

# Interpretation of electrocardiographic, echocardiographic and biochemical findings during different stages of Canine Visceral Leishmaniasis

## Interpretación de los hallazgos electrocardiográficos, ecocardiográficos y bioquímicos durante las diferentes etapas de la leishmaniasis visceral canina

Ural K<sup>1\*</sup> Ph.D, Paşa S<sup>1</sup> Ph.D, Gultekin M<sup>1</sup> Ph.D, Balıkçı C<sup>1</sup> DVM.

<sup>1</sup>University of Adnan Menderes, Faculty of Veterinary, Department of Internal Medicine, Aydın, Turkey

\*Correspondence: [uralkerem@gmail.com](mailto:uralkerem@gmail.com)

Received: January 2017; Accepted: May 2017.

### ABSTRACT

**Objective.** The purpose of the present study was to test the hypothesis that cardiac alterations participate within different stages of CVL. **Materials and methods.** Twenty-eight dogs were diagnosed with CVL, were classified [based on clinical signs, rapid ELISA/IFAT, hematological and serum biochemical tests, urinary protein/creatinine ratio, ECG and ECHO]. as follows; group I (mild disease), group II (moderate disease), group III (severe disease), group IV (very severe disease) and group V included healthy controls. **Results.** Ig G antibodies against leishmaniasis as tested by IFAT, were deemed 1/64 to 1/16000 among infected groups. There were statistical significance regarding mean values for WBC [among healthy control group (V.) and other groups ( $p=0.049$ )], RBC [among stage III-stage IV and other groups ( $p=0.001$ )], Hb [between stage I and stage III-stage IV ( $p=0.008$ )], HCT [between stage I and other groups ( $p = 0.001$ )] MCHC [between stage I and stage II- stage IV ( $p=0.046$ )], serum creatinine [( $p=0.008$ ) stage IV and stage I-II within group V], serum protein [( $p=0.002$ ) among stage IV and stage I-III- healthy control groups] and serum albumine [( $p=0.004$ ) among stage IV and stage I-II]. There was no alteration in CTnI concentrations, among groups. UPC analysis revealed statistical difference among control group and stage II to IV dogs ( $p=0.000$ ). Moderate or severe ECG abnormalities were detected in 6/28 of diseased dogs. Regarding ECHO examination LA/Ao value presented significant difference ( $p=0.003$ ) among stage IV and other groups. **Conclusions.** It may be suggested that establishing Leishvet Working Group to those of dogs classified into stage I to IV, ECG [left atrial/ventricular enlargement, myocardial hypoxia] and ECHO [left atrial dilation, decreased/increased LVIDs, decreased/increased LVIDd, shortened FS and EF (systolic dysfunction)] alterations must be taken into account along with hematological and serum biochemical analysis.

**Keywords:** Canine Visceral Leishmaniasis, stage, electrocardiography, echocardiography, cardiac troponin I (*Source: CAB thesaurus*)

### RESUMEN

**Objetivo.** El propósito del presente estudio fue probar la hipótesis de que las alteraciones cardíacas participan en diferentes estadios de CVL. **Materiales y métodos.** Veintiocho perros fueron diagnosticados con CVL, fueron clasificados [Basados en signos clínicos, pruebas ELISA / IFAT rápidas, pruebas bioquímicas hematológicas y de suero, relación proteína / creatinina urinaria, ECG y ECHO]. Como sigue; Grupo I (enfermedad leve), grupo II (enfermedad moderada), grupo III (enfermedad

grave), grupo IV (enfermedad muy grave) y grupo V incluidos controles sanos. **Resultados.** Los anticuerpos Ig G contra la leishmaniasis en el grupo como probado por IFAT, se consideraron 1/64 a 1/16000 entre los grupos infectados. Hubo significación estadística con respecto a los valores medios de WBC [entre grupo control sano (V) y otros grupos ( $p=0.049$ )], RBC [entre estadio III-fase IV y otros grupos ( $p=0.001$ )], Hb [entre etapa I y estadio III, fase IV ( $p=0.008$ )], HCT [entre etapa I y otros grupos ( $p=0.001$ )] MCHC [entre etapa I y etapa II- estadio IV ( $p=0.046$ )], creatinina sérica [ $p=0.008$ ] estadio IV y estadio I-II en el grupo V], proteína sérica [ $p=0.002$ ] en estadio IV y estadio I-III- grupos sanos de control] y suero de albúmina [ $p=0.004$ ] I - II]. No hubo alteración en las concentraciones de CTnI, entre los grupos. El análisis de UPC reveló diferencia estadística entre el grupo control y los perros de estadio II a IV ( $p=0.000$ ). Se detectaron alteraciones ECG moderadas o severas en 6/28 de los perros enfermos. En cuanto al examen ECHO, el valor LA / Ao presentó diferencias significativas ( $p=0.003$ ) entre los grupos IV y otros. **Conclusiones.** Se puede sugerir que el establecimiento del Grupo de Trabajo de Leishvet a los de los perros clasificados en estadios I a IV, ECG [aumento de la aurícula / ventrículo izquierdo, hipoxia miocárdica] y ECHO [dilatación auricular izquierda, disminución / aumento de los LVID, Y la EF (disfunción sistólica)] alteraciones deben tomarse en cuenta junto con el análisis hematológico y bioquímico del suero.

**Palabras clave:** Leishmaniasis visceral canina, estadio, electrocardiografía, ecocardiografía, troponina cardiaca I (Source: CAB thesaurus)

## INTRODUCTION

Canine Visceral Leishmaniasis (CVL), a well recognized parasitic and zoonotic disease caused by an intracellular protozoan of the genus *Leishmania* (1), is transmitted to the canine species by the bite of blood-sucking sand flies (*Phlebotomus* species). The disease might exist subclinically or might manifest as a systemic involvement [cutaneous, ocular or renal lesions, hepatosplenomegaly, anemia, muscular atrophy and weight loss] (2). Within the last 15 years clinical signs of cardiac disease are reported in relationship with leishmaniasis (3-6), myocardial lesions might exist (3-7), thus the parasite could be detected in cardiac tissue (3,4,6).

Thus, the goals of this study composed of dogs naturally exposed to CVL were to (1) quantify the echocardiographic and electrocardiographic findings and alterations in cTnI concentrations, (2) determine if different stages of CVL is related to cardiac injury and (3) evaluate the association of hematologic, serologic and serum biochemical abnormalities and severity of disease (different stages of CVL).

## MATERIALS AND METHODS

**Site of the study and animal population.** The study was performed at the University of Adnan Menderes, Faculty of Veterinary, Department of Internal Medicine (37.828922 latitude and 27.793518 longitude) located in Eagean region of Turkey) to those of dogs referred to clinics with disease associated signs.

## INTRODUCCION

La leishmaniosis visceral canina (CVL), una enfermedad parasitaria y zoonótica bien reconocida causada por un protozoo intracelular del género *Leishmania* (1), se transmite a las especies caninas por la mordedura de moscas de la sangre (*Phlebotomus* species). La enfermedad puede existir subclínicamente o puede manifestarse como una afección sistémica [lesiones cutáneas, oculares o renales, hepatoesplenomegalia, anemia, atrofia muscular y pérdida de peso] (2). En los últimos 15 años se han reportado signos clínicos de enfermedad cardiaca en relación con leishmaniasis (3-6), pudiendo existir lesiones miocárdicas (3-7), por lo que se pudo detectar el parásito en el tejido cardíaco (3,4,6).

Por lo tanto, los objetivos de este estudio compuesto de perros naturalmente expuestos a CVL fueron: (1) cuantificar los hallazgos ecocardiográficos y electrocardiográficos y las alteraciones en las concentraciones de cTnI, (2) determinar si las diferentes etapas de CVL están relacionadas con lesiones cardíacas y (3) evaluar La asociación de anomalías bioquímicas hematológicas, serológicas y séricas y la gravedad de la enfermedad (diferentes estadios de CVL).

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Sitio del estudio y población animal.** El estudio se realizó en la Universidad de Adnan Menderes, Facultad de Veterinaria, Departamento de Medicina Interna (37.828922 de latitud y 27.793518 longitud) ubicado en la región de

**Grouping and classification of animals.** Prior to study necessary ethical guidelines were taken into consideration, and a written owner consent was available for all dogs involved. A total of 35 dogs, comprising 28 with CVL and 7 healthy were enrolled. Diagnosis of CVL was established through dogs presenting one or some of the clinical signs in association with the disease condition, subjected to rapid ELISA based test kits and immune fluorescence antibody test. Dogs diagnosed with CVL, based on serological, clinical, hematological and biochemical findings, were classified into 4 different groups (n=7), as reported by Leishvet Group (8). Aforementioned research groups were assigned in a subset of five major groups of dogs studied were as follows;

- I group: Stage I (mild disease)
- II group: Stage II (moderate disease)
- III group: Stage III (severe disease)
- IV group: Stage IV (very severe disease)
- V group: Healthy controls.

Laboratory analysis deemed necessary for staging of the diseases were shown in table 1.

