

Evaluation of Cardiopulmonary biomarkers during different stages of Canine Visceral Leishmaniasis

Evaluación de biomarcadores cardiopulmonares durante diferentes etapas de Leishmaniasis visceral canina

Canberk Balikci^{1*} Ph.D, Kerem Ural¹ Ph.D

¹University of Adnan Menderes, Faculty of Veterinary, Department of Internal Medicine, Aydin, Turkey

*Correspondence: canberkbalikci@gmail.com

Received: June 2017; Accepted: November 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.** Dogs were diagnosed with CVL, were classified 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 in group as tested by IFAT, were deemed 1/64 to 1/16000 among infected groups. Considering the cTnI levels, there were significant differences ($p=0.018$) between stage IV (group IV) and healthy control group, besides between group IV and group I. Considering D-dimer levels, there was difference between healthy control group and group II, III and IV ($p=0.005$). Regarding NT-pro BNP levels, there were differences between healthy control group and stage III, IV, besides between stage I with stage III, IV ($p=0.000$). **Conclusions.** The results showed that levels of cTnI, Nt pro-BNP and D-dimer were higher in dogs infected with CVL in contrast to healthy dogs, in which levels of those biomarkers were below detection limits. Obtained results suggested the possibility of cTnI and NT pro-BNP as markers for cardiac damage and D-dimer as a supportive tool for a diagnosis of probable thromboembolism in dogs with CVL.

Keywords: Canine Visceral Leishmaniasis, cTnI, D-dimer, NT-proBNP (Source: CAB).

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.** Perros fueron diagnosticados con CVL, se clasificaron de la siguiente manera; Grupo I (enfermedad leve), grupo II (enfermedad moderada), grupo III (enfermedad grave), grupo IV (enfermedad muy grave) y grupo V controles sanos incluidos. **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. Considerando los niveles de

cTnI, hubo diferencias significativas ($p=0.018$). Entre el grupo IV y el grupo control sano, además entre el grupo IV y el grupo I. Considerando los niveles D-dímero, hubo diferencia entre el grupo control sano y el grupo II, III y IV ($p=0.005$). Teniendo en cuenta los niveles de NT-proBNP, hubo diferencia estadística entre el grupo de control sano y el estadio III, IV, además entre la etapa I con estadio III, IV ($p=0.000$). **Conclusiones.** Los resultados mostraron que los niveles de cTnI, Nt pro-BNP y D-dímero fueron mayores en perros infectados con CVL en contraste con perros sanos, en los que los niveles de estos biomarcadores estaban por debajo de los límites de detección. Los resultados obtenidos sugirieron la posibilidad de que cTnI y NT pro-BNP como marcadores de daño cardíaco y D-dímero como una herramienta de apoyo para un diagnóstico de tromboembolismo probable en perros con CVL.

Palabras clave: Leishmaniasis Visceral Canina, cTnI, D-dímero, NT-proBNP (*Fuente: CAB*).

INTRODUCTION

Canine Visceral Leishmaniasis (CVL), one of the most significant zoonotic disease caused by *Leishmania* parasite (1), is transmitted to the canine species by the bite of blood-sucking sand flies (*Phlebotomus* species) (2). This systemic disease probably involve any organ, tissue/body fluid, that might have manifestations within nonspecific clinical sings or by frequent clinical abnormalities (3). Clinical findings in relationship with cardiac involvement participated within the literature due to CVL (4), myocardial lesions might exist, thus the parasite could be detected in cardiac tissue (4,5).

According to the authors' knowledge none of the previous studies investigated intravital diagnosis of cardiac alterations. Therefore, the purposed of this study involving dogs naturally exposed to CVL were to a) in cardiopulmonary biomarkers such as cTnI, D-dimer and NT-proBNP concentrations, b) establish if different stages of CVL is contributing to cardiac failure (5).

MATERIALS AND METHODS

Site of study. The study was performed at Eagean part of Turkey in Aydin to those of dogs referred to clinics CVL disease associated symptoms, which were then subjected to further classification.

Grouping and classification of dogs with CVL. At the beginning of the study ethical guidelines were applied, and a written owner consent was available for all dogs involved. The research protocole was approved by the instutional laboratory animals ethics committee of Adnan Menderes University HADYEK (no: 64583101/2014/118, 29.08.2014). In total 35, 28 with CVL and 7 healthy, dogs were enrolled. CVL diagnosis based on was one or some of

INTRODUCCIÓN

La leishmaniasis visceral canina (CVL), una de las enfermedades zoonóticas más significativas causadas por el parásito de *Leishmania* (1), se transmite a las especies caninas por la picadura de moscas de la sangre (*Phlebotomus* species) (2). Esta enfermedad sistémica probablemente involucra cualquier órgano, líquido tisular / corporal, que pueda tener manifestaciones dentro de cantos clínicos inespecíficos o por anomalías clínicas frecuentes (3). Los hallazgos clínicos en relación con la participación cardíaca participaron en la literatura debido a CVL (4), las lesiones miocárdicas podrían existir, por lo que el parásito podría ser detectado en el tejido cardíaco (4,5).

