-1998).** *J Am Vet Med Assoc* 216, 371-375.
- Allegret V, Dunn M, Bedard C, 2011. **Monitoring unfractionated heparin therapy in dogs by measuring thrombin generation.** *Vet Clin Path* 40, 24-31.
- Anderson FA Jr, Spencer FA, 2003. **Risk factors for venous thromboembolism.** *Circulation* 107, I9-I16.
- Andreasen EB, Tranholm M, Wiinberg B, et al., 2012. **Haemostatic alterations in a group of canine cancer patients are associated with cancer type and disease progression.** *Acta Vet Scand* 54, 3.
- Anderson L, Quasim I, Steven M et al., 2014. **Interoperator and intraoperator variability of whole blood coagulation assays: a comparison of thromboelastography and rotational thromboelastometry.** *J Cardiothorac Vasc Anesth* 28, 1550-1557.
- Armentano RA, Bandt C, Schaer M, et al., 2014. **Thromboelastographic evaluation of hemostatic function in dogs treated for crotalid snake envenomation.** *J Vet Emerg Crit Care* 24, 144-153.
- Bailey CJ, Koenigshof AM, 2014. **The effects of protamine sulfate on clot formation time and clot strength thromboelastography variables for canine blood samples.** *Am J Vet Res* 75, 338-343.
- Bakhtiari K, Meijers JC, de Jonge E, Levi M., 2004. **Prospective validation of the International Society of Thrombosis and Haemostasis scoring system for disseminated intravascular coagulation.** *Crit Care Med* 32, 2416-2421.
- Barthélemy A, Rannou B, Forterre M, et al., 2015. **Differences between coagulation and cytokine profiles in dogs of different ages.** *Vet J* 205, 410-412.

- Bastyr EJ, Kadrofske MM, Vinik AI, 1990. **Platelet activity and phosphoinositide turnover increase with advancing age.** *Am J Med* 88, 601–606.
- Bauer N, Eralp O, Moritz A, 2009. **Establishment of reference intervals for kaolin-activated thromboelastography in dogs including an assessment of the effects of sex and anticoagulant use.** *J Vet Diagn Invest* 21, 641-648.
- Bauer NB, Er E, Moritz A, 2012. **Effect of submaximal aerobic exercise on platelet function, platelet activation, and secondary and tertiary hemostasis in dogs.** *Am J Vet Res* 73, 125-133.
- Becker RC, 1995. **The heparin rebound phenomenon-does it offer insights toward understanding the pathobiology of coronary thrombosis and its treatment?** *J Thromb Thrombolysis* 1, 157-161.
- Bentley AM, Mayhew PD, Culp WT, Otto CM, 2013. **Alterations in the hemostatic profiles of dogs with naturally occurring septic peritonitis.** *J Vet Emerg Crit Care* 23, 14-22.
- Bharti AR, Nally JE, Ricaldi JN, et al., 2003. **Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance.** *Lancet Infect Dis* 3, 757–771.
- Birnbaum N, Barr SC, Center SA, et al., 1998. **Naturally acquired leptospirosis in 36 dogs: serological and clinicopathological features.** *J Small Anim Pract* 39, 231-236.
- Brainard BM, Meredith CP, Callan MB, et al., 2007. **Changes in platelet function, hemostasis, and prostaglandin expression after treatment with nonsteroidal anti-inflammatory drugs with various cyclooxygenase selectivities in dogs.** *Am J Vet Res* 68, 251-257.
- Brainard BM, Koenig A, Babski DM, et al., 2012. **Viscoelastic pharmacodynamics after dalteparin administration to healthy dogs.** *Am J Vet Res* 73, 1577-1582.
- Brainard BM, Goggs R, Mendez-Angulo JL, et al., 2014. **Systematic evaluation of evidence on veterinary viscoelastic testing Part 5: Nonstandard assays.** *J Vet Emerg Crit Care* 24, 57-62.
- Breuhl EL, Moore G, Brooks MB, Scott-Moncrieff JC, 2009. **A prospective study of unfractionated heparin therapy in dogs with primary immune-mediated hemolytic anemia.** *J Am Anim Hosp Assoc* 45, 125-133.
- Brooks AC, Guillaumin J, Cooper ES, Couto G, 2014. **Effects of hematocrit and red blood cell-independent viscosity on canine thromboelastographic tracings.** *Transfusion* 54, 727-734.
- Bruno B, Maurella C, Falco S, et al., 2015a. **Assessment of coagulation utilizing thromboelastometry in dogs undergoing orthopedic surgery.** *J Vet Emerg Crit Care* 25, 358-363.

- Bruno B, Maurella C, Falco S, et al., 2015b. **Thromboelastometric evaluation of hemostasis in dogs infected with *Leishmania infantum***. *J Vet Emerg Crit Care* 25, 502-511.
- Bucknoff MC, Hanel RM, Marks SL, et al., 2014. **Evaluation of thromboelastography for prediction of clinical bleeding in thrombocytopenic dogs after total body irradiation and hematopoietic cell transplantation**. *Am J Vet Res* 75, 425-432.
- Cammerer U, Dietrich W, Rampf T, et al., 2003. **The predictive value of modified computerized thromboelastography and platelet function analysis for postoperative blood loss in routine cardiac surgery**. *Anesth Analg* 96, 51-57.
- Caprini JA, Zuckerman L, Cohen E, et al., 1976. **The identification of accelerated coagulability**. *Thromb Res* 9, 167-180.
- Cavestri R, Radice L, Ferrarini F, et al., 1992. **Influence of erythrocyte aggregability and plasma fibrinogen concentration on CBF with aging**. *Acta Neurol Scand* 85, 292-298.
- Chierakul W, Tientadakul P, Suputtamongkol Y, et al., 2008. **Activation of the coagulation cascade in patients with leptospirosis**. *Clin Infect Dis* 46, 254-260.
- Conversy B, Blais MC, Dunn M, et al., 2013. **Rivaroxaban demonstrates in vitro anticoagulant effects in canine plasma**. *Vet J* 198, 437-443.
- Cohen E, Caprini J, Zuckerman L, et al., 1977. **Evaluation of three methods used to identify accelerated coagulability**. *Thromb Res* 10, 587-604.
- Conner BJ, Hanel RM, Hansen BD, et al., 2012. **Effects of acepromazine maleate on platelet function assessed by use of adenosine diphosphate activated- and arachidonic acid- activated modified thromboelastography in healthy dogs**. *Am J Vet Res* 73, 595-601.
- Conway EM, 2011. **The clot is ticking as the clot thickens**. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 31, 2361-2363.
- Davenport A, Rugman FP, Desmond MJ, Ganta R, 1989. **Is thrombocytopenia seen in patients with leptospirosis immunologically mediated?** *J Clin Pathol* 42, 439-440.
- De Francesco Daher E, Oliveira Neto FH, Ramirez SM, 2002. **Evaluation of hemostasis disorders and anticardiolipin antibody in patients with severe leptospirosis**. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 44, 85-90.
- deLaforcade A, Goggs R, Wiinberg B, 2014. **Systematic evaluation of evidence on veterinary viscoelastic testing part 3: Assay activation and test protocol**. *J Vet Emerg Crit Care* 24, 37-46.
- Dolan G, Neal K, Cooper P, et al., 1994. **Protein C, antithrombin III and plasminogen: effect of age, sex and blood group**. *Brit J Haematol* 86, 798-803.

- Donahue SM, Otto CM, 2005. **Thromboelastography: a tool for measuring hypercoagulability, hypocoagulability, and fibrinolysis.** *J Vet Emerg Crit Care* 15, 9-16.
- Donahue SM, Brooks M, Otto CM, 2011. **Examination of hemostatic parameters to detect hypercoagulability in dogs with severe protein-losing nephropathy.** *J Vet Emerg Crit Care* 21, 346-355.
- Doria C, Mandalà L, Smith JD, et al., 2004. **Thromboelastography used to assess coagulation during treatment with molecular adsorbent recirculating system.** *Clin Transplant* 18, 365-71.
- Durila M, Lukáš P, Astraverkhava M, Vymazal T, et al., 2015. **Evaluation of fibrinogen concentrates and prothrombin complex concentrates on coagulation changes in a hypothermic in vitro model using thromboelastometry and thromboelastography.** *Scand J Clin Lab Invest* 75, 407-414.
- Eralp O, Yilmaz Z, Failing K, et al., 2011. **Effect of experimental endotoxemia on thromboelastography parameters, secondary and tertiary hemostasis in dogs.** *J Vet Intern Med* 25, 524-531.
- Evangelista K, Franco R, Schwab A, Coburn J., 2014. **Leptospira interrogans binds to cadherins.** *PLoS Negl Trop Dis* 8, e2672.
- Evangelista K, Hahn B, Wunder EA Jr, et al., 2014. **Identification of cell-binding adhesins of Leptospira interrogans.** *PLoS Negl Trop Dis* 8, e3215.
- Evans PA, Hawkins K, Lawrence M, et al., 2008. **Rheometry and associated techniques for blood coagulation studies.** *Med Eng Phys* 30, 671-679.
- Falco S, Bruno B, Maurella C, et al., 2012. **In vitro evaluation of canine hemostasis following dilution with hydroxyethyl starch (130/0.4) via thromboelastometry.** *J Vet Emerg Crit Care* 22, 640-645.
- Feher G, Koltai K, Kesmarky G, et al., 2006. **Hemorheological parameters and aging.** *Clin Hemorheol Microcirc* 35, 89-98.
- Fenty RK, Delaforcade AM, Shaw SE, O'Toole TE, 2011. **Identification of hypercoagulability in dogs with primary immune-mediated hemolytic anemia by means of thromboelastography.** *J Am Vet Med Assoc* 238, 463-467.
- Fenyvesi TL M, Träger I, Jörg I, et al., 2005. **Effect of direct thrombin inhibitors, unfractionated heparin, low molecular weight heparins dalteparin and enoxaparin and of the heparinoid danaparoid on the rotation thromboelastometry method (ROTEM®).** *Haemostaseologie* 25(S),138.
- Ferrucci L, Corsi A, Lauretani F, et al., 2005. **The origins of age-related proinflammatory state.** *Blood* 105, 2294-2299.

- Flatland B, Koenigshof AM, Rozanski EA, et al., 2014. **Systematic evaluation of evidence on veterinary viscoelastic testing Part 2: sample acquisition and handling.** *J Vet Emerg Crit Care* 24, 30-36.
- Fletcher DJ, Blackstock KJ, Epstein K, Brainard BM, 2014. **Evaluation of tranexamic acid and  $\epsilon$ -aminocaproic acid concentrations required to inhibit fibrinolysis in plasma of dogs and humans.** *Am J Vet Res* 75, 731-738.
- Fletcher DJ, Rozanski EA, Brainard BM, et al., 2016. **Assessment of the relationships among coagulopathy, hyperfibrinolysis, plasma lactate, and protein C in dogs with spontaneous hemoperitoneum.** *J Vet Emerg Crit Care* 26, 41-51.
- Flint SK, Abrams-Ogg AC, Kruth SA, et al., 2011. **Independent and combined effects of prednisone and acetylsalicylic acid on thromboelastography variables in healthy dogs.** *Am J Vet Res* 72, 1325-1332.
- Fraune CK, Schweighauser A, Francey T, 2013. **Evaluation of the diagnostic value of serologic microagglutination testing and a polymerase chain reaction assay for diagnosis of acute leptospirosis in dogs in a referral center.** *J Am Vet Med Assoc* 15, 1373-1380.
- Garcia-Pereira BL, Scott MA, Koenigshof AM, Brown AJ, 2012. **Effect of venipuncture quality on thromboelastography.** *J Vet Emerg Crit Care* 22, 225-229.
- Gauthier V, Holowaychuk MK, Kerr CL, et al., 2015. **Effect of synthetic colloid administration on coagulation in healthy dogs and dogs with systemic inflammation.** *J Vet Intern Med* 29, 276-285.
- Geisen V, Stengel C, Brem S, et al., 2007. **Canine leptospirosis infections - clinical signs and outcome with different suspected *Leptospira* serogroups (42 cases).** *J Small Anim Pract* 48, 324-328.
- Gleerup G, Winther K, 1995. **The effect of ageing on platelet function and fibrinolytic activity.** *Angiology* 46, 715-718.
- Goldstein RE, Lin RC, Langston CE, et al., 2006. **Influence of infecting serogroup on clinical features of leptospirosis in dogs.** *J Vet Intern Med* 20, 489-494.
- Goeijenbier M, Gasem MH, Meijers JC, et al., 2015. **Markers of endothelial cell activation and immune activation are increased in patients with severe leptospirosis and associated with disease severity.** *J Infect* 71, 437-446.
- Goggs R, Wiinberg B, Kjølgaard-Hansen M, Chan DL, 2012. **Serial assessment of the coagulation status of dogs with immune-mediated haemolytic anaemia using thromboelastography.** *Vet J* 191, 347-353.
- Goggs R, Brainard B, de Laforcade AM, et al., 2014a. **Partnership on Rotational ViscoElastic Test Standardization (PROVETS): evidence-based guidelines on rotational viscoelastic assays in veterinary medicine.** *J Vet Emerg Crit Care* 24, 1-22.

- Goggs R, Chan DL, Benigni L, et al., 2014b. **Comparison of computed tomography pulmonary angiography and point-of-care tests for pulmonary thromboembolism diagnosis in dogs.** *J Small Anim Pract* 55, 190-197.
- Golomb BA, Chan VT, Denenberg JO, et al., 2014. **Risk marker associations with venous thrombotic events: a cross-sectional analysis.** *BMJ Open* 4, 3: e003208.
- Gonzales JL, Hanel RM, Hansen BD, Marks SL, 2011. **Effect of intravenous administration of dextrose on coagulation in healthy dogs.** *Am J Vet Res* 72, 562-569.
- Goodwin LV, Goggs R, Chan DL, Allenspach K, 2011. **Hypercoagulability in dogs with protein-losing enteropathy.** *J Vet Intern Med* 25, 273-277.
- Gratzl E, Kölbl O, Hromatka L, 1964. **The change in the epidemiology and clinical manifestations of canine leptospirosis in Vienna since 1956.** *J Small Anim Pract* 5, 331-349.
- Hamzianpour N, Chan DL, 2016. **Thromboelastographic assessment of the contribution of platelets and clotting proteases to the hypercoagulable state of dogs with immune-mediated hemolytic anemia.** *J Vet Emerg Crit Care* 26, 295-299.
- Hanel RM, Chan DL, Conner B, et al., 2014. **Systematic evaluation of evidence on veterinary viscoelastic testing part 4: Definitions and data reporting.** *J Vet Emerg Crit Care* 24, 47-56.
- Hartert H, 1960. **Thrombelastography: physical and physiological aspects.** In: Copley AL, Stainsby G, eds. *Flow Properties of Blood and Other Biological Systems*. Oxford, UK: Pergamon Press, 186-196.
- Hartert H, Schaefer JA, 1962. **The physical and biological constants of thrombelastography.** *Biorheology* 1, 31-39.
- Hauptman JG, Walshaw R, Olivier NB, 1997. **Evaluation of the sensitivity and specificity of diagnostic criteria for sepsis in dogs.** *Vet Surg* 26, 393-397.
- Hayes G, Mathews K, Doig G, et al., 2010. **The acute patient physiologic and laboratory evaluation (APPLE) score: a severity of illness stratification system for hospitalized dogs.** *J Vet Intern Med* 24, 1034-1047.
- Hemker HC, Al Dieri R, De Smedt E, Beguin S, 2006. **Thrombin generation, a function test of the haemostatic-thrombotic system.** *Thromb Haemost* 96, 553-561.
- Hoareau G, Mellema M, 2015. **Pro-coagulant thromboelastographic features in the bulldog.** *J Small Anim Pract* 56, 103-107.
- Hochleitner G, Sutor K, Levett C, et al., 2015. **Revisiting Hartert's 1962 Calculation of the Physical Constants of Thrombelastography.** *Clin Appl Thromb Hemost*, pii: 1076029615606531.

- Hollowaychuk MK, Hanel RM, Darren Wood R, et al., 2014. **Prospective multicenter evaluation of coagulation abnormalities in dogs following severe acute trauma.** *J Vet Emerg Crit Care* 24, 93-104.
- Inadera H, Egashira K, Takemoto M, et al., 1999. **Increase in circulating levels of monocyte chemoattractant protein-1 with aging.** *J Interferon Cytokine Res* 19, 1179-1182.
- Iselin BM, Willimann PF, Seifert B, et al., 2001. **Isolated reduction of haematocrit does not compromise in vitro blood coagulation.** *Br Journal Anaesth* 87, 246-249.
- Issa N, Guisset O, Mourissoux G, et al., 2015. **Leptospirose et thrombopénie.** *Rev Méd Int* 36, 558-560.
- Jackson GN, Ashpole KJ, Yentis SM, 2009. **The TEG vs the ROTEM thromboelastography/thromboelastometry systems.** *Anaesthesia* 64, 212-215.
- Javorschi S, Richard-Harston S, Labrousche S, et al., 1998. **Influence of age and thrombotic history on hemostatic parameters.** *Thromb Res* 91, 241-248.
- Jessen LR, Wiinberg B, Jensen AL, et al., 2008. **In vitro heparinization of canine whole blood with low molecular weight heparin (dalteparin) significantly and dose-dependently prolongs heparinase-modified tissue factor-activated thromboelastography parameters and prothrombinase-induced clotting time.** *Vet Clin Pathol* 37, 363-372.
- Jørgensen KA, Dyerberg J, Olesen AS, Stoffersen E, 1980. **Acetylsalicylic acid, bleeding time and age.** *Thromb Res* 19, 799-805.
- Kakiuchi H, Kawarai-Shimamura A, Fujii Y, et al., 2014. **Efficacy and safety of tranexamic acid as an emetic in dogs.** *Am J Vet Res* 75, 1099-1103.
- Kawasaki J, Katori N, Kodaka M, et al., 2004. **Electron microscopic evaluations of clot morphology during thromboelastography.** *Anesth Analg* 99, 1440-1444.
- Kelesidis T, 2014. **The cross-talk between spirochetal lipoproteins and immunity.** *Front Immunol* 5, 310.
- Kelley D, Lester C, DeLaforcade A, Webster CR, 2013. **Thromboelastographic evaluation of dogs with congenital portosystemic shunts.** *J Vet Intern Med* 27, 1262-1267.
- Kelley D, Lester C, Shaw S, et al., 2016. **Thromboelastographic Evaluation of Dogs with Acute Liver Disease.** *J Vet Intern Med* 29, 1053-1062.
- Kelmer E, Segev G, Papashvilli V, et al., 2015. **Effects of intravenous administration of tranexamic acid on hematological, hemostatic, and thromboelastographic analytes in healthy adult dogs.** *J Vet Emerg Crit Care* 25, 495-501.
- Kidd L, Mackman N, 2013. **Prothrombotic mechanisms and anticoagulant therapy in dogs with immune-mediated hemolytic anemia.** *J Vet Emerg Crit Care* 23, 3-13.