**Table 1.** Laboratory methods used in the present study

Sample	Parameter/ Measurement	Method/ Device
EDTA whole blood	Whole blood count	Coulter/ Abacus Junior Vet
Serum	Anti- <i>Leishmania</i> antibody titer	IFAT/ Commercial test kit
	Total Protein	Samsung Lab Geo PT10
	Albumine	Samsung Lab Geo PT10
	Creatinine	Samsung Lab Geo PT10
	CTnI	Fluorescent Immunassay/ Finecare, Wondfo
Urine	Protein	Colorimetric
	Creatinine	Colorimetric

**Hematological examination.** Blood samples were withdrawn from *Vena cephalica antebrachii*. A total of 2.5 mL anticoagulated (EDTA) blood was forwarded to laboratory for complete blood counts by use of automatic cell counter (Abacus Junior). Leukocyte (WBC), erythrocyte (RBC), packed cell volume (PCV), hemoglobine (HGB), mean erythrocyte volume (MCV) and mean erythrocyte hemoglobin concentration (MCHC) and thrombocyte (PLT) values were detected.

**Urinalysis.** Voided urine sample or urine collected by catheterization (5 mL) were analyzed for total protein and creatinine concentrations in a private [Bio-Rad Eqas, Vetqas (Veterinary Laboratory Quality Assurance Unit) and Vqas (Veterinary Laboratory Quality Association

Eagean de Turquía) a los de los perros se refiere a las clínicas con signos asociados a la enfermedad.

**Agrupación y clasificación de animales.** Antes de estudiar las directrices éticas necesarias se tuvieron en cuenta, y un consentimiento por escrito del propietario estaba disponible para todos los perros involucrados. Un total de 35 perros, comprendiendo 28 con CVL y 7 sanos fueron inscritos. El diagnóstico de CVL se estableció a través de perros que presentaban uno o algunos de los signos clínicos en asociación con la condición de la enfermedad, se sometieron a kits de prueba rápidos basados en ELISA y prueba de anticuerpos de fluorescencia inmune. Los perros diagnosticados con CVL, basados en hallazgos serológicos, clínicos, hematológicos y bioquímicos, se clasificaron en 4 grupos diferentes (n = 7), según lo informado por Leishvet Group (8). Los grupos de investigación antes mencionados fueron asignados a un subgrupo de cinco grupos principales de perros estudiados como sigue:

- Grupo I. Etapa I (enfermedad leve)
- II. Grupo: Etapa II (enfermedad moderada)
- III. Grupo: Estadio III (enfermedad grave)
- IV. Grupo: Estadio IV (enfermedad muy grave)
- V. grupo: controles sanos.

Los análisis de laboratorio considerados necesarios para la estadificación de las enfermedades se muestran en la tabla 1.

**Examen hematológico.** Se extrajeron muestras de sangre de Vena cephalica antebrachii. Un total de 2,5 mL de sangre anticoagulada (EDTA) se envió al laboratorio para recuentos sanguíneos completos mediante el uso de contador automático de células (Abacus Junior). Se detectaron valores de leucocitos (eritrocitos), eritrocitos (RBC), volumen de células empaquetadas (PCV), hemoglobina (HGB), volúmenes medios de eritrocitos (MCV) y hemoglobina media de eritrocitos (MCHC) y trombocitos (PLT).

**Análisis de orina.** Se analizaron las muestras de orina o la orina extraídas por cateterización (5 mL) para determinar las concentraciones totales de proteína y creatinina en un organismo privado [EQAS de Bio-Rad, Vetqas (Unidad de Aseguramiento de Calidad de Laboratorio Veterinario) y Vqas (Bilim Special Veterinary Diagnosis and Analysis Laboratory, Estambul, Turquía), en el que se calculó colorimétricamente la relación proteína / creatinina urinaria. Todas las muestras urinarias fueron enviadas inmediatamente bajo envases fríos.

Assurance Programme]) outer quality programme partnership laboratory (Bilim Special Veterinary Diagnosis and Analysis Laboratory, Istanbul, Turkey), in which urinary protein/creatinine ratio was calculated colorimetrically. All urinary samples were forwarded immediately under cold packages.

**Serology-Based Assays.** ELISA based test kits were used according to the manufacturer's instructions to detect *Leishmania infantum* (Snap Leishmania test kit, IDEXX) and to those of *E. canis*/*E. ewingii*, *A. phagocytophilum*/*A. platys*, *Borrelia burgdorferi* antibodies and *Dirofilaria immitis* antigens (Snap 4Dx plus, IDEXX). An immunofluorescence assay (8,9) was used to test canine sera for antibodies against *Leishmania infantum* (Leishmania IgG) as previously described (10). Serum aliquots for serology tests were stored until analysis. The IFAT result deemed positive for CVL with a 1:64 and above dilution of the serum gave an evident yellow-green fluorescent signal upon microscopical detection, whereas nonreactive (without samples yellow-green fluorescent) appeared negative (10).

**Serum cTnI concentrations.** Serum cTnI concentrations were determined at the Department of Internal Medicine, Faculty of Veterinary, University of Adnan Menderes, with a commercial troponin I analysis system (Wondfo Finecare Fluorescent Immunoassay) previously validated. Serum aliquots were stored until study, and were thawed just prior to the moment of the analysis. Measurements below the lower limit of detection (0.1 ng/mL) were assigned this value for the statistical analysis. Linear range (min-max) of the Finecare Fluorescent Immunoassay was 0.1-50 ng/mL.

**Serum biochemical analysis.** Total Protein, albumine and creatinine levels were determined by use of chemistry analyzer (Samsung Lab Geo PT10; Korea).

**Cardiac evaluation.** Cardiac examination was performed [electrocardiographic (ECG), echocardiographic (ECHO) and cTnI analysis] in dogs infected with leishmaniasis [in an attempt to diagnose, detect presence and severity of cardiac injury] and to those of healthy dogs [for comparative evaluation].

For ECG examination standard 10-lead ECGs (leads I, II, III, aVR, aVL, aVF, rV2, V2, V4, and V10) were recorded at least for 60 seconds in all cases by use of a computer-based ECG monitor with a speed of 50 mm/s, calibrated for 10 mV/cm. ECGs were analyzed for heart rhythm and rate, alterations in amplitude of T wave/ST

**Ensayos basados en serología.** Se utilizaron kits de prueba basados en ELISA de acuerdo con las instrucciones del fabricante para detectar *Leishmania infantum* (kit de prueba Snap Leishmania, IDEXX) y para los de *E. canis* / *E. Ewingii*, *A. phagocytophilum* / *A. Platys*, anticuerpos de *Borrelia burgdorferi* y antígenos de *Dirofilaria immitis* (Snap 4Dx plus, IDEXX). Se utilizó un ensayo de inmunofluorescencia (8,9) para analizar el suero canino de anticuerpos contra *Leishmania infantum* (*Leishmania* IgG) como se describió anteriormente (10). Se almacenaron alícuotas de suero para pruebas serológicas hasta su análisis. El resultado de IFAT considerado positivo para CVL con una dilución 1:64 y superior del suero dio una señal fluorescente amarilla-verde evidente tras la detección microscópica, mientras que no reactivo (sin muestras de color amarillo-verde fluorescente) apareció negativo (10).

**Concentraciones séricas de cTnI.** Las concentraciones séricas de cTnI se determinaron en el Departamento de Medicina Interna de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Adnan Menderes, con un sistema comercial de análisis de troponina I (Wondfo Finecare Fluorescent Immunoassay) previamente validado. Las alícuotas de suero se almacenaron hasta el estudio, y se descongelaron justo antes del momento del análisis. A las mediciones por debajo del límite inferior de detección (0.1 ng/mL) se les asignó este valor para el análisis estadístico. La gama lineal (min-máx.) Del inmunoensayo fluorescente de Finecare fue de 0.1-50 ng/mL.

**Análisis bioquímico del suero.** Los niveles totales de proteína, albumina y creatinina se determinaron mediante el uso de un analizador químico (Samsung Lab Geo PT10, Corea).

**Evaluación cardíaca.** Se realizó un examen cardíaco [ECG], ecocardiográfico (ECHO) y análisis de cTnI] en perros infectados con leishmaniasis [en un intento de diagnóstico, detectar presencia y gravedad de la lesión cardíaca] ya los de perros sanos [para evaluación compative] .

Para el ECG se registraron, por lo menos durante 60 segundos en todos los casos, ECG estándar de 10 derivaciones (conductores I, II, III, aVR, aVL, aVF, rV2, V2, V4 y V10) mediante el uso de un monitoreo De ECG basado en ordenador Con una velocidad de 50 mm / s, calibrado para 10 mV / cm. ECGs fueron analizados para el ritmo cardíaco y la tasa, alteraciones en la amplitud de la onda T / segmento ST, disturbios de conducción. Los ECG fueron clasificados de acuerdo a la gravedad de las anomalías, como se describió anteriormente (11).

segment, conduction disturbances. ECGs were rated according to severity of abnormalities, as previously described (11).

ECHO analysis were performed within the right parasternal sagittal plane in a motion (M) mode with an electronic 2.7-5 MHz probe, with portable ECHO machine (Mindray M5, China) as purchased within the budget of this project. Parameters such as left ventricle internal diameter in diastole (LVIDd) and systole (LVIDs), fractional shortening (FS) and ejection fraction (EF) [using Teichholz method] were calculated (12,13). From every case enrolled, four consecutive heart cycles were averaged involving each parameter (14). Left ventricular systolic dysfunction was defined as a fractional shortening of 26 % (14).

