

La tromboelastografia attivata con caolino nel cane sano ed in quello leishmaniotico

Ambrosio R., Sannino M.L.*, Borbone P.®, Cortese L.

Dipartimento di Scienze Cliniche Veterinarie – Sezione di Clinica Medica, Università degli Studi di Napoli Federico II - Italy

*Convenzionato ASL CE2

®Illa Università degli Studi di Napoli, Dipartimento di Cardiochirurgia Respiratoria – Azienda Ospedaliera Monaldi

SUMMARY

Kaolin-activated thromboelastography in healthy and leishmaniotic dogs

Thromboelastography (TEG) is an analytical method for assessing global hemostasis (1). When used together with specific activators such as Kaolin, Celite or Tissue Factor (2,4,5,12), this method can evaluate hemostatic disorders in dog, and this animal's predisposition to intravascular disseminated coagulation (DIC).

The objective of the present study is simplify the interpretation of data obtained from kaolin activated TEG analysis in dog. Reference values for kaolin activated TEG analysis in healthy dog, namely, for R, K, α , MA, G and C.I., have been specified in previous studies of dog (1) and man (2). The present study establishes its own reference values for kaolin activated TEG analysis in healthy dogs, and compares these reference values to kaolin activated TEG values found in leishmaniotic dogs. These latter values (Tab.2) are used to establish new reference values that indicate the presence of hyper-coagulation, an early stage of DIC often associated with leishmanosis (6,9).

KEYWORDS

Thromboelastography, hemostasis, leishmaniosis, dog

INTRODUZIONE

Ambrosio R., Sannino M.L.

La tromboelastografia è un esame che valuta tutti gli step dell'emostasi, compreso l'inizio del processo, la propagazione di questo ed infine la fibrinolisi; grazie all'uso di un attivatore specifico per noi il caolino questo esame dà informazioni su disordini emostatici e rileva nelle fasi iniziali la tendenza alla CID.

I valori medi dei parametri della tromboelastografia nel cane sano (R, K, α , MA, G) sono noti se si utilizza il fattore tissutale come attivatore (10,12) ma sono pochi i lavori nel quale si usa come attivatore il caolino per stabilire il range di normalità. (1) Il nostro studio ha come finalità quella di facilitare l'interpretazione dei dati forniti da laboratori che usano un attivatore diverso, quando la tecnica è utilizzata nel cane sano o in quello con disordini dell'emostasi come avviene in quello colpito da leishmaniosi. In base ai dati della letteratura i cani con leishmaniosi viscerale hanno disturbi emocoagulativi (6,9) che sono la causa della epistassi, dell'ematuria e della diarrea emorragica che spesso si riscontrano in questa patologia. Gli stessi autori indicano, inoltre, che nei cani con leishmaniosi viscerale si sviluppa una coagulazione intravasale disseminata che

nelle forme più gravi può diventare scompensata. La CID dei cani, come sappiamo, è caratterizzata da una notevole variabilità del profilo coagulativo (11) che non permette di trarre conclusioni definitive sull'emostasi generale; quest'ultima può essere valutata con test per l'emostasi primaria, come la conta piastrinica, e per l'emostasi secondaria, con test su plasma come l'aPTT (via intrinseca) e PT (via estrinseca). L'attività fibrinolitica è, invece, testata con la misura del fibrinogeno, dei prodotti di degradazione di quest'ultimo e dei D-dimeri. Con gli esami suddetti c'è diagnosi di CID, ma non si hanno risposte sulla capacità emostatica globale del soggetto e sul trattamento con farmaci anticoagulanti o pro coagulanti, specialmente se il cane è sospettato di essere in una fase d'ipercoagulabilità. Nel corso di CID è indispensabile per il clinico fare diagnosi quanto più precocemente possibile nello stadio d'ipercoagulabilità quando ancora non si evidenziano i sintomi della malattia, ciò è possibile con la tromboelastografia che permette di stabilire se un cane è in uno stato di ipo, iper o normocoagulabilità e quindi di indirizzare e monitorare la terapia.