- Klose TC, Creevy KE, Brainard BM, 2011. **Evaluation of coagulation status in dogs with naturally occurring canine hyperadrenocorticism.** *J Vet Emerg Crit Care* 21, 625-632.
- Ko AI, Goarant C, Picardeau M, 2009. **Leptospira: the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen.** *Nat Rev Microbiol* 7, 736-747.
- Kol A, Borjesson DL, 2010. **Application of thromboelastography/thromboelastometry to veterinary medicine.** *Vet Clin Pathol* 39, 405-416.
- Kol A, Nelson RW, Gosselin RC, Borjesson DL, 2013. **Characterization of thrombelastography over time in dogs with hyperadrenocorticism.** *Vet J* 197, 675-681.
- Kol A, Marks SL, Skorupski KA, et al., 2015. **Serial haemostatic monitoring of dogs with multicentric lymphoma.** *Vet Comp Oncol* 13, 255-266.
- Kohn B, Steinicke K, Arndt G, et al., 2010. **Pulmonary abnormalities in dogs with leptospirosis.** *J Vet Intern Med* 24, 1277-1282.
- Kristensen AT, Wiinberg B, Jessen LR, et al., 2008. **Evaluation of human recombinant tissue factor-activated thromboelastography in 49 dogs with neoplasia.** *J Vet Intern Med* 22, 140-147.
- Kuiper GJ, Kleinegris MC, van Oerle R, et al., 2016. **Validation of a modified thromboelastometry approach to detect changes in fibrinolytic activity.** *Thromb J* 14, 1.
- Laharrague PF, Cambus JP, Fillola G, Corberand JX, 1993. **Plasma fibrinogen and physiological aging.** *Aging* 5, 445-449.
- Lee SH, Kim KA, Park YG, et al., 2000. **Identification and partial characterization of a novel hemolysin from *Leptospira interrogans* serovar lai.** *Gene* 254, 19-28.
- Lennon EM, Hanel RM, Walker JM, Vaden SL, 2013. **Hypercoagulability in dogs with protein-losing nephropathy as assessed by thromboelastography.** *J Vet Intern Med* 27, 462-468.
- Licari LG, Kovacic JP, 2009. **Thrombin physiology and pathophysiology.** *J Vet Emerg Crit Care* 19, 11-22.
- Liebenberg C, Goddard A, Wiinberg B, et al., 2013. **Hemostatic abnormalities in uncomplicated babesiosis (*Babesia rossi*) in dogs.** *J Vet Intern Med* 27, 150-156.
- Lippi G, Arnetoli G, Accardi R, Doni A, 1985. **Hemostatic Balance Index in TIA patients: sex-related changes.** *Angiology* 36, 425-30.
- Lisboa TA, Andrade MV, Rezende-Neto JB, et al., 2015. **Effects of *Tityus serrulatus* scorpion venom on thromboelastogram in rats.** *Toxicon* 94, 45-49.

- Lunsford KV, Mackin AJ, Langston VC, Brooks M, 2009. **Pharmacokinetics of subcutaneous low molecular weight heparin (enoxaparin) in dogs.** *J Am Anim Hosp Assoc* 45, 261-267.
- Lynch AM, deLaforcade AM, Sharp CR, 2014. **Clinical experience of anti-Xa monitoring in critically ill dogs receiving dalteparin.** *J Vet Emerg Crit Care* 24, 421-428.
- Lynch AM, deLaforcade AM, Meola D, et al., 2016a. **Assessment of hemostatic changes in a model of acute hemorrhage in dogs.** *J Vet Emerg Crit Care* 26, 333-43.
- Lynch AM, Respass M, Boll AE, et al., 2016b. **Hospital-acquired anemia in critically ill dogs and cats: a multi-institutional study.** *J Vet Intern Med* 30, 141-146.
- Major A, Schweighauser A, Francey T, 2014. **Increasing incidence of canine leptospirosis in Switzerland.** *Int J Environ Res Public Health* 11, 7242-7260.
- Mari D, Mannucci PM, Coppola R, et al., 1995. **Hypercoagulability in centenarians: the paradox of successful aging.** *Blood* 85, 3144-3149.
- Marín LM, Iazbik MC, Zaldivar-Lopez S, et al., 2012. **Epsilon aminocaproic acid for the prevention of delayed postoperative bleeding in retired racing greyhounds undergoing gonadectomy.** *Vet Surg* 41, 594-603.
- Martinez-Lopez DG, Fahey M, Coburn J, 2010. **Responses of human endothelial cells to pathogenic and non-pathogenic Leptospira species.** *PLoS Negl Trop Dis* 4, e918.
- Massberg S, Grahl L, von Bruehl ML, et al., 2010. **Reciprocal coupling of coagulation and innate immunity via neutrophil serine proteases.** *Nat Med* 16, 887-896.
- Mastrorilli C, Dondi F, Agnoli C, et al., 2007. **Clinicopathologic features and outcome predictors of Leptospira interrogans Australis serogroup infection in dogs: a retrospective study of 20 cases (2001-2004).** *J Vet Intern Med* 21, 3-10.
- Matika RW, Nielsen VG, Steinbrenner EB, et al., 2014. **Hemodialysis patients have plasmatic hypercoagulability and decreased fibrinolytic vulnerability: role of carbon monoxide.** *ASAIO J* 60, 716-721.
- Mayhew PD, Savigny MR, Otto CM, et al., 2013. **Evaluation of coagulation in dogs with partial or complete extrahepatic biliary tract obstruction by means of thromboelastography.** *J Am Vet Med Assoc* 242, 778-785.
- McMichael MA, Smith SA, 2011. **Viscoelastic coagulation testing: technology, applications, and limitations.** *Vet Clin Pathol* 40, 140-153.
- McMichael MA, Smith SA, Galligan A, Swanson KS, 2014a. **In vitro hypercoagulability on whole blood thromboelastometry associated with in vivo reduction of circulating red cell mass in dogs.** *Vet Clin Pathol* 43, 154-163.

- McMichael M, Goggs R, Smith S, et al., 2014b. **Systematic evaluation of evidence on veterinary viscoelastic testing part 1: System comparability.** *J Vet Emerg Crit Care* 24, 23-29.
- McMichael MA, O'Brien M, Smith SA, 2015. **Hypercoagulability in dogs with blastomycosis.** *J Vet Intern Med* 29, 499-504.
- Medeiros Fda R, Spichler A, Athanazio DA, 2010. **Leptospirosis-associated disturbances of blood vessels, lungs and hemostasis.** *Acta Trop* 115, 155-162.
- Mercier E, Mathieu M, Sandersen CF, et al., 2010. **Evaluation of the influence of age on pulmonary arterial pressure by use of right ventricular catheterization, pulsed-wave Doppler echocardiography, and pulsed-wave tissue Doppler imaging in healthy beagles.** *Am J Vet Res* 71, 891-897.
- Mestre M, Clairefond P, Mardiguian J, et al., 1985. **Comparative effects of heparin and PK 10169, a low molecular weight fraction, in a canine model of arterial thrombosis.** *Thromb Res* 38, 389-399.
- Miller RI, Ross SP, Sullivan ND, Perkins NR, 2007. **Clinical and epidemiological features of canine leptospirosis in North Queensland.** *Aust Vet J* 85, 13-19.
- Miragliotta G, Fumarola D, 1983. **In vitro effect of Leptospira icterohaemorrhagiae on human mononuclear leukocytes procoagulant activity: comparison of virulent with nonvirulent strain.** *Can J Comp Med* 47, 70-72.
- Mischke R, Fehr M, Nolte I, 2005. **Efficacy of low molecular weight heparin in a canine model of thromboplastin-induced acute disseminated intravascular coagulation.** *Res Vet Sci* 79, 69-76.
- Moldal ER, Kristensen AT, Peeters ME, et al., 2012. **Hemostatic response to surgical neutering via ovariectomy and ovariohysterectomy in dogs.** *Am J Vet Res* 73, 1469-1476.
- Morris BR, deLaforcade A1, Lee J, et al., 2016. **Effects of in vitro hemodilution with crystalloids, colloids, and plasma on canine whole blood coagulation as determined by kaolin-activated thromboelastography.** *J Vet Emerg Crit Care* 26, 58-63.
- Morris TA, Marsh JJ, Konopka R, et al., 2000. **Anti-thrombotic efficacies of enoxaparin, dalteparin, and unfractionated heparin in venous thrombo-embolism.** *Thromb Res* 100, 185-194.
- Nagel SS, Schoeman JP, Thompson PN, et al., 2014. **Hemostatic analysis of dogs naturally envenomed by the African puffadder (Bitis arietans) and snouted cobra (Naja annulifera).** *J Vet Emerg Crit Care* 24, 662-671.
- Nates JL, Aravindan N, Hirsch-Ginsberg C, et al., 2007. **Critically ill cancer patients are not consistently hypercoagulable after craniotomy.** *Neurocrit Care* 7, 211-216.

- Ng KF, 2004. **Changes in thromboelastograph variables associating with aging.** *Anesth Analg* 99, 449-454.
- Nicodemo AC, Del Negro G, Amato Neto V, 1990. **Thrombocytopenia and leptospirosis.** *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 32, 252-259.
- Nicodemo AC, Duarte MI, Alves VA, et al., 1997. **Lung lesions in human leptospirosis: microscopic, immunohistochemical, and ultrastructural features related to thrombocytopenia.** *Am J Trop Med Hyg* 56, 181-187.
- Nielsen VG, Cohen BM, Cohen E, 2005. **Effects of coagulation factor deficiency on plasma coagulation kinetics determined via thromboelastography: critical roles of fibrinogen and factor II, VII, X and XII.** *Acta Anaesth Scand* 49, 222-231.
- O'Kell AL, Grant DC, Panciera DL, et al., 2012. **Effects of oral prednisone administration with or without ultralow-dose acetylsalicylic acid on coagulation parameters in healthy dogs.** *Am J Vet Res* 73, 1569-1576.
- O'Marra SK, Shaw SP, deLaforcade AM, 2012. **Investigating hypercoagulability during treatment for immune-mediated thrombocytopenia: a pilot study.** *J Vet Emerg Crit Care* 22, 126-130.
- Othman M, Powell S, Chirinian Y, et al., 2009. **Thromboelastography reflects global hemostatic variation among severe haemophilia A dogs at rest and following acute exercise.** *Haemophilia* 15, 1126-1134.
- Otto CM, Rieser TM, Brooks MB, Russell MW, 2000. **Evidence of hypercoagulability in dogs with parvoviral enteritis.** *J Am Vet Med Assoc* 217, 1500-1504.
- Panek CM, Nakamura RK, Bianco D, 2015. **Use of enoxaparin in dogs with primary immune-mediated hemolytic anemia: 21 cases.** *J Vet Emerg Crit Care* 25, 273-277.
- Park FM, Blois SL, Abrams-Ogg AC, et al., 2013. **Hypercoagulability and ACTH-dependent hyperadrenocorticism in dogs.** *J Vet Intern Med* 27, 1136-1142.
- Pazzi P, Goddard A, Kristensen AT, Dvir E, 2014. **Evaluation of hemostatic abnormalities in canine spirocercosis and its association with systemic inflammation.** *J Vet Intern Med* 28, 21-29.
- Peyrou V, Lormeau JC, Hérault JP, et al., 1999. **Contribution of erythrocytes to thrombin generation in whole blood.** *Thromb Haemost* 81, 400-406.
- Pittman JR, Koenig A, Brainard BM, 2010. **The effect of unfractionated heparin on thrombelastographic analysis in healthy dogs.** *J Vet Emerg Crit Care* 20, 216-223.
- Raby C, 1975. **Control of heparin therapy.** *International Heparin Symposium London*, July 18-19.
- Reilly IA, FitzGerald GA, 1986. **Eicosenoid biosynthesis and platelet function with advancing age.** *Thromb Res* 41, 545-554.

- Reis EA, Hagan JE, Ribeiro GS, et al., 2013. **Cytokine response signatures in disease progression and development of severe clinical outcomes for leptospirosis.** *PLoS Negl Trop Dis* 7, e2457.
- Rentko VT, Clark N, Ross LA, Schelling SH, 1992. **Canine leptospirosis. A retrospective study of 17 cases.** *J Vet Intern Med* 6, 235-244.
- Rioja E, Dziki BT, Fosgate G, et al., 2012. **Effects of a constant rate infusion of magnesium sulphate in healthy dogs anaesthetized with isoflurane and undergoing ovariohysterectomy.** *Vet Anaesth Analg* 39, 599-610.
- Roeloffzen WW, Kluin-Nelemans HC, Mulder AB, et al., 2010. **In normal controls, both age and gender affect coagulability as measured by thromboelastography.** *Anesth Analg* 110, 987-994.
- Rose LJ, Dunn ME, Allegret V, Bédard C, 2011. **Effect of prednisone administration on coagulation variables in healthy Beagle dogs.** *Vet Clin Pathol* 40, 426-434.
- Rose L, Dunn ME, Bédard C, 2013. **Effect of canine hyperadrenocorticism on coagulation parameters.** *J Vet Intern Med* 27, 207-211.
- Rugeri L, Delecroix E, Scherrer F, et al., 2006. **Thromboélastométrie rotative : réhabilitation de l'ancienne thromboélastographie.** *IBS* 21, 380-387.
- Saavedra PV, Stingle N, Iazbik C, et al., 2011. **Thromboelastographic changes after gonadectomy in retired racing greyhounds.** *Vet Rec* 169, 99.
- Savry C, Quinio P, Lefèvre F, Schmitt F, 2005. **Maniabilité et intérêts potentiels du thromboélastomètre modifié (ROTEM) dans le monitoring extemporané de l'hémostase en réanimation.** *Ann Fr Anesth Reanim* 24, 607-616.
- Scarpelini S, Rhind SG, Nascimento B, et al., 2009. **Normal range values for thromboelastography in healthy adult volunteers.** *Braz J Med Biol Res* 42, 1210-1217.
- Schuller S, Callanan JJ, Worrall S, et al., 2015a. **Immunohistochemical detection of IgM and IgG in lung tissue of dogs with leptospiral pulmonary haemorrhage syndrome (LPHS).** *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 40, 47-53.
- Schuller S, Francey T, Hartmann K, et al., 2015b. **European consensus statement on leptospirosis in dogs and cats.** *J Small Anim Pract* 56, 159-179.
- Scott KC, Hansen BD, DeFrancesco TC, 2009. **Coagulation effects of low molecular weight heparin compared with heparin in dogs considered to be at risk for clinically significant venous thrombosis.** *J Vet Emerg Crit Care* 19, 74-80.
- Seidler S, Zimmermann HW, Bartneck M, et al., 2010. **Age-dependent alterations of monocyte subsets and monocyte-related chemokine pathways in healthy adults.** *BMC Immunol* 11, 30.

- Shibata J, Hasegawa J, Siemens HJ, et al., 2003. **Hemostasis and coagulation at a hematocrit level of 0.85: functional consequences of erythrocytosis.** *Blood* 101, 4416-4422.
- Shinoda T, Arakura H, Katakura M, et al., 1990. **Usefulness of thrombelastography for dosage monitoring of low molecular weight heparin and unfractionated heparin during hemodialysis.** *Artif Organs* 14, 413-415.
- Sinnott VB, Otto CM, 2009. **Use of thromboelastography in dogs with immune-mediated hemolytic anemia: 39 cases (2000-2008).** *J Vet Emerg Crit Care* 19, 484-488.
- Sivro A, Lajoie J, Kimani J, et al., 2013. **Age and menopause affect the expression of specific cytokines/chemokines in plasma and cervical lavage samples from female sex workers in Nairobi, Kenya.** *Immun Ageing* 10, 42.
- Smith SA, McMichael M, Galligan A, et al., 2010. **Clot formation in canine whole blood as measured by rotational thromboelastometry is influenced by sample handling and coagulation activator.** *Blood Coagul Fibrinolysis* 21, 692-702.
- Smith SA, McMichael MA, Gilor S, et al., 2012. **Correlation of hematocrit, platelet concentration, and plasma coagulation factors with results of thromboelastometry in canine whole blood samples.** *Am J Vet Res* 73, 789-798.
- Solberg HE, 1987. **Approved recommendation on the theory of reference values: Part 5. Statistical treatment of reference values. Determination of reference limits.** *J Clin Chem Clin Biochem* 25:645-656.
- Solomon C, Schöchl H, Ranucci M, Schlimp CJ, 2015a. **Can the viscoelastic parameter  $\alpha$ -angle distinguish fibrinogen from platelet deficiency and guide fibrinogen supplementation?** *Anesth Analg* 121, 289-301.
- Solomon C, Ranucci M, Hochleitner G, et al., 2015b. **Assessing the Methodology for Calculating Platelet Contribution to Clot Strength (Platelet Component) in Thromboelastometry and Thrombelastography.** *Anesth Analg* 121, 868-878.
- Somers C, Al-Kindi S, Montague S, 2003. **Erythroid hypoplasia associated with leptospirosis.** *J Infect* 47, 85-86.
- Song J, Drobatz KJ, Silverstein DC, 2016. **Retrospective evaluation of shortened prothrombin time or activated partial thromboplastin time for the diagnosis of hypercoagulability in dogs: 25 cases (2006-2011).** *J Vet Emerg Crit Care* 26, 398-405.
- Spiess BD, Tuman KJ, McCarthy RJ, et al., 1987. **Thromboelastography as an indicator of postcardiopulmonary bypass coagulopathies.** *J Clin Monit* 3, 25-30.
- Strasser A, Simunek M, Seiser M, Hofecker G, 1997. **Age-dependent changes in cardiovascular and metabolic responses to exercise in beagle dogs.** *Zentralbl Veterinärmed A* 44, 449-460.

- Subramanian A, Albert V, Saxena R, et al., 2014. **Establishing a normal reference range for thromboelastography in North Indian healthy volunteers.** *Indian J Pathol Microbiol* 57, 43-50.
- Taggart R, Austin B, Hans E, Hogan D, 2012. **In vitro evaluation of the effect of hypothermia on coagulation in dogs via thromboelastography.** *J Vet Emerg Crit Care* 22, 219-224.
- Tangeman LE, Littman MP, 2013. **Clinicopathologic and atypical features of naturally occurring leptospirosis in dogs: 51 cases (2000-2010).** *J Am Vet Med Assoc* 243, 1316-1322.
- Taylor FB Jr, Toh CH, Hoots WK, et al., 2001. **Towards definition, clinical and laboratory criteria, and a scoring system for disseminated intravascular coagulation.** *Thromb Haemost* 86, 1327-1330.
- Thawley VJ, Sánchez MD, Drobatz KJ, King LG, 2016. **Retrospective comparison of thromboelastography results to postmortem evidence of thrombosis in critically ill dogs: 39 cases (2005-2010).** *J Vet Emerg Crit Care* 26, 428-436.
- Tonkin LR, Parnell NK, Hogan DF, 2013. **In vitro effects of lipid emulsion on platelet function and thromboelastography in canine blood samples.** *Am J Vet Res* 74, 567-571.
- Turgut M, Sünbül M, Bayirli D, et al., 2002. **Thrombocytopenia complicating the clinical course of leptospiral infection.** *J Int Med Res* 30, 535-540.
- Urban R, Guillermo Couto C, Iazbik MC, 2013. **Evaluation of hemostatic activity of canine frozen plasma for transfusion by thromboelastography.** *J Vet Intern Med* 27, 964-969.
- Vargo CL, Taylor SM, Carr A, Jackson ML, 2009. **The effect of a low molecular weight heparin on coagulation parameters in healthy cats.** *Can J Vet Res* 73, 132-136.
- Velagic V, Samardzic J, Baricevic Z, et al., 2014. **Management of heparin-induced thrombocytopenia with fondaparinux in a patient with left ventricular assist device.** *Int J Organ Transplant Med* 5, 83-86.
- Vilar P, Couto CG, Westendorf N, et al., 2008. **Thromboelastographic tracings in retired racing greyhounds and in non-greyhound dogs.** *J Vet Int Med* 22, 374-379.
- Vilar Saavedra P, Lara García A, Zaldívar López S, Couto G, 2011. **Hemostatic abnormalities in dogs with carcinoma: a thromboelastographic characterization of hypercoagulability.** *Vet J* 190, e78-83.
- Wagenaar JF, Goris MG, Sakundarno MS, et al., 2007. **What role do coagulation disorders play in the pathogenesis of leptospirosis?** *Trop Med Int Health* 12, 111-122.