**Statistical analysis.** Statistical analysis of the results was performed by use of SPSS 18.0 for Windows (SPSS, 2009). In each group during sampling time arithmetic mean (X), standard deviation (s) and minimum-maximum (Xmin-Xmax) values were calculated. Given the set of data, the present researchers checked if its distribution was normal. Two tests, Shapiro-Wilk or Kolmogorov-Smirnov, were run for normality. Parameters not normally distributed were subjected to nonparametric methods. Comparison of parameters in more than 2 groups were performed by Kruskal-Wallis test, post-hoc pairwise comparisons

## RESULTS

**Signalment.** Dogs of 11 different breeds were enrolled, as shown in table 2. Twenty three dogs were purebred, whereas 12 were of crossbred. Enrolled dog population consisted of 26 males and 9 females, distributed as following: Group I dogs: 3 males and 4 females; Group II: all male; Group III and IV each 6 males and 1 female and controls: 4 males and 3 females. The body weight ranged from 7 to 41 kg and did not vary significantly among the groups.

**Clinical findings.** Control group of dogs were subjected to physical examination and laboratory analysis aforementioned above and suggested as healthy. Based on laboratory parameters (Table 1) and staged according to Leishvet guidelines, diseased groups presented clinical signs as shown in table 3.

**IFAT titers.** The IFAT was positive for all dogs in the infected groups. IFAT titers according to groups and individual cases were shown in table 4.

**Cardiac Troponin I results.** Among control group and to those of groups I., II. and IV. there was no alteration in CTnI concentrations, all values

El análisis ECHO se realizó en el plano sagital para el derecho en un modo de movimiento (M) con una sonda electrónica de 2,7-5 MHz, con una máquina portátil ECHO (Mindray M5, China) adquirida dentro del presupuesto de este proyecto. Se encontraron parámetros como el diámetro interno del ventrículo izquierdo en diástole (LVIDd) y sístole (LVIDs), acortamiento fraccionario (FS) y fracción de eyección (EF) [utilizando el método de Teichholz] (12,13). De cada caso inscrito, se promediaron cuatro ciclos cardíacos consecutivos que implicaban cada parámetro (14). La disfunción sistólica del ventrículo izquierdo se definió como acortamiento fraccionario del 26% (14).

**Análisis estadístico.** El análisis estadístico de los resultados se realizó mediante el uso de SPSS 18.0 para Windows (SPSS, 2009). En cada grupo se calcularon los valores de media aritmética (X), desviación estándar (s) y mínimo-máximo (Xmin-Xmax) durante el muestreo. Dado el conjunto de datos, los investigadores actuales verificaron si su distribución era normal. Dos pruebas, Shapiro-Wilk o Kolmogorov-Smirnov, fueron ejecutadas para la normalidad. Los parámetros no distribuidos normalmente fueron sometidos a métodos no paramétricos. Comparación de los parámetros en más de 2 grupos se realizaron por Kruskal-Wallis prueba, post-hoc pairwise comparaciones.

## RESULTADOS

**Filiación.** Se incluyeron perros de 11 razas diferentes, como se muestra en la tabla 2. Veintitrés perros eran de raza pura, mientras que 12 de crossbred. La población de perros inscritos constaba de 26 machos y 9 hembras, distribuidos de la siguiente manera: Perros del Grupo I: 3 machos y 4 hembras; Grupo II: todos machos; Grupo III y IV cada 6 machos y 1 hembra y controles: 4 machos y 3 hembras. El peso corporal osciló entre 7 y 41 kg y no varió significativamente entre los grupos.

**Hallazgos clínicos.** El grupo de control de perros fue sometido a examen físico y análisis de laboratorio anteriormente mencionados y se sugirió como sanos. Basándose en los parámetros de laboratorio (Tabla 1) y en estadios según las directrices de Leishvet, los grupos enfermos presentaron signos clínicos como se muestra en la tabla 3.

**Títulos IFAT.** El IFAT fue positivo para todos los perros en los grupos infectados. Los títulos de IFAT según grupos y casos individuales se muestran en la tabla 4.



**Table 2.** Demographic information of infected cases and control group

Stage	Case	Sex	Breed	Age (Year)	Weight (Kg)
I	1	M	Crossbred	2	28
	2	F	Spaniel Cooker	1	8
	3	M	Crossbred	2	18
	4	F	Golden retriever	3	24
	5	F	Crossbred	4	12
	6	F	Labrador Retriever	1	16
	7	M	Crossbred	3	11
II	1	M	Pointer	3	20
	2	M	English mastiff	6	38
	3	M	German shepherd	2	23
	4	M	Crossbred	1	15
	5	M	Crossbred	1	16
	6	M	Terrier	2	9
	7	M	Crossbred	4	22
III	1	M	Dogo Argentino	5	41
	2	M	Kangal	1,5	35
	3	M	Terrier	4	7
	4	M	Presa Canario	5	51
	5	M	Boxer	4	18
	6	F	Crossbred	12	13
	7	M	Dogo Argentino	3	32
IV	1	M	Dogo Argentino	3	38
	2	M	Spaniel cocker	6	28
	3	M	Boxer	4	16
	4	F	Golden retriever	4	20
	5	M	Cooker	3	25
	6	M	Kangal	2,5	25
	7	M	Golden retriever	14	28
Control	1	M	Crossbred	3	10
	2	M	Terrier	4	14
	3	F	Dogo argentino	1	16
	4	M	Crossbred	2	18
	5	F	Kangal	6	15
	6	F	Crossbred	2	15
	7	M	Crossbred	8	18

M= Male, F= Female

were detected under the lower limits of detection (<0.1 ng/mL), whereas solely in one dog (in G III) presented midly elevation (0.16 ng/mL).

**Hematological results.** Hematological data and relevant descriptive statistics were presented in table 5. There were statistical significance regarding mean ( $\pm$ standard deviation) values for WBC [among healthy control group (V.) and other groups ( $p=0.049$ )], RBC [among stage III-stage IV and other groups ( $p=0.001$ )], Hb [between

**Table 4.** IFAT analysis results of groups

Group	I		II				III				IV			V		
Case	All	1	2	3	4	5	6	7	1	2	3	4	5	6	7	All
IFAT	1/64	1/512	1/128				1/512	1/128	1/256	1/512	1/1024	1/2048	1/4096	1/8000	1/16000	0

**Table 3.** Number of cases showing clinical manifestations in infected groups

Symptoms	Groups				
	I	II	III	IV	V
High body temperature	0	0	1	2	0
Lymphadenopathy	7	7	7	7	0
Weight loss	3	5	7	7	0
Onychogriposis	2	3	3	4	0
Hypotrichosis	7	7	7	7	0
Periocular alopecia	0	1	1	1	0
Skin lesions	7	7	7	7	0
Epistaxis	0	0	0	2	0

**Resultados de la Troponina I cardiaca.** Entre el grupo control y los de los grupos I, II y IV. No hubo alteraciones en las concentraciones de CTnI, todos los valores se detectaron bajo los límites inferiores de detección (<0.1 ng/mL), mientras que únicamente en un perro (en G III) se presentó una elevación media (0.16 ng/mL).

**Resultados hematológicos.** Los datos hematológicos y las estadísticas descriptivas relevantes se presentaron en la tabla 5. Hubo significación estadística con respecto a la media ( $\pm$  desviación estándar) de los valores de WBC [entre grupo de control sano (V) y otros grupos ( $p=0.049$ )], RBC [entre estadio III ( $p=0.001$ )], Hb [entre estadio I y estadio III-fase IV ( $p=0.008$ )], HCT [entre etapa I y otros grupos ( $p=0.001$ )] y MCHC [entre estadio I y etapa III - estadio IV ( $p=0.046$ )].

**Resultados bioquímicos en suero.** Entre los perros infectados con Leishmaniasis, el análisis bioquímico del suero (albumina, creatinina y proteína total) realizado para la estadificación de la enfermedad con estadística descriptiva se indicó en la tabla 6. Teniendo en cuenta los hallazgos bioquímicos séricos hubo diferencias significativas en la creatinina sérica [( $p=0.008$ ) IV y otros grupos, excepto G III], TP sérico [( $p=0.002$ ) entre G IV y otros grupos, excepto G II], albumina sérica [( $p=0.004$ ) entre estadio IV y estadio I-II].

