



*Sveriges lantbruksuniversitet*  
Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap  
Institutionen för kliniska vetenskaper

# Tromboelastografi (TEG) för utvärdering av hemostasrubbningar hos tikar med pyometra

Isabella Silins

*Uppsala*

2013

*Examensarbete inom veterinärprogrammet*

*ISSN 1652-8697  
Examensarbete 2013:60*



Tromboelastografi (TEG) för utvärdering av  
hemostasrubbningar hos tikar med pyometra  
Evaluation of hemostatic disturbances by  
tromboelastography (TEG) in dogs with pyometra

Isabella Silins

*Handledare: Ragnvi Hagman, Institutionen för kliniska vetenskaper*

*Biträdande handledare: Inger Lilliehöök, Universitetsdjursjukhuset*

*Examinator: Odd Höglund, Institutionen för kliniska vetenskaper*

*Examensarbete inom veterinärprogrammet, Uppsala 2013  
Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap  
Institutionen för kliniska vetenskaper  
Kurskod: EX0736, Nivå A2E, 30hp*

*Nyckelord: pyometra, TEG, hyperkoaguabilitet, koagulationsrubbningar  
Key words: pyometra, TEG, hypercoagulability, homeostatic disturbances*

*Online publication of this work: <http://epsilon.slu.se>*

*ISSN 1652-8697*

*Examensarbete 2013:60*

## INNEHÅLL

Sammanfattning .....	2
Summary.....	2
Förkortningar och ordlista.....	3
Inledning.....	3
Pyometra .....	3
Endotoxinemi och hemostas .....	4
Tromboelastografi.....	5
Material och metoder .....	6
Djur .....	6
Provinsamling och analys.....	7
Statistiska analyser.....	8
Etiskt godkännande.....	9
Resultat .....	9
Koagulation.....	9
Klinisk status.....	10
Hematologi och blodkemi.....	10
Tabeller och data.....	11
Diskussion.....	14
Konklusioner.....	16
Referenser .....	16

## **SAMMANFATTNING**

Målet med studien var att med hjälp av tromboelastografi (TEG) undersöka om tikar med pyometra är drabbade av koagulationsrubbnings, och i sådana fall hur ofta samt vilken typ av koagulationsrubbnings.

I studien ingick 25 tikar med kliniska tecken på pyometra samt 16 friska kontrolltikar. Alla tikar undersöktes kliniskt av veterinär och blodprov togs för undersökning av biokemiska variabler, hematologi samt koagulation inklusive tromboelastografi (TEG). Tikar med pyometra provtogs preoperativt innan kirurgisk behandling. Sex av dessa tikar följdes med flera blodprover även postoperativt under minst en månad.

Resultaten visade att 92 % av tikarna med kliniska tecken på pyometra var hyperkoaguabla, och att koagulationsrubbningsen kan kvarstå under flera veckor postoperativt hos vissa tikar. D-dimer var förhöjt hos åtta pyometratikar, aPTT var lindrigt förlängt hos fem tikar och lindrigt förkortat hos tio, medan PK var normalt hos alla pyometratikarna

Slutsatsen var att hyperkoaguabilitet är mycket vanligt hos tikar med pyometra samt att TEG visat sig vara en lämplig och känslig metod för att diagnosticera hyperkoaguabla tillstånd, jämfört med andra hemostasanalyser som generellt används.

## **SUMMARY**

The aim with the study was to evaluate the presence of homeostatic disturbances by the use of tromboelastography (TEG) in bitches suffering from pyometra. The aim was also to, if present, identify types of homeostatic disturbances.

Twenty-five bitches with clinical signs of pyometra were included in the study together with 16 healthy female control dogs. All dogs were clinically examined and blood samples were taken. Serum biochemistry, haematology and a coagulation panel including TEG were performed in all dogs, pre-operatively in the dogs with pyometra. Six bitches with clinical signs of pyometra were followed post-operatively by several blood samples during at least a month.

The results showed that 92 % of bitches with clinical signs of pyometra were hypercoagulable, and that this hypercoagulability could persist for several weeks post-operatively. Elevated D-dimer was found in eight bitches with pyometra, aPTT was slightly prolonged in five bitches and slightly shortened in ten bitches, while PK was normal for all bitches with pyometra.

In conclusion, hypercoagulability was a common finding in bitches suffering from pyometra and TEG was a suitable method for identification of hypercoagulable conditions, compared to other coagulation analysis methods generally used.

## FÖRKORTNINGAR OCH ORDLISTA

AF (andningsfrekvens), aktiverad partiell tromboplastintid (aPTT), Alaninaminotransferas (ALAT), Albumin (ALB), Alkalisk fosfatas (ALP), C-reaktivt protein (CRP), Cystisk endometriehyperplasi (CEH), Disseminerad intravasal koagulation (DIC), *Escherichia coli* (*E. coli*), Erytrocytvolymfraction (EVF), faste-gallsyror (f-Gallsyror), HF (hjärtfrekvens), Interquartile Range (IQR), Kapillär återfyllnadstid (CRT), Koagulationstid (K), Leukocytpartikelkoncentration (LPK), Lipopolysackarider (LPS), Maximal Amplitud (MA), Protein C (autoprothrombin IIA), Protrombinkomplex (PK), Reaktionsstid (R), total antal vita blodkroppar (WBC), Segmentkärniga neutrofiler (Segmk neutrofiler), Systemic inflammatory response syndrome (SIRS), Stavkärniga neutrofiler (Stavk. neutrofiler), Trombocytpartikelkoncentration (TPK), Tromboelastografi (TEG)

## INLEDNING

### PYOMETRA

Pyometra är en potentiellt livshotande sjukdom som drabbar i genomsnitt 25 % av alla intakta tikar före 10 års ålder (Egenvall et al., 2001). I ett land som Sverige där det i dagsläget fortfarande är relativt ovanligt att kastrera friska tikar är pyometra en vanlig sjukdom (Egenvall et al., 1999).

Trots att grundforskningen kring pyometra påbörjades redan på 1930-talet, är patogenesen vid sjukdomen fortfarande oklar. Tidigt kopplades förekomsten av cystisk endometriehyperplasi (CEH) till pyometra, där CEH antogs utgöra ett förstadium till pyometra i ett CEH-pyometra sjukdomskomplex (Dow, 1958). På senare tid har denna koppling börjat ifrågasättas eftersom CEH kan leda till pyometra, men pyometra även kan uppstå på annat sätt utan CEH (De Bosschere et al., 2001). CEH har framförallt en hormonell etiologi till skillnad från pyometra som även har en infektiös komponent i etiologi och sjukdomsutveckling (De Bosschere et al., 2002).