- Wagenaar JF, Goris MG, Partiningrum DL, et al., 2010. **Coagulation disorders in patients with severe leptospirosis are associated with severe bleeding and mortality.** *Trop Med Int Health* 15, 152-159.
- Walker JM, Hanel RM, Hansen BD, Motsinger-Reif AA, 2012. **Comparison of venous sampling methods for thromboelastography in clinically normal dogs.** *Am J Vet Res* 73, 1864-1870.
- Wand S, Schneider S, Meybohm P, et al., 2015. **Assessment of hemostatic changes after initiation of continuous venovenous hemodialysis.** *Clin Lab* 61, 379-387.
- Wang H, Wu Y, Ojcius DM, et al., 2012. **Leptospiral hemolysins induce proinflammatory cytokines through Toll-like receptor 2-and 4-mediated JNK and NF- $\kappa$ B signaling pathways.** *PLoS One* 7, e42266.
- Wang W, Gao X, Guo M, et al., 2014. **Leptospira interrogans induces uterine inflammatory responses and abnormal expression of extracellular matrix proteins in dogs.** *Microb Pathog* 75, 1-6.
- Weil A, 1886. **Ueber einer eigenhuemliche, mit Milztumor, icterus und nephritis einhergehende, akute Infektionskrankheit.** *Deutsch Arch Klin Med* 39, 209.
- White CR, Langston C, Hohenhaus AE, et al., 2016. **Evaluation of the relationship between clinical variables and thromboelastographic findings in dogs with protein-losing nephropathy.** *J Vet Emerg Crit Care* 26, 74-79.
- Whiting D, DiNardo JA, 2014. **TEG and ROTEM: technology and clinical applications.** *Am J Hematol* 89, 228-232.
- Whiting P, Al M, Westwood M, et al., 2015. **Viscoelastic point-of-care testing to assist with the diagnosis, management and monitoring of haemostasis: a systematic review and cost-effectiveness analysis.** *Health Technol Assess* 19, 58.
- Wiinberg B, Jensen AL, Johansson PI, et al., 2008. **Thromboelastographic evaluation of hemostatic function in dogs with disseminated intravascular coagulation.** *J Vet Intern Med* 22, 357-365.
- Wiinberg B, Jensen AL, Johansson PI, et al., 2010. **Development of a model based scoring system for diagnosis of canine disseminated intravascular coagulation with independent assessment of sensitivity and specificity.** *Vet J* 185, 292-298.
- Wolberg AS, Aleman MM, Leiderman K, Machlus KR, 2012. **Procoagulant activity in hemostasis and thrombosis: Virchow's triad revisited.** *Anesth Analg* 114, 275-285.
- Wurlod VA, Howard J, Francey T, et al., 2015. **Comparison of the in vitro effects of saline, hypertonic hydroxyethyl starch, hypertonic saline, and two forms of hydroxyethyl starch on whole blood coagulation and platelet function in dogs.** *J Vet Emerg Crit Care* 25, 474-487.

- Yamamoto K, Takeshita K, Kojima T, et al., 2005. **Aging and plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) regulation: implication in the pathogenesis of thrombotic disorders in the elderly.** *Cardiovasc Res* 66, 276-285.
- Yang HL, Jiang XC, Zhang XY, et al., 2006. **Thrombocytopenia in the experimental leptospirosis of guinea pig is not related to disseminated intravascular coagulation.** *BMC Infect Dis* 6, 19.
- Yang ST, Wu H, Gao XY, et al., 2013. **Evaluation of optimal dosage of heparin in hemodialysis patients by thromboelastograph.** *Beijing Da Xue Xue Bao* 45, 625-629.
- Zanuzzo FS, Teixeira-Neto FJ, Thomazini CM, et al, 2015. **Effects of dipyron, meloxicam, or the combination on hemostasis in conscious dogs.** *J Vet Emerg Crit Care* 25, 512-520.
- Zhang Y, Lou XL, Yang HL, et al., 2012. **Establishment of a leptospirosis model in guinea pigs using an epicutaneous inoculations route.** *BMC Infect Dis* 12, 20.
- Zois NE, Moesgaard SG, Kjelgaard-Hansen M, et al., 2012. **Circulating cytokine concentrations in dogs with different degrees of myxomatous mitral valve disease.** *Vet J* 1992, 106-111.
- Zwaal RF, Comfurius P, Bevers EM, 1993. **Mechanism and function of changes in membrane-phospholipid asymmetry in platelets and erythrocytes.** *Biochem Soc Trans* 21, 248-253.

## ***TRAVAUX DE THESE***

Les études de cette thèse ont été valorisées par trois publications dans des journaux internationaux à comité de lecture (ces publications étant présentes à la fin de ce manuscrit) et à quatre courtes communications (trois présentations orales et un poster) en congrès internationaux dont certaines ont été récompensées. Voici le recensement de ces travaux :

### ➤ PUBLICATIONS DANS DES JOURNAUX INTERNATIONAUX A COMITE DE LECTURE

- Barthélemy A, Magnin M, Pouzot-Nevoret C, Bonnet-Garin JM, Hugonnard M, Goy-Thollot I, 2016. **Bleeding, hemostatic, and thromboelastometric disorders in leptospirosis: a prospective study in 35 dogs.** *J Vet Intern Med* 2016, doi: 10.1111/jvim.14626.
- Pouzot-Nevoret C, Barthélemy A, Cluzel M, Verwaerde P, Bonnet-Garin JM, Goy-Thollot I, 2016. **Enoxaparin has no significant anticoagulation activity in healthy Beagles at a dose of 0.8 mg/kg four times daily.** *Vet J* 210, 98-100.
- Barthélemy A, Rannou B, Forterre M, Verwaerde P, Pouzot-Nevoret C, Bonnet-Garin JM, Goy-Thollot I, 2015. **Differences between coagulation and cytokine profiles in dogs of different ages.** *Vet J* 205, 410-412.

### ➤ COURTES COMMUNICATIONS EN CONGRES INTERNATIONAUX

- Barthélemy A, Magnin M, Pouzot-Nevoret C, Bonnet-Garin JM, Hugonnard M, Goy-Thollot I. **Bleeding, hemostatic, and thromboelastometric disorders in leptospirosis: a prospective study in 35 dogs.** Quinzième congrès annuel de l'EVECC, Ljubljana, Slovénie, 03 au 05 juin 2016 [Présentation orale]. *Récompense de la meilleure présentation orale européenne.*
- Barthélemy A, Rannou B, Forterre M, Verwaerde P, Pouzot-Névoret C, Bonnet-Garin JM, Goy-Thollot I. **Influence of aging on coagulation and inflammatory response in dogs: a thromboelastometric approach.** Treizième congrès annuel de l'EVECCS, Prague, République Tchèque, 12 au 15 juin 2014 [Présentation orale]. *Récompense de la meilleure présentation orale européenne.*

- Barthélemy A, Verwaerde P, Rannou B, Forterre M, Pouzot-Nevoret C, Bonnet-Garin JM, Goy-Thollot I. **Specificity and sensitivity of rotational thromboelastometry (ROTEM®) parameters and indices to identify hypercoagulable or hypocoagulable profiles in dogs.** Treizième congrès annuel de l'EVECCS, Prague, République Tchèque, 12 au 15 juin 2014 [Présentation orale].
- Barthélemy A, Rannou B, Forterre M, Verwaerde P, Pouzot-Nevoret C, Bonnet-Garin JM, Goy-Thollot I. **Establishment of reference intervals for extrinsic rotational thromboelastometry (exTEM®) parameters in normal dogs: assessment of sex and blood components influences.** Treizième congrès annuel de l'EVECCS, Prague, République Tchèque, 12 au 15 juin 2014 [Poster].

## Standard Article

J Vet Intern Med 2016

## Hemorrhagic, Hemostatic, and Thromboelastometric Disorders in 35 Dogs with a Clinical Diagnosis of Leptospirosis: A Prospective Study

A. Barthélemy, M. Magnin, C. Pouzot-Nevoret, J.-M. Bonnet-Garin, M. Hugonnard, and I. Goy-Thollot

**Background:** Leptospirosis in dogs is occasionally associated with a hemorrhagic syndrome, the pathophysiology of which is not fully understood.

**Hypothesis/Objectives:** To characterize hematologic, hemostatic, and thromboelastometric abnormalities in dogs with leptospirosis and to study their association with hemorrhagic diatheses and outcomes.

**Animals:** Thirty-five client-owned dogs.

**Methods:** A prospective observational single cohort study was conducted. Results from the CBC, coagulation tests (prothrombin, activated partial thromboplastin and thrombin times, fibrinogen, fibrin(ogen) degradation products, and D-dimer concentrations), rotational thromboelastometry (TEM), signalment, hemorrhagic diatheses, occurrence of disseminated intravascular coagulation (DIC) at admission, and survival to discharge were recorded.

**Results:** The most common hematologic and hemostatic abnormalities were anemia (30/35), thrombocytopenia (21/35), and hyperfibrinogenemia (15/35). Eight dogs were diagnosed with DIC. A normal TEM profile was found in 14 dogs, a hypercoagulable profile in 14 dogs, and a hypocoagulable profile in 7 dogs. The 8 dogs with hemorrhagic diatheses at admission had significantly decreased platelet counts ( $P = .037$ ) and increased D-dimer concentrations ( $P = .015$ ) compared with other dogs. Dogs with a hypocoagulable profile exhibited more hemorrhagic diatheses compared with the dogs that had normal and hypercoagulable profiles ( $P = .049$ ). The mortality rate was lower in dogs with a hypercoagulable profile than in those with a hypocoagulable profile (21% vs 57%;  $P = .043$ ). Disseminated intravascular coagulation was not a significant prognostic factor.

**Conclusions and Clinical Importance:** Thromboelastometric parameters were altered in dogs with both hypercoagulable and hypocoagulable profiles. A hypocoagulable profile was significantly correlated with hemorrhagic diathesis and higher mortality rate.

**Key words:** Bleeding; Canine; Coagulation; DIC; Leptospirosis; Thrombocytopenia.

Leptospirosis is a reemerging widespread zoonosis caused by pathogenic members of the genus *Leptospira*.<sup>1</sup> The clinical manifestations of leptospirosis range from a mild illness to an acute, life-threatening multisystemic disorder.<sup>1</sup> Leptospirosis is commonly associated with acute kidney injury, liver dysfunction, pulmonary involvement, and, less commonly, a hemorrhagic syndrome.<sup>1,2</sup> In previous retrospective studies of dogs, this hemorrhagic syndrome was characterized by the occurrence of hematuria (with an incidence of

From the Intensive Care Unit (SIAMU), VetAgro Sup campus vétérinaire de Lyon, Université de Lyon, (Barthélemy, Magnin, Pouzot-Nevoret, Goy-Thollot); Univ Lyon, VetAgro Sup, APCSe, (Barthélemy, Magnin, Pouzot-Nevoret, Bonnet-Garin, Goy-Thollot); Clinic for Small Animal Internal Medicine, USC 1233 Emerging Pathogens and Wild Rodents, VetAgro Sup Campus Vétérinaire de Lyon, Université de Lyon, Marcy l'Etoile, France (Hugonnard).

This work was performed in the Intensive Care Unit (SIAMU) of VetAgro Sup campus vétérinaire de Lyon, Marcy l'Etoile, France.

Corresponding author: Anthony Barthélemy, Intensive Care Unit (SIAMU), VetAgro Sup Campus Vétérinaire de Lyon, 1 avenue Bourgelat, Marcy l'Etoile, France; e-mail: anthony.barthelemy@vet-agro-sup.fr.

Submitted March 19, 2016; Revised October 11, 2016; Accepted November 2, 2016.

Copyright © 2016 The Authors. Journal of Veterinary Internal Medicine published by Wiley Periodicals, Inc. on behalf of the American College of Veterinary Internal Medicine.

This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited and is not used for commercial purposes.

DOI: 10.1111/jvim.14626

## Abbreviations:

A10	amplitude 10 minutes after CT
aPTT	activated partial thromboplastin time
CFT	clot formation time
CT	clotting time
DIC	disseminated intravascular coagulation
exTEM	extrinsic thromboelastometry
FDPs	fibrinogen and fibrin degradation products
fibTEM	fibrinogen function thromboelastometry
G	shear elastic modulus strength
Li45	lysis index 45 minutes after CT
MAT	microagglutination test
MCF	maximum clot firmness
ML	maximum lysis
NSAIDs	nonsteroidal anti-inflammatory drugs
PCR	polymerase chain reaction
PT	prothrombin time
TEM	thromboelastometry
TPI	thrombodynamic potential index
TT	thrombin time

6–31%),<sup>3–7</sup> melena (3–9%),<sup>4,6,8</sup> petechial hemorrhages (11.5–12.5%),<sup>6,9</sup> hemorrhagic nasal discharge (19%),<sup>6</sup> hematochezia (3%),<sup>4</sup> and spontaneous hemorrhage (2.5%).<sup>10</sup>

Although the hemorrhagic potential of leptospirosis was observed as early as 1886,<sup>11</sup> the causes and mechanisms of hemorrhage have not been clearly elucidated. First, leptospirosis is assumed to cause systemic vasculitis, which could be an important mechanism of tissue damage and hemorrhagic tendencies.<sup>12</sup> Inflammation of the vascular endothelium may be a consequence of

direct invasion by infectious agents<sup>12-14</sup> or of immune mechanisms.<sup>15-17</sup> Second, thrombocytopenia is a well-documented feature of leptospirosis (14–58% in naturally occurring leptospirosis in dogs).<sup>4-6,8,18,19</sup> The underlying mechanisms of thrombocytopenia are not fully understood.<sup>16</sup> Thrombocytopenia may be the result of decreased thrombopoiesis<sup>20,21</sup> or increased platelet consumption related to immune or nonimmune causes,<sup>16,18,22,23</sup> Kupffer cell phagocytosis,<sup>24</sup> or a combination of these causes.<sup>16</sup> Third, leptospirosis can be associated with disseminated intravascular coagulation (DIC).<sup>1,2,6,16,25,26</sup> In 2 previous retrospective studies partially focused on coagulation disorders in naturally occurring leptospirosis in dogs, DIC was diagnosed in 7 of 16<sup>6</sup> and 38 of 209 dogs.<sup>2</sup> Disseminated intravascular coagulation was not associated with a poor outcome in the first study<sup>6</sup> but was associated with a negative outcome (death or euthanasia) in the second study.<sup>2</sup> Multivariate analysis conducted in 2 prospective studies of humans<sup>25,26</sup> did not identify DIC as an independent factor for clinical hemorrhage, and there was no significant association between DIC scores and hemorrhagic diathesis. In these 2 studies, DIC was not associated with outcome.<sup>25,26</sup>

Rotational thromboelastometry (TEM) can be used to assess the viscoelastic properties of clot formation in whole blood under low shear conditions, which provides information on global hemostatic function from the beginning of clot formation through fibrinolysis.<sup>27</sup> The shape of the TEM profile defines a patient's hemostatic condition as normal, hypercoagulable, or hypocoagulable.<sup>27,28</sup> To our knowledge, no study has been performed to assess the thromboelastometric findings in leptospirosis in humans or in dogs.

The aim of our study was to describe the clinical hemorrhagic signs and the hematologic, hemostatic, and thromboelastometric abnormalities observed in dogs with naturally occurring leptospirosis at a referral center in France by evaluation of traditional and global coagulation tests including TEM.

## Materials and Methods

Dogs presented to the intensive care unit (SIAMU) of VetAgro Sup campus vétérinaire de Lyon, France, between January 2013 and June 2015 with a clinical diagnosis of leptospirosis were eligible for inclusion in this prospective, observational, single cohort study. Owner consent was obtained before enrollment in the study. Institutional ethical approval was obtained before the start of the study.

### Inclusion and Exclusion Criteria

Dogs were suspected to have leptospirosis if they had clinical signs consistent with the disease (acute kidney injury, glycosuria without hyperglycemia, acute hepatitis, hemorrhagic syndrome, and hemorrhagic gastroenteritis) and if other causes were ruled out or appeared unlikely. Dogs were diagnosed with leptospirosis if they fulfilled at least 1 of the following 3 criteria: single microagglutination test (MAT) titer  $\geq 1 : 800$  for nonvaccine serovars or  $\geq 1 : 1600$  for vaccine serovars (from the serogroups icterohaemorrhagiae and canicola),<sup>29,30</sup> a 4-fold increase in convalescent titers;

or a positive urine or blood polymerase chain reaction (PCR) test. These criteria were applied regardless of vaccination status. The MAT assays were performed at the Laboratoire des Leptospire.<sup>a</sup> Twenty-four serovars representing the following 13 serogroups were tested icterohaemorrhagiae, australis, autumnalis, ballum, bataviae, canicola, grippityphosa, hebdomadis, panama, pomona, pyrogenes, sejroe, and tarassovi.

Dogs were excluded from the study if blood parameters could not be assessed at the time of admission or if anticoagulants (unfractionated or low-molecular-weight heparin or antiplatelet medications [aspirin or clopidogrel]) were given by the primary veterinarian during the month preceding admission.

### Clinical Information

Clinical information collected for each case included signalment, primary or referred consultation, vaccination status for leptospirosis, previous treatments (anticoagulants, antibiotics, corticosteroids, and nonsteroidal anti-inflammatory drugs [NSAIDs]), hemorrhagic diatheses, duration of clinical signs, duration of hospitalization, and outcomes (survival, natural death, or euthanasia). Clinical signs used to define hemorrhagic diatheses were hematochezia, melena, hematemesis, macroscopic hematuria, hemorrhagic nasal discharge, hemoptysis, skin or mucosal hematomas or hemorrhages, and petechial hemorrhages. The same clinician (AB) performed all physical examinations of each suspected dog at admission.

### Blood and Urine Sample Collection

At admission, in each case of suspected leptospirosis, the dog underwent venipuncture of the lateral saphenous vein with a 21-gauge needle connected to a syringe to collect 10 mL of venous whole blood. Blood samples were divided into the following tubes: citrate tube for coagulation profiling and TEM, ethylenediaminetetraacetic acid tube for CBC and blood PCR assays, serum tube for MAT, and lithium heparin tube for biochemical profiles. Citrated whole blood samples were collected in 3.2% buffered sodium citrate in a 1 : 9 ratio of citrate to blood (final concentration 10.8 mM citrate). Urine was collected by ultrasound-guided cystocentesis and placed in 2 glass tubes: 1 for the urinalysis and 1 for the urine PCR assay.

### Analyses

Blood analyses included CBC,<sup>b</sup> biochemical profile,<sup>c</sup> coagulation profile,<sup>d,e</sup> and TEM.<sup>f</sup> The CBC and coagulation profiles were performed according to the manufacturers' recommendations. If anemia was present, a microscopic examination of the blood smear was performed by a trained technician to manually determine the reticulocyte count to discriminate between regenerative (reticulocytes  $> 100 \times 10^9/L$ ), hyporegenerative (reticulocytes between 40 and  $100 \times 10^9/L$ ), and nonregenerative (reticulocytes  $< 40 \times 10^9/L$ ) anemia. The coagulation profile included prothrombin time (PT), activated partial thromboplastin time (aPTT), thrombin time (TT), fibrinogen and fibrin(ogen) degradation products (FDPs), and D-dimer concentrations.