**Examen electrocardiográfico.** A los de los perros inscritos, el examen ECG se realizó una vez en CVL infectados y grupos de control, como se muestra en la tabla 7. Dos de los actuales investigadores (Prof. Dr. KU y DVM CB), que fueron bien experimentados durante muchos años en ECG y Examen ECHO, análisis realizado. El primer autor pasó 17 años en el campo de

**Table 5.** Descriptive statistics of relevant hematological data for CVL infected dogs

Data	Groups					P value
	I	II	III	IV	V	
WBC (x10 <sup>9</sup> /L)	15.8±4.9 <sup>b</sup> (10.7-22.1)	17.2±7.4 <sup>b</sup> (10.2-31.6)	21.2±17.9 <sup>b</sup> (5.8-59)	16.4±9.4 <sup>b</sup> (7.6-26.9)	7.6±1.2 <sup>a</sup> (6.2-9.4)	0.049
RBC (x10 <sup>12</sup> /L)	5.8±0.5 <sup>a</sup> (5.1-6.9)	5.8±1.7 <sup>a</sup> (4.1-9.2)	4.4±0.6 <sup>b</sup> (3.7-5.2)	4.8±1 <sup>b</sup> (3.95-6.1)	7.2±0.7 <sup>a</sup> (6.2-7.9)	0.001
HGB (g/dL)	13.8±1.5 <sup>a</sup> (11.0-16.3)	13.5±4.3 <sup>a,b</sup> (8.4-21.8)	9.9±2.2 <sup>b</sup> (7.1-13.5)	10.9±2.9 <sup>b</sup> (8.3-15.6)	14.9±1.4 <sup>a</sup> (12.2-16.8)	0.008
HCT (%)	37.2±3.8 <sup>a</sup> (30.6-43.2)	37.0±10.8 <sup>b</sup> (25.3-57.1)	28.9±4.5 <sup>b</sup> (23.0-35.5)	31.2±7.0 <sup>b</sup> (23.9-39.8)	43.7±1.8 <sup>a</sup> (41.0-46.1)	0.001
MCV (fL)	63.7±2.3 (60.0-66.0)	63.4±2.5 (61.0-68.0)	65.4±3.8 (61.0-72.0)	64.857±2.9 (61.0-70.0)	66.0±2.1 (63.0-69.0)	0.359
MCHC (g/dL)	37.0±1.1 <sup>b</sup> (35.7-38.3)	36.2±1.8 <sup>a,b</sup> (33.0-37.9)	33.8±3.5 <sup>a</sup> (30.9-38.3)	34.5±2.5 <sup>a</sup> (31.1-39.2)	34.3±1.5 <sup>a</sup> (32.2-36.5)	0.046
PLT (x10 <sup>9</sup> /L)	437.5±204 (202-681)	334.8±287 (32-717)	249.2±45.3 (185-316)	185.1±97.5 (64-317)	318.8±62.6 (248-401)	0.121

Mean ± standard deviation (minimum-maximum), Difference between groups according to letters a and b are shown

WBC: White blood cell, RBC: Red blood cell, HGB: Hemoglobin, HCT: Hematocrit, MCV: Erythrocyte mean volume, MCHC: Mean hemoglobin volume in erythrocytes, PLT: Thrombocyte

stage I and stage III-stage IV ( $p=0.008$ ), HCT [between stage I and other groups ( $p=0.001$ )] and MCHC [between stage I and stage III- stage IV ( $p=0.046$ )].

**Serum biochemical results.** Among dogs infected with Leishmaniasis serum biochemical analysis (albumine, creatinine and total protein) performed for staging of the disease with descriptive statistics were denoted on table 6. Considering serum biochemical findings there were significant differences for serum creatinine [( $p=0.008$ ) among G IV and other groups, except G III], serum TP [( $p=0.002$ ) among G IV and other groups, except for G II], serum albumine [( $p=0.004$ ) among stage IV and stage I-II].

**Electrocardiographic examination.** To those of enrolled dogs, ECG examination was performed once in CVL infected and control groups, as shown in table 7. Two of the present researchers (Prof. Dr. K.U. and DVM C.B.), who were well experienced for many years in ECG and ECHO examination, performed analysis. First author spent 17 years in cardiology field, and participated within the ECG and ECHO examinations of several cases. Moderate or severe ECG abnormalities were detected in 6/28 of diseased dogs (Table 7); however, with 3 out of 7

la cardiología, y participó en los exámenes ECG y ECHO de varios casos. Se detectaron alteraciones ECG moderadas o graves en 6/28 de los perros enfermos (Tabla 7); Sin embargo, con 3 de los 7 casos en los perros de la etapa IV, mostrando evidencia de que a medida que el progreso del estado de la enfermedad, más perros presentaron anomalía ECG, al menos para este estudio. Los perros de control también se incluyeron en la comparación, aunque estos perros fueron seleccionados para la ausencia de anomalías de ECG. Algunos de los perros inscritos en los grupos presentaron más de 1 anomalía del ECG, a aquellos de los cuales la taquicardia sinusal leve ( $n = 4$ ), las altas ondas T ( $n = 5$ ) y la elevación del segmento ST ( $n = 5$ , con 3 casos en la etapa IV ) Eran evidentes.

**Resultados del examen ecocardiográfico.** En cuanto al ECHO examen de los grupos infectados de perros con CVL (I.-IV.) media ( $\pm$  desviación estándar) LA / Ao valor presentaron diferencia significativa ( $p = 0,003$ ) entre la etapa IV y otros grupos. Aunque hubo diferencias individuales insignificantes con respecto a otros parámetros (FS, EF, LVIDs y LVIDd), la evaluación global no presentó diferencias entre los grupos que se muestran en las tabla 8 y 9.

**Table 6.** Albumine, creatinine and total protein values of CVL-infected and control dogs according to groups

	Groups					p value
	I	II	III	IV	V	
ALB (g/dL)	2.52±0.31 <sup>a</sup> (2-2.86)	2.3±0.43 <sup>a</sup> (1.84-3.16)	2.1±0.42 <sup>a,b</sup> (1.3-2.76)	1.71±0.28 <sup>b</sup> (1.3-2.1)	2.21±1.2 <sup>a,b</sup> (2-2.5)	0.004
CREA (mg/dL)	0.78±0.27 <sup>a</sup> (0.44-1.3)	0.79±0.3 <sup>a</sup> (0.48-1.3)	1.03±0.59 <sup>a,b</sup> (0.6-2.3)	1.65±0.97 <sup>b</sup> (0.6-2.6)	0.56±0.16 <sup>a</sup> (0.4-0.8)	0.008
TP (g/dL)	5.7±1.76 <sup>a</sup> (2.8-8.3)	6.0±0.62 <sup>a,b</sup> (5.4-6.8)	5.4±0.85 <sup>a</sup> (3.86-6.22)	7.6±1.25 <sup>b</sup> (5.5-8.9)	4.67±0.9 <sup>a</sup> (3.6-5.8)	0.002

ALB: Albumine, CREA: Creatinine, TP: Total protein. Mean ± standart deviation (minimum-maximum). The differences between the groups according to letters a and b are shown.

cases in stage IV dogs, showing evidence that as the disease status progress, more dogs presented ECG abnormality, at least for this study. Control dogs were also included within the comparison, although these dogs were selected for the absence of ECG abnormalities. Some of the dogs enrolled in groups presented more than 1 ECG abnormality, to those of which mild sinus tachycardia (n=4), high T waves (n=5) and ST segment elevation (n=5, with 3 cases in stage IV) were prominently evident.

**Table 7.** Electrocardiographic findings\* among dogs infected with leishmaniasis and to those of control group (V) of dogs

ECG Abnormality*	Group				
	I	II	III	IV	V
Mild sinus tachycardia	1	1	1	1	0
Persistent sinus tachycardia	0	0	1	1	0
Bradycardia	0	0	0	1	0
Atrial premature complex	0	1	0	0	0
High T waves	0	0	2	3	0
ST segment elevation	0	0	2	3	0
<b>ECG abnormalities by severity</b>					
No abnormality or mild	7	6	5	4	7
Moderate	0	1	1	2	0
Severe	0	0	1	1	0

\*Schober et al (11).

### Echocardiographic examination results.

Regarding ECHO examination of infected groups of dogs with CVL (I-IV.) mean ( $\pm$  standard deviation) LA/Ao value presented significant difference ( $p=0.003$ ) among stage IV and other groups. Although there were insignificant individual differences regarding other parameters (FS, EF, LVIDs and LVIDd), overall evaluation did not present differences among groups which was shown in table 8 and 9.

**Table 9.** Statistical evaluation of ECHO findings

Data	Groups					p value
	I	II	III	IV	V	
Weight	17.4 $\pm$ 7.6 (8-28)	19.7 $\pm$ 9.1 (9-38)	29.4 $\pm$ 15.2 (7-51)	23.7 $\pm$ 4.8 (16-28)	15.1 $\pm$ 2.7 (10-18)	0.100
LVIDs	2.1 $\pm$ 0.5 (1.4-2.9)	1.7 $\pm$ 0.5 (1.0-2.2)	2.3 $\pm$ 0.9 (0.9-3.2)	2.0 $\pm$ 0.7 (1.5-3.1)	2.23 $\pm$ 0.6 (1.8-3.2)	0.443
LVIDd	3.3 $\pm$ 0.6 (2.3-4.2)	3.2 $\pm$ 0.4 (2.7-4.0)	3.7 $\pm$ 1.0 (2.5-5.0)	3.5 $\pm$ 0.6 (2.9-4.2)	3.2 $\pm$ 0.7 (2.5-4.2)	0.777
EF	67.4 $\pm$ 6.1 (59-74)	76.6 $\pm$ 14.4 (58-93)	64.6 $\pm$ 19.2 (35.3-93.8)	73 $\pm$ 14 (52-82.6)	60.6 $\pm$ 9.3 (48-74)	0.200
FS	36.6 $\pm$ 4.4 (31-42)	46.4 $\pm$ 14.4 (29-65)	37.2 $\pm$ 16.2 (16.4-65.4)	37.6 $\pm$ 11.2 (26.9-50)	32.3 $\pm$ 6.8 (24-42)	0.635
LA/Ao	1.3 $\pm$ 0.3 <sup>a</sup> (0.9-1.7)	1.1 $\pm$ 0.2 <sup>a</sup> (0.7-1.3)	1.3 $\pm$ 0.2 <sup>a</sup> (1-1.6)	1.8 $\pm$ 0.2 <sup>b</sup> (1.5-2.1)	1.3 $\pm$ 0.2 <sup>a</sup> (1.1-1.5)	0.003

Mean  $\pm$  standart deviation (minimum-maximum) The differences between the groups according to letters a and b are shown.