Flera olika faktorer kan påverka risken för att utveckla pyometra. Tikar som ej valpat löper en lindrigt ökad risk att utveckla pyometra jämfört med tikar som har haft en eller flera kullar. Det tycks även finnas ärftliga orsaker eftersom vissa hundraser har betydligt större risk att utveckla sjukdomen jämfört med andra hundraser. Pyometra drabbar främst medelålders till äldre tikar, med en medianålder på 9 år vid insjuknandet (Niskanen, 1998). Långhårig Collie, Rottweiler, Cavalier King Charles Spaniel, och Golden Retriever är raser som är predisponerade för att utveckla pyometra (Egenvall et al., 2001).

Traditionellt antogs det att hormonella förändringar skapade en gynnsam miljö för bakterier i livmodern varpå pyometra kunde utvecklas. Dow (1958) samt Teunissen (1952) la grunden för denna teori genom att undersöka hur experimentellt administrerat östrogen och progesteron påverkade utvecklingen av CEH samt pyometra. De fann att inflammatoriska och cystiska förändringar i livmodern kunde framkallas av höga progesterongivor. Teunissen visade också att östrogen inte självt orsakade CEH eller pyometra, men det potentierade effekten av tillfört progesteron (Teunissen 1952). Cox (1970) visade att progesteron minskar

kontraktiliteten i livmodern och ger en ökad körtelsekretion i endometriet, vilket skapar en miljö i livmodern som är gynnsam för bakterier. De Bosschere et al. (2002) visade att uttrycket av östrogenreceptorer skiljer sig i livmödrar från tikar med endometrit/pyometra jämfört med livmödrar från friska tikar eller tikar med CEH. Samma forskargrupp har även tidigare visat att tikar med endometrit/pyometra alltid uppvisade kliniska symtom som nedsatt allmäntillstånd, anorexi, polyuri och polydipsi, till skillnad från tikar med CEH som ej uppvisade några kliniska symtom på sjukdom. Detta i kombination med de skilda receptoruttrycken, tyder på två skilda sjukdomskomplex med två olika patogeneser. Att däremot diagnostisera pyometra enbart baserat på kliniska symtom utan bilddiagnostik är svårt, då likartade symtom kan uppstå även vid andra sjukdomstillstånd exempelvis njursvikt, leversvikt, diabetes mellitus och Cushing's sjukdom. (De Bosschere et al., 2000)

*Escherichia coli* (*E. coli*) är den vanligaste bakterien som identifierats i samband med pyometra. Wadås et al. (1996) fann att man hos 65 % av 138 tikar med pyometra kunde isolera just *E. coli* från livmödrarna men hos 26 % av tikarna kunde ingen bakteriell växt påvisas vid odling.

*E. coli*-isolaten från tikarna med pyometra uppvisade större likheter än förväntat vilket tyder på att det kan vara *E. coli*-stammar med speciella egenskaper som orsakar just pyometra. Vidare kunde man isolera identiska *E. coli*-stammar från såväl livmodern som rektum hos tikarna med pyometra, detta kan indikera att det rör sig om en ascenderande infektion från tarmfloran. Samtidigt kunde även identiska *E. coli*-stammar isoleras från urinvägarna hos tikar med pyometra och samtidig subklinisk urinvägsinfektion. Det är dock oklart vilken av infektionerna som är den primära (Fransson, 2003, Hagman och Kuhn, 2002).

Pyometra kännetecknas av kliniska tecken på såväl infektion som inflammation i livmodern. Variga flytningar från vulva kan ibland vara det enda tecknet på sjukdom i de fall där cervix är öppen. Andra vanliga sjukdomstecken är anorexi, nedsatt allmäntillstånd, polyuri, polydipsi, bukighet och kräkningar (Dow, 1958).

Förhöjda nivåer av endotoxiner i blodet har även påvisats hos tikar med pyometra, vilket kan förklara varför många tikar är systemiskt påverkade (Hagman et al., 2006, Okano et al., 1998). I en studie kopplades höga nivåer av endotoxiner i blodet till en sämre sjukdomsprognos och i samma studie såg man att endotoxinnivåerna i blodet hade sjunkit inom 9 dagar efter genomförd ovariehysterektomi (Okano et al., 1998).

## **ENDOTOXINEMI OCH HEMOSTAS**

Endotoxin eller lipopolysackarider (LPS), ingår i yttermembranet på Gram-negativa bakterier som exempelvis *E. coli* och är om det förekommer fritt i blodet ett potent stimuli av ett systemiskt inflammations svar (Van Amersfoot et al., 2003). När endotoxin tillfördes experimentellt till hundar uppkom kliniska symtom och förändringar i form av nedsatt allmäntillstånd, kräkningar, buksmärta vid palpation och feber. En initial leukopeni följdes av förhöjda nivåer av vita blodkroppar. Hundarna utvecklade även rubbningar i hemostasen. Hemostasförändringarna som ses i samband med endotoxinemi kan förklaras med att man ser sänkta nivåer av bland annat protein C, en av de viktigaste koagulationshämmarna (Eralp et

al., 2011). I en studie på hundar med sepsis (definierat som ett systemiskt inflammationssvar orsakat av en infektion) såg man minskade nivåer av såväl protein C som antitrombin, även det en viktig koagulationshämmare (Laforcade et al., 2003). Alla individer reagerar dock individuellt på endotoxemi och kan i varje enskilt ögonblick vara antingen hyperkoaguabla, normokoaguabla eller hypokoaguabla. (Eralp et al., 2011). Hemostasrubbingar förekommer vid flertalet andra sjukdomar, exempelvis vid inflammatoriska mag-tarm-sjukdomar, neoplasier, pneumoni, peritonit och sepsis (Wagg et al., 2009) (Laforcade et al., 2003).

Om hemostasrubbingar förvärras kan disseminerande intravasal koagulation, DIC, uppstå. Initialt anses DIC orsaka hyperkoaguabilitet i samband med att de normala reglerande funktionerna i hemostasen har satts ur spel och kallas då för subklinisk DIC. Det uppstår då en mängd mikrotromber i kärlbädden. Detta övergår i normokoaguabilitet för att därefter när koagulationsfaktorer och trombocyter har konsumerats i den initiala fasen, övergå i en hypokoaguabilitet med ökad blödningstendens och då en så kallad klinisk DIC. Ofta uppstår det samtidigt en multiorgansvikt och tillstånden leder ofta till döden. DIC är ett tillstånd som är svårt att identifiera tidigt och förebygga, och det kan uppstå till följd av exempelvis pyometra (Fletcher et al., 2001, Wiinberg et al., 2008).