Rotational TEM was performed exactly 30 minutes after blood sample collection. Two technicians performed all of the analyses according to the manufacturer's instructions. Prewarmed (37°C) citrated whole blood samples (300  $\mu L$  each) were added to clotting reagents<sup>g</sup> with the supplied electronic pipette. Two profiles were conducted as follows: extrinsic TEM (exTEM)<sup>h</sup> to evaluate the extrinsic pathway (with tissue factor activation) and fibrinogen function TEM (fibTEM)<sup>i</sup> to assess fibrinogen function (with tissue factor activation and platelet inactivation with cytochalasin D).

These 2 profiles were run a total of 60 minutes. The data obtained from the manufacturer's modeling software included clotting time (CT), clot formation time (CFT), amplitude 10 minutes after CT (A10), maximum clot firmness (MCF),  $\alpha$ -angle ( $\alpha$ ), lysis index 45 minutes after CT (Li45), and maximum lysis (ML). The reference ranges for these TEM parameters were previously established at our institution in 53 healthy dogs by the same protocol as that described above.<sup>3</sup> Furthermore, 2 global coagulation indices based on the exTEM assay were calculated: the shear elastic modulus strength ( $G$ ), which is a measure of clot firmness expressed in metric units calculated from MCF as follows:  $G = (5,000 \times \text{MCF}) / (100 - \text{MCF})$ , and the thrombodynamic potential index (TPI), which was calculated from maximum clot elasticity (MCE);  $\text{MCE} = (100 \times \text{MCF}) / (100 - \text{MCF})$  using the following equation:  $\text{TPI} = \text{MCE} / \text{CFT}$ . Reference ranges for  $G$  and TPI were defined at our institution as 4,025–11,129 dynes/cm<sup>2</sup>, and 0.38–2.81, respectively.<sup>3</sup>

### Definitions of Coagulation Profiles

Dogs were categorized as DIC-positive if at least 3 of the following criteria were met at the time of admission: decreased platelet count ( $<200 \times 10^9/\text{L}$ ), prolonged PT ( $>10$  s), prolonged aPTT ( $>20$  s), prolonged TT ( $>25$  s), reduction of fibrinogen concentration ( $<1.5$  g/L), increased FDP concentration ( $>20$   $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), or increased D-dimer concentration ( $>0.8$   $\mu\text{g}/\text{mL}$ ).

A hypercoagulable profile based on the exTEM assay was defined as  $G > 11,129$  dynes/cm<sup>2</sup> and  $\text{TPI} > 2.81$ , and a hypocoagulable profile was defined as  $G < 4,025$  dynes/cm<sup>2</sup> and  $\text{TPI} < 0.38$ .

Finally, an APPLEfast scoring system was calculated in each dog to stratify illness severity by mortality risk as previously described.<sup>31</sup>

### Statistical Analysis

All data are presented as the median (range). Normality was assessed by the d'Agostino and Pearson omnibus test. Comparisons between survivors and nonsurvivors, between dogs with and without DIC, and between dogs with and without hemorrhagic diatheses, were performed by Student's *t*-test for normally distributed data and the Mann-Whitney *U*-test for non-normally distributed data. Comparisons among dogs with hypocoagulable, normal, and hypercoagulable profiles were performed by one-way analysis of variance (ANOVA). Qualitative data were compared by Fisher's exact test and by calculating the odds ratios (ORs) associated with the 95% confidence interval (95% CI). No correction for multiple comparisons was made in this pilot exploratory study. Survival was assessed by Kaplan-Meier product limit estimates, and differences among groups were assessed by the log-rank test. Statistical analyses were performed by a commercially available statistical program.<sup>3</sup> A *P*-value  $\leq .05$  was considered statistically significant.

## Results

### Leptospirosis Diagnosis and Vaccination

Between January 2013 and June 2015, a clinical diagnosis of leptospirosis was established in 45 dogs. Ten dogs were excluded because TEM could not be performed at the time of admission. Thirty-five dogs were included in the study. Leptospirosis was diagnosed by MAT in 30 dogs (as single MAT titers in 25 dogs [median of the highest titer, 1 : 800; range, 1 : 800–1 : 3200] and a 4-fold rise in convalescent titers in 5 dogs [median of the highest titer, 1 : 3200; range,

1 : 3200–1 : 6400]), by PCR in 3 dogs (positive urine and blood PCR in 1 dog and positive blood PCR in 2 dogs), and by a combination of MAT and positive urine PCR in 2 dogs.

Thirty-four dogs (97%) had been vaccinated against leptospirosis within the last year. Only bivalent vaccines were used against the serogroups canicola and icterohaemorrhagiae.<sup>1,m,n</sup> Based on single MAT titers at admission, the most commonly represented serogroups were australis, autumnalis, and panama (Table 1).

### Characteristics of the Study Population

The median age of the dogs was 5.0 years (range, 4 months to 12 years), and their median weight was 29.4 kg (range, 5.8–58.7 kg). Twenty-six dogs (74%) were males (23 intact [66%] and 3 castrated [9%]) and 9 were females (26%) (4 intact [12%] and 5 neutered [14%]). Thirty-two dogs (91%) were purebred and belonged to 22 breeds. The most commonly represented breeds were German Shepherds (4/35, 11%) and Jack Russell Terriers, Golden Retrievers, and Labrador Retrievers (3/35 each, 9%). Thirty-two dogs (91%) were referred by their primary veterinarians. Twenty-three dogs (66%) had received antibiotics before admission. Three dogs (9%) had received glucocorticoids before admission (dexamethasone in 2 dogs and methylprednisolone in 1 dog). Two dogs (6%) had received meloxicam before admission. None of the dogs had received anticoagulants by the primary veterinarian.

### Signs of Bleeding at Admission

The median time from the onset of clinical signs to admission to our facility was 4 days (1–30 days). Eight dogs (23%) were presented with hemorrhagic diatheses, 5 of 8 dogs exhibited a combination of 2 hemorrhagic clinical signs, and 1 of 8 dogs was presented with a combination of 3 hemorrhagic clinical signs. The hemorrhagic clinical signs included hematochezia (3/35, 9%), macroscopic hematuria (3/35, 9%), melena (2/35, 6%), hematemesis (2/35, 6%), spontaneous mucous membrane hemorrhages (2/35, 6%), 1 oral bleeding and 1 scleral hemorrhage), hemoptysis (1/35, 3%), petechial hemorrhages (1/35, 3%), and skin hematomas (1/35, 3%).

### Hospitalization and Outcomes

The median hospitalization time was 7 days (range, 0–21 days). Twenty-two dogs (63%) were discharged. Thirteen dogs (37%) died during hospitalization. Six dogs died naturally (4 secondary to respiratory distress not responding to supportive care and 2 during hemodialysis), and 7 were euthanized. The reasons for euthanasia were the following: development of respiratory distress associated with severe hemoptysis and hemorrhagic nasal discharge (2 dogs), presence of intestinal intussusception (2 dogs), severe deterioration of general condition (2 dogs), and failure to introduce a hemodialysis central venous catheter into the jugular

**Table 1.** Description of the serogroups and serovars identified by MAT in 35 dogs with leptospirosis based on admission single MAT titers  $\geq 1 : 1600$  for vaccine serovars (from the serogroups icterohaemorrhagiae and canicola) or  $\geq 1 : 800$  for nonvaccine serovars.

Serogroup	Serovar	All dogs (n = 35)	With hemorrhagic diatheses (n = 8)	Without hemorrhagic diatheses (n = 27)	With a hypercoagulable profile (n = 14)	With a normal profile (n = 14)	With a hypocoagulable profile (n = 7)
Icterohemorrhagiae	Icterohemorrhagiae	3	0	3	0	1	2
	Copenhagen	6	1	5	3	2	1
Australis	Australis	13	1	12	1	6	6
	Bratislava	13	2	11	1	6	6
	Munchen	18	2	16	9	8	1
Autumnalis	Autumnalis	4	0	4	1	3	0
	Bim	10	1	9	1	6	3
Ballum	Castellonis	0	0	0	0	0	0
Bataviae	Bataviae	0	0	0	0	0	0
Canicola	Canicola	0	0	0	0	0	0
Grippotyphosa	Grippotyphosa	3	2	1	0	1	2
	Vanderhoedoni	2	0	2	0	1	1
Hebdomadis	Hebdomadis	0	0	0	0	0	0
	Kremastos	0	0	0	0	0	0
Panama	Mangus	11	2	9	1	6	4
	Panama	2	0	2	0	2	0
Pomona	Mozdok	1	0	1	0	0	1
	Pomona	1	0	1	0	1	0
Pyrogenes	Pyrogenes	2	1	1	1	0	1
Sejroe	Sejroe	0	0	0	0	0	0
	Saxkoebing	0	0	0	0	0	0
	Hardjo	0	0	0	0	0	0
Tarassovi	Tarassovi	0	0	0	0	0	0

MAT, microagglutination test.

veins because of the presence of thrombi in each jugular vein (1 dog).

#### *Hematologic, Hemostatic, and Thromboelastometric Findings at Admission*

Hematologic abnormalities were found in 32 dogs (91%). Abnormal CBC findings at admission included anemia (30/35, 86%; all with a reticulocyte count  $< 40 \times 10^9/L$ ), thrombocytopenia (21/35, 60%), leukocytosis (6/35, 17%), leukopenia (2/35, 6%), and mildly increased in hematocrit (1/35, 3%; Table 2).

Hemostatic abnormalities were found in 29 dogs (83%). Abnormal findings in the coagulation profile at admission included hyperfibrinogenemia (15/35, 43%), prolonged aPTT (8/35, 23%), hypofibrinogenemia (7/35, 20%), prolonged PT (5/35, 14%), prolonged TT (5/35, 14%), and increased FDP concentration (4/35, 11%). D-dimer concentration was only measured in 23 dogs and was increased in 9 dogs (39%; Table 2). Based on these alterations of the coagulation profile and thrombocytopenia, 8 dogs (23%) were diagnosed with DIC.

Abnormal findings in the exTEM profile at admission included an increase in  $\alpha$ -angle (19/35, 54%), A10 (14/35, 40%), MCF (14/35, 40%), CT (8/35, 23%), and CFT (7/35, 20%) and a decrease in CFT (16/35, 46%), A10,  $\alpha$ -angle, and MCF (7/35 for each, 20%). The TPI and G were increased in 14 dogs (40%) and decreased

in 7 dogs (20%; Table 3). Based on the values of G and TPI, 14 dogs (40%), 14 dogs (40%), and 7 dogs (20%) were defined as having a hypercoagulable profile, normal TEM profile, and hypocoagulable profile, respectively.

Abnormal findings in the fibTEM profile at admission included an increase in A10 (20/35, 57%), MCF (19/35, 54%), CT (5/35, 14%), and ML (1/35, 3%) and a decrease in A10 and MCF (3/35 for each, 9%) and CT (1/35, 3%; Table 4).

#### *Comparison Between Dogs With and Without Bleeding Diatheses*

No association was found between serogroup and the presence of hemorrhagic diathesis (Table 1).

Compared with the 28 dogs without hemorrhagic diathesis, the 8 dogs (23%) with hemorrhagic diatheses had significantly lower platelet counts ( $P = .037$ ) and significantly higher D-dimer concentrations ( $P = .015$ ; Table 2). The exTEM assay indicated that the CT and CFT were significantly prolonged in dogs with hemorrhagic diatheses compared with dogs without hemorrhagic diatheses ( $P = .047$  and  $P = .014$ , respectively), whereas A10 ( $P = .007$ ),  $\alpha$ -angle ( $P = .025$ ), MCF ( $P = .006$ ), TPI ( $P = .009$ ), and G ( $P < .001$ ) were significantly decreased (Table 3). The fibTEM assay indicated that no parameter was different between dogs with and without hemorrhagic diatheses (Table 4).

Table 2. Results of the CBC and coagulation profile (median (range)) in 35 dogs with leptospirosis.

Blood parameter	Reference intervals	All dogs (n = 35)	Survivors (n = 22)	Nonsurvivors (n = 13)	P value <sup>a</sup>	With hemorrhagic diatheses (n = 8)	Without hemorrhagic diatheses (n = 27)	P value <sup>b</sup>
PT (s)	6-10	7.5 (6.5-69.2)	7.2 (6.5-12.9)	7.9 (6.7-69.2)	.083	8.2 (6.7-12.9)	7.4 (6.5-69.2)	.102
aPTT (s)	10-20	15.5 (9.6-180)	15.5 (9.8-180)	15 (9.6-180)	.561	18.3 (12.9-180)	14.5 (9.6-180)	.116
TT (s)	10-25	15.7 (6.2-60)	15.3 (6.2-60)	17.1 (12.5-60)	.833	17.4 (12.8-60)	15.0 (6.2-60)	.336
Fibrinogen (g/L)	1.5-4	3.1 (0.9-7.3)	4.1 (0.9-7.3)	2.8 (1-5.6)	.134	1.6 (0.9-7.3)	3.4 (0.9-6.0)	.512
FDPs (µg/mL)	<20	<5 (<5->20)	<5 (<5->20)	5-20 (<5->20)	NA	5-20 (<5->20)	<5 (<5->20)	NA
D-dimer (µg/mL)	<0.8	0.6 (0.3-2.8)	0.6 (0.3-1.6)	0.9 (0.4-2.8)	.166	1.6 (0.4-2.8)	0.6 (0.3-1.5)	.015
(n = 23)			(n = 13)	(n = 10)		(n = 7)	(n = 16)	
Hematocrit (L/L)	0.37-0.54	0.29 (0.09-0.6)	0.29 (0.16-0.45)	0.29 (0.09-0.6)	.609	0.25 (0.16-0.60)	0.30 (0.09-0.45)	.121
Leukocytes (×10 <sup>9</sup> /L)	6-17	12.7 (2.1-29.8)	12.7 (2.8-29.8)	12.7 (2.1-23.9)	.608	12.3 (6.0-23.6)	12.7 (2.1-29.8)	.798
Platelets (×10 <sup>9</sup> /L)	200-500	177 (38-460)	192 (76-422)	175 (38-460)	.535	107 (38-273)	189 (77-460)	.037

aPTT, activated partial thromboplastin time; FDPs, fibrin(ogen) degradation products; NA, not applicable; PT, prothrombin time; TT, thrombin time.

<sup>a</sup>Comparison between survivors and nonsurvivors.

<sup>b</sup>Comparison between dogs with and without bleeding diatheses.

The bold values are corresponding to P-value ≤ .05

Among the 8 dogs with hemorrhagic diatheses at admission, 5 were presented with a hypocoagulable TEM profile (5/7, 71%), 2 with a normal profile (2/14, 14%), and 1 with a hypercoagulable profile (1/14, 7%).

**Comparison Between Dogs With and Without DIC**

Disseminated intravascular coagulation was diagnosed in 8 dogs (23%) at admission. Four dogs with DIC (50%, 4/8) and 4 dogs without DIC (15%, 4/27) had hemorrhagic diatheses at admission. The DIC was not associated with the presence of hemorrhagic diatheses (P = .161). Hematemesis and melena at admission were the only hemorrhagic signs that were significantly associated with the presence of DIC (OR = 21.2; 95% CI = 0.9-496.2; P = .047 for each).

The exTEM assay indicated that CT and CFT were significantly prolonged in dogs with DIC compared with dogs without DIC (P < .0001 and P = .005; respectively), whereas A10, α-angle, and MCF were significantly decreased (P < .0001 for each; Fig 1). The fibTEM assay showed that CT and ML were significantly increased in dogs with DIC compared with dogs without DIC (P < .0001 and P = .041, respectively), whereas A10 (P = .0002) and MCF (P = .0002) were significantly decreased (Fig 2).

Values for G and TPI were significantly decreased in dogs with DIC compared with dogs without DIC (P < .0001 for each; Fig 1). Among the 8 dogs with DIC, 75% (6/8) had a hypocoagulable profile and 25% (2/8) had a normal profile based on the exTEM assay. Among the 27 dogs without DIC, 52% (14/27) had a hypercoagulable profile, 44% (12/27) had a normal profile, and 4% (1/27) had a hypocoagulable profile based on the exTEM assay. The only dog exhibiting a hypocoagulable profile without DIC was presented with thrombocytopenia (38 × 10<sup>9</sup>/L) and increased D-dimer concentration (2.78 µg/mL).

**Comparison Among Dogs With Hypocoagulable, Normal, and Hypercoagulable Profiles**

No association was found between serogroup and a hypocoagulable, normal, or hypercoagulable TEM profile (Table 1).

The dogs with a hypocoagulable profile had significantly more hemorrhagic signs than dogs with normal and hypercoagulable profiles (OR = 9.17; 95% CI = 1.15-73.3; P = .049). Macroscopic hematuria was documented significantly more frequently in dogs with a hypocoagulable profile than in dogs with normal and hypercoagulable profiles (OR = 22.56; 95% CI = 1.97-524.8; P = .026).

Platelet counts and fibrinogen concentration were significantly decreased in dogs with a hypocoagulable profile compared with dogs with a normal profile (P = .010 and P = .028, respectively), in dogs with a hypocoagulable profile compared with dogs with a hypercoagulable profile (P < .001 and P = .005, respectively), and in dogs with a normal profile compared

**Table 3.** Results of exTEM (extrinsic thromboelastometry) parameters (median (range)) in 35 dogs with leptospirosis.

exTEM parameter	Reference intervals	All dogs (n = 35)	Survivors (n = 22)	Nonsurvivors (n = 13)	P value <sup>a</sup>	With hemorrhagic diatheses (n = 8)	Without hemorrhagic diatheses (n = 27)	P value <sup>b</sup>
CT (s)	33–70	47 (33–3600)	39 (33–3600)	53 (36–2025)	.119	79 (34–3600)	40 (33–2025)	<b>.047</b>
CFT (s)	78–231	79 (18–3600)	67 (20–3600)	88 (18–3600)	.130	291 (20–3600)	67 (18–3600)	<b>.014</b>
A10 (mm)	33–59	55 (0–75)	62 (0–75)	52 (0–75)	.099	22 (0–72)	57 (0–75)	<b>.007</b>
$\alpha$ (°)	51–75	78 (0–87)	81 (0–86)	73 (0–87)	.115	33 (0–86)	79 (0–87)	<b>.025</b>
MCF (mm)	45–69	62 (5–80)	68 (5–80)	57 (5–79)	<b>.035</b>	30 (5–77)	67 (5–80)	<b>.006</b>
Li45 (%)	88–100	100 (97–100)	100 (99–100)	100 (97–100)	.369	100 (99–100)	100 (97–100)	.746
ML (%)	0–41	5 (0–17)	5 (0–16)	1.5 (0–17)	.288	1 (0–16)	5 (0–17)	.133
TPI	0.38–2.81	1.81 (0–20.90)	2.94 (0–16.74)	1.77 (0–20.90)	.066	0.09 (0–16.74)	2.61 (0–20.90)	<b>.009</b>
G (dynes/cm <sup>2</sup> )	4,025–11,129	8,158 (0–20,000)	10,625 (0–20,000)	6,628 (0–18,810)	<b>.037</b>	2,239 (0–16,739)	10,151 (0–20,000)	<b>&lt;.001</b>

A10, amplitude 10 minutes after CT; CFT, clot formation time; CT, clotting time; G, shear elastic modulus strength; Li45, lysis index 45 minutes after CT; MCF, maximum clot firmness; ML, maximum lysis; TPI, thrombodynamic potential index.