**Table 8.** Evaluation of ECHO findings\*

ECHO Abnormalities*	Groups				
	I	II	III	IV	V
Decreased FS *	0	1	2	3	0
Decreased LVIDS **	1	3	2	5	0
Decreased LVIDd **	1	2	3	4	0
Enlarged atrium (1.5<LA/Ao<2)***	1	0	2	2	0
Significantly enlarged atrium (LA/Ao>2)**	0	0	0	1	0

\*Diniz et al (14) \*\*Categorical assessments were based on normal reference values for dogs and predicting intervals for variable weights (body weight); Cornell et al (26) \*\*\* Tai et al (29).

**Análisis de orina.** El análisis de UPC reveló que los valores del grupo de control eran <0,1. Por otro lado los valores de UPC fueron <0.1-0.3 en G I, 0.5-1 en G II, 2-3 en G III, 5-10 en G IV. Todos los valores se muestran en la tabla 10.

## DISCUSION

El presente estudio se llevó a cabo con el apoyo financiero y científico del Consejo de Investigación Científica y Tecnológica de Turquía, en el que se tomó en consideración la estadificación actualizada de la enfermedad basada en los criterios de Leishvet (8). Por lo tanto, no debe ser imprudente sacar la conclusión de que el examen cardiológico basado en ECG y ECHO hallazgos y cñTI análisis de acuerdo a las etapas de CVL no se informó anteriormente.

Teniendo en cuenta las directrices de Leishvet serológicas (títulos IFAT y pruebas ELISA adicionales), los hallazgos clínicos y la evaluación de laboratorio (TP, alb y creatinina) perros incluidos en este estudio participaron en 4 diferentes grupos infectados (estadio I a IV). La etapa I incluyó (títulos de anticuerpos positivos bajos: 1/64), hasta la etapa IV (niveles de anticuerpos positivos altos: 1/1024-1/16000). De acuerdo con la estadificación propuesta y la literatura pertinente (8) estadio I y



**Urinalysis.** UPC analysis revealed control group values were  $<0.1$ . On the other hand UPC values were  $<0.1-0.3$  in G I,  $0.5-1$  in G II,  $2-3$  in G III,  $5-10$  in G IV. All values were shown in table 10. Statistical difference was evident among control group and stage II to IV dogs ( $p=0.000$ )

## DISCUSSION

The present study was conducted with the financial and scientific (3001 Tübitak Project) support of The Scientific and Technological Research Council of Turkey, in which updated staging of the disease was taken into consideration based on the criteria by Leishvet Guidelines (8). Therefore it should not be unwise to draw conclusion that cardiological examination based on ECG and ECHO findings and cTnI analysis according to the stages of CVL were not reported previously.

Taking into account Leishvet Guidelines serological (IFAT titers and additional ELISA tests), clinical findings and laboratory evaluation (TP, Alb and creatinine) dogs enrolled in this study were participated in 4 different infected groups (stage I to IV). Stage I included (low positive antibody titers:  $1/64$ ), to stage IV (high positive antibody levels:  $1/1024-1/16000$ ). In agreement with the proposed staging and the relevant literature (8), stage I and II (to those of groups denoted with same numbers) revealed normal renal profile, whereas stage III dogs presented chronic kidney disease (CKD) IRIS stage I or stage II, and finally stage IV dogs showed CKD) IRIS stage III or stage IV.

Regarding hematological data statistical significance were evident for WBC [among healthy control group (V.) and other groups ( $p=0.049$ )], RBC [among stage III-stage IV and other groups ( $p=0.001$ )], Hb [between stage I and stage III-stage IV ( $p=0.008$ )], HCT [between stage I and other groups ( $p=0.001$ )] and MCHC [between stage I and stage III- stage IV ( $p=0.046$ )]. As the disease progress erythrocyte markers altered, as expected.

Cardiac troponins (cTn) are used as blood biomarkers with high specificity and sensitivity for detecting myocardial degeneration. The latter contractile proteins, might be released from myocardium in relation with the severity of tissue injury and myocyte membrane disruption (15). Specifically detectable elevations in circulating cTnI were reported in Canine Monocytic Ehrlichiosis (14). Regarding the relation between cTnI and leishmaniasis limited portion of study took place in the literature.

**Table 10.** Values and statistical evaluation of the UPC analysis

Data	Groups					p value
	I	II	III	IV	V	
UPC	0.15 $\pm 0.1^{a,b}$ (0.1-0.3)	2.4 $\pm 0.5^b$ (2.0-3.0)	2.4 $\pm 0.5^b$ (2.0-3.0)	6.9 $\pm 2.2^b$ (5.0-10.0)	0.09 $\pm 0.0^a$ (0.09-0.09)	<b>0,000</b>

Mean  $\pm$  standart deviation (minimum-maximum) The differences between the groups according to letters a and b are shown.

II (a los de los grupos con el mismo número) reveló perfil renal normal, los perros weheras etapa III presentaron enfermedad renal crónica (IRC) IRIS etapa I o fase II, Y finalmente los perros del estadio IV mostraron CKD) IRIS etapa III o etapa IV.

En cuanto a los datos hematológicos, se observó una significación estadística para los glóbulos blancos [entre el grupo control sano (V) y otros grupos ( $p=0.049$ )], RBC [entre estadio III y otros grupos ( $p=0.001$ ) I y III estadio IV ( $p=0.008$ )], HCT [entre etapa I y otros grupos ( $p=0.001$ )] y MCHC [entre etapa I y etapa III - estadio IV ( $p=0.046$ )]. A medida que los marcadores eritrocíticos del progreso de la enfermedad se alteraron, como se esperaba.

Las troponinas cardíacas (cTn) se utilizan como biomarcadores sanguíneos con alta especificidad y sensibilidad para detectar la degeneración miocárdica. Las últimas proteínas contráctiles, podrían liberarse del miocardio en relación con la gravedad de la lesión tisular y la alteración de la membrana de los miocitos (15). Se observaron elevaciones específicamente detectables en la cTnI circulante en Ehrlichiosis monocítica canina (14). En cuanto a la relación entre cTnI y leishmaniasis, parte limitada del estudio tuvo lugar en la literatura. La investigación bibliográfica detallada reveló casos (16) y algunos estudios originales limitados (17,18).

Un estudio reciente informó que la miocarditis en CVL (3,5) podría estar asociada a alteraciones inmunológicas debidas a infección por Leishmania (7). Otro estudio examinó los corazones de 30 perros naturalmente infectados con Leishmania infantum chagasi, detectó lesiones miocárdicas en todos los perros y el parásito se encontró en el tejido cardíaco (20/30 perros). De acuerdo con los resultados de este estudio, las lesiones cardíacas podrían ser prevalentes en perros con CVL de origen natural, incluso en ausencia de signos clínicos relacionados con la insuficiencia cardíaca (6).

Un estudio previo fue objeto de una evaluación de la cTnI sérica como indicador de lesión miocárdica en perros con leishmaniasis (17). En ese estudio en 40 perros con leishmaniasis, la concentración media

Detailed literature search revealed case reports (16), and some limited original studies (17,18).

A recent study reported that myocarditis in CVL (3,5) could be in association within immunological alterations due to *Leishmania* infection (7). Another study inspected the hearts of 30 dogs naturally infected with *Leishmania infantum chagasi*, detected myocardial lesions in all dogs, and the parasite was found in the cardiac tissue (20/30 dogs). According to the results of that study cardiac lesions might be prevalent in dogs with naturally occurring CVL even in the absence of clinical signs related to heart failure (6).

A prior study was the subject of an evaluation for serum cTnI as an indicator of myocardial injury in dogs with leishmaniasis (17). In that study in 40 dogs with leishmaniasis, median cTnI concentration was significantly ( $p = 0.011$ ) higher in contrast to 11 control dogs. Sixteen dogs (40%) with CVL presented elevated cTnI concentration. There was moderately to weak correlation among cTnI with decreased positive *Leishmania* titer, and increased age, whereas cTnI concentration did not differ between azotemic animals and control dogs (17). However serum cTnI concentration might have interaction with age, thus could be elevated with marked azotemia, a finding frequently associated with canine leishmaniasis (15). In the present study there was no increase on serum cTnI concentrations among dogs with different stages of CVL infected dogs, although advanced stages (stage III or IV) caused chronic renal failure.

A total of 30 non-uremic dogs with leishmaniasis in Greece, were prospectively enrolled as 20 in Group A were treated with a combination of meglumine antimonate and allopurinol for 28 days, whereas 10 dogs participated in Group B were treated with allopurinol alone (18). Blood samples were collected at timepoint 0 (before treatment) and at 14 and 28 days after the initiation of treatment. None of the dogs treated with meglumine antimonate in group A presented a serum cTnI concentration above the upper limit of the reference range ( $>0.5$  ng/mL) nor cardiotoxicity at 2 and 4 weeks after the initial therapy (18).