Pyometra behandlas i dagsläget allra oftast kirurgisk eftersom det är säkrast och mest effektivt. Mortaliteten är 3-4%. För patientsäkerhetens skull kan det vara viktigt att preoperativt uppskatta om en patient har grava hemostasrubbingar vilket i sin tur kan resultera i ökade blödningrisk i samband med operationen (Egenvall et al., 2001). Vid kirurgiska ingrepp är en fungerande koagulationsförmågan livsviktig för att patienten ska överleva ingreppet. Det kan även röra sig om en kostnadsfråga där ökad blödningsbenägenhet kan kräva dyrbara insatser t ex i form av att ge blodplasma. Generellt har man använt sig av koagulationsanalyser som exempelvis aPTT, PK och D-dimer där de två förstnämnda används för att bedöma hur olika delar av koagulationskaskaden fungerar och där den sistnämnda används för att detektera en specifik nedbrytningsprodukt från tromber. Ofta körs samtliga dessa analyser tillsammans i en panel och resultaten kan vara svårtolkade för en kliniker.

Med analyserna aPTT och PK undersöks funktionen på koagulationsfaktorerna. Vid hypokoaguabla tillstånd orsakade av koagulationsfaktorbrist eller DIC ses ofta kraftigt förlängda aPTT och PK. Medan D-dimer kan användas för att påvisa DIC i samband med prokoagulatoriska tillstånd (Laforcade et al., 2003, Park et al., 2009). TEG, tromboelastografi är en hemostasanalys som görs på helblod, till skillnad från de tidigare nämnda analyserna som görs på citratplasma. I TEG-analysresultatet fås därför även information om hur trombocyterna och leukocyterna påverkar koagulationen tillsammans med koagulationsfaktorerna. Utifrån TEG-resultatet kan man bedöma om patienten i provögonblicket var hyper-, normo- eller hypokoaguabel (Kol och Borjesson, 2010).

## **TROMBOELASTOGRAFI**

Tromboelastografi (TEG) utförs med hjälp av en liten behållare samt ett upphängt roterbart stift. 0,36 mL blod placeras i behållaren, med en konstant temperatur om 37 °C. Stiftet sänks ner i blodet. Behållaren oscilleras sedan i en vinkel om 4° 45” grader under en 10 sekunder lång cykel. När fibrin börjar bildas mellan behållaren och stiftet så börjar stiftet att rotera med



behållarens riktning. Rörelsen överförs genom upphängningen i form av en wire, till en elektrisk eller mekanisk omvandlare som översätter rörelseinformationen till digital information som skickas till en dator. Med hjälp av datorn beräknas sedan en graf.

Ursprungligen användes metoden TEG inom humansjukvården och då med helblod utan tillsatser, dock krävde analysmetoden att analysen genomfördes inom 4 minuter från att blodprovet togs (Bowbrick et al., 2000)

En så snäv tidsgräns är opraktisk och hundar har en snabbare koagulationsinitiering än människor (Cade och Robinson, 1974). Därför har man utvärderat och kommit fram till att helblod med en tillsats av citrat i kombination med att calcium tillsätts för att starta koagulationen, gör att analysen kan genomföras inom 30 minuter från att blodprovet är taget (Bowbrick et al., 2000).

Ur TEG-analysens tromboelastogram kan 4 olika standardvärden utläsas; R (reaktionstid), K (koagulationstid),  $\alpha$  (vinkel) och MA (maximal amplitud). R mäter tiden från analysens start till dess att de första fibrinrådarna börjar bildas och tills de två grenarna har divergerat 1 mm från varandra. R representerar främst den inre koagulationsvägen och påverkan av koagulationsfaktorerna VIII, IX, XI, och XII. K representerar tiden från punkten där R slutar tills grenarna har divergerat 20 mm från varandra, vilket motsvarar en viss koagelhållfasthet. K-värdet påverkas av koagulationsfaktorerna II, VIII, trombinbildning, trombocytantal och -funktion, fibrinutfällning, fibrinogenkoncentration samt hematokrit.  $\alpha$  fås genom att vinkeln mäts mellan den horisontella mittlinjen och en tangent som dras i kurvans riktning från den punkt där linjerna har divergerat 1 mm från varandra.  $\alpha$  visar hur fort koaglet bildats och påverkas av ungefär samma faktorer som K. MA motsvaras av det maximala avståndet i mm mellan de två divergerande grenarna i tromboelastogrammet och indikerar koaglets slutgiltiga hållfasthet. MA påverkas av fibrin- och fibrinogenkoncentrationen, koagulationsfaktor XIII, trombocyt funktion och -antal, trombinkoncentration samt hematokrit. Ytterligare värde, G, kan beräknas utifrån MA med hjälp av formeln  $G = 5(5000 \times MA) / (96 - MA)^2$  och är ett mått på koaglets hållfasthet. (Wiinberg et al. 2005)

## **MATERIAL OCH METODER**

### **DJUR**

25 tikar ingick i studien, samtliga var klientägda kliniska fall som inkom till Universitetsdjursjukhuset, Sveriges lantbruksuniversitet (SLU), Uppsala, Sverige under tidsperioden maj 2011-november 2012 och där djurägarna har gett sitt medgivande till att djuren medverkar i studien. De inkluderades i studien baserat på klinisk misstanke på pyometra och att en vätskefylld livmoder hade identifierats med hjälp av ultraljud.

Hundarna behandlades med ovariehysterektomi (OHE) och ingen av dem hade tidigare behandlats medicinskt för pyometra. Diagnos fastställdes med hjälp av anamnes, klinisk undersökning, bildiagnostik, makroskopisk morfologisk bedömning av livmodern i samband med operationen, bakteriologisk undersökning av livmoder och blod, samt histologisk undersökning av livmödrarna. Tikarna i gruppen var av 17 olika raser, mellan åldrarna 4,1

och 12,4 år med en medelålder på 7,5 år vid insjuknandet. I samband med mottagandet på kliniken fyllde en undersökande veterinär i ett formulär med uppgifter om kroppstemperatur, hjärt- och andningsfrekvens, slemhinnefärg, CRT, eventuell smärta vid bukpalpation, bedömning av allmäntillstånd samt grad av hydrering. Preoperativa blodprov togs från samtliga tikar i gruppen. Sex av dessa tikar långtidsuppföljdes med flera blodprover under 29 till 73 dagar efter insjuknandet.

16 friska och intakta tikar användes som kontroller. Blodprover togs från samtliga tikar på samma sätt som hos tikarna med pyometra. Inom kontrollgruppen var tikarna av 11 olika raser (en av okänd ras) mellan åldrarna 0,9-17 år och med en medelålder på 5,3 år. Innan provtagningen gjordes en klinisk undersökning av respektive tik. På ett formulär noterades skriftligt uppgifter om respektive tiks kroppstemperatur, hjärt- och andningsfrekvens, slemhinnefärg, kapillär återfyllnadstid (CRT) eventuell smärta vid bukpalpation, bedömning av allmäntillstånd samt grad av hydrering. Ingen av dessa tikar har tidigare behandlats för pyometra eller någon annan uterin sjukdom. Hos den tik som kastrerades fann man inga tecken på uterin sjukdom i samband med operationen eller vid histologisk bedömning av livmodern postoperativt. Inklusionskriterier för kontrollerna var även C-reaktivt protein (CRP) koncentrationer <5 mg/L samt normal vit och röd blodbild.