<sup>a</sup>Comparison between survivors and nonsurvivors.

<sup>b</sup>Comparison between dogs with and without bleeding diatheses.

The bold values are corresponding to  $P$ -value  $\leq .05$

**Table 4.** Results of fibTEM (fibrinogen function thromboelastometry) parameters (median (range)) in 35 dogs with leptospirosis.

fibTEM parameter	Reference intervals	All dogs (n = 35)	Survivors (n = 22)	Nonsurvivors (n = 13)	P value <sup>a</sup>	With hemorrhagic diatheses (n = 8)	Without hemorrhagic diatheses (n = 27)	P value <sup>b</sup>
CT (s)	32–98	44 (27–3600)	40.5 (27–3600)	52 (37–3600)	<b>.045</b>	71 (35–3600)	42 (27–3600)	.057
CFT (s)	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
A10 (mm)	3–13	15 (0–36)	16 (0–36)	14 (3–32)	.186	5 (0–35)	17 (0–36)	.078
$\alpha$ (°)	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
MCF (mm)	3–14	15 (0–36)	17 (0–36)	13 (0–32)	.154	5 (0–35)	18 (0–36)	.069
Li45 (%)	64–100	100 (90–100)	99 (90–100)	100 (93–100)	.405	100 (93–100)	100 (90–100)	1
ML (%)	0–48	2 (0–84)	2 (0–84)	2 (0–13)	.963	12 (0–84)	1 (0–18)	.076

A10, amplitude 10 minutes after CT; CFT, clot formation time; CT, clotting time; Li45, lysis index 45 minutes after CT; MCF, maximum clot firmness; ML, maximum lysis; NA, not applicable.

<sup>a</sup>Comparison between survivors and nonsurvivors.

<sup>b</sup>Comparison between dogs with and without bleeding diatheses.

The bold values are corresponding to  $P$ -value  $\leq .05$

with dogs with a hypercoagulable profile ( $P = .008$  and  $P = .002$ , respectively). The PT, aPTT, and D-dimer concentration were significantly increased in dogs with a hypocoagulable profile compared with dogs with a normal profile ( $P = .006$ ,  $P = .004$ , and  $P = .042$ , respectively) and in dogs with a hypocoagulable profile compared with dogs with a hypercoagulable profile ( $P = .002$ ,  $P < .001$ , and  $P = .018$ , respectively). The TT was significantly prolonged in dogs with a hypocoagulable profile compared with dogs with a hypercoagulable profile ( $P < .001$ ) and in dogs with a normal profile compared with dogs with a hypercoagulable profile ( $P = .020$ ; Fig 3).

The APPLEfast score was not significantly different among these 3 groups (Table 5).

#### Comparison Between Survivors and Nonsurvivors

None of the CBC or classic coagulation profile parameters were significantly different between survivors and nonsurvivors (Table 2).

The exTEM assay showed that MCF and G were significantly increased in the survivors compared with the nonsurvivors ( $P = .035$  and  $P = .037$ , respectively; Table 3; Fig 4), whereas CT according to the fibTEM assay was significantly decreased ( $P = .045$ ; Table 4; Fig 4). The areas under the curve (AUC) were calculated for these 3 parameters and were 0.715, 0.713, and 0.592, respectively, for MCF and G according to the exTEM assay and for CT according to the fibTEM assay.

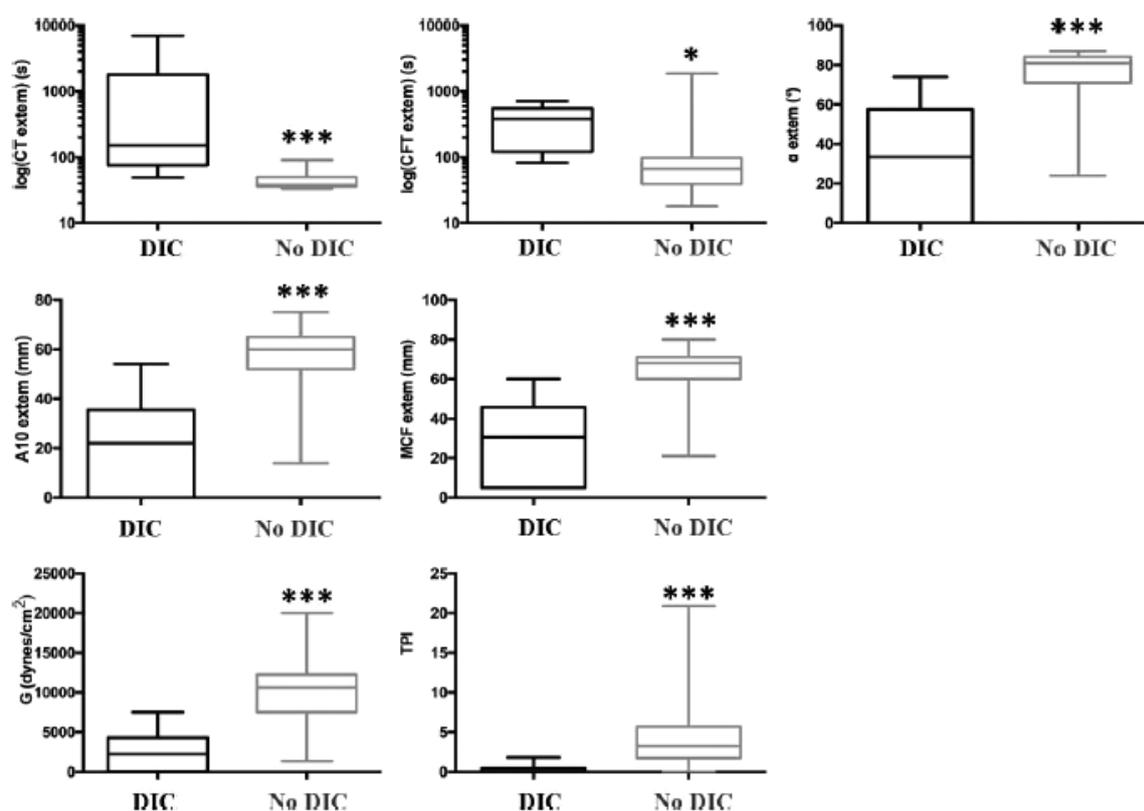


Fig 1. Comparison of the distribution of exTEM (extrinsic thromboelastometry) parameters among 35 dogs with leptospirosis between dogs with DIC ( $n = 8$ ) and dogs without DIC ( $n = 27$ ) at admission. CT and CFT are presented on a log scale for clarity. A10, amplitude 10 minutes after CT; CFT, clot formation time; CT, clotting time; DIC, disseminated intravascular coagulation; G, shear elastic modulus strength; MCF, maximum clot firmness; TPI, thrombodynamic potential index.  $*P < .05$ ,  $**P < .001$ ,  $***P < .0001$  between the dogs with DIC and the dogs without DIC.

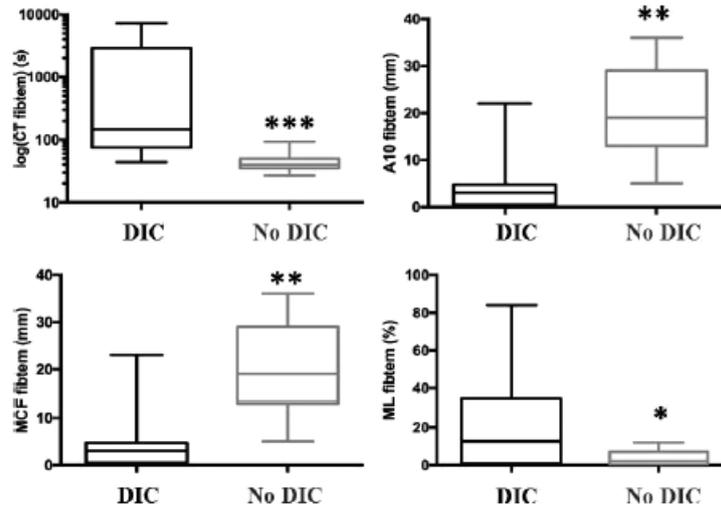
The difference between mortality rate in dogs with hemorrhagic diatheses compared with those without hemorrhagic diatheses was not significant (63% [5/8] and 30% [8/27], respectively;  $P = .051$ ). Mortality rates were significantly lower in dogs with a hypercoagulable profile than in dogs with a hypocoagulable profile (21% [3/14] and 57% [4/7], respectively;  $P = .043$ ; Fig 5). Mortality rates were not significantly different between dogs with a normal TEM profile and those with a hypercoagulable profile or between dogs with a normal TEM profile and those with a hypocoagulable profile ( $P = .847$  and  $P = .195$ , respectively). The mortality rates were not different between dogs with and without DIC ( $P = .433$ ).

### Discussion

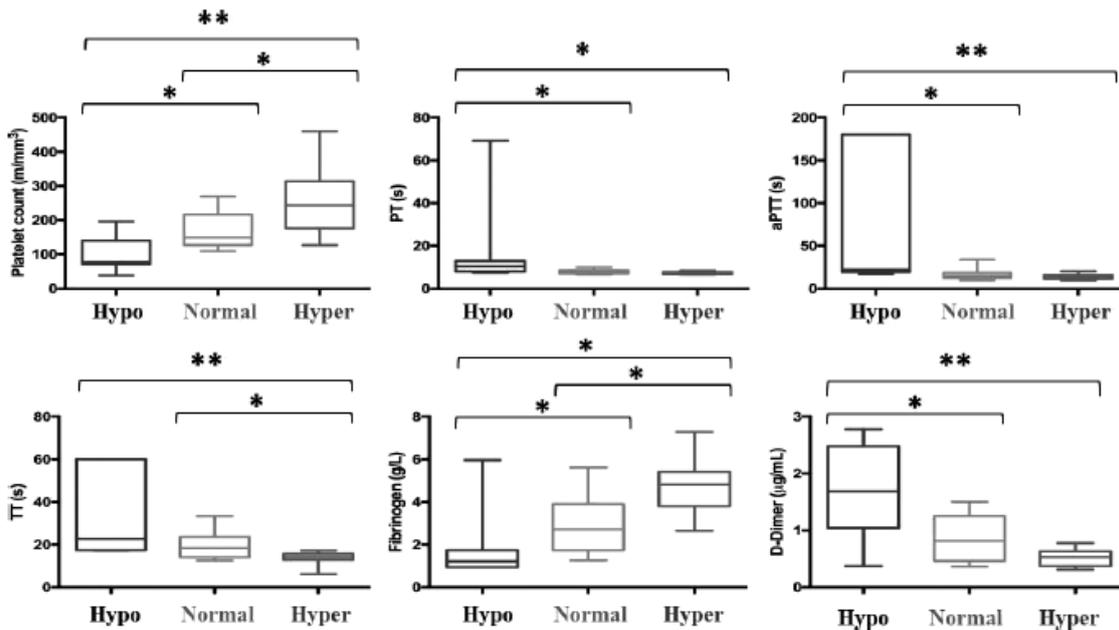
Evidence of hemorrhage in naturally occurring leptospirosis in dogs has been inconsistently reported and poorly characterized. Our prospective study provides an in-depth investigation of this clinical feature and the associated hemostatic disorders. To our knowledge, ours is the first study to describe the

thromboelastometric profiles of dogs suspected to have acute leptospirosis in combination with classic hemostatic parameters and the first to compare them between dogs with (23%) and without hemorrhagic diatheses. Among the population as a whole, the most common hematologic abnormalities were anemia (86%) and thrombocytopenia (60%). Abnormalities in the coagulation profile were observed in 83% of the cases. Disseminated intravascular coagulation occurred in 23% of the dogs and was not a negative prognostic factor. According to the results of TEM, 40% of the dogs had a hypercoagulable profile, 40% had a normal profile, and 20% had a hypocoagulable profile. The mortality rate was significantly lower in dogs with a hypercoagulable profile than in those with a hypocoagulable profile.

Thrombocytopenia was a common hematologic finding in the present study, with a slightly higher prevalence (60%) than previously reported (14–58%).<sup>4–6,8,18,19</sup> Thrombocytopenia is a well-documented feature of leptospirosis in humans and dogs. The underlying mechanisms of thrombocytopenia are not fully understood. Thrombocytopenia may be the result of platelet consumption due to activation,



**Fig 2.** Comparison of the distribution of fibTEM (fibrinogen function thromboelastometry) parameters among 35 dogs with leptospirosis between dogs with DIC (n = 8) and dogs without DIC (n = 27) at admission. CT is presented on a log scale for clarity. A10, amplitude 10 minutes after CT; CT, clotting time; DIC, disseminated intravascular coagulation; MCF, maximum clot firmness; ML, maximum lysis. \* $P < .05$ , \*\* $P < .001$ , \*\*\* $P < .0001$  between the dogs with DIC and the dogs without DIC.



**Fig 3.** Comparison of the distribution of the platelet count, PT, aPTT, TT, fibrinogen, and D-dimer concentration among 35 dogs with leptospirosis between dogs with a hypocoagulable profile (n = 7), a normal profile (n = 14), and a hypercoagulable profile (n = 14) at admission. The accolades represent a comparison between 2 profile types. aPTT, activated partial thromboplastin time; hyper, hypercoagulable profile; hypo, hypocoagulable profile; PT, prothrombin time; TT, thrombin time. \* $P < .05$ , \*\* $P < .001$  between the different groups.

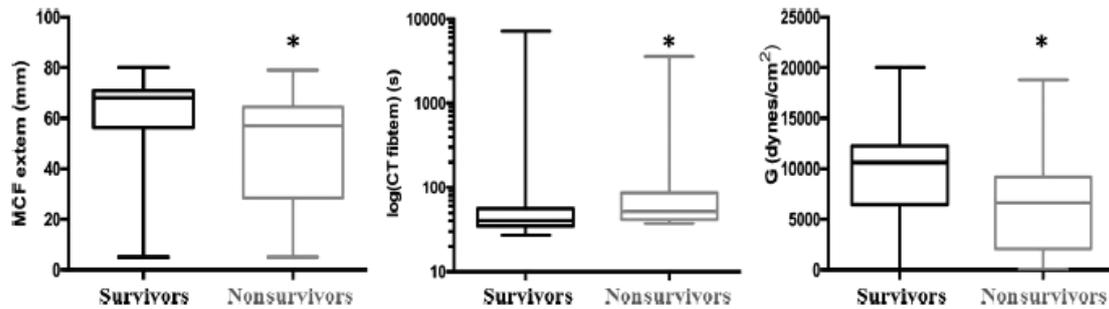
adhesion, and aggregation due to a stimulated vascular endothelium,<sup>32</sup> increased platelet consumption due to immune causes,<sup>16,18,22,23</sup> hemophagocytic syndrome,<sup>24,33</sup> or some combination of these factors. Weak evidence of

bone marrow suppression secondary to a direct toxic effect of *Leptospira* has also been documented.<sup>21</sup> According to the results of our study, thrombocytopenia may partially explain the hemorrhagic signs

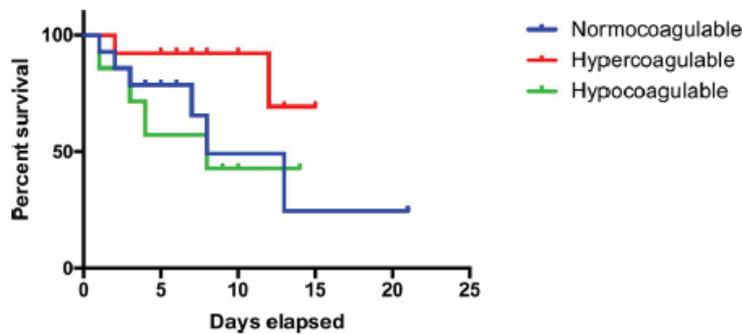
**Table 5.** Results of APPLEfast scoring system in 35 dogs with leptospirosis.

Results of APPLEfast	All dogs (n = 35)	Dogs with a hypercoagulable profile (n = 14)	Dogs with a normal profile (n = 14)	Dogs with a hypocoagulable profile (n = 7)
Median	21	19.5	21.5	21
Range	15–30	15–30	17–26	19–22
<i>P</i> value <sup>a</sup>			.64	

<sup>a</sup>Comparison between dogs with a hypercoagulable, a normal, and a hypocoagulable profile.



**Fig 4.** Comparison of the distribution of MCF and G based on the exTEM (extrinsic thromboelastometry) assay and CT from the fibTEM (fibrinogen function thromboelastometry) assay between the surviving dogs (n = 22) and the nonsurviving dogs (n = 13) with leptospirosis at admission. CT from the fibTEM assay is presented on a log scale for clarity. CT, clotting time; G, shear elastic modulus strength; MCF, maximum clot firmness. \**P* < .05 between the survivors and nonsurvivors.



**Fig 5.** Comparison of the Kaplan-Meier curves for the 35 dogs with leptospirosis between dogs with a hypercoagulable profile (n = 14), a normal thromboelastometric profile (n = 14), and a hypocoagulable profile (n = 7).

observed in leptospirosis in dogs. In our study, the platelet count was significantly lower in dogs with hemorrhagic diatheses than in dogs without hemorrhagic diatheses, and dogs with a hypocoagulable profile exhibited significantly more hemorrhagic diatheses than dogs with normal and hypercoagulable profiles. Furthermore, a hypocoagulable profile was associated with a low platelet count and a low fibrinogen concentration. In humans, thrombocytopenia is an indicator of severe disease and a risk factor for hemorrhage in leptospirosis, and it is the only independent hemostasis factor that has been associated with clinical hemorrhage.<sup>25,26</sup>

Disseminated intravascular coagulation occurred in 8 of 35 dogs (23%), 4 of 8 of which had hemorrhagic diathesis. In a previous retrospective study, DIC

(defined by the same criteria as those listed in the Materials and Methods section) was observed in 7 of 16 dogs (44%).<sup>6</sup> In a second study, DIC was diagnosed in 38 of 209 dogs based on the presence of at least 2 abnormal hemostatic parameters among the 4 routinely assessed parameters (platelet count, PT, aPTT, and plasma fibrinogen concentration).<sup>2</sup> Disseminated intravascular coagulation is commonly considered as a cause of bleeding diatheses in leptospirosis.<sup>1,2,6,16,25,26</sup> However, the link between DIC and bleeding signs in spontaneous and experimental cases of leptospirosis remains unclear because DIC has been inconsistently documented in hemorrhagic animals. In an experimental model of leptospirosis in guinea pigs, neither platelet thrombi nor fibrin thrombi were found in the liver, lungs, or kidneys

by morphological observation, although D-dimer and FDP concentrations were significantly increased.<sup>24</sup> In 2 prospective studies of humans, DIC was diagnosed in 10 of 46 patients (22%)<sup>25</sup> and in 36 of 49 (73%) patients<sup>26</sup> based on the overt DIC score developed by the DIC scientific subcommittee of the International Society for Thrombosis and Hemostasis.<sup>34</sup> However, DIC did not appear as an independent factor of hemorrhagic diatheses based on a multivariate analysis,<sup>26</sup> and there was no significant association between DIC scores and hemorrhagic diatheses.<sup>25</sup> As reported in our study, DIC was not found to be a negative prognostic factor in these dogs with leptospirosis.<sup>6,25,26</sup> However, DIC was associated with a negative outcome (death or euthanasia) in another study of dogs (OR = 7.9; 95% CI = 3.4–18.4).<sup>2</sup>

Our results highlight the complexity of the hemostatic imbalance in leptospirosis by documenting elements favoring the occurrence of both hypercoagulable and hypocoagulable profiles. Some dogs exhibited an increase in FDPs (11%) and D-dimer (39%) concentrations at the time of admission. However, almost no fibrinolysis TEM parameter was altered (except ML in the fibTEM assay), which could represent a lack of sensitivity of TEM needed to identify alterations in fibrinolysis. The results of a previous prospective study performed in dogs with spontaneous hemoperitoneum showed that enhancing *in vitro* fibrinolysis with 50 U/mL of tissue plasminogen activator increased the ability of the thromboelastographic assay to identify differences in fibrinolysis.<sup>35</sup> Furthermore, among the dogs with a normal TEM profile (40%), the majority exhibited alterations in primary (thrombocytopenia) and secondary hemostasis. Additional studies are needed to characterize this group of dogs to establish whether they are normocoagulable or are in a transitional phase between hypercoagulable and hypocoagulable profiles.