Según el conocimiento de los autores, ninguno de los estudios preliminares investigó el diagnóstico intravital de alteraciones cardíacas. Por lo tanto, el propósito de este estudio con perros naturalmente expuestos a CVL fue a) las alteraciones en biomarcadores cardiopulmonares tales como las concentraciones de cTnI, D-dímero y NT-proBNP, b) establecer si diferentes etapas de CVL están contribuyendo A insuficiencia cardíaca (5).

MATERIALES Y MÉTODOS

Sitio de estudio. El estudio se realizó en Eagean parte de Turquía en Aydin a los de los perros se refiere clínica CVL síntomas asociados a la enfermedad, que fueron sometidos a una clasificación posterior.

Agrupación y clasificación de perros con CVL. Al principio del estudio se aplicaron directrices éticas y se dispuso de un consentimiento por escrito del propietario para todos los perros involucrados. El protocolo de investigación fue aprobado por el comité de ética de animales de laboratorio institucional de la Universidad Adnan Menderes HADYEK (no: 64583101/2014/118,

the clinical signs in association with the disease condition, verified to ELISA test kits and immune fluorescence antibody test. Dogs diagnosed with CVL, based on clinical, serological, hematological and biochemical findings, were classified into 4 different groups (n=7), as reported by Leishvet Group (6). In addition with healthy dogs, research groups were assigned in a subset of 5 major groups as follows;

group: stage I (mild disease)
 group: stage II (moderate disease)
 group: stage III (severe disease)
 group: stage IV (very severe disease)
 group: healthy controls.
 Laboratory analysis performed necessary for classification of CVL were shown in table 1.

Cardiac evaluation.

Special reference to cardiopulmonary markers. Cardiac examination was performed [D-dimer, NT-proBNP and cTnI analysis] in dogs infected with leishmaniasis [for diagnosing, detecting presence/severity of cardiac injury] and to those of healthy dogs [comperatively].

Serum cTnI, D-dimer and NT-proBNP concentrations. Serum cTnI, D-dimer and NT-proBNP concentrations were determined at the Department of Internal Medicine, Faculty of Veterinary, University of Adnan Menderes, with a commercial analysis system (Wondfo Finecare Fluorescent Immunoassay) previously validated. Serum aliquots were stored till study analysis, and were thawed just prior to the moment of the analysis. Measurements below the lower limit of detection (0.1 ng/mL, 0.1 mg/L and 18 pg/L for cTnI, D-dimer and NT-proBNP respectively) were assigned this value for the statistical analysis. Linear range (min-max) of the Finecare Fluorescent Immunoassay was 0.1-50 ng/mL, 0.1-10 mg/L and 18-35000 pg/mL, respectively.

Statistical analysis. Statistical analysis was performed via SPSS 18.0 for Windows (SPSS, 2009). Arithmetic mean (X), standard deviation (s) and minimum-maximum (Xmin-Xmax) values were calculated. The present authors checked if its normally distributed. Two tests, Shapiro-Wilk or Kolmogorov-Smirnov, were run for normality. Even if parameters were not normally distributed were then verified with nonparametric methods. Comparison of parameters in more than 2 groups were checked by Kruskal-Wallis test, post-hoc pairwise comparisons.

29.08.2014). En total 35, 28 con CVL y 7 sanos, se inscribieron perros. CVL diagnóstico basado en uno o algunos de los signos clínicos en asociación con la condición de la enfermedad, verificado a los kits de prueba de ELISA y la prueba de anticuerpos de fluorescencia inmune. Los perros diagnosticados con CVL, basados en hallazgos clínicos, serológicos, hematológicos y bioquímicos, se clasificaron en 4 grupos diferentes (n = 7), según lo reportado por Leishvet Group (6). Además, con perros sanos, los grupos de investigación fueron asignados en un subconjunto de 5 grupos principales como sigue:

I. grupo: estadio I (enfermedad leve)
 II. Grupo: etapa II (enfermedad moderada)
 III. Grupo: estadio III (enfermedad grave)
 IV. Grupo: estadio IV (enfermedad muy grave)
 Grupo V.: controles sanos.