#### **PROVINSAMLING OCH ANALYS**

Blodprover för biokemiska, hematologiska analyser samt koagulationsanalyser togs från distala *vena cephalica*, med vacutainer. Rör för koagulationsanalyser togs sist i ordningen och då utan stas. Hos kontrollerna togs blodproverna efter klinisk undersökning och hos tikarna med pyometra togs blodproverna strax innan operation innan premedicinering. Proverna togs i vacutainerrör med tillsats av EDTA, natrium-heparin eller citrat samt rör utan tillsats (Hettisch Labinstrument AB, Sollentuna, Sverige). Proverna i citratröret för koagulationsanalyserna togs utan stas.

Alla biokemiska, hematologiska samt koagulationsanalyser genomfördes vid Kliniskt kemiska laboratoriet, UDS, SLU, enligt rutinmetoder. De hematologiska analyserna som utfördes var räkning av erythrocyter, trombocyter och leukocyter med Advia 2120 (Siemens Healthcare Diagnostics, Erlangen, Tyskland), manuell differential räkning samt morfologisk bedömning av blodceller i blodutstryk färgade med May-Grunewald Giemsa. Majoriteten av differentialräkningarna gjordes med manuell differentialräkning En hund med pyometra blev endast analyserad med Advia 2120. De biokemiska parametrarna alaninaminotransferas (ALAT) och alkalisk fosfatas (ALP), urea, gallsyror, CRP, glukos och kreatinin analyserades med Architect c4000 (Abbott Laboratories Abbott Park, Illinois, USA). Hematologi och biokemianalyserna gjordes inom 4 timmar. De koagulationsanalyser som utfördes var aktiverad Partiell Tromboplastintid (aPTT), Protrombinkomplex (PK), D-dimer samt TEG. PK, aPTT och D-dimer analyserades på fryst citratplasma. TEG-analyserna utfördes med TEG® 5000 Thrombelastograph® Hemostasis Analyzer system (Haemonetics Corporation, Braintree, Massachusetts, USA) på citratblod 30 minuter efter provtagning utom hos en tik i pyometragruppen där TEG-analysen utfördes inom 45 minuter efter provtagningen. Hemostasen aktiverades med hjälp av kaolin. Kvarvarande citratplasma hälldes över i rör utan

tillsats och frystes ned omedelbart. Rören förvarats i -70 °C innan de tinades upp för återstående koagulationsanalyser.

Den definitiva histologiska diagnosen ställdes med hjälp av histopatologisk bedömning av hematoxylineosinfärgat provmaterial från formalinaldehydfixerande livmödrar samt äggstockar av en patolog (Fredrik Södersten, Avd för patologi, Institutionen för biomedicin och veterinärmedicinsk folkhälsovetenskap, SLU). Utifrån de histopatologiska fynden klassificerades hundarna att ha livmoder utan patologiska fynd, endometriehyperplasi, akut pyometra med purulent inflammation, respektive kronisk pyometra med slemhinneatrofi och lymfocytär/plasmacytär inflammation. De flesta tikarna hade akut pyometra med purulent inflammation (19 st). Tre tikar hade mer kronisk pyometra och två av tikarna bedömdes ha en histologiskt normal livmoder och kan därmed ej anses ha pyometra. En tik saknade histologisk diagnos.

Den bakteriologiska odlingen av svabb-prover från livmödrarna samt blododling av blodprover visade att 20 av tikarna hade växt av *e. coli* i livmodern, två av tikarna hade växt av streptokocker i livmodern och en tik hade växt av *Proteus mirabilis* i livmodern. Ett av proverna från livmödrarna visade sparsam växt av *Citrobacter species*, vilket saknade klinisk relevans och troligtvis berodde på kontamination och ett annat prov från livmödrarna visade ingen bakteriell växt. Fem av tikarnas blododlingar visade växt av *e. coli*. En blododling visade växt av en koagulasnegativ stafylokock vilket hade en oklar klinisk relevans då odlingen från samma tiks livmoder visade växt av *e. coli*. Blododlingarna från övriga 19 tikar i gruppen visade ingen växt av bakterier. Samtliga bakteriologiska odlingar gjordes av Enheten för Bakteriologi, SVA, Uppsala.

Hundarna bedömdes vara påverkade av SIRS (Systemic inflammatory response syndrome) om två eller flera av följande kriterier var uppfyllda; AF > 20/min, HF >120 slag/minut, totalantal vita (WBC) <  $6 \times 10^9$  eller >  $16 \times 10^9$ /L eller > 3 % stavkärniga neutrofiler och kroppstemperatur < 38,1° C eller > 39,2° C. Dessa kriterier rapporteras ha en specificitet på 64 % samt en sensitivitet på 97 % för att detektera SIRS (Hauptman et al., 1997).

## **STATISTISKA ANALYSER**

Jämförelser mellan de två grupperna av hundar, såväl som jämförelser mellan subgrupper inom grupperna, gjordes dels med hjälp av generella linjära modeller, GLM, vilket är analogt med användandet av "Student's t tests" och dels med traditionella Student's t-test (Olsson, 2011). Standardberäkningar av residualer avslöjade ej några allvarliga avvikelser. GLM samt "Mixed procedures" inom programmet SAS (SAS, 2009, Cary, North Carolina, USA) användes.

Analysresultat som var under mätområdet skrevs om till halva värdet vid statistiska beräkningar. För CRP < 5,0 användes 2,5 mg/L och för eosinofilvärden <  $0,1 \times 10^9$ /L användes  $0,05 \times 10^9$ /L

## ETISKT GODKÄNNANDE

Studien godkändes av Uppsala djurförsöksetiska nämnd innan arbetet påbörjades (C179/12).

## RESULTAT

### KOAGULATION

Resultaten från olika koagulationsanalyser inklusive TEG redovisas i Tabell 1. Vid ett MA-värde överstigande 66 mm och/eller ett G-värde överstigande 10 d/sc bedömdes individen lida av hyperkoaguabilitet. Samtliga tikar med pyometra utom två hade ett MA-värde > 66 mm och ett G-värde över 10 d/sc, vilket gjorde att samtliga tikar utom två i pyometragruppen bedömdes vara hyperkoaguabla. Två av dessa tikar med kliniska symtom på pyometra samt MA- och G-värden tydande på hyperkoaguabilitet visade sig ha histologiskt normala livmödrar. Två tikar med kliniska symtom på pyometra hade normala MA- samt G-värden. Dessa två tikar hade även normalt antal neutrofiler och lågt CRP. Vid den histologiska undersökningen av just dessa två tikar visade sig den ena tiken ha en kronisk pyometra och den andra tiken saknade histologisk diagnos. Ingen av tikarna i pyometragruppen var hypokoaguabla. I kontrollgruppen fanns det en tik som hade lindrigt förhöjda MA- och G-värden, samtliga övriga kontrolltikar var normokoaguabla.