As mentioned by the Partnership on Rotational ViscoElastic Test Standardization (PROVETS), there is insufficient evidence to recommend how a hypercoagulable or a hypocoagulable profile should be defined in dogs based on TEM parameters.<sup>36,37</sup> This definition is most often based on the values of 4 measured parameters (CT, CFT,  $\alpha$ -angle, and MCF) or using G values.<sup>37</sup> In our study, we categorized the TEM profiles based on G and TPI values according to the results of a previous preliminary retrospective study.<sup>9</sup> In this previous study, the 4 measured parameters and 5 calculated indices (maximal clot elasticity, G, TPI, global index, and coagulation index) were evaluated to establish their sensitivity and specificity for identifying an exTEM hypocoagulable or hypercoagulable profile. An exTEM profile was arbitrarily considered abnormal if  $\geq 2$  of the measured parameters changed in the same direction (e.g., a shortened CT or CFT or an increased  $\alpha$ -angle or MCF to identify a hypercoagulable profile; or a prolonged CT or CFT or decreased  $\alpha$ -angle or MCF to identify a hypocoagulable profile).<sup>37</sup> According to the results of this previous study,<sup>9</sup> G and TPI appeared to be the best indices for identifying hypercoagulable (AUC = 0.998 and AUC = 0.991, respectively) and

hypocoagulable profiles (AUC = 0.987 and AUC = 0.999, respectively).

Some differences were obtained when we compared the TEM parameters that were measured by the exTEM assay and the fibTEM assay between surviving and nonsurviving dogs and between dogs with and without hemorrhagic diatheses. The fibTEM assay was useful for assessing fibrinogen functions (with tissue factor activation) by irreversibly inhibiting the platelets with cytochalasin D, a potent inhibitor of actin polymerization. Except for the fibrinolytic parameters, all of the exTEM parameters were significantly different between dogs with and without hemorrhagic diatheses, whereas no statistical differences were observed for the fibTEM parameters between these 2 groups. These results suggest that leptospirosis-induced hypocoagulability is at least in part a reflection of the availability of fibrinogen and platelets (fibrinogen concentrations and platelet counts were lower in dogs with a hypocoagulable profile than in dogs with a hypercoagulable profile; Fig 3), but platelet availability appeared to play a greater role than fibrinogen concentration in the occurrence of hypocoagulability. The results of our study suggest the relevance of systematically performing an exTEM assay in association with a fibTEM assay to identify the TEM disorders in dogs with leptospirosis.

The number of hypercoagulable TEM profiles observed in this study may have been influenced by the high frequency of anemia (86%). Some studies suggest that a hypercoagulable profile induced by decreased hematocrit may have a nonspecific influence in viscoelastic tests, which may result in an artifactual hypercoagulable profile.<sup>38–40</sup> In addition, 43% of dogs in our study had hyperfibrinogenemia, which could favor hypercoagulable profiles.<sup>39</sup> Three dogs received some glucocorticoids before admission to our facility. The results of a previous study showed that chronically administering prednisone in healthy mixed-breed dogs led to increased clot strength and decreased clot lysis when a thromboelastographic approach was used.<sup>41</sup> In our study, the dog that received methylprednisolone had a normal profile, and of the 2 dogs that received dexamethasone, 1 had a hypercoagulable profile, and 1 had a hypocoagulable profile. Thus, the administration of glucocorticoids did not appear to have influenced the TEM profiles. Finally, 2 dogs received meloxicam before admission. These dogs were not excluded from the study, in accordance with the results of a previous study in which the administration of meloxicam did not seem to alter hemostasis according to the methods evaluated (TEM and whole blood platelet aggregation) in dogs.<sup>42</sup>

In our study, the mortality rate was 37%. This result is similar to that reported in previous studies with mortality rates between 17 and 52.5%.<sup>2–8,10,18</sup> The mortality rate was lower in dogs with a hypercoagulable profile than in those with a hypocoagulable profile, and G values were significantly higher in survivors than in nonsurvivors. Other studies demonstrated that dogs with a hypocoagulable profile had a higher mortality rate than those with a hypercoagulable profile in DIC,<sup>43</sup> in

crotalid snake envenomation,<sup>44</sup> and in immune-mediated hemolytic anemia.<sup>45</sup> This relationship brings into question the role of coagulation in inflammatory processes. In the case of sepsis associated with leptospirosis, activation of coagulation could foster compartmentalization of bacteria in microvessels and decrease bacterial invasion into tissue.<sup>46</sup> Conversely, hypocoagulability could facilitate enhanced spread of infection and subsequently mortality.<sup>46</sup>

Our study had several limitations. First, the diagnosis of leptospirosis based on a single MAT titer, especially in vaccinated dogs, is very controversial. Vaccination can result in titers  $\geq 1 : 6400$  to nonvaccine serovars several months after vaccination.<sup>47</sup> However, a previous study has demonstrated that the administration of leptospirosis-inactivated bivalent vaccine induced a relatively low- and short-lived antibody response.<sup>48</sup> Therefore, it remains possible that some dogs in our study had other causes of their illness. Second, the dogs belonged to a referral population and are likely to represent a more severely affected population than those seen in general practice, and it is unclear whether our results can be extrapolated to all dogs with leptospirosis. The third limitation is the small sample size, which decreased the power of the statistical tests. The frequency of DIC in our study should be interpreted cautiously because the diagnosis of DIC has not been standardized in dogs. A model-based scoring system was developed in veterinary medicine,<sup>49</sup> but the application of this scoring system was not possible in this study, because it used reference intervals for tests performed at 1 specific laboratory. Finally, no discard tube was used to collect the blood samples, unlike the recommended standard.<sup>36,37</sup> It is possible that this method of blood collection led to preanalytical bias.

In conclusion, hemostatic derangements are an important but still poorly characterized aspect of leptospirosis. The results of our study suggest that the hemorrhagic tendency observed in leptospirosis is the result of an imbalance in the hemostatic equilibrium, with alterations in both primary and secondary hemostasis. This imbalance may lead to DIC, which occurred in more than 20% of dogs in this case series. However, DIC was not a negative prognostic factor, and mortality rates were lower among dogs with a hypercoagulable TEM profile compared to those with a hypocoagulable profile. Our results suggest that further study is warranted to determine what triggers this disordered hemostasis, which specific components of inflammation and hemostasis are involved, and whether identifying a hypocoagulable TEM profile in an individual dog with leptospirosis has therapeutic implications.

### Footnotes

<sup>a</sup> Laboratoire des Leptospire, VetAgro Sup, Campus vétérinaire de Lyon, 1 avenue Bourgelat, Marcy l'Etoile, France

<sup>b</sup> Xt-2000iV, Sysmex, Kobe, Japan

<sup>c</sup> VetTest, IDEXX, Westbrook, ME, US

<sup>d</sup> STart, Stago, Asnières sur Seine, France

<sup>e</sup> Konelab 30, ThermoFisher, Cergy Pontoise, France

<sup>f</sup> ROTEM, Pentapharm GmbH, Munich, Germany

<sup>g</sup> starTEM, Pentapharm GmbH, Munich, Germany

<sup>h</sup> exTEM, Pentapharm GmbH, Munich, Germany

<sup>i</sup> fibTEM, Pentapharm GmbH, Munich, Germany

<sup>j</sup> Barthélemy A, Rannou B, Verwaerde P, et al. Establishment of reference intervals for extrinsic rotational thromboelastometry (exTEM) parameters in normal dogs: assessment of sex and blood component influences. *J Vet Emerg Crit Care* 2014; 24:S32

<sup>k</sup> Prism 6, GraphPad Software, La Jolla, USA, CA

<sup>l</sup> Nobivac<sup>®</sup> lepto, MSD Santé Animale, Beaucauzé, France

<sup>m</sup> Canigen<sup>®</sup>, Virbac France, Carros, France

<sup>n</sup> Eurican<sup>®</sup>, Merial, Lyon, France

<sup>o</sup> Barthélemy A, Verwaerde P, Rannou B, et al. Specificity and sensitivity of rotational thromboelastometry (ROTEM<sup>®</sup>) parameters and indices to identify hypercoagulable or hypocoagulable states in dogs. *J Vet Emerg Crit Care* 2014; 24:S30-S31

### Acknowledgments

The authors thank Dr Anaïs Boyeaux, Dr Maxime Cambournac, Dr Robin Perrin, Catherine Boisvineau, Aurélie Pin, Faustine Rioux, and Jean-Yves Ayoub for their assistance in caring for the dogs used in this study and Dr Benoît Rannou for his help.

*Source of Funding:* This study did not receive any grant or financial support.

*Conflict of Interest Declaration:* Authors declare no conflict of interest.

*Off-label Antimicrobial Declaration:* Authors declare no off-label use of antimicrobials.

### References

- Bharti AR, Nally JE, Ricaldi JN, et al. Leptospirosis: A zoonotic disease of global importance. *Lancet Infect Dis* 2003;3:757–771.
- Major A, Schweighauser A, Francey T. Increasing incidence of canine leptospirosis in Switzerland. *Int J Environ Res Public Health* 2014;11:7242–7260.
- Rentko VT, Clark N, Ross LA, Schelling SH. Canine leptospirosis. A retrospective study of 17 cases. *J Vet Intern Med* 1992;6:235–244.
- Birnbaum N, Barr SC, Center SA, et al. Naturally acquired leptospirosis in 36 dogs: Serological and clinicopathological features. *J Small Anim Pract* 1998;39:231–236.
- Adin CA, Cowgill LD. Treatment and outcome of dogs with leptospirosis: 36 cases (1990–1998). *J Am Vet Med Assoc* 2000;216:371–375.
- Mastrorilli C, Dondi F, Agnoli C, et al. Clinicopathologic features and outcome predictors of *Leptospira interrogans* Australis serogroup infection in dogs: A retrospective study of 20 cases (2001–2004). *J Vet Intern Med* 2007;21:3–10.
- Geisen V, Stengel C, Brem S, et al. Canine leptospirosis infections – clinical signs and outcome with different suspected *Leptospira* serogroups (42 cases). *J Small Anim Pract* 2007;48:324–328.
- Goldstein RE, Lin RC, Langston CE, et al. Influence of infecting serogroup on clinical features of leptospirosis in dogs. *J Vet Intern Med* 2006;20:489–494.
- Gratzl E, Kölbl O, Hromatka L. The change in the epidemiology and clinical manifestations of canine leptospirosis in Vienna since 1956. *J Small Anim Pract* 1964;5:331–349.

10. Miller RI, Ross SP, Sullivan ND, Perkins NR. Clinical and epidemiological features of canine leptospirosis in North Queensland. *Aust Vet J* 2007;85:13–19.
11. Weil A. Ueber einer eigenhüemliche, mit Milztumor, icterus und nephritis einhergehende, akute Infektionskrankheit. *Deutsch. Arch Klin Med* 1886;39:209. [in German].
12. Medeiros Fda R, Spichler A, Athanazio DA. Leptospirosis-associated disturbances of blood vessels, lungs and hemostasis. *Acta Trop* 2010;115:155–162.
13. Zhang Y, Lou XL, Yang HL, et al. Establishment of a leptospirosis model in guinea pigs using an epicutaneous inoculations route. *BMC Infect Dis* 2012;12:20.
14. Martinez-Lopez DG, Fahey M, Coburn J. Responses of human endothelial cells to pathogenic and non-pathogenic *Leptospira* species. *PLoS Negl Trop Dis* 2010;4:e918.
15. Ko AI, Goarant C, Picardeau M. *Leptospira*: The dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. *Nat Rev Microbiol* 2009;7:736–747.
16. Wagenaar JF, Goris MG, Sakundarno MS, et al. What role do coagulation disorders play in the pathogenesis of leptospirosis? *Trop Med Int Health* 2007;12:111–122.
17. Schuller S, Callanan JJ, Worrall S, et al. Immunohistochemical detection of IgM and IgG in lung tissue of dogs with leptospiral pulmonary haemorrhage syndrome (LPHS). *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2015;40:47–53.
18. Kohn B, Steinicke K, Arndt G, et al. Pulmonary abnormalities in dogs with leptospirosis. *J Vet Intern Med* 2010;24:1277–1282.
19. Tangeman LE, Littman MP. Clinicopathologic and atypical features of naturally occurring leptospirosis in dogs: 51 cases (2000–2010). *J Am Vet Med Assoc* 2013;243:1316–1322.
20. Nicodemo AC, Del Negro G, Amato Neto V. Thrombocytopenia and leptospirosis. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 1990;32:252–259.
21. Somers C, Al-Kindi S, Montague S. Erythroid hypoplasia associated with leptospirosis. *J Infect* 2003;47:85–86.
22. Turgut M, Sünbül M, Bayırlı D, et al. Thrombocytopenia complicating the clinical course of leptospiral infection. *J Int Med Res* 2002;30:535–540.
23. Davenport A, Rugman FP, Desmond MJ, Ganta R. Is thrombocytopenia seen in patients with leptospirosis immunologically mediated? *J Clin Pathol* 1989;42:439–440.
24. Yang HL, Jiang XC, Zhang XY, et al. Thrombocytopenia in the experimental leptospirosis of guinea pig is not related to disseminated intravascular coagulation. *BMC Infect Dis* 2006;6:19.
25. Wagenaar JF, Goris MG, Partiningrum DL, et al. Coagulation disorders in patients with severe leptospirosis are associated with severe bleeding and mortality. *Trop Med Int Health* 2010;15:152–159.
26. Chierakul W, Tientadukul P, Suputtamongkol Y, et al. Activation of the coagulation cascade in patients with leptospirosis. *Clin Infect Dis* 2008;46:254–260.
27. McMichael MA, Smith SA. Viscoelastic coagulation testing: Technology, applications, and limitations. *Vet Clin Pathol* 2011;40:140–153.
28. Donahue SM, Otto CM. Thromboelastography: A tool for measuring hypercoagulability, hypocoagulability, and fibrinolysis. *J Vet Emerg Crit Care* 2005;15:9–16.
29. Fraune CK, Schweighauser A, Francey T. Evaluation of the diagnostic value of serologic microagglutination testing and a polymerase chain reaction assay for diagnosis of acute leptospirosis in dogs in a referral center. *J Am Vet Med Assoc* 2013;15:1373–1380.
30. Schuller S, Francey T, Hartmann K, et al. European consensus statement on leptospirosis in dogs and cats. *J Small Anim Pract* 2015;56:159–179.
31. Hayes G, Mathews K, Doig G, et al. The acute patient physiologic and laboratory evaluation (APPLE) score: A severity of illness stratification system for hospitalized dogs. *J Vet Intern Med* 2010;24:1034–1047.
32. Nicodemo AC, Duarte MI, Alves VA, et al. Lung lesions in human leptospirosis: Microscopic, immunohistochemical, and ultrastructural features related to thrombocytopenia. *Am J Trop Med Hyg* 1997;56:181–187.
33. Issa N, Guisset O, Mourissoux G, et al. Leptospirose et thrombopénie. *La Revue de Médecine Interne* 2015;36:558–560. [in French].
34. Taylor FB Jr, Toh CH, Hoots WK, et al. Towards definition, clinical and laboratory criteria, and a scoring system for disseminated intravascular coagulation. *Thromb Haemost* 2001;86:1327–1330.
35. Fletcher DJ, Rozanski EA, Brainard BM, et al. Assessment of the relationships among coagulopathy, hyperfibrinolysis, plasma lactate, and protein C in dogs with spontaneous hemoperitoneum. *J Vet Emerg Crit Care* 2016;26:41–51.
36. Goggs R, Brainard B, de Laforcade AM, et al. Partnership on Rotational ViscoElastic Test Standardization (PROVETS): Evidence-based guidelines on rotational viscoelastic assays in veterinary medicine. *J Vet Emerg Crit Care* 2014;24:1–22.
37. Hanel RM, Chan DL, Conner B, et al. Systematic evaluation of evidence on veterinary viscoelastic testing part 4: Definitions and data reporting. *J Vet Emerg Crit Care* 2014;24:47–56.
38. McMichael MA, Smith SA, Galligan A, Swanson KS. In vitro hypercoagulability on whole blood thromboelastometry associated with in vivo reduction of circulating red cell mass in dogs. *Vet Clin Pathol* 2014;43:154–163.
39. Smith SA, McMichael MA, Gilor S, et al. Correlation of hematocrit, platelet concentration, and plasma coagulation factors with results of thromboelastometry in canine whole blood samples. *Am J Vet Res* 2012;73:789–798.
40. Brooks AC, Guillaumin J, Cooper ES, Couto CG. Effects of hematocrit and red blood cell-independent viscosity on canine thromboelastographic tracings. *Transfusion* 2014;54:727–734.
41. Flint SK, Abrams-Ogg AC, Kruth SA, et al. Independent and combined effects of prednisone and acetylsalicylic acid on thromboelastography variables in healthy dogs. *Am J Vet Res* 2011;72:1325–1332.
42. Zanuzzo FS, Teixeira-Neto FJ, Thomazini CM, et al. Effects of dipyron, meloxicam, or the combination on hemostasis in conscious dogs. *J Vet Emerg Crit Care* 2015;25:512–520.
43. Wüinberg B, Jensen AL, Johansson PI, et al. Thromboelastographic evaluation of hemostatic function in dogs with disseminated intravascular coagulation. *J Vet Intern Med* 2008;22:357–365.
44. Armentano RA, Bandt C, Schaer M, et al. Thromboelastographic evaluation of hemostatic function in dogs treated for crotalid snake envenomation. *J Vet Emerg Crit Care* 2014;24:144–153.
45. Goggs R, Wüinberg B, Kjelgaard-Hansen M, Chan DL. Serial assessment of the coagulation status of dogs with immune-mediated haemolytic anaemia using thromboelastography. *Vet J* 2012;191:347–353.
46. Massberg S, Grahl L, von Bruehl ML, et al. Reciprocal coupling of coagulation and innate immunity via neutrophil serine proteases. *Nat Med* 2010;16:887–896.
47. Midence JN, Leutenegger CM, Chandler AM, Goldstein RE. Effects of recent *Leptospira* vaccination on whole blood real-time PCR testing in healthy client-owned dogs. *J Vet Intern Med* 2012;26:149–152.
48. Minke JM, Bey R, Tronel JP, et al. Onset and duration of protective immunity against clinical disease and renal carriage in

dogs provided by a bi-valent inactivated leptospirosis vaccine. *Vet Microbiol* 2009;137:137–145.