MATERIALI E METODI

Animali

30 cani meticci di cui 10 sani all'esame clinico e con parametri emocoagulativi e biochimici nel range di normalità e 20 affetti da leishmania e risultati positivi all'esame sierologico (IFI, titolo > 1:80) e all'osservazione diretta del parassita su prelievi di midollo e di linfonodo, 4 di questi soggetti presentavano disturbi dell'emostasi (epistassi, diarrea emorragica, ematuria).

Campioni

Il sangue è stato ottenuto con puntura della giugulare e raccolto in una provetta da siero, due contenenti sodio citrato ed una EDTA. Il sangue della prima provetta è stato centrifugato e il siero utilizzato per valutare i principali parametri biochimici (AZ, CR, ALT, GPT; GLIC) e per un protidogramma (QPE), oltre che per l'esame sierologico (IFI); il sangue contenuto nella provetta con EDTA è stato utilizzato per l'emocromo e la conta piastrinica; il sangue raccolto nelle provette con sodio citrato in rapporto di 1:9 è stato utilizzato, quello della prima provetta, per il profilo emocoagulativo (Aptt, PT, fibrinogeno...) e quello della seconda per la tromboelastografia attivata con caolino.

Tromboelastografia

La TEG è stata eseguita utilizzando il tromboelastografo Analyzer 5000 (Hemoscope Corp., IL) dopo circa 30 minuti dal prelievo di sangue. Un millilitro di sangue è stato, a tal scopo, messo in una fiala contenente kaolino all'1%, che mediante delicati capovolgimenti viene mescolata per 5 volte per un' appropriata attivazione del campione. Dopo l'attivazione, 340µL di sangue sono stati pipettati in un bicchiere contenente 20µL di cloruro di calcio 0,2M e il campione così analizzato a 37° C. Il tracciato è stato automaticamente bloccato dopo 60 minuti fino alla definizione della massima ampiezza (parametro MA).

I risultati della Tromboelastografia sono stati ottenuti grazie al software del computer TEG e registrati per successivi esami.

Sono stati presi come punti di riferimento dell'attività coagulativa 6 parametri : R (tempo di reazione), K (tempo di coagulazione), α (angolo), MA (ampiezza massima), G e C.I. (indice di coagulazione). R è il periodo di latenza che porta alla formazione della fibrina; K misura il tempo impiegato dall'ampiezza del tracciato per passare da 2 a 20mm; α è l'angolo che si forma tra la linea mediana e la tangente al tracciato, mentre l'MA rappresenta l'ampiezza massima del tracciato e da questa si risale a G che da informazioni sulla stabilità del coagulo, e all'indice di coagulazione (C.I.) che viene definito dalla seguente equazione: $C.I. = -0.6516R - 0.3772K + 0.1224MA + 0.0759\alpha - 7.7922$.

In base ai valori di G e di C.I. i soggetti si possono dividere in tre gruppi: iper- ipo o normocoagulabili.

RISULTATI

I risultati della tromboelastografia nei cani sani e nei cani con leishmaniosi sono riportati in *Tab.1 e 2*.

Nei cani sani R variava da 1,2 a 6,9 con un valore

medio di 4,9; K oscillava tra 1,4 e 3 con valore medio di 2,27 mentre l'angolo (α) variava da 53,5 a 69,1 con valore medio di 59,8; i valori di MA avevano un range di 69,5 e 52,7 con 61,33 di media; infine G oscillava tra 11,4 e 5,6 con media di 7,8.

Nei cani con Leishmania in base al valore di G e di C.I. si riscontravano 5 (25%) soggetti ipercoagulabili (*Fig.1*), 3 ipocoagulabili (*Fig.2*) e 12 normocoagulabili (*Fig.3*). Dei 3 soggetti ipocoagulabili 2 presentavano disturbi dell'emostasi in particolare epistassi e ifema, mentre gli altri due soggetti con fenomeni emorragici erano normocoagulabili. In tutti e tre i gruppi i risultati delle prove emostatiche classiche erano normali mentre in 11(55%) soggetti vi era piastrinopenia e di questi 7 (63%) avevano un angolo di minor valore dei cani sani; più in particolare vi era una differenza statisticamente significativa tra ipo, iper e normocoagulabili per le piastrine e se si considerano i valori della TEG per MA, mentre il valore di α e quello di K variavano in modo significativo tra gli ipo ed ipercoagulabili e tra gli ipo e i normocoagulabili.