As aforementioned above limited literature evaluated intravital diagnosis of cardiac alterations in leishmaniasis. Cardiac involvement in dogs (3,6,7,17) revealed that this protozoan might be also involved in heart, which promptly support the necessity of cardiac evaluation in cases of suspected leishmaniasis.

In the present study except 1 case, cTnI levels were not changed. Although it is not possible to

de cTnI fue significativamente ( $p = 0.011$ ) mayor en contraste con 11 perros de control. Dieciséis perros (40%) con CVL presentaron una concentración elevada de cTnI. Hubo una correlación moderada a débil entre cTnI con disminución del título positivo de *Leishmania* y aumento de la edad, mientras que la concentración de cTnI no difirió entre los animales azotémicos y los perros control (17). Sin embargo, la concentración sérica de cTnI podría tener interacción con la edad, por lo que se podría elevar con azotemia marcada, un hallazgo frecuentemente asociado con la leishmaniasis canina (15). En el presente estudio no hubo aumento en las concentraciones séricas de cTnI entre los perros con diferentes estadios de perros infectados con CVL, aunque las etapas avanzadas (estadio III o IV) causaron insuficiencia renal crónica.

Un total de 30 perros no urémicos con leishmaniasis en Grecia, se inscribieron prospectivamente como 20 en el grupo A fueron tratados con una combinación de antimonato de meglumina y alopurinol durante 28 días, mientras que 10 perros participantes en el grupo B fueron tratados con alopurinol solo (18). Se recogieron muestras de sangre en el punto de tiempo 0 (antes del tratamiento) ya los 14 y 28 días después del inicio del tratamiento. Ninguno de los perros tratados con antimonato de meglumina en el grupo A presentó una concentración sérica de cTnI por encima del límite superior del intervalo de referencia ( $>0.5$  ng / ml) ni cardiotoxicidad a las 2 y 4 semanas después de la terapia inicial (18).

Como se mencionó anteriormente, la literatura limitada evaluó el diagnóstico intravital de alteraciones cardíacas en la leishmaniasis. La afectación cardíaca en perros (3,6,7,17) reveló que este protozoario podría estar también implicado en el corazón, lo que prontamente apoya la necesidad de evaluación cardíaca en casos de sospecha de leishmaniasis.

En el presente estudio excepto 1 caso, los niveles de cTnI no fueron cambiados. Aunque no es posible hacer una interpretación únicamente analizando los niveles de cTnI, fue un hallazgo interesante e inesperado. La medición repetida no estaba disponible, excluyendo para interpretar la elevación persistente. La elevación persistente de los niveles de cTnI sugirió un daño continuo irreversible y activo a los cardiomiocitos (15). Además, la gravedad de la elevación estaba en correlación con el grado de daño miocárdico (19). A este contexto, los niveles no elevados de cTnI observados en este estudio, aunque en etapas avanzadas de la infección, podrían explicarse brevemente con lesión miocárdica no progresada o no desarrollada.

Silvestrini et al (17) detectaron que los niveles de cTnI eran más altos ( $p = 0.017$ ) en perros

make interpretation solely analyzing cTnI levels, it was an interesting and unexpected finding. Repeated measurement was not available, excluding out to interpret persistent elevation. Persistent elevation in cTnI levels suggested irreversible and active continuing damage to cardiomyocytes (15). Besides the severity of elevation was in correlation with the extent of myocardial damage (19). To this context non-elevated cTnI levels observed in this study, although in advanced stages of the infection, might be briefly explained with nonprogressed or undeveloped myocardial injury.

Silvestrini et al (17) detected that cTnI levels were higher ( $p=0.017$ ) in proteinuric dogs compared with nonproteinuric dogs with CVL. Hypoalbuminemia and proteinuria, prominent features of CVL, classically exist secondary to glomerulonephritis due to immune complex deposition (20). Similar pathogenesis could affect microvasculature damage as in the myocardium, probably accompanying to cardiomyocyte damage and subsequent cTnI release (17). However in the present study taking into account UPC values in different stages of CVL, proteinuric dogs (stage II, III and IV) did not present cTnI elevations, not in agreement with Silvestrini et al (17). On the other hand only a limited portion of dogs participated in this study would have had influence on results.

As myocarditis and arrhythmias have been shown to occur in human beings and dogs with leishmaniasis (20), ECG and ECHO examination might be of beneficial for noninvasive detection of myocardial injury. Given ECG as a noninvasive detection method (21) and its usage both for diagnostic and prognostic purposes in suspected myocarditis cases (22), the present project established 12 lead computerized ECG for supporting the diagnosis and detection of myocardial injury and foremost cardiac alterations (cardiac monitorization, atrial/ventricular dilatation, congestive heart failure, conduction disturbances, arrhythmia, pericardial disease) in relation with CVL.

Electrocardiograms of 105 dogs serologically positive CVL infected dogs were examined for rhythm disturbances and alterations in ECG waves (20). Sinus arrest (14.3%), right bundle branch block (4.8%), and atrial premature beats (4.8%) were observed. Those latter alterations were suggestive of enlargements of left atrium/ventricle and myocardial hypoxia (20). Another study evaluated the cardiotoxic changes in relation with pentavalent antimonial compounds in CVL (23). Twenty-eight dogs naturally infected with *Leishmania infantum* were treated with

proteinúricos en comparación con perros no proteínicos con CVL. La hipoalbuminemia y la proteinuria, características prominentes de CVL, existen clásicamente secundarias a la glomerulonefritis debido a la deposición del complejo inmune (20). Una patogénesis similar podría afectar el daño de la microvasculatura como en el miocardio, probablemente acompañando al daño de cardiomiocitos y posterior liberación de cTnI (17). Sin embargo, en el presente estudio, teniendo en cuenta los valores de UPC en diferentes estadios de CVL, los perros proteinúricos (estadios II, III y IV) no presentaron elevaciones de cTnI, no de acuerdo con Silvestrini et al (17). Por otra parte sólo una parte limitada de los perros que participaron en este estudio habría tenido influencia en los resultados.

Como se ha demostrado que la miocarditis y las arritmias ocurren en seres humanos y perros con leishmaniasis (20), el ECG y el ECHO pueden ser beneficiosos para la detección no invasiva de lesión miocárdica. Dado el ECG como un método de detección no invasivo (21) y su uso tanto para propósitos diagnósticos como pronósticos en sospechas de casos de miocarditis (22), el presente proyecto estableció 12 electrocardiogramas computarizados para apoyar el diagnóstico y detección de lesión miocárdica y principalmente alteraciones cardíacas Monitorización, dilatación auricular / ventricular, insuficiencia cardíaca congestiva, trastornos de la conducción, arritmia, enfermedad pericárdica) en relación con CVL.

Electrocardiogramas de 105 perros serológicamente positivos CVL perros infectados fueron examinados para el ritmo alteraciones y alteraciones en las ondas de ECG (20). Se observaron paros sinusales (14.3%), bloqueo de la rama derecha (4.8%) y latidos auriculares prematuros (4.8%). Esas últimas alteraciones eran sugestivas de agrandamientos de la aurícula izquierda / ventrículo izquierdo y la hipoxia miocárdica (20). Otro estudio evaluó los cambios cardiotóxicos en relación con los compuestos antimoniales pentavalentes en CVL (23). Veintiocho perros naturalmente infectados con *Leishmania infantum* fueron tratados con antimoniato de meglumina y se determinó un examen de ECG antes y después del tratamiento, en el que no se detectaron anomalías en los trazos de ECG (23).

En el presente estudio se observó una mayor amplitud de la onda T (tensión) [más de 1/3 de la amplitud de la onda R, no compuesta de onda T bifásica] y elevación del segmento ST [ $> 0.15$  mV] en dos (fase III) Y tres casos (estadio IV). Ambos cambios podrían estar dedicados al infarto de miocardio ya la hipoxia miocárdica (23). Debería ser mejor hacer la interpretación junto con los

meglumine antimoniate and ECG examination before and after treatment were determined, in which no abnormalities were detected on ECG tracings (23).

In the present study increased T wave amplitude (voltage) [more than 1/3 of the amplitude of the R wave, not composed of biphasic T-wave] and ST segment elevation [ $>0.15$  mV] were evident in two (stage III) and three cases (stage IV). Both changes might be dedicated to myocardial infarction and myocardial hypoxia (23). It should be better to make interpretation along with ECHO examinations. Entire ECG evaluation revealed mild sinus tachycardia and atrial premature complex in two cases (stage II), mild sinus tachycardia and persistent sinus tachycardia each one case (stage III), mild sinus tachycardia, persistent sinus tachycardia and bradycardia each one case (stage IV), interestingly denoting that as stages of the disease develop ECG alterations rose.

ECG abnormalities by severity revealed that the vast majority with three cases were enrolled in stage IV (G IV) CVL infected dogs accompanied by moderate alterations. Twelve lead ECG abnormalities, which was not previously described in dogs with CVL, were detected in 6/28 (moderate or severe alterations) diseased dogs in this study. Additionally it was not easy to comparatively evaluate the results with previous studies performed six lead ECG.

Echocardiographic abnormalities, which was not previously described, both in M mode and B mode, in dogs with CVL were detected in more than two-third of *L. infantum*-infected dogs in this study. Left ventricular dilation and hypertrophy might be in relationship with myocardial injury (14). Left ventricular dilation is well known compensatory mechanism for prevention against decrease in cardiac output. Left ventricular dilation frequently preexists a persistent decline in FS (14), which was detected in six out of 28 cases (from stage I to III) of the *L. infantum*-infected dogs.