Samtliga tikar i pyometragruppen hade normala PK-värden. Fem av tikarna hade lindrigt förlängd aPTT, tio av dem hade lindrigt förkortad aPTT, och resten hade normal aPTT. Åtta tikar hade förhöjda nivåer av D-dimer, där tre tikar utmärkte sig med D-dimervärden > 1 mg/ml. Nio tikar hade förhöjda fibrinogennivåer, övriga hade normala fibrinogennivåer. För tre av tikarna saknades fibrinogenresultat. I kontrollgruppen hade samtliga tikar normala PK-värden, samt normala fibrinogenvärden. Fyra av tikarna hade lindrigt förlängt aPTT. För en av tikarna saknades D-dimervärde och tre av kontrolltikarna hade lindrigt förhöjda D-dimervärden.

Tikarna i pyometragruppen hade normalt eller i två fall förhöjt trombocytantal, och samtliga kontrolltikar hade normalt trombocytantal.

En av tikarna med pyometra utmärkte sig något i form av en kombination av kraftigt förhöjda D-dimervärden och sänkt aPTT samt hyperkoaguabel enligt TEG. Tiken utmärkte sig dock inte när det kommer till kliniska symtom, utan var endast lindrigt nedsatt i allmäntillståndet samt lindrigt dehydrerad.

Ingen av tikarna i pyometragruppen hade förlängt PK, 28 % hade förhöjt D-dimer och 36 % hade förkortad aPTT. Medan 92 % av tikarna med pyometra var hyperkoaguabla baserat på TEG-resultaten. Beräkningar baserade på de 19 tikar som fick den histologiska diagnosen akut pyometra med purulent inflammation var 100 % hyperkoaguabla enligt TEG-resultaten, 44 % hade förhöjt D-dimer och 42 % hade förkortad aPTT.

I en långtidsuppföljning följdes sex tikar som hade haft kliniska symtom på pyometra med upprepade provtagningar. Av de fem som var hyperkoaguabla var en hyperkoaguabel 2 dagar

efter operation (normal dag 14), tre var hyperkoaguabla dag 11, 13 respektive 21 (normala dag 15, 21 respektive 35) En var fortfarande hyperkoaguabel vid sista provtagningen efter 45 dagar.

## **KLINISK STATUS**

Den kliniska statusen bedömdes utifrån flera olika parametrar preoperativt. En överblick av fördelningen gällande kliniska parametrar ges i tabell 2.

Samtliga kontrolltikar bedömdes vara friska efter fullständig klinisk undersökning av veterinär.

När kontrollgruppens SIRS-status bedömdes kunde tre av kontrolltikarna bedömas som SIRS-positiva. Detta beror sannolikt på att tikarnas andnings- och hjärtfrekvens var tillfälligtvis förhöjd pga stress vid undersökningstillfället. Inga andra SIRS-parametrar än de två angivna kunde anses vara onormala hos dessa 3 kontrolltikar. Pyometragruppens SIRS-status redovisas i Tabell 2.

## **HEMATOLOGI OCH BLODKEMI**

Majoriteten av tikarna med kliniska tecken på pyometra hade neutrofil med vänsterförskjutning och monocytyt samt högt CRP. Fem av tikarna hade CRP < 5mg/L. Dessa fem tikar hade även normalt LPK och ingen neutrofil. En av dessa fem tikar hade kronisk pyometra, två hade inga histologiska förändringar på sin livmoder, en tik hade akut pyometra medan en tik saknade histologisk diagnos.

Hematokriten (B-EVF) och retikulocytantalet var signifikant lägre hos pyometrahundarna. Åtta av tikarna hade lindrig-måttlig anemi (0,25-0,32L/L) utan ökning av retikulocyter.

Hos samtliga kontroller låg CRP under den nedersta detektionsgränsen, < 5 mg/L.

Pyometratikarna hade signifikant lägre albumin och högre ALP-koncentration i blodet jämfört med kontrolltikarna, medan ingen skillnad sågs för ALAT, gallsyror, krea och glukos

## TABELLER OCH DATA

Tabell 1. Koagulationsvärden hos tikar med kliniska tecken på pyometra respektive friska kontroller.

	Tikar med kliniska tecken på pyometra			Friska kontroller			GLM/t-test (p)
	Medelvärde±SD (min-max)	Median	n	Medelvärde±SD (min-max)	Median	n	
PK (s)	18,9±1,6 (15,4-22,3)	19,1	25	17,2±1,0 (15,5-19,8)	17,3	15	0,002*
aPTT (s)	22,7±5,6 (14,8-34,3)	20,1	25	26,1±4,6 (20,3-36,2)	25,6	15	0,059
D-dimer (mg/L)	0,5±1,0 (0,1-4,4)	0,2	24	0,2±0,2 (0,1-0,8)	0,1	14	0,179
Fibrinogen <sup>a</sup> (g/L)	4,4±1,5 (1,6-6,9)	4,5	22	1,8±0,3 (1,4-2,4)	1,8	12	<0,0001*
R (s)	3,6±0,8 (2,1-5,9)	3,4	25	3,0±0,7 (2,0-4,4)	3,0	15	0,041*
K (se)	1,0±0,3 (0,8-1,8)	1,0	25	1,5±0,4 (1,0-2,3)	1,4	15	<0,0001*
α (grader)	75,6±3,6 (65,8-82,7)	76,2	25	68,5±4,7 (60,4-74,3)	70,6	15	<0,0001*
MA (mm)	75,9±7,0 (87,5-53,8)	78,0	25	60,2±5,1 (68,7-51,0)	62,2	15	<0,0001*
G (d/sc)	17,4±6,1 (5,8-34,9)	17,7	25	7,8±1,6 (5,2-11,0)	8,2	15	<0,0001*

<sup>a</sup>Fibrinogenrövärdet är faktoriserat med 1,8 för metoden och med 1,1 för citratplasma. \* P-värden <0,05, dvs statistiskt signifikanta. PK= Protrombinkomplex, aPTT= aktiverad Partiell Tromboplastintid, R= Reaktionstid, K= Koagulationstid, α =vinkel, MA= Maximal Amplitud,  $G=5(5000 \times MA)/(96-MA)^2$ , CRP=C-Reaktivt Protein.

Tabell 2. Kliniska parametrar inom gruppen av 25 tikar med kliniska tecken på pyometra.