CONCLUSIONI E DISCUSSIONE

Il fatto che i valori di R del presente studio nei cani sani (*Tab. 1*) siano più bassi di quelli trovati nell'uomo⁽²⁾ indica che la risposta nel cane ad un possibile insulto emorragico è più rapida che nell'uomo.

Questo studio è originale perché usa la TEG attivata con Kaolino per accertare, grazie a valori di referenza per G e C.I., la presenza sia di una condizione di ipo che di iper o di normocoagulabilità nel cane. La presenza di una di queste condizioni coagulative permette di attuare alternative terapeutiche specifiche se c'è un eventuale diagnosi di leishmaniosi.

Quando si sospetta una DIC è molto importante, per il clinico, diagnosticarla in fase iniziale e non in fase conclamata (ipercoagulabilità), in questo caso i test classici per la coagulazione (Aptt,PT, Fibrinogeno) possono essere ambigui (*Tab. 3*) perché sono basati sull'esame del plasma, mentre la TEG si basa sia sul plasma che sulla componente cellulare dando così un'interpretazione completa della funzione emostatica. Nel nostro studio come in quelli di altri Autori^(3,7,8,10,11) nei cani con ipocoagulabilità i valori di K sono prolungati, l'angolo e MA sono più bassi dei normocoagulabili, mentre nei cani con ipercoagulabilità i valori di K sono più bassi e l'angolo ed Ma più elevati. Questi risultati mostrano che in questi cani l'emostasi è alterata in differenti componenti. Ciò è quello che avviene nei cani con leishmaniosi dove la trombocitopenia e la trombocitopenia non sono le sole cause delle disfunzioni emostatiche di questa patologia. La Trombocitopenia, infatti, anche se presente nel 55% dei soggetti era associata ad una riduzione del valore di MA solo in un caso (n°13 ipocoagulabile); in tale modo la contrazione del coagulo mediato dalle piastrine è nella maggior parte dei casi normale. I segni clinici di sanguinamento sono probabilmente legati a valori prolungati della R (tutti gli ipocoagulabili) e alla diminuzione dell'angolo

(tutti gli ipocoagulabili) che indicano che anche la riduzione dei fattori della coagulazione è responsabile di una variazione dei valori della TEG e dei segni di sanguinamento.

In ogni caso i cani con leishmaniosi hanno disordini dell'emostasi non ascrivibili ad un solo fattore e per questa ragione la TEG è molto utile in questa patologia

per valutare l'emostasi e la capacità coagulativa in toto, perché essa permette la distinzione tra sanguinanti o pazienti trombotici permettendo di indirizzare la terapia. Occorrono comunque ulteriori ricerche su un campione più numeroso per studiare l'influenza di altri fattori quali la razza, il sesso e l'età che possono modificare i valori di riferimento presentati in *tabella 1*.