Systolic function decreases might be proofed via reduced fractional shortening (FS%) and ejection fraction ( $<45\%$ ). The latter two parameters are frequently analyzed for measuring the left ventricular systolic function, also suggested as a good indicator of ventricular contractility (24). In an attempt to diagnose myocardial failure and specific chamber dilatation 2D/ M-mode echocardiography is required. Regarding veterinary literature, the vast majority of researchers reported fractional shortening (FS) as foremost indicator of systolic function. Among dogs FS values less than 20-25% are suggested to

exámenes de ECHO. La evaluación completa del ECG reveló taquicardia sinusal leve y complejo prematuro auricular en dos casos (estadio II), taquicardia sinusal leve y taquicardia sinusal persistente en cada caso (estadio III), taquicardia sinusal leve, taquicardia sinusal persistente y bradicardia en cada caso (estadio IV), Lo que denota de manera interesante que a medida que las etapas de la enfermedad se desarrollan las alteraciones del ECG subieron.

ECG anomalías por gravedad reveló que la gran mayoría con tres casos se inscribieron en la etapa IV (G IV) CVL infectados perros acompañados de alteraciones moderadas. Doce anomalías de ECG de plomo, que no se describieron previamente en perros con CVL, se detectaron en 6/28 (alteraciones moderadas o graves) perros enfermos en este estudio. Además, no fue fácil evaluar los resultados de forma complementaria con estudios previos realizados con seis ECG de plomo.

En este estudio se detectaron anomalías ecocardiográficas, que no se describieron previamente, tanto en modo M como en modo B, en perros con CVL en más de dos tercios de los perros infectados por *L. infantum*. La dilatación ventricular izquierda y la hipertrofia podrían estar en relación con la lesión miocárdica (14). La dilatación ventricular izquierda es un mecanismo compensatorio bien conocido para la prevención contra la disminución del gasto cardíaco. La dilatación ventricular izquierda con frecuencia preexiste una disminución persistente de FS (14), que se detectó en seis de los 28 casos (de la etapa I a la III) de los perros infectados por *L. infantum*.

La disminución de la función sistólica puede comprobarse mediante reducción del acortamiento fraccionario (FS%) y fracción de eyección ( $<45\%$ ). Los dos últimos parámetros son frecuentemente analizados para medir la función sistólica del ventrículo izquierdo, también sugerido como un buen indicador de la contractilidad ventricular (24).

En un intento de diagnosticar el fallo miocárdico y la dilatación específica de la cámara se requiere ecocardiografía en modo 2D / M. En cuanto a la literatura veterinaria, la gran mayoría de las investigaciones informó de acortamiento fraccionario (FS) como principal indicador de la función sistólica. Entre los perros, se sugiere que los valores FS inferiores al 20-25% son anormalmente bajos, la disfunción sistólica de la denotina. Por otro lado, incluso si la insuficiencia mitral es evidente, el FS puede ser desvalorizado (25).

Los estudios con respecto a los perros sanos revelaron FS (%)  $>30$  (26) y los valores bajo



be abnormally low, denoting systolic dysfunction. On the other hand even if mitral regurgitation is evident, FS may be misevaluated (25).

Studies regarding healthy dogs revealed FS (%) > 30 (26) and values under should probably denote dilated cardiomyopathy (25). In the present study mean values among groups although did not reveal significant increase or decrease individual evaluation presented decreased FS in 1 case (29%) in GII, 2 cases in GIII (25% and 16.4%) and 3 in G IV (27%, 26.9% and 29.8%). As stages of CVL progressed independently from the serum biochemical findings, cases with decreased FS values elevated [3 out of 7 cases (42.85%) in stage IV]. However it was not able to attribute decreased FS values with dilated cardiomyopathy. Besides in progress of dilated cardiomyopathy radiographical (not involved in the present study), ECHO and post-mortem (solely intravital diagnosis was evidenced, none of the cases were dead, hence this examination was impossible) examinations along with left ventricular and left atrial dilation might exist (26,27). Furthermore precise diagnosis of dilated cardiomyopathy requires entire evaluation of (a) left ventricular dilatation (b) decreased systolic function and (c) increased sphericity of the left ventricle (26,27). In our study among 28 dogs with CVL, six of those presented reduced FS values, might be attributable to systolic dysfunction.

Ejection fraction (EF) has been described as the foremost parameter for assessment of systolic function and values ranging from less than 40%-50% are denoted abnormal in humans. Considering dogs, an EF less than 40% is abnormally low (25) which indicates systolic function loss. In our study mean EF (%) values indicated no decrease, whereas individual examination revealed one case in stage III (% 35.3), which could be attributed to systolic function loss.

Left ventricular internal diameter at end diastole and systole might be of beneficial for direct interpretation of cardiomyopathy, besides for indirect evaluation of cardiac chambers/ congenital defects Regarding hypertrophic cardiomyopathy, LVIDd/ LVIDs both decreases, whereas in dilated cardiomyopathy both of those increase (28). In the present study both LVIDd and LVIDs values decreased in two cases of stage II, three in stage III and four in stage IV, respectively, which might be briefly explained with the occurrence of hypertrophic cardiomyopathy. It may be briefly explained as the stage of CVL increased; progression of chronic disease might cause more severe

deberían probablemente denotar miocardiopatía dilatada (25). En el presente estudio, los valores medios entre los grupos, aunque no revelaron un aumento significativo ni una valoración individual individual, presentaron FS disminuida en 1 caso (29%) en GII, 2 casos en GIII (25% y 16,4%) y 3 en G IV (27% , 26.9% y 29.8%). Como los estadios de CVL progresó independientemente de los resultados bioquímicos del suero, los casos con valores de FS desacelerados elevados [3 de 7 casos (42,85%) en la etapa IV]. Sin embargo, no fue capaz de atribuir valores decaídos FS con cardiomiopatía dilatada. Además de la cardiomiopatía dilatada radiographical (no implicado en el estudio present), ECHO y post mortem (sólo diagnóstico intravital se evidenció, ninguno de los casos estaban muertos, por lo tanto, este examen era imposible), junto con ventrículo izquierdo y dilatación auricular izquierda Podría existir (26,27). Además, el diagnóstico preciso de la cardiomiopatía dilatada requiere una evaluación completa de (a) dilatación ventricular izquierda (b) disminución de la función sistólica y (c) aumento de la esfericidad del ventrículo izquierdo (26,27). En nuestro estudio entre 28 perros con CVL, seis de los que presentaron valores de FS reducidos podrían atribuirse a la disfunción sistólica.

La fracción de eyección (EF) se ha descrito como el parámetro más importante para la evaluación de la función sistólica y los valores que van desde menos del 40-50% se denotan anormales en los seres humanos. Teniendo en cuenta los perros, una EF inferior al 40% es anormalmente baja (25), lo que indica pérdida de la función sistólica. En nuestro estudio, los valores promedio de EF (%) no indicaron disminución, mientras que el examen individual reveló un caso en la etapa III (% 35.3), que podría atribuirse a la pérdida de función sistólica.

El diámetro interno del ventrículo izquierdo al final de la diástole y la sístole podría ser beneficioso para la interpretación directa de la miocardiopatía, además de la evaluación indirecta de las cámaras cardíacas / defectos congénitos. En cuanto a la miocardiopatía hipertrófica, el LVIDd / LVID disminuye ambos, mientras que en la cardiomiopatía dilatada, . En el presente estudio, tanto los valores de LVIDd como de LVID disminuyeron en dos casos de estadio II, tres en estadio III y cuatro en estadio IV, respectivamente, lo que podría explicarse brevemente con la aparición de cardiomiopatía hipertrófica. Se puede explicar brevemente como la etapa de CVL aumentó; La progresión de la enfermedad crónica podría causar una lesión cardíaca más grave, lo que resulta en mucho más casos con disminución de LVIDd y LVIDs valores.

Tai ve Huang (29), en un estudio previo, describió un aumento de la aurícula izquierda ( $1.5 \leq LA$



cardiac injury, resulting in much more cases with decreased LVIDd and LVIDs values.

Tai ve Huang (29) in a prior study described enlarged left atria ( $1.5 \leq LA/Ao \leq 2$ ), markedly enlarged left atria ( $LA/Ao > 2$ ) based on left atrial/aortic root ratio ( $LA/Ao$ ) (29). In our study enlarged left atria [one case in stage I (1.71), two cases in stage III (1.52, 1.61) and five cases (1.63, 1.77, 1.96, 1.75 ve 1.66) in stage IV] and markedly enlarged left atria only in one case of stage IV (2.06) were detected.

In conclusion based on Leishvet guidelines serological (IFAT titers and ELISA test kits), clinical and laboratory findings (especialmente Tp, Alb and UPC) cases were enrolled into four different stages/groups (stage I to IV) presented hematologic [altered erythrocyte markers], electrocardiographic [left atrial/ventricular dilation, myocardial hypoxia] and echocardiographic [left atrial enlargement, LVIDd increase/decrease, LVIDs increase/decrease, FS and EF decrease (systolic dysfunction)] alterations which must be taken into consideration. Cardiac status should be established which could contribute to intravital diagnosis and hasten additional therapy protocols directed to cardiovascular system in dogs with CVL.