El análisis de laboratorio realizado necesario para la clasificación de CVL se muestran en la tabla 1.

Evaluación cardíaca.

Referencia especial a los marcadores cardiopulmonares. Se realizó un examen cardiaco [D-dímero, NT-proBNP y análisis de cTnI] en perros infectados con leishmaniasis [para diagnosticar, detectar presencia/gravedad de lesión cardíaca] y en perros sanos [comperativamente].

Concentración sérica de cTnI, D-dímero y NT-proBNP. Las concentraciones séricas de cTnI, D-dímero y NT-proBNP se determinaron en el Departamento de Medicina Interna de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Adnan Menderes, con un sistema de análisis comercial (Wondfo Finecare Fluorescent Immunoassay) previamente validado. Las alícuotas de suero se almacenaron hasta el análisis de estudio, y se descongelaron justo antes del momento del análisis. Se asignaron este valor para el análisis estadístico a las mediciones por debajo del límite inferior de detección (0.1 ng/ml, 0.1 mg/L y 18 pg/L para cTnI, D-dímero y NT-proBNP, respectivamente). El intervalo lineal (min-máx.) Del inmunoensayo fluorescente de Finecare fue de 0.1-50 ng/ml, 0.1-10 mg/ly 18-35000 pg/mL, respectivamente.

Análisis estadístico. El análisis estadístico se realizó a través de SPSS 18.0 para Windows (SPSS, 2009). Se calcularon la media aritmética (X), la desviación estándar (s) y los valores mínimo-máximo (Xmin-Xmax). Los autores actuales verificaron si su distribución normal. Dos pruebas, Shapiro-Wilk o Kolmogorov-Smirnov, fueron ejecutadas para la normalidad. Incluso si los parámetros no eran normalmente distribuidos se verificaron con métodos no paramétricos. Comparación de los parámetros en más de 2 grupos fueron controlados por Kruskal-Wallis prueba, post-hoc pairwise comparaciones.

RESULTS

Signalment. Dogs of 11 different breeds were enrolled (In group I; one Labrador retriever, Spaniel cooker, Golden retriever and four crossbred. In group II; one Pointer, English mastiff, Terrier, German shepherd and three crossbred. In group III; Kangal, Terrier, Presa canario, Boxer, crossbred and two Dogo argentino. In group IV; Dogo argentino, Spaniel cocker, Boxer, Golden retriever, Cooker, Kangal and Golden retriever. In control group; Terrier, Dogo argentino, Kangal and four crossbred). 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 presented clinical signs as shown in Table 2.

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 3.

cTnI results. There was no change in cTnI level observed in the control and I. group of the study, whereas 2 cases in the second group (0.09-0.01 ng/mL), 3 cases in the III. group (0.09-0.16 ng/mL) and 5 cases in the IV. (0.09-0.8 mg/L) group (Table 4) revealed elevated values. There was significant differences ($p=0.018$). between

Table 1. Laboratory methods used in the present study

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

*Solano-Galego et al (6).

IFAT results deemed positive for CVL with a titer 1:64 and above

RESULTADOS

Filiación. Se incluyeron perros de 11 razas diferentes (en el grupo I, un labrador, cuenco, golden retriever y cuatro mestizos, en el grupo II un puntero, mastín inglés, terrier, pastor alemán y tres cruzados. En el grupo III: un Kangal, Terrier, Presa canario, Boxer, crossbred y dos Dogo Argentino En el grupo IV, un Dogo argentino, Spaniel cocker, Boxer, Golden Retriever, Kangal, Golden Retriever En el grupo Control, un Terrier, Dogo argentino, Kangal y cuatro mestizos). Veintitrés perros eran puros, mientras que 12 eran mestizos. 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 hembras 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 los perros fue sometido a examen físico y análisis de laboratorio anteriormente mencionados y se sugirió como sano. Basado en parámetros de laboratorio (Tabla 1) y presentado signos clínicos como se muestra en la Tabla 2.

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 3.

Resultados cTnI. No hubo cambios en el nivel de cTnI observado en el grupo de control e I. en el estudio, mientras que en el segundo grupo (0.09-0.01 ng/mL), 3 casos en el III. Grupo (0.09-0.16 ng/mL) y 5 casos en el IV. (0.09-0.8 mg/L) (Tabla 4) reveló valores elevados. Hubo diferencias significativas ($p=0.018$). Entre el grupo IV (grupo IV) y el grupo control sano, además entre el grupo IV y el grupo I.