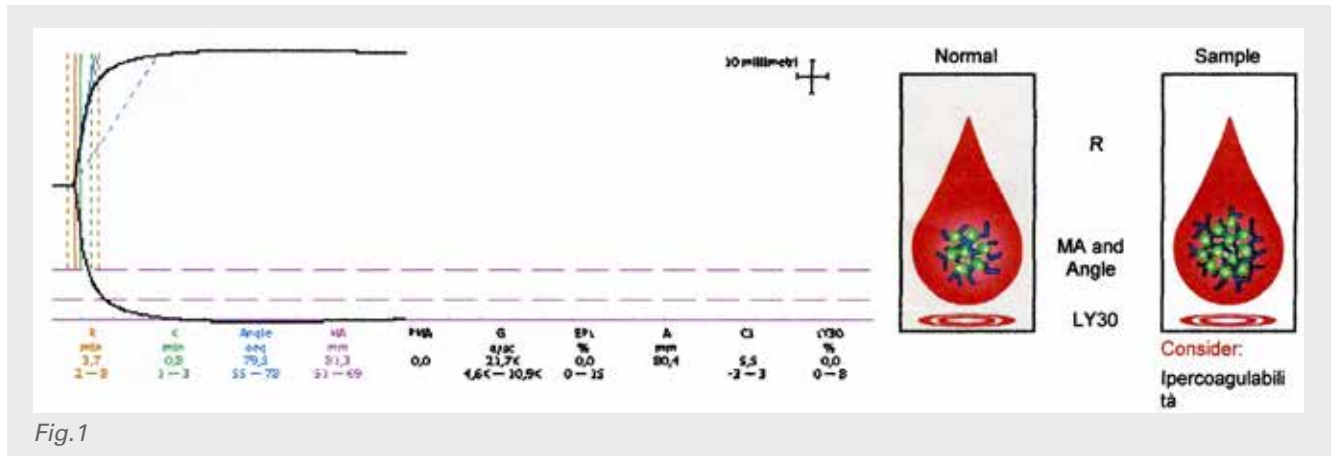


Fig.1

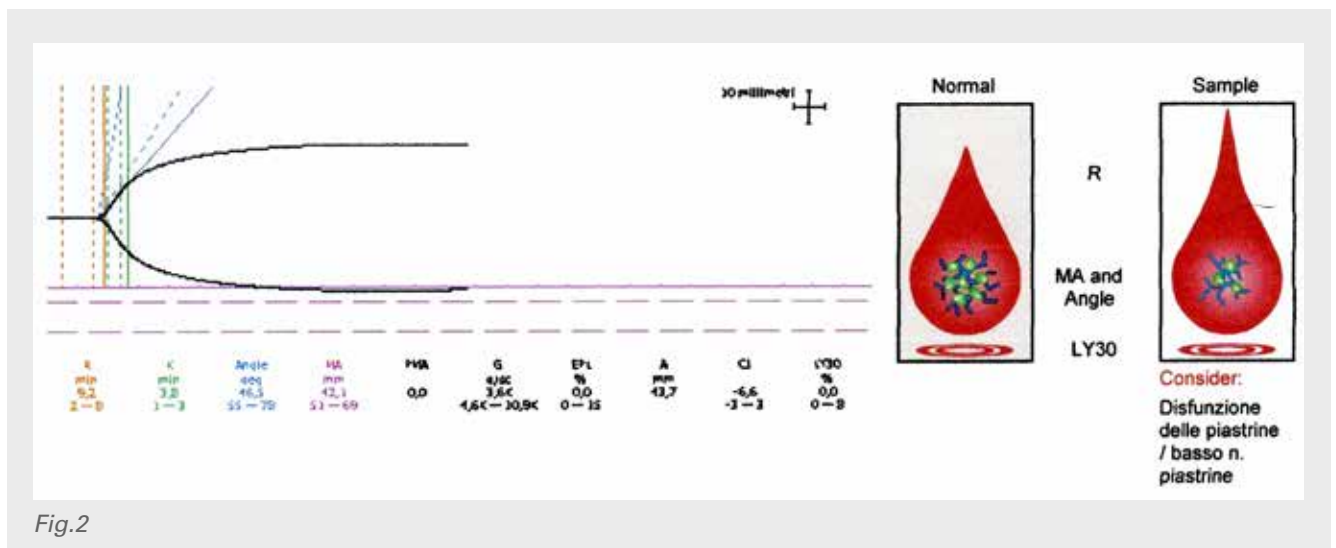


Fig.2

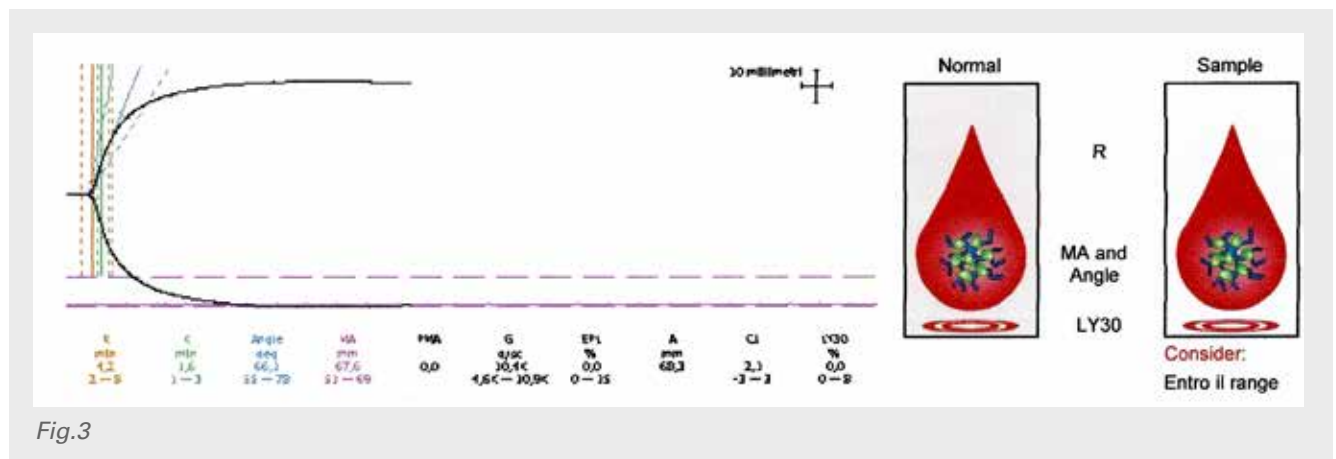


Fig.3

N°	R min	K min	A	MA mm	G d/sec	CI
1	4,2	1,6	66,1	67,6	10,4	2,1
2	6,2	2,8	55,4	64,4	9	-0,8
3	4,4	1,9	62	66,9	10,1	1,5
4	1,2	1,4	69,1	57,7	6,8	3,2
5	4,8	1,7	65,6	69,5	11,4	2
6	6,9	3	54	54,8	6,1	-2,8
7	3,7	3	53,5	52,7	5,6	-0,8
8	4,2	2,4	59,4	60,3	7,6	0,4
9	4,6	2,8	54,5	54,4	6	-1
10	6,9	2,1	61,3	65	9,3	-\$0,5
media	4,9 (1,2-6,9)	2,2 (1,5-3)	59,8(53,5-69,1)	61,3 (52,7-69,5)	7,8 (5,6-11,4)	0,3 (-2,8-3,2)

Tab.1.: Tromboelastografia nei cani sani: valori di referenza

IPERCOAGULABILI						
N°	R min	K min	A	MA mm	G d/sec	CI
1	5,7	1,6	67,1	70,8	12,1	1,7
2	3,7	0,8	79,6	81,3	21,7	5,5
3	5,4	2,3	58,6	71,3	12,4	1
4	5,2	1,8	65,4	69,6	11,5	1,6