### Acknowledgements

The present authors would like to thank TUBITAK for financial support of 3001 Starting R&D Projects Funding Programme (Tübitak Ar-Ge Project) with no:1140453. The researchers who participated at all stages, put pen and showed great effort were involved at this manuscript.

/  $Ao \leq 2$ ), una marcada agrandamiento de la aurícula izquierda ( $LA / Ao > 2$ ) basada en la relación auricular / aorta). En nuestro estudio se agrandaron las aurículas izquierdas [1 caso en la etapa I (1,71), dos casos en estadio III (1,52, 1,61) y cinco casos (1,63, 1,77, 1,96, 1,75 ve 1, 66) en la etapa IV] y la aurícula izquierda marcadamente agrandada sólo en un caso de la etapa IV (2.06).

En conclusión, basándose en las directrices serológicas de Leishvet (títulos de IFAT y kits de prueba ELISA), los hallazgos clínicos y de laboratorio (especialmente Tp, Alb y UPC) se incluyeron en cuatro etapas/grupos (estadios I a IV) presentados hematológicos [marcadores alterados de eritrocitos], Electrocardiograma [dilatación auricular/ventricular izquierda, hipoxia miocárdica] y ecocardiográfico [aumento de la aurícula izquierda, aumento/disminución de LVIDd, aumento/disminución de LVID, disminución de FS y EF (disfunción sistólica)]. Debe establecerse un estado cardíaco que podría contribuir al diagnóstico intravital y acelerar los protocolos terapéuticos adicionales dirigidos al sistema cardiovascular en perros con CVL.

### Agradecimientos

Los presentes autores desean agradecer a TUBITAK por el apoyo financiero del Programa de Financiamiento de Proyectos de RD de 3001 (Proyecto Tübitak Ar-Ge) sin número: 1140453. Los investigadores que participaron en todas las etapas, pusieron pluma y mostraron un gran esfuerzo estuvieron involucrados en este manuscrito.

## REFERENCES

1. Kaszak I, Planellas M, Dworecka-Kaszak B. Canine leishmaniosis-an emerging disease. *Ann Parasitol* 2015; 61(2):69-76.
2. Feitosa MM, Ikeda FA, Luvizotto MCR, Perri SHV. Clinical aspects from dogs naturally infected with visceral leishmaniasis in Araçatuba, São Paulo State, Brazil. *Clin Vet* 2000; 5(28):36-44.
3. Lopez-Pena M, Aleman N, Munoz F, Fondevila D, Suarez ML, Goicoa A, Nieto JM. Visceral leishmaniasis with cardiac involvement in a dog: a case report. *Acta Vet Scand* 2009; 51:20-27.
4. Torrent E, Leiva M, Segalés J, Franch J, Peña T, Cabrera B, Pastor J. Myocarditis and generalised vasculitis associated with leishmaniosis in a dog. *J Small Anim Pract* 2005; 46:549-552.
5. Alves GBB, Pinho FA, Silva SMMS, Cruz MSP, Costa FAL. Cardiac and pulmonary alterations in symptomatic and asymptomatic dogs infected naturally with *Leishmania chagasi*. *Braz J Med Biol Res* 2010; 43:310-315.
6. Rosa FA, Leite HAC, Braga ET, Moreira PRR, Baltazar FH, Biondo AW, et al. Cardiac lesions in 30 dogs naturally infected with *Leishmania infantum chagasi*. *Vet Pathol* 2013; 51(3):603-606.

7. Costagliola A, Piegari G, Otrocka-Domagala I, Ciccarelli D, Iovane V, Oliva G, et al. Immunopathological Features of Canine Myocarditis Associated with *Leishmania infantum* Infection. *BioMed Res Int* 2016; 8016186.
8. Solano-Gallego L, Miró G, Koutinas A, Cardoso L, Pennisi MG, Ferrer L, et al. LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniasis. *Parasit Vectors* 2011; 4:86.
9. Paltrinieri S, Solano-Gallego L, Fondati A, Lubas G, Gradoni L, Castagnaro M, et al. Guidelines for diagnosis and clinical classification of leishmaniasis in dogs. *J Am Vet Med Assoc* 2010; 36(11):1184-1191.
10. Abranches P, Santos-Gomes G, Rachamim N, Campino L., Schnur LF, Jaffe CI. An experimental model for canine visceral leishmaniasis. *Parasite Immunol* 1991; 13(5):537-550.
11. Schober KE, Cornand C, Kirbach B, Aupperle H, Oechtering G. Serum cardiac troponin I and cardiac troponin T concentrations in dogs with gastric dilatation-volvulus. *J Am Vet Med Assoc* 2002; 221:381-388.
12. Mjølstada OC, Snarea SR, Folkvord L, Helland F, Grimsmoe A, Torpa H, Haraldseth O, Haugena BO. Assessment of left ventricular function by GPs using pocket-sized ultrasound. *Fam Pract* 2012; 29:534-540.
13. Testuz A, Müller H, Keller PF, Meyer P, Stampfli T, Sekoranjia L, Burri H. Diagnostic accuracy of pocket-size handheld echocardiographs used by cardiologists in the acute care setting. *Eur Heart J Cardiovasc Imaging* 2013; 14(1):38-42.
14. Diniz PPVP, De Moraes HAS, Breitschwerdt EB, Schwartz DS. Serum cardiac troponin I concentration in dogs with ehrlichiosis. *J Vet Intern Med* 2008; 22:1136-1143.
15. O'Brien PJ, Smith DE, Knechtel TJ. Cardiac troponin I is a sensitive, specific biomarker of cardiac injury in laboratory animals. *Lab Anim* 2006; 40:153-171.
16. Mendes RS, Gurjão I TA, Oliveira LM, Santana V., Tafuri WL, Santos JRS, et al. Chronic myocarditis in a dog naturally infected by *Leishmania infantum* chagasi: clinical and pathological aspects. *Arq Bras Med Vet Zootec* 2014; 66(1):79-84.
17. Silvestrini P, Piviani M, Alberola J, Rodrigues-Cortes A, Planellas M, Roura X, et al. Serum cardiac troponin I concentrations in dogs with leishmaniasis: correlation with age and clinicopathologic abnormalities. *Vet Clin Path* 2012; 41(4):568-574.
18. Xenoulis PG, Saridomichelakis MN, Chatzis MK, Kasabalis D, Petanides T, Suchodolski JS, et al. Prospective evaluation of serum pancreatic lipase immunoreactivity and troponin I concentrations in *Leishmania infantum*-infected dogs treated with meglumine antimonite. *Vet Parasitol* 2014; 203(3-4):326-330.
19. Fonfara S, Louriero J, Swift S, James R, Cripps P, Mc Ewan J. Cardiac troponin I as a marker for severity and prognosis of cardiac disease in dogs. *Vet J* 2010; 184:334-339.
20. Sousa MG, Carareto R, Silva JG, Oliveira J. Assessment of the electrocardiogram in dogs with visceral leishmaniasis. *Pesqui Vet Bras* 2013; 33(5):643-647.
21. Nalmas S, Nagarakanti R, Slim J, Abter E, Bishburg E. Electrocardiographic changes in infectious diseases. *Hosp Physician* 2007; 1:15-27.
22. Ukena C, Mahfoud F, Kindermann I, Kandolf R, Kindermann M, Böhm M. Prognostic electrocardiographic parameters in patients with suspected myocarditis. *Eur J Heart Fail* 2011; 13(4):398-405.
23. Luciani A, Sconza S, Civitella C, Guglielmini C. Evaluation of the cardiac toxicity of N-methyl-glucamine antimoniate in dogs with naturally occurring leishmaniasis. *Vet J* 2013; 196(1):119-121.
24. Vörös K, Heteyey C, Reiczigel J, Czirok G. M-mode and two-dimensional echocardiographic reference values for three Hungarian dog breeds: Hungarian Vizsla, Mudi and Hungarian Greyhound. *Acta Vet Hung* 2009; 57(2):217-227.
25. Dukes-McEwan J, Borgarelli M, Tidholm A, Vollmar AC, Häggström J. ESVC Taskforce for Canine Dilated Cardiomyopathy. Proposed guidelines for the diagnosis of canine idiopathic dilated cardiomyopathy. *Journal of Veterinary Cardiology* 2003; 5(2):17-19.

26. Cornell CC, Kittleson MD, Della Torre P, Häggström J, Lombard CW, Pedersen HD, et al. Allometric scaling of M-mode cardiac measurements in normal adult dogs. *J Vet Intern Med* 2004; 18(3):311-321.
27. Baumwart RD, Orvalho J, Meurs KM. Evaluation of serum cardiac troponin I concentration in Boxers with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Am J Vet Res* 2007; 68(5):524-528.
28. Gugjoo MB, Hoque M, Saxena AC, Zama MS, Dey S. Reference values of M-mode echocardiographic parameters and indices in conscious Labrador Retriever dogs. *Iran J Vet Res* 2014; 15(4):341-349.
29. Tai TC, Huang HP. Echocardiographic assessment of right heart indices in dogs with elevated pulmonary artery pressure associated with chronic respiratory disorders, heartworm disease, and chronic degenerative mitral valvular disease. *Vet Med - Czech* 2013; 58(12):613-620.