Klinisk status	Antal tikar (% av totalantal)
<b>Allmäntillstånd<sup>a</sup></b>	
Normalt	6 (25%)
Lindrigt nedsatt	13 (54%)
Måttligt nedsatt	5 (21%)
<b>Dehydrering<sup>b</sup></b>	
Ingen	6 (27%)
Lindrig	14 (64%)
Måttlig	2 (9%)
Kraftig	0 (0%)
<b>Buksmärta vid palpation<sup>c</sup></b>	8 (38%)
<b>Vaginala flytningar<sup>d</sup></b>	16 (66%)
<b>CRT<sup>e</sup></b>	
1,5-2 sekunder	14 (63%)
< 1,5 sekunder	7 (32%)
> 2 sekunder	1 (5%)
<b>SIRS-positiva</b>	18 (72%)

SIRS= systemic inflammatory response syndrome. CRT= kapillär återfyllnad. <sup>a</sup>Ej undersökt 1 tik. <sup>b</sup>Ej undersökt 3 tikar. <sup>c</sup>Ej undersökt 4 tikar. <sup>d</sup>Ej undersökt 2 tikar. <sup>e</sup>Ej undersökt 3 tikar.

Tabell 3. Kliniska parametrar, hematologi samt blodkemi hos 25 tikar med kliniska tecken på pyometra samt 16 friska kontrollhundar.

	Alla tikar dag 1			Kontroller dag 1			GLM/t-test (p)
	Medelvärde±SD (min-max)	Median	n	Medelvärde±SD (min-max)	Median	n	
<b>Kroppstemp (°C)</b>	39,1±0,6 (38,2-40,5)	39,2	25	38,3±0,3 (37,8-39,0)	38,3	16	<0,0001*
<b>Andningsfrekvens (andetag/min)</b>	41,0±52,0 (15,0-260,0)	24,0	22	22,0±10,0 (12,0-48,0)	16,0	16	0,170
<b>Hjärtfrekvens (slag/min)</b>	109±25 (72-180)	100	25	103±23, (72-152)	96	16	0,390
<b>EVF</b>	0,37±0,07 (0,25-0,50)	0,35	25	0,48±0,06 (0,35-0,59)	0,48	16	<0,0001*
<b>Retikulocyter (10x9/L)</b>	17,3±15,2 (4,0-73,0)	11,0	19	33,5±22,9 (7,0-76,0)	25,5	14	0,024*
<b>TPK (10x9/L)</b>	354,1±111,7 (181,0-579,0)	358,0	20	308,2±58,2 (210,0-421,0)	331,5	12	0,210
<b>LPK (10x9/L)</b>	18,8±8,0 (4,8-33,7)	18,9	24	10,0±2,2 (6,8-13,9)	9,8	16	<0,001*
<b>Stavk neutr. (10x9/L)</b>	3,1±2,5 (0,0-7,9)	2,5	23	0,4±0,6 (0,0-2,0)	0,1	14	<0,001*
<b>Segmk neutr. (10x9/L)</b>	11,1±6,2 (3,0-25,3)	10,6	23	5,8±1,6 (3,8-10,4)	5,5	16	0,002*
<b>Eosinofiler (10x9/L)</b>	0,3±0,5 (0,0-1,9)	0,1	23	0,8±0,7 (0,1-2,4)	0,5	16	0,013*
<b>Lymfocyter (10x9/L)</b>	1,7±0,8 (0,6-4,4)	1,6	23	2,5±0,7 (1,6-3,8)	2,4	16	0,004*
<b>Monocyter (10x9/L)</b>	2,3±1,5 (0,1-5,4)	2,0	23	0,5±0,3 (0,0-1,1)	0,5	16	<0,0001*
<b>CRP (mg/L)</b>	175,2±103,6 (2,5-298,0)	220,0	25	2,5±0,0 (2,5-2,5)	2,5	16	<0,0001*
<b>ALB (g/L)</b>	27,4±4,3 (19,0-35,0)	28,0	25	31,3±1,9 (26,0-34,0)	31,0	16	0,002*
<b>ALP (µkat/L)</b>	2,0±1,3 (0,4-5,8)	1,8	25	0,8±0,5 (0,1-2,1)	0,7	16	0,001*
<b>ALAT</b>	0,6±0,8 (0,1-3,9)	0,3	25	0,6±0,3 (0,1-1,4)	0,5	16	0,913
<b>f-Gallsyror (µmol/L)</b>	4,4±4,8 (0,3-17,3)	2,4	24	3,9±3,4 (0,3-13,3)	2,7	16	0,728
<b>Glukos (mmol/L)</b>	5,1±0,9 (0,9-7,2)	5,1	25	5,0±0,5 (3,7-6,1)	5,0	16	0,713
<b>Kreatinin (µmol/L)</b>	64,4±3,4 (43,0-100,0)	62,0	25	72,3±13,8 (51,0-96,0)	74,0	16	0,083



EVF=Erytrocytvolymfraction (hematokrit), TPK=Trombocytpartikelkoncentration (antal trombocyter), ALB= Albumin, ALP= Alkalinfosfatase, ALAT= Alaninaminotransferas, f-Gallsyror = faste-Gallsyror, CRP=C-reaktivt protein, LPK= Leukocytpartikelkoncentration (totalantal leukocyter), Stavk= Stavkärniga, Segmk=Segmentkärniga. \* P-värden < 0,05, som uppvisar statistisk signifikans.

## DISKUSSION

Detta är första gången som förekomsten av koagulationsrubbningar har undersökts hos tikar med pyometra med hjälp av TEG. Resultaten av undersökningen visade att 92 % av tikarna med kliniska tecken på pyometra var hyperkoaguabla och att 100 % av tikarna var hyperkoaguabla när hänsyn togs till den histologiska diagnosen akut pyometra. Ingen skillnad i hyperkoaguabilitet kunde påvisas i relation till tikarnas allmäntillstånd, vilket innebär att även tikar med pyometra och ett relativt gott allmäntillstånd kan antas ha koagulationsrubbningar. Även tre pyometratikar med lågt CRP och normalt antal neutrofiler var hyperkoaguabla medan de andra två med lågt CRP var normokoaguabla. De två normokoaguabla tikarna visade sig sakna en histologisk diagnos i ena fallet och ha en kronisk pyometra i det andra fallet. Av de tre hyperkoaguabla tikarna med kliniska symtom på pyometra och lågt CRP hade två av tikarna histologiskt normala livmödrar och den tredje tiken en akut pyometra. I de två fall med hyperkoaguabla tikar där pyometra kunde uteslutas histologiskt trots kliniska tecken på pyometra, kan annan okänd inflammation ligga till grund för hyperkoaguabiliteten. Det kan även röra sig om normalvariation. Sammanfattningsvis tyder resultaten på att det är förväntat att tikar med pyometra är hyperkoaguabla. Det logiska antagandet är att koagulationsrubbningarna direkt hänger ihop med den systemiska inflammationen som orsakas av pyometra. Det är tidigare känt att systemisk inflammation kan påverka koagulationssystemet (O'Brien M. 2012).