5	6,6	2,6	58,1	68,9	11,5	-0,2
Media	5,3 (3,7-6,6)	1,8 (0,8-2,6)	65,7 (58,1-79,6)	72,3 (68,9-81,3)	13,8 (11,5-21,7)	1,9 (-0,2-5,5)
Ipocoagulabili						
6	9,2	3,8	46,5	42,1	3,6	-6,6
7	7,5	3,3	45,3	56,8	6,6	-3,5
8	8,3	4,4	40,9	55,5	6,2	-5
Media	8,3 (7,5-9,2)	3,8 (3,3-4,4)	44,2 (40,9-46,5)	51,4 (42,1-56,8)	5,4 (3,6-6,6)	-5 (-3,5-6,6)
Normocoagulabili						
9	5,3	1,9	62,2	65	9,3	0,7
10	6,8	2,1	61,8	62,2	8,2	0,7
11	4,8	1,4	70,3	65,5	9,5	1,9
12	5,3	2,7	53,4	60,5	7,7	-0,8
13	7,8	2,9	53,3	62,2	8,2	-2,3
14	4,8	3,2	49,6	53,9	5,8	-1,7
15	5	1,8	64,7	64,2	9	1
16	5,2	2,3	58,7	64,3	9	0,3
17	4,1	2,7	56,1	63,5	8,7	0,6
18	4,9	1,9	63,1	67	10,2	1,3
19	7,8	3	52,1	67,8	10,5	-1,8
20	5,1	2,7	59,2	61	7,8	-0,2
Media	5,5 (4,1-7,8)	2,3 (1,4-3,2)	58,7 (49,6-70,3)	63 (53,9-67,8)	8,6 (5,8-10,5)	0 (-2,3-1,9)