49. Wüinberg B, Jensen AL, Johansson PI, et al. Development of a model based scoring system for diagnosis of canine

disseminated intravascular coagulation with independent assessment of sensitivity and specificity. *Vet J* 2010;185: 292–298.



Contents lists available at ScienceDirect

## The Veterinary Journal

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/tvj](http://www.elsevier.com/locate/tvj)

## Short Communication

## Differences between coagulation and cytokine profiles in dogs of different ages



A. Barthélemy<sup>a,b,\*</sup>, B. Rannou<sup>c</sup>, M. Forterre<sup>a,b</sup>, P. Verwaerde<sup>a,d</sup>, J.-M. Bonnet-Garin<sup>b</sup>, C. Pouzot-Nevoret<sup>a,b</sup>, I. Goy-Thollot<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup> Intensive Care Unit (SIAMU), VetAgro Sup Campus Vétérinaire de Lyon, Université de Lyon, Marcy l'Etoile, France

<sup>b</sup> EA4174 Sepsis, Inflammation, Hémostasie, VetAgro Sup Campus Vétérinaire de Lyon, Université de Lyon, Marcy l'Etoile, France

<sup>c</sup> Laboratoire de Biologie Médicale, VetAgro Sup Campus Vétérinaire de Lyon, Université de Lyon, Marcy l'Etoile, France

<sup>d</sup> Critical and Intensive Care and Anaesthesia, Veterinary School of Toulouse, Toulouse, France

## ARTICLE INFO

## Article history:

Accepted 17 May 2015

## Keywords:

Ageing  
Coagulation  
Cytokines  
Dog  
Thromboelastometry

## ABSTRACT

In human medicine, age is a risk factor for thromboembolic diseases associated with hypercoagulable and antifibrinolytic states, but information in veterinary medicine is limited. This study compared the thromboelastometric (TEM) profiles of two groups of dogs of distinct ages. Ten healthy old (>10 years) Beagles and 10 healthy young (<3 years) Beagles were recruited. White blood cell counts and haematocrit were significantly lower in the old group compared to the young group, and fibrinogen, total proteins, globulins and monocyte chemoattractant protein-1 plasma concentrations were significantly higher in the old group. Comparisons of the TEM profiles indicated a hypercoagulable profile and a decrease in fibrinolytic activity in all old Beagles. The findings support the need to consider age as a possible risk factor for thrombosis in dogs.

© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

The process of ageing in humans is accompanied by alterations in the blood coagulation system with the development of a hypercoagulable state and an antifibrinolytic state (Mari et al., 1995; Ferrucci et al., 2005). These changes are enhanced by predisposing factors such as the development of low-grade inflammation characterised by elevated plasma cytokine levels (Inadera et al., 1999). Some human studies have demonstrated hypercoagulability in the elderly using viscoelastic tests (Ng, 2004; Roeloffzen et al., 2010) but this approach has not been used to assess the influence of ageing on coagulation ability in dogs. The present study compared the thromboelastometric (TEM) and cytokine profiles of two groups of dogs of distinct ages.

The Animal Care Committee of the veterinary campus of Lyon approved this study (number 1266; 27 September 2012). Ten old laboratory Beagles (>10 years of age; mean, 134.5 months; range, 128–148 months; nine males, one female) and 10 young laboratory adult Beagles (<3 years of age; mean, 26.5 months; range, 21–35 months; five males, five females) were recruited. The old group and the young group were obtained from different breeders.

Venipuncture of the jugular vein using a 23 G needle connected to a syringe was used to collect 10 mL of venous whole blood from each dog. Automated analysers were used to obtain blood cell counts (Xt-2000IV, Sysmex), serum biochemical analyses (Konelab 30i, Thermo

Fisher) and classic coagulation profiles (Coag Dx, IDEXX). Cytokine plasma concentrations were determined using a canine-specific multiplex assay that included internal control material (CCYTOMAG-90K, Millipore) on an automated analyser (Bio-Plex 200, Bio-Rad). The TEM assay (ROTEM, Pentapharm) was performed according to recent Partnership on Rotational ViscoElastic Test Standardisation (PROVETS) recommendations (Flatland et al., 2014). Three profiles were evaluated: (1) intrinsic TEM (inTEM) profile to evaluate the intrinsic pathway; (2) extrinsic TEM (exTEM) to evaluate the extrinsic pathway, and (3) fibrinogen function TEM (fibTEM) profile.

The normal distribution and homogeneity of the variances were examined using the Shapiro–Wilk test and Fisher–Snedecor test, respectively. Intergroup comparisons were performed using a parametric (Student's unpaired *t* test) or non-parametric (Mann–Whitney *U* test) two-sided test. A *P* value <0.05 was considered significant. All analyses were performed using commercial software (XLSTAT v2012, Addinsoft).

Haematocrit and white blood cell counts were significantly lower in old dogs. Plasma fibrinogen, total protein and globulin levels were significantly higher in old dogs, and prothrombin time and plasma albumin levels were significantly reduced (see Appendix: Supplementary Table S1). Of the plasma cytokine concentrations, only the increase in monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in old dogs was significant (*P* = 0.002) (see Appendix: Supplementary Table S2). As shown in Table 1, clotting time (CT), clot formation time (CFT) and maximum lysis of the exTEM assay were significantly lower in old dogs compared to young dogs, but amplitude

\* Corresponding author. Tel.: +33 4 78 87 07 07.

E-mail address: [anthony.barthelemy@vetagro-sup.fr](mailto:anthony.barthelemy@vetagro-sup.fr) (A. Barthélemy).

**Table 1**  
Comparison of extrinsic thromboelastometric profiles between young and old dogs.

exTEM parameter	Young dogs (n = 10)				Old dogs (n = 10)				P value
	Median	Mean	Range	SD	Median	Mean	Range	SD	
CT (s)	46.5		36–63		35		32–39		<0.001
A10 (mm)		55.3		4.8		67.7		4.3	<0.001
CFT (s)		94.7		15.5		64.3		12.0	<0.001
MCF (mm)		65.3		5.4		74.8		3.1	<0.001
$\alpha$ (°)		71.3		3.2		78.1		2.5	<0.001
Li45 (%)	100		75–100		100		99–100		0.234
Li60 (%)	97		66–99		98		97–99		0.009
ML (%)	10		2–27		4		1–9		0.019
TEG-G <sup>a</sup> (dynes/cm <sup>2</sup> )		9,618		1,795		15,106		2,425	<0.001
ROTEM-TPI <sup>b</sup>		2.1		0.7		5.0		1.6	<0.001

CT, clotting time; A10, amplitude 10 min after CT; CFT, clot formation time; exTEM, extrinsic thromboelastometry; Li45, lysis index 45 min after CT; Li60, lysis index 60 min after CT; MCF, maximum clot firmness; ML, maximum lysis; ROTEM-TPI, thrombodynamic potential index; SD, standard deviation; TEG-G, shear elastic modulus strength.

<sup>a</sup> TEG-G =  $(5000 \times \text{MCF}) / (100 - \text{MCF})$ .

<sup>b</sup> ROTEM-TPI =  $(100 \times \text{MCF}) / (100 - \text{MCF}) / \text{CFT}$ .

10 min after CT (A10), maximum clot firmness (MCF),  $\alpha$  angle and Li60 (lysis index 60 min after CT) were significantly higher. CFT and ML in the inTEM assay were significantly lower in old dogs, but A10, MCF,  $\alpha$  and Li60 were significantly higher (Table 2). ML in the fibTEM assay was significantly lower in old dogs, but A10, MCF,  $\alpha$  and lysis index 45 min after CT were significantly higher (Table 3). The reference intervals for exTEM, inTEM and fibTEM parameters are shown in Appendix: Supplementary Table S3.

The present study is the first to demonstrate the occurrence of a hypercoagulable profile with advancing age in dogs using a TEM approach as previously reported for humans (Ng, 2004; Roeloffzen et al., 2010). Old dogs exhibited a faster rate of fibrin formation and greater ultimate clot strength with better viscoelastic properties. The decrease in haematocrit and the associated increase in fibrinogen plasma levels seemed to be the major factors contributing to the hypercoagulability profile of old healthy dogs. Two studies have

already reported a tendency towards hypercoagulability in TEM parameters associated with a decrease in red cell mass in canine models (Smith et al., 2012; McMichael et al., 2014). However, McMichael et al. (2014) suggested that hypercoagulability induced by decreased haematocrit may be a nonspecific influence in viscoelastic tests.

As in human medicine, the development of low-grade inflammation related to age and characterised by increased plasma fibrinogen, pro-inflammatory cytokines, and globulin levels may be another mechanism underlying the hypercoagulable profile observed in old dogs (Inadera et al., 1999; Ferrucci et al., 2005). The increase in MCP-1 concentration supports the putative involvement of inflammation in age-related hypercoagulability in dogs. This observation is consistent with a previous study that demonstrated that MCP-1 was the sole cytokine that was significantly higher in dogs with low-grade inflammation, such as initial congestive heart failure (Zois et al., 2012).

**Table 2**  
Comparison of intrinsic thromboelastometric profiles between young and old dogs.

inTEM parameter	Young dogs (n = 10)				Old dogs (n = 10)				P value
	Median	Mean	Range	SD	Median	Mean	Range	SD	
CT (s)		169.5		28.0		177.2		42.4	0.638
A10 (mm)		52.7		6.2		65.2		4.1	<0.001
CFT (s)		73.9		18.7		50.8		11.3	0.005
MCF (mm)		65.2		3.3		72.8		2.5	<0.001
$\alpha$ (°)		75.2		3.4		79.6		2.5	0.004
Li45 (%)	100		99–100		100		99–100		1.000
Li60 (%)		96.8		1.3		98.7		1.0	0.002
ML (%)	7		2–16		3		1–7	2.1	0.004

CT, clotting time; A10, amplitude 10 min after CT; CFT, clot formation time; inTEM, intrinsic thromboelastometry; Li45, lysis index 45 min after CT; Li60, lysis index 60 min after CT; MCF, maximum clot firmness; ML, maximum lysis; SD, standard deviation.

**Table 3**  
Comparison of fibrinogen function thromboelastometric profiles between young and old dogs.

fibTEM parameter	Young dogs (n = 10)				Old dogs (n = 10)				P value
	Median	Mean	Range	SD	Median	Mean	Range	SD	
CT (s)	37		31–66		34		31–43		0.111
A10 (mm)	10		8–1		22.5		13–41		<0.001
CFT (s)		NA		NA		60.4		36.5	NA
MCF (mm)		12.10		3.18		25.50		7.52	<0.001
$\alpha$ (°)		NA		NA		79.9		2.9	NA
Li45 (%)		78.7		9.6		86.6		5.4	0.039
Li60 (%)		78.7		10.6		86.9		6.7	0.055
ML (%)		26.9		8.4		15.7		5.6	0.003

CT, clotting time; A10, amplitude 10 min after CT; CFT, clot formation time; fibTEM, fibrinogen function thromboelastometry; Li45, lysis index 45 min after CT; Li60, lysis index 60 min after CT; MCF, maximum clot firmness; ML, maximum lysis; NA, not applicable; SD, standard deviation.

Concurrent with age-related hypercoagulability, we found that age also influenced fibrinolysis. Consistent with several human studies (Mari *et al.*, 1995; Ferrucci *et al.*, 2005), fibrinolysis was slower and less intense in old dogs in the three TEM assays. The exact mechanism underlying these changes has not been elucidated, but the age-related decrease in fibrinolytic activity may contribute to thrombotic events in old dogs.

There are some limitations to our study. The first limitation is the small sample size, which decreased the power of the statistical tests. Second, the different sex distributions of the two groups could affect the interpretation of our results, although we previously demonstrated no influence of sex on TEM profiles in healthy Beagles (Barthélemy *et al.*, 2014). Third, the study was performed only in laboratory Beagles, and it is unclear whether our results can be extrapolated to other breeds or to pet dogs. Finally, with the exception of TEM profiles, no fibrinolysis parameter was measured. Further studies should confirm our preliminary observations using a more complete fibrinolysis profile.

In conclusion, this study has demonstrated an age-related hypercoagulable profile that was associated with decreased fibrinolysis ability in dogs as assessed using a TEM approach. Low-grade inflammation seemed to be involved, but relationships between increased plasma pro-inflammatory cytokine plasma concentrations and hypercoagulability must be further investigated in a larger population of old dogs. The incidence of thromboembolic diseases remains to be established in old dogs, but age should be considered a primary risk factor.

#### Conflict of interest statement

None of the authors of this paper has a financial or personal relationship with other people or organisations that could inappropriately influence or bias the content of the paper.

#### Acknowledgements

Preliminary results were presented as an oral short communication at the 14th Congress of European Veterinary Emergency and Critical Care Society, Prague, 13–15 June 2014.

The authors are grateful to Dr. Jean-Jacques Thiébaud and Faustine Riou for their technical assistance and Sonja Frenzel of Novartis for measuring plasma cytokine concentrations.

#### Appendix: Supplementary material

Supplementary data to this article can be found online at doi:10.1016/j.tvjl.2015.05.012.

#### References

- Barthélemy, A., Rannou, B., Verwaerde, P., Forterre, M., Pouzot-Névolet, C., Bonnet-Garin, J.M., Goy-Thollot, I., 2014. Establishment of reference intervals for extrinsic rotational thromboelastometry (exTEM) parameters in normal dogs: Assessment of sex and blood components influences. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care* 24, S32. (Abstract).
- Ferrucci, L., Corsi, A., Lauretani, F., Bandinelli, S., Bartali, B., Taub, D.D., Guralnik, J.M., Longo, D.L., 2005. The origins of age-related proinflammatory state. *Blood* 105, 2294–2299.
- Flatland, B., Koenigshof, A.M., Rozanski, E.A., Goggs, R., Wiinberg, B., 2014. Systematic evaluation of evidence on veterinary viscoelastic testing Part 2: Sample acquisition and handling. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care* 24, 30–36.
- Inadera, H., Egashira, K., Takemoto, M., Ouchi, Y., Matsushima, K., 1999. Increase in circulating levels of monocyte chemoattractant protein-1 with aging. *Journal of Interferon and Cytokine Research* 19, 1179–1182.
- Mari, D., Mannucci, P.M., Coppola, R., Bottasso, B., Bauer, K.A., Rosenberg, R.D., 1995. Hypercoagulability in centenarians: The paradox of successful aging. *Blood* 85, 3144–3149.
- McMichael, M.A., Smith, S.A., Galligan, A., Swanson, K.S., 2014. In vitro hypercoagulability on whole blood thromboelastometry associated with in vivo reduction of circulating red cell mass in dogs. *Veterinary Clinical Pathology* 43, 154–163.
- Ng, K.F., 2004. Changes in thromboelastograph variables associated with aging. *Anesthesia and Analgesia* 99, 449–454.
- Roeloffzen, W.W., Kluin-Nelemans, H.C., Mulder, A.B., Veeger, N.J., Bosman, L., de Wolf, J.T., 2010. In normal controls, both age and gender affect coagulability as measured by thromboelastography. *Anesthesia and Analgesia* 110, 987–994.
- Smith, S.A., McMichael, M.A., Gilor, S., Galligan, A.J., Hoh, C.M., 2012. Correlation of hematocrit, platelet concentration, and plasma coagulation factors with results of thromboelastometry in canine whole blood samples. *American Journal of Veterinary Research* 73, 789–798.
- Zois, N.E., Moesgaard, S.G., Kjelgaard-Hansen, M., Rasmussen, C.E., Falk, T., Fossing, C., Häggström, J., Pedersen, H.D., Olsen, L.H., 2012. Circulating cytokine concentrations in dogs with different degrees of myxomatous mitral valve disease. *The Veterinary Journal* 192, 106–111.



Contents lists available at ScienceDirect

The Veterinary Journal

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/tvj](http://www.elsevier.com/locate/tvj)

## Short Communication

## Enoxaparin has no significant anticoagulation activity in healthy Beagles at a dose of 0.8 mg/kg four times daily

Céline Pouzot-Nevoret<sup>a,b,c,\*</sup>, Anthony Barthélemy<sup>a,b,c</sup>, Marianne Cluzel<sup>a,b</sup>, Patrick Verwaerde<sup>a,d</sup>, Jeanne-Marie Bonnet-Garin<sup>b,c</sup>, Isabelle Goy-Thollot<sup>a,b,c</sup><sup>a</sup> Intensive Care Unit (SIAMU), VetAgro Sup campus vétérinaire de Lyon, Université de Lyon, Marcy l'Etoile, France<sup>b</sup> EA4174 Sepsis, Inflammation, Hémostase, VetAgro Sup campus vétérinaire de Lyon, Université de Lyon, France<sup>c</sup> APCSe Aggressions Pulmonaires et Circulatoires dans le Sepsis, Marcy l'Etoile, France<sup>d</sup> Critical and Intensive Care and Anaesthesia, Veterinary School of Toulouse, Toulouse, France

## ARTICLE INFO

## Article history:

Accepted 27 January 2016

## Keywords:

Anticoagulation  
Dog  
Enoxaparin  
Low-molecular-weight heparin  
Thromboelastometry

## ABSTRACT

Enoxaparin at 0.8 mg/kg every 6 h is used in dogs to prevent prothrombotic events, but has only been validated in healthy Greyhounds, a breed with documented hypocoagulable haemostatic profiles in vitro and bleeding tendencies in vivo. This study investigated the effects of enoxaparin at this dose rate on the coagulation parameters of eight healthy adult Beagles over a 48 h period. Anti-Xa activity was significantly increased 3 h after the second and third of nine injections, and target anti-Xa activity was only reached transiently in 3/8 dogs. Paradoxically, a transient increase in endogenous thrombin potential was observed 6 h after the third injection. Other haematologic, biochemical and coagulation parameters were not significantly altered from the baseline values during enoxaparin treatment ( $P > 0.05$ ). This study suggests that assumptions regarding the pharmacodynamic effects of enoxaparin are not generalisable across breeds.

© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Low-molecular-weight heparin (LMWH) has been adopted for primary prophylaxis in dogs at risk for thrombosis (Breuhl et al., 2009). The dose rates of LMWH used in dogs are mostly based on human pharmacokinetic and/or empirical data. However, the pharmacokinetics of enoxaparin in normal dogs differ from those in humans, challenging the use of these extrapolated doses (Lunsford et al., 2009; Kidd and Mackman, 2013). Lunsford et al. (2009) have shown a significant effect of enoxaparin at 0.8 mg/kg administered SC four times daily in healthy Greyhounds, whose specific physiological and haematological characteristics differ from those of other canine breeds (Vilar et al., 2008; Lunsford et al., 2009). The present study described the effect of enoxaparin using a large panel of coagulation tests in healthy dogs.

The Animal Care Committee of the veterinary campus of Lyon approved this study (Reference Number 1363; 12 November 2013). Healthy laboratory male Beagles (1–2 years old; bodyweight, 9–11 kg) were used in this study.

Nine SC injections of enoxaparin at 0.8 mg/kg (Lovenox, Sanofi-Aventis) were scheduled every 6 h over 48 h (Fig. 1). Jugular venepuncture was performed using 21 G needles connected to a vacutainer to collect several blood samples (Fig. 1).

\* Corresponding author. Tel.: +33 6 82 74 34 05.

E-mail address: [celine.pouzotnevoret@vetagro-sup.fr](mailto:celine.pouzotnevoret@vetagro-sup.fr) (C. Pouzot-Nevoret).