Table 2. 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

Table 3. 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				1/2048			1/4096	1/8000	1/16000	0

Table 4. cTnI, D-dimer and NT-proBNP values of CVL-infected and control dogs according to groups

Data	Groups						P
	I	II	III	IV	V		
cTnI (ng/mL)	0.09±0 ^a (0.09)	0.092±0.01 ^{a,b} (0.09-0.01)	0.11±0.03 ^{a,b} (0.09-0.16)	0.23±0.28 ^b (0.09-0.8)	0.09±0 ^a (0.09)		0.018
D-dimer (mg/L)	1.55±2.22 ^{a,b} (0.09-6.1)	2.77±3.45 ^b (0.09-10)	1.96±2.1 ^b (0.4-5.7)	1.78±1.43 ^b (0.4-4.2)	0.09±0 ^a (0.09)		0.005
NT-pro BNP (pmol/L)	67.82±7.51 ^{a,b} (61.9-78.9)	140.1±53.7 ^{a,b,c} (80.2-225.6)	224.1±51.3 ^c (152.6-272)	1355.2±791 ^c (315.6-1939.8)	62.4±0.6 ^a (61.9-62.9)		0.000

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

stage IV (group IV) and healthy control group, besides between group IV and group I.

D-dimer results. No change in D-dimer level was observed in the control group of the study, whereas 5 cases in the first group (0.2-6.1 mg/L), 6 cases in the II. group (0.6-10 mg / L), was detected in all cases in the III. (0.4-5.7 mg/L) and IV. (0.4-4.2 mg/L) group (Table 4). There was statistical difference between healthy control group and group II, III and IV (p=0.005).

NT-proBNP results. Considering the evaluation of pmol/L in studies on NT-proBNP in dogs, it was evaluated based on the conversion factor of 1 pg/mL = 0.118 pmol/L (7). No increase in NT-proBNP level was found in the I., II., III. and control groups of the study. An increase of 4 cases in the IV. group (1808.3-1939.73 pmol/L) was determined (Table 4). There was statistical difference between healthy control group and stage III, IV, besides between stage I with stage III, IV (p=0.000).

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 5. Statistical difference was evident among control group and stage II to IV dogs (p=0.000)

Table 5. Values and statistical evaluation of the UPC analysis

Data	Groups					P
	I	II	III	IV	V	
UPC	0.15±0.1 ^{a,b} (0.1-0.3)	2.4±0.5 ^b (2.0-3.0)	2.4±0.5 ^b (2.0-3.0)	6.9±2.2 ^b (5.0-10.0)	0.09±0.0 ^a (0.09-0.09)	0,000

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

D-dímero resultados. No se observó ningún cambio en el nivel de D-dímero en el grupo de control del estudio, mientras que 5 casos en el primer grupo (0.2-6.1 mg/L), 6 casos en el II. Grupo (0.6-10 mg/L), se detectó en todos los casos en el III. (0.4-5.7 mg/l) y IV. (0.4-4.2 mg/L) (Tabla 4). Hubo diferencias estadísticas entre el grupo de control sano y el grupo II, III y IV (p=0.005).

Resultados del NT-proBNP. Teniendo en cuenta la evaluación de pmol / L en los estudios sobre NT-proBNP en perros, se evaluó con base en el factor de conversión de 1 pg/mL = 0.118 pmol/L (7). Ningún aumento en el nivel de NT-proBNP se encontró en el I, II, III. Y grupos de control del estudio. Un aumento de 4 casos en el IV. Grupo (1808.3 - 1.939.73 pmol/L) (Tabla 4). Se observó diferencia estadística entre el grupo control sano y el estadio III, IV, además entre el estadio I con estadio III, IV (p=0.000).

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 5. La diferencia estadística fue evidente entre el grupo control y los perros de estadio II a IV (p = 0.000)

DISCUSION

El presente estudio se llevó a cabo con el apoyo financiero y científico (Unidad de Financiación de Proyectos de Investigación de la Universidad de Adnan Menderes), en el que se tomó en consideración la estandarización actualizada de la enfermedad basándose en los criterios de Leishvet (6). Por lo tanto, no debe ser imprudente sacar la conclusión de que el examen cardiológico

DISCUSSION

The present study was conducted with the financial and scientific (Adnan Menderes University Research Projects Funding Unit) support, in which updated staging of the disease was taken into consideration based on the criteria by Leishvet Guidelines (6). Therefore it should not be unwise to draw conclusion that cardiological examination based on cTnI, D-dimer and NT-proBNP analysis according to the stages of CVL was 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 (6), 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.

Cardiopulmonary biomarkers, namely biological processing markers easily be analyzed, thus might be used as indicators of response to treatment interventions and detecting pathogenic conditions (8). Regarding veterinary medicine different cardiac biomarkers might