Tab.2.: Tromboelastografia nei cani leishmaniotici

N°	R-PT (s)	APTT (s)	FIB-CL (mg/dl)	PLT
1	8,1	12,1	265	800
2	8,1	12,3	192	699
3	8	13,2	243	240
4	8,3	9,3	169	245
5	7,3	12,4	165	245
6	8	12,8	273	9
7	7,8	12,5	340	100
8	7,3	17,8	159	90
9	7,3	10,8	287	307
10	8	9,3	323	320
11	8,3	12,8	273	300
12	8,1	13,1	158	150
13	8	12,7	245	229
14	8	12,1	165	84
15	7,4	13,4	323	299
16	8,1	12,7	265	295
17	7,9	11,4	245	220
18	8	9,3	356	240
19	8,3	25,1	454	240
20	7,8	13,2	354	216

Tab. 3.: test classici di coagulazione nei cani leishmaniotici

BIBLIOGRAFIA

- Bauer N., Eralp O., Moritz A.: Establishment of reference intervals for kaolin-activated thromboelastography in dogs including an assessment of the effects of sex and anticoagulant use. *Journal Veterinary Diagnostic Investigation*, 2009, 21, 641-648.
- Chan K-L., Summerhayes R.G., Ignajtovic V., Horton S.B., Mongale P.T.: Reference Values for Kaolin-Activated Thromboelastography in Healthy Children. *Anesthesiology Analgesy*, 2007, 105, 1610-1613.
- Flint S.K., Abrams-Ogg A.C.G., Kruth S.A., Bersenas A. M., WoddR.D.: Independent and combined effects of prednisone and acetylsalicylic acid on thromboelastography variables in healthy dogs. *American Journal of Veterinary Research*, 2011, 72, 1325-1332
- Hunt B.J., Avidian M.S., Da Fonseca J., Parmar K., Alcock E., Ponte J.: The effects of Aprotinin on Thromboelastography with Three Different Activators. *Anesthesiology*, 2001, 95, 1169-1174
- Kristensen A.T., Wiinberg B., Jessen L.R., Andreasen E., Jensen A.L.: Evaluation of Human Recombinant Tissue Factor-Activated Thromboelastography in 49 Dogs with Neoplasia. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 2008, 22, 140-147
- Lomtadze M.L., Khochava M.A., Shalamberidze I.A., Shilakadze M.A., Dzhokhtaberidze T.G.: Functional status of haemostasis system in patients with visceral leishmaniasis. *Georgian Medical News*, 2005, 128, 59-62.
- O'Kell A., Grant D.C., Panciera D.L., Troy G.C., Weinstein N. M.: Effects of oral prednisone administration with or without ultralow-dose acetylsalicylic acid on coagulation parameters in healthy dogs. *American Journal of Veterinary Research*, 2012, 73, 1569-1576
- Otto C.M., Rieser T.M., Brooks M. B., Russel M.W.: Evidence of hypercoagulability in dogs with parvoviral enteritis. *Journal American Veterinary Medical Association*, 2000, 217, 1500-1504.
- Valladares J.E., De Gopegui R.R., Riera C., Alberola J., Gallego M., Espada Y., Portus M., Arboix M.: Study of haemostatic disorders in experimentally induced leishmaniasis in Beagle dogs. *Research in Veterinary Science*, 1998, 64, 195-198.
- Vilar P., Couto C.G., Westendorf N., Iazbik C., Charske J., Marin L.: Thromboelastographic Tracings in Retired Racing Greyhounds and in Non-Greyhound Dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 2008, 22, 374-379.
- Wiinberg B., Jensen A.L., Johanson P.I., Rozansky E., Tranholm M., Kristensen A.T.: Thromboelastographic Evaluation of Hemostatic Function in Dogs with Disseminated Intravascular Coagulation. *Journal Veterinary Internal Medicine*, 2008, 22, 357-365.
- Wiinberg B., Jensen A.L., Rozanski E., Johansson P.I., Kjelgaard-Hansen M., Tranholm M., Kristensen A.T.: Tissue factor thromboelastography correlates to clinical signs of bleeding in dogs. *The Veterinary Journal*, 2009, 179, 121-129.