Med tanke på att pyometra bäst behandlas kirurgiskt är det ett skäl till att man vid klinisk misstanke om allvarlig koagulationsrubbning bör undersöka tikens hemostas pre-operativt. Detta gäller framförallt om man har skäl att misstänka att patienten är på väg att drabbas av DIC. Detta för att undvika oönskade blödningskomplikationer i samband med det kirurgiska ingreppet och att få en chans att stabilisera patientens tillstånd före operationen. Med antagandet att det hyperkoaguabla tillståndet är normalt för tikar med pyometra bör man reagera om TEG-resultaten visar på normokoaguabilitet samt att det finns anledning att vara observant på om TEG-resultaten visar på ett hypokoaguabelt tillstånd då detta indikerar underfunktion i hemostasen med risk för blödningar.

TEG är en känslig metod för att identifiera hyperkoaguabla tillstånd. Detta framgår tydligt av TEG-resultaten som statistiskt signifikant urskiljer pyometragruppen som hyperkoaguabel, från kontrollgruppen. Liknande resultat har setts vid en tidigare studie hos hundar med parvovirusinfektion där TEG har använts (Otto et al., 2000). Tidigare har det varit svårt att identifiera hyperkoaguabla tillstånd. Framförallt D-dimer har använts men metoden har sina begränsningar i och med att det krävs att det hyperkoaguabla tillståndet redan har gett upphov till fibrinolys och dessförinnan fibrinbildning, innan D-dimervärdena blir förhöjda (Lip och Lowe, 1995). Även om enstaka tikar med pyometra i den här studien hade kraftigt förhöjda D-dimervärden så gick det ej att fastställa någon statistiskt signifikant skillnad mellan

grupperna när D-dimer-värdena jämfördes. Detta betyder att det med TEG går att identifiera hyperkoaguabla tillstånd innan koagulationsrubningen har fortskridit till patologisk trombbildning och ger utslag på D-dimeranalysen. Från att det knappt har funnits några studier med hundar där TEG har använts så börjar det nu publiceras flera. Resultaten från studierna kan dock vara svåra att jämföra då det finns variationer på hur TEG-analyser kan utföras.

Att TEG är en känslig metod blir uppenbart då det med hjälp av TEG-analysen gick att identifiera en mycket större andel (92 % respektive 100 % för tikar med kliniska tecken på pyometra respektive tikar med histologiska tecken på akut pyometra) av tikarna i studien som hyperkoaguabla jämfört med resultaten i form av förhöjda D-dimer-värden (28 % respektive 44 %) och/eller förkortad aPTT (36 % respektive 42 %).

Hos hundar med kliniska parvovirusinfektioner upplevde behandlande veterinärer att det förekom en hög andel tromboflebiter samt kateter-relaterade tromber. Med anledning av detta genomfördes en studie där man med hjälp av TEG fann att dessa hundar generellt var hyperkoaguabla (Otto et al., 2000). Den gemensamma komponenten mellan parvo-infekterade hundar och tikar med pyometra är troligtvis den systemiska inflammationen som stimulerar kroppens koagulationssystem. Generellt utmärkte sig pyometragruppen i jämförelse med kontrollgruppen med att oftast ha höga CRP-koncentrationer och leukocytos vilket tyder på inflammation i kroppen samtidigt som TEG-resultaten indikerade hyperkoaguabilitet. Resultaten från parvo-studien går helt i linje med resultaten från vår studie, och visade också att TEG är en bra metod för att identifiera hyperkoaguabla tillstånd. Majoriteten, 72 %, av tikarna med kliniska tecken på pyometra var SIRS-positiva när de delades in enligt kriterierna fastställda av Hauptman et al. (1997), däremot gick det inte att fastställa några statistiskt signifikanta skillnader gällande koagulationsresultaten mellan de SIRS-positiva och SIRS-negativa tikarna. När SIRS-statusen enbart bedömdes hos tikarna med den histologiska diagnosen akut pyometra var 78 % SIRS-positiva enligt kriterierna ovan.

I en humanstudie såg man tendenser till att patienter med sepsis och samtidig DIC, var hypokoaguabla när TEG analyserades. Patienterna som enbart hade sepsis utan tecken på DIC var istället hyperkoaguabla (Sivula et al., 2009). I liknande studier på hundar med sepsis vara de överlevande patienterna i större utsträckning hyperkoaguabla vid pre-operativ TEG-analys, men de icke-överlevande snarare hade värden inom referensgränserna i den studien där TEG användes. I den andra sepsis-studien användes andra koagulationsanalyser, och ett prokoagulatoriskt tillstånd identifierades med hjälp av förhöjda nivåer av D-dimer samt högt fibrinogen. Det kan därför stämma att SIRS orsakad av infektion och subklinisk DIC orsakar hyperkoaguabilitet, som vid klinisk DIC övergår i normokoaguabilitet och därefter hypokoaguabilitet vilket är förknippat med en sämre prognos (Bentley et al., 2013, Laforcade et al., 2003). Detta stämmer väl överens med våra resultat där tikarna varit i relativt gott kliniskt skick men trots detta var hyperkoaguabla.

Det är överraskande att tikarna i den grupp som långtidsuppföljdes var hyperkoaguabla under så pass lång tid, hos en tik över en månad postoperativt. Kirurgiska ingrepp i sig orsakar hyperkoaguabilitet och detta har tidigare visats hos kliniskt friska tikar i samband med OHE

eller ovariektomi. Dessa tikar följdes med ett nollprov samt upp till ett dygn efter ingreppen och TEG-resultaten visade där att tikarna var hyperkoaguabla vid tidpunkten 24 timmar efter ingreppen. (Moldal et al., 2012) Dock var den TEG-analysen inte av exakt samma typ som har används i den här studien. Man kan dock anta att det kirurgiska ingreppet i kombination med den systemiska inflammationen orsakad av pyometra är orsaken bakom tikarnas kvarstående hyperkoaguabilitet postoperativt även i den här studien. Nämnas bör att tikarnas allmäntillstånd var gott under långtidsuppföljningen, och att den långvariga hyperkoaguabiliteten kan anses vara subklinisk. Det går inte att helt att utesluta att den långvariga hyperkoaguabiliteten hos någon av tikarna som långtidsuppföljdes inte orsakats av annan okänd subklinisk inflammation. Det saknas dock andra studier med långtidsuppföljningar som visar när koagulationsrubbningar som uppstått i samband med systemisk inflammation eller kirurgiska ingrepp har normaliserats.