Automated analysers were used to obtain blood cell counts (Xt-2000iV, Sysmex), serum biochemical analyses (Konelab 30i, Thermo Fisher), prothrombin time (PT) and activated partial thromboplastin time (aPTT; Coag Dx, IDEXX), four profiles (exTEM, inTEM, fibTEM and hepTEM) of thromboelastometric assays (ROTEM, Pentapharm, performed according to recent PROVETS recommendations; Flatland et al., 2014) and for the measurement of anti-Xa activity, anti-thrombin activity, fibrinogen concentration (Destiny Max, Stago), thrombin generation and endogenous thrombin potential (ETP; Fluoroscan, Stago, performed on platelet-poor plasma as previously described by Allegret et al., 2011). This large panel of coagulation tests was used to ensure that the dogs had no coagulation abnormalities prior to treatment, and because some parameters, such as fibrinogen, haematocrit and platelet count, are known to influence the ROTEM results (Goggs et al., 2014).

The normal distribution and homogeneity of the variances were examined using the Shapiro–Wilk test and Bartlett test, respectively. A repeated-measures parametric analysis of variance (ANOVA) followed by a multiple comparison test (Tukey post-hoc test), or a non-parametric approach using a Friedman test or a Kruskal–Wallis test, was conducted if both hypotheses were verified or not, respectively. Statistical analysis was performed using commercial software (XLSTAT v2014, Addinsoft) and  $P < 0.05$  was considered statistically significant.

During the study period, clinical parameters and CBCs remained normal in all dogs, and no evidence of haemorrhagic

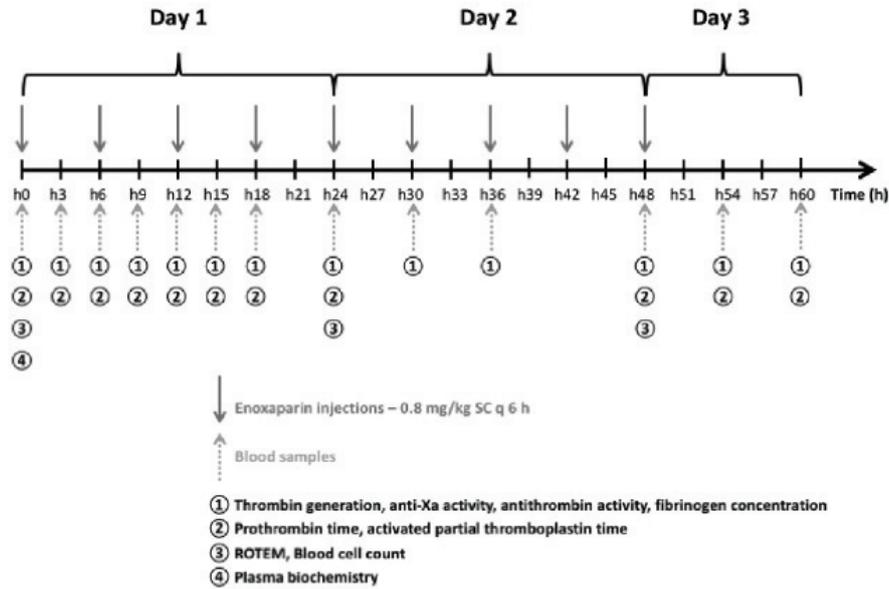


Fig. 1. Experimental protocol.

complications were observed. Biochemical profiles in all dogs were within the reference range.

No significant changes in PT, aPTT, ROTEM parameters, fibrinogen concentrations or antithrombin activity were observed during the 48 h enoxaparin treatment (Appendix: Supplementary Tables S1–S5). Six hours after the third enoxaparin injection (h18), a significant increase in plasma ETP was observed compared to baseline values ( $P = 0.02$ ). This ETP peak was transient. All other ETP values did not differ significantly from baseline values (Table 1).

Compared with the baseline values, there was only a significant increase in anti-Xa activity 3 h after the second and third injections ( $P < 0.01$ , Table 2). Only three of eight dogs reached the target range of 0.5–1 U/mL used in human medicine for relevant heparin therapeutic effect. There was increased anti-Xa activity at

3 h after the second (h9;  $n = 1$ ) and the third (h15;  $n = 1$ ) injections, and just before the third injection (h12;  $n = 1$ ; Table S4).

Lunsford et al. (2009) reported that the target levels of anti-Xa activity were maintained in normal Greyhounds by the administration of enoxaparin at 0.8 mg/kg SC every 6 h, hence the choice of this dose in this study. However, Greyhounds are known to have haematological parameters (including increased packed cell volume and decreased platelet counts) that differ from those of other breeds, and tend to exhibit slower clotting kinetics and weaker clot strength (Vilar et al., 2008; Lunsford et al., 2009). Abnormal post-operative bleeding in Greyhounds, possibly due to enhanced fibrinolysis, has also been described (Marin et al., 2012). Considering these findings, our study aimed to assess this dose in healthy dogs other than Greyhounds. A significant increase in anti-Xa activity was ob-

**Table 1**  
Changes (mean ± standard deviation, SD) in endogenous thrombin potential (ETP; nM/min) with associated global  $P$  and  $P$  vs. h18.

ETP	Time point (h after first injection)												Global $P$	
	EI1		EI2		EI3		EI4	EI5	EI6	EI7	EI9			
	h0	h3	h6	h9	h12	h15	h18	h24	h30	h36	h48	h56		h60
Mean	309.3	245.6	378.7	248.0	315.4	391.3	472.5	278.1	279.0	304.4	292.6	295.2	330.6	<0.01
SD	85.0	59.9	77.3	77.8	56.2	79.5	76.4	46.4	47.0	55.3	52.4	64.0	43.7	
$P$ vs. h18	0.02	<0.01	0.27	<0.01	<0.01	0.57	1.00	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	

EI, Enoxaparin injection followed by its number in the experimental protocol.

**Table 2**  
Changes (mean ± standard deviation, SD) in anti-Xa activity (U/mL; reference range < 0.15) with associated global  $P$  and  $P$  compared with h0.

Anti-Xa	EI and time point (h after first injection)												Global $P$	
	EI1		EI2		EI3		EI4	EI5	EI6	EI7	EI9			
	h0	h3	h6	h9	h12	h15	h18	h24	h30	h36	h48	h56		h60
Mean	0.15	0.21	0.03	0.40	0.23	0.35	0.18	0.14	0.14	0.22	0.17	0.16	0.05	<0.01
SD	0.18	0.1	0.08	0.17	0.27	0.11	0.15	0.12	0.12	0.11	0.12	0.11	0.08	
$P$ vs. h0	1	0.32	0.12	<0.01	0.72	<0.01	0.98	0.95	0.75	0.25	0.85	0.87	0.12	

EI, Enoxaparin injection followed by its number in the experimental protocol.

served transiently, 3 h after the second and third of the nine heparin injections. Because the increase in anti-Xa activity was short-lived, it is unlikely this dosing regimen would have thromboprophylactic effects in healthy beagles.

During enoxaparin treatment, no dogs exhibited evidence of clinical bleeding, confirming the findings of previous studies (Lunsford et al., 2009; Scott et al., 2009). Additionally, no ROTEM parameters changed significantly from baseline values after heparin administration. This finding might be attributable to either a lack of enoxaparin efficacy at the administered dose and/or a lack of sensitivity by thromboelastometry. Indeed, based on anti-Xa activity, supratherapeutic levels of another LMWH (dalteparin) were required to alter ROTEM parameters in an in vitro study (Feuring et al., 2011).

Our study did not demonstrate significant changes in PT and aPTT. This was to be expected because these coagulation tests have poor sensitivity and specificity for mild disturbances of coagulation (Allegret et al., 2011). Furthermore, unlike unfractionated heparin, LMWH does not prolong aPTT (Lunsford et al., 2009).

The results of the present study did not reveal any significant decrease in thrombin generation following enoxaparin administration in healthy dogs. The baseline ETP varied from 156.28 to 462.27 nM/min, illustrating the variation in thrombin generation between dogs. These results are similar to those reported by Allegret et al. (2011) during unfractionated heparin therapy monitoring. Paradoxically, a significant increase in ETP was observed in all dogs 6 h after the third injection (h18), a phenomenon that has been described previously with heparin therapy in dogs (Allegret et al., 2011). Whether this is clinically relevant or not is unknown.

Our study had some limitations. Firstly, sample size was small. However, Lunsford et al. (2009) demonstrated significant anticoagulant activity of enoxaparin in a group of seven dogs; therefore it is reasonable to assume that a similar effect would be observed in this study. Secondly, transient modifications in anti-Xa activity and parameters associated with thrombin generation were measured at 3 h intervals. Thus, it is possible that changes in anti-Xa activity and ETP could have occurred between sampling intervals, but been undetected. However, if such transient effects occurred, they were unlikely to be clinically relevant. The sex distribution of our study population (only males) might also have affected our results. However, we previously observed no influence of sex on ROTEM profiles in healthy Beagles (unpublished data). Finally, this study was performed only in young adult Beagles, and the results should be extrapolated with caution to other canine breeds or to old and/or unhealthy animals.

Our study demonstrated that an enoxaparin dose of 0.8 mg/kg SC four times daily was safe, but did not maintain the anti-Xa activity level within our predetermined target range. This calls into question the efficacy of dosing enoxaparin at 0.8 mg/kg every 6 h in non-Greyhound dogs, and supports other studies suggesting that monitoring of anti-Xa activity is advisable in individual dogs receiving LMWH (Kidd and Mackman, 2013). Moreover, the transient hypercoagulability observed in our study, as well as its clinical significance, should be investigated further. The determination of an efficacious dose rate in healthy and critically ill dogs appears to be

a major challenge in veterinary critical care medicine. Further investigation of the pharmacodynamic effects of enoxaparin in healthy and critically ill dogs is warranted.

#### Conflict of interest statement

None of the authors of this paper has a financial or personal relationship with people or organisations that could inappropriately influence or bias the content of this paper.

#### Acknowledgements

The authors are grateful to Professor Claude Négrier and Dr Benoit Rannou for offering technical support. The authors also thank Stéphanie Francillon, Sylvie Marin, Martine Mazet and Brigitte Chatard for analysing blood samples (anti-Xa activity, thrombin generation and antithrombin activity and fibrinogen concentration). We also wish to thank l'Institut Claude Bourgelat (ICLB) for dog handling and assistance during the collection of blood samples.

#### Appendix: Supplementary material

Supplementary data to this article can be found online at doi:10.1016/j.tvjl.2016.01.018.

#### References

- Allegret, V., Dunn, M., Bedard, C., 2011. Monitoring unfractionated heparin therapy in dogs by measuring thrombin generation. *Veterinary Clinical Pathology* 40, 24–31.
- Breuhl, E.L., Moore, G., Brooks, M.B., Scott-Moncrieff, J.C., 2009. A prospective study of unfractionated heparin therapy in dogs with primary immune-mediated haemolytic anemia. *Journal of the American Animal Hospital Association* 45, 125–133.
- Feuring, M., Wehlin, M., Schultz, A., 2011. Dalteparin dose-dependently increases ROTEM thrombelastography parameters only at supratherapeutic anti-factor Xa levels: An in vitro study. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 38, 783–786.
- Flatland, B., Koenigshof, A.M., Rozanski, E.A., Goggs, R., Wiinberg, B., 2014. Systematic evaluation of evidence on veterinary viscoelastic testing Part 2: Sample acquisition and handling. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care* 24, 30–36.
- Goggs, R., Brainard, B., de Laforcade, A., Flatland, B., Hanel, R., McMichael, M., Wiinberg, B., 2014. Partnership on Rotational ViscoElastic Test Standardization (PROVETS): Evidence-based guidelines on rotational viscoelastic assays in veterinary medicine. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care* 24, 1–22.
- Kidd, L., Mackman, N., 2013. Prothrombotic mechanisms and anticoagulant therapy in dogs with immune-mediated hemolytic anemia. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care* 23, 3–13.
- Lunsford, K.V., Mackin, A.J., Langston, V.C., Brooks, M., 2009. Pharmacokinetics of subcutaneous low molecular weight heparin (enoxaparin) in dogs. *Journal of the American Animal Hospital Association* 45, 261–267.
- Marin, L.M., Iazbik, M.C., Zaldivar-Lopez, S., Guillaumin, J., McLoughlin, M.A., Couto, C.G., 2012. Epsilon aminocaproic acid for the prevention of delayed postoperative bleeding in retired racing greyhounds undergoing gonadectomy. *Veterinary Surgery* 41, 594–603.
- Scott, K.C., Hansen, B.D., DeFrancesco, T.C., 2009. Coagulation effects of low molecular weight heparin compared with heparin in dogs considered to be at risk for clinically significant venous thrombosis. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care* 19, 74–80.
- Vilar, P., Couto, C.G., Westendorf, N., Iazbik, C., Charske, J., Marin, L., 2008. Thromboelastographic tracings in retired racing greyhounds and in non-greyhound dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 22, 374–379.

# ESTABLISHMENT OF REFERENCE INTERVALS FOR EXTRINSIC ROTATIONAL THROMBOELASTOMETRY (EXTEM®) PARAMETERS IN NORMAL DOGS: ASSESSMENT OF SEX AND BLOOD COMPONENTS INFLUENCES



Anthony Barthélemy<sup>1,2</sup>, Benoît Rannou<sup>3</sup>, Patrick Verwaerde<sup>4</sup>, Marie Forterre<sup>1,2</sup>, Céline Pouzot-Névoret<sup>1,2</sup>, Jeanne-Marie Bonnet-Garin<sup>2</sup>, Isabelle Goy-Thollot<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Intensive Care Unit (SIMMU), VetAgro Sup veterinary campus of Lyon, Université de Lyon, Marcy l'Etoile, France  
<sup>2</sup>EA174 Sepak, Inflammation, Hémostase, VetAgro sup veterinary campus of Lyon, Université de Lyon, Marcy l'Etoile, France  
<sup>3</sup>Clinical pathology laboratory, VetAgro Sup veterinary campus of Lyon, Université de Lyon, Marcy l'Etoile, France  
<sup>4</sup>Critical and intensive care and anaesthetics, Veterinary School of Toulouse, Toulouse, France

## INTRODUCTION

Veterinary patients with hemostasis disorders are frequently presented to emergency and critical care practices. Rotational thromboelastometry (ROTEM®) as thromboelastography (TEG®) has recently been introduced in veterinary medicine to diagnose blood coagulability disorders. However, reference intervals of TEM parameters have never been assessed in a large number of dogs. The aim of this prospective study was to establish reference intervals for extrinsic thromboelastometry (exTEM) parameters in healthy dogs. In addition, the impact of sex and the influence of protein plasma levels and complete blood count (CBC) were evaluated.

## MATERIAL AND METHODS

This study was conducted in 33 adult dogs (17 intact males, 6 neutered males, 22 intact females, and 8 spayed females) aged between 12 and 114 months, including student or staff-owned dogs and blood donors. Inclusion criteria were a normal physical exam and CBC, prothrombin time and activated partial thromboplastin time within normal limits. Blood samples were collected from the jugular vein using a 23G needle connected to a 5mL syringe pre-filled with 3.2% buffered sodium citrate in a strict 1:9 ratio of citrate to blood. ROTEM® was performed exactly 30 minutes after blood sampling. Five exTEM measured variables (figure 1) and two calculated indices (TEG-G reflecting the global clot stability and ROTEM-TPI, the thrombodynamic potential index) were evaluated, and reference intervals were defined using the 0.025 and 0.975 percentiles of each parameters.

Sex influences were evaluated using an exact Fisher-test. A simple linear regression approach was also performed after exam of Gaussian distribution using Shapiro-Wilk Test. Linear relationships between exTEM parameters and white blood cell (WBC) ( $10^9/L$ ), hematocrit (%), platelets count ( $10^9/L$ ) and plasma total solids (g/L) were established using spearman coefficient determination. Statistical analysis was performed using XLStat® software. P value < 0.05 was considered as significant.

## RESULTS

Reference intervals for exTEM measured variables were defined in figure 1. For the two calculated indices, reference intervals were defined as: TEG-G [ $4.025-11.129$  kdyn/ $mm^2$ ] and ROTEM-TPI [ $0.38-2.81$  mm/s]. Sex had no significant influence on measured or calculated exTEM parameters. In normal dogs, CT values were significantly and positively associated only with hematocrit values. A10, CFT, MCF and alpha values were significantly associated with WBC, platelets count and plasma total solids respectively (figure 3).

## CONCLUSION

Beyond the first establishment of reference intervals for exTEM parameters in normal dogs, these results showed that hematocrit, WBC, platelets count and plasma total solids values significantly influence parameters describing the hemostatic profile obtained by ROTEM®. Those results are particularly relevant and are strongly suggesting that those blood parameters should be examined to avoid misinterpretation of data and profiles obtained by thromboelastometry/graphy.

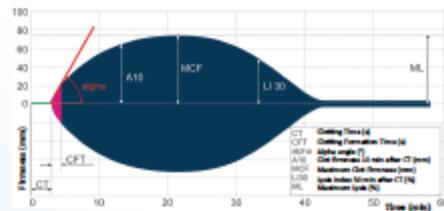


Fig. 1: Measured exTEM variables

	CT (s)	A10 (mm)	CFT (s)	MCF (mm)
Mean	51.4	43.5	149.9	56.3
SD	11.6	8.0	44.7	6.7
Ref intervals	33.0 - 69.7	32.6 - 59.0	78.5 - 230.7	44.6 - 69.0

	α (°)	LA5 (%)	LA60 (%)	ML (%)
Mean	62.7	98.3	94.0	11.8
SD	6.6	4.2	7.7	12.2
Ref intervals	51.0 - 74.7	88.8 - 100.0	72.6 - 100.0	0.0 - 41.0

Fig. 2: Reference intervals for exTEM variables

	Hematocrit		WBC		Platelets count		Total solids	
	r <sup>2</sup>	P value	r <sup>2</sup>	P value	r <sup>2</sup>	P value	r <sup>2</sup>	P value
CT	0.97	0.024	0.96	0.825	0.84	0.513	5.56	0.089
A10	1.15	0.475	7.54	0.047	31.13	<0.001	18.10	0.002
CFT	1.10	0.452	7.99	0.041	29.80	<0.001	22.95	<0.001
MCF	1.32	0.412	0.73	0.050	30.72	<0.001	16.33	0.003
α	0.82	0.519	8.59	0.034	28.37	<0.001	22.43	<0.001

Fig. 3: Spearman rank order correlation coefficients (r<sup>2</sup>) and the associated P values of hematocrit, WBC, platelets count and plasma total solids with exTEM variables

## References

- Rattani, B., Kornegay, A.M., Rozanski, J.A., Soggs, R., Winkler, B., 2014. Systematic evaluation of evidence on veterinary clinical trials: testing Part 2: sample acquisition and handling. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care* 24, 80-86.
- Newburn, W.W., Klein-Renwick, H.C., Müller, A.B., Veeger, N.J., Roeman, L., de Wit, J.T., 2010. In normal controls, both age and gender affect coagulability as measured by thromboelastography. *Anesthesia & Analgesia* 110, 981-984.
- McMichael, M.A., Smith, S.A., Salzman, A., Swanson, K.S., 2014. In vitro hypercoagulability on whole blood thromboelastometry associated with in vivo reduction of circulating red cell mass in dogs. *Veterinary Clinical Pathology* DOI:10.1111/vcp.12127
- Smith, S.A., McMichael, M.A., Dixon, S., Salzman, A., Nair, C.M., 2013. Correlation of hematocrit, platelet concentration, and plasma coagulation factors with results of thromboelastometry in canine whole blood samples. *American Journal of Veterinary Research* 74, 788-793.