## KONKLUSIONER

Tikar med pyometra har koagulationsrubbningar i form av hyperkoaguabilitet, även då de fortfarande har ett relativt gott allmäntillstånd. Det kan ta flera veckor innan tikarna blir normokoaguabla igen efter kirurgisk behandling. Tromboelastografi är en känslig metod som kan vara till god hjälp för att bedöma den aktuella patientens tillstånd.

## REFERENSER

Van Amersfoort S. E., Van Berkel J.C. T., och Kuiper J. (2003) Receptors, Mediators, and Mechanisms Involved in Bacterial Sepsis and Septic Shock, *Clinical Microbiology Reviews*, 379–414

Bentley M. A., Mayhew D. P., Culp T. N. W. och Otto M. C. (2013) Alterations in the hemostatic profiles of dogs with naturally occurring septic peritonitis, *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*. doi: 10.1111, 1-9. [Epub ahead of print]

De Bosschere H., Ducatelle R., Vermeirsch H., Van Den Broeck W. och Coryn M. (2001) Cystic endometrial hyperplasia - pyometra complex in the bitch : *Theriogenology*. 55, 1509-1519

should the tw o e

De Bosschere H., Ducatelle R., Vermeirsch H., Simoens P. och Coryn M. (2002) Estrogen-alfa and progesterone receptor expression in cystic endometrial hyperplasia and pyometra in the bitch, *Animal Reproduction Science*, 70, 251–259

Bowbrick A. V., Mikhailidis P. D., och Stansby G. (2003) The Use of Citrated Whole Blood in Thromboelastography, *Anesthesia & Analgesia*. 90, 1086–8

Cade F. J. och Robinson T. F. (1974) Coagulation and Fibrinolysis in the Dog, *Canine Journal of Comparative Medicine*. 39, 296-298

Donahue M. S. och C M. Otto M. C. (2005) Thromboelastography: a tool for measuring hypercoagulability, hypocoagulability, and fibrinolysis, *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*. 15(1), 9-16

Dow C. (1958) The cystic hyperplasia-pyometra complex in the bitch. *Veterinary Record* 70, 1102-1110.

Egenvall A., Hagman R., Bonnett N. B., Hedhammar Å., Olson P., och Lagerstedt A-S. (2001) Breed Risk of Pyometra in Insured Dogs in Sweden, *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 15, 530–538

Egenvall A., Hedhammar Å., Bonnet N.B. och Olson P. (1999) Survey of the Swedish Dog Population: Age, Gender, Breed, Location and Enrolment in Animal Insurance, *Acta Veterinaria Scandinavica*. 40(3), 231-240.

Eralp O., Yilmaz Z., Failing K., Moritz A., och Bauer N. (2011) Effect of Experimental Endotoxemia on Thrombelastography; Parameters, Secondary and Tertiary Hemostasis in Dogs, *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 25, 524–531

Fletcher B. T., Toh C-H., Hoots W. K., Wada H. och Levi M. (2001) Towards Definition, Clinical and Laboratory Criteria, and ~~Scoring System for Disseminated Intravascular Coagulation~~ *and Haemostasis*. 86, 1327–30

Fransson A. B. och Ragle A. C. (2003) Canine Pyometra: An Update on Pathogenesis and Treatment, *Compendium*, 25(8), 602-611

Hagman R., Kindahl H. och Lagerstedt A-S. (2006) Pyometra in Bitches Induces Elevated Plasma Endotoxin and Prostaglandin F<sub>2</sub>-alfa Metabolite Levels, *Acta Veterinaria Scandinavica*. 47, 55-68

Hagman R. och Kühn I. (2002) Escherichia coli strains isolated from the uterus and urinary bladder of bitches suffering from pyometra: comparison by restriction enzyme digestion and pulsed-field gel electrophoresis, *Veterinary Microbiology*, 84, 143–153

Hauptman JG., Walshaw R. och Olivier NB. (1997) Evaluation of the sensitivity and specificity of diagnostic criteria for sepsis in dogs. *Veterinary Surgery*. 26, 393–397.

de Laforcade M. A., Freeman M. L., Shaw P. S., Brooks B. M., Rozanski A. E., och Rush E. J. (2003) Hemostatic Changes in Dogs with Naturally Occurring Sepsis, *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 17, 674–679

Lip Y. H. G. och Lowe D. O. G. (1995) Fibrin D-dimer: a useful clinical marker of thrombogenesis?, *Clinical Science*. 89, 205-214.

Moldal R. E., Kristensen T. AM., Peeters E. M., Nødtvedt A. och Kirpensteijn J. (2012) Hemostatic response to surgical neutering via ovariectomy and ovariohysterectomy in dogs, *American Journal of Veterinary Research*. 73(9), 1469-1476.

Niskanen M. och Thrusfield M. V. (1998) Associations between age, parity, hormonal therapy and breed and pyometra in Finnish dogs, *The Veterinary Record*. 143, 493-498

O'Brien M. (2012) The Reciprocal Relationship Between Inflammation and Coagulation, *Topics in Companion Animal Medicine*. 27, 46-52

Okano S., Tagawa M. och Takase K. (1998) Relationship of the Blood Endotoxin Concentration and Prognosis in Dogs with Pyometra, *The Journal of Veterinary Medical*. 60(11), 1265-1267

Otto M.C., Rieser M.T., Brooks B.M. och Russel W.M. (2000) Evidence of hypercoagulability in dogs with parvoviral enteritis, *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 217 (10), 1500-1504.

Park S. M., Martini Z. W., Dubick A. M., Salinas J., Butenas S., Kheirabadi S. B., Pusateri E. A., Wang JJ., Vos A. J., Guymon H.C., Wolf E. S., Mann G. K. och John B. Holcomb B. J. (2009)

Thromboelastography as a Better Indicator of Postinjury Hypercoagulable State Than Prothrombin Time or Activated Partial Thromboplastin Time, *Journal of Trauma*, 67(2), 266-276.

SAS Institute Inc. (2008): SAS/Stat User's Guide. Version 9. Cary, N. C., SAS Institute Inc.

Sivula M., Pettila V., Niemi T., Varpula M. och Kuitunen A. (2009) Thromboelastometry in patients with severe sepsis and disseminated intravascular coagulation. *Blood Coagulation & Fibrinolysis*. 20 (6), 419-426.

Teunissen G.H.B. (1952) The development of endometritis in the dog and the effect of oestriol and progesterone on the uterus, *Acta endocrinologica*. 9, 407-420

Wagg R. C, Boysen R. S. och Bédard C. (2009) Thrombelastography in dogs admitted to an intensive care unit, *Veterinary Clinical Pathology*, 38(4), 453-461

Wiinberg B., Lundorff Jensen A., Rojkjaer R., Johansson P., Kjelgaard-Hansen M. och Kristensen T. A. (2005) Validation of human recombinant tissue factor- activated thromboelastography on citrated whole blood from clinically healthy dogs, *Veterinary Clinical Pathology*, 34, 389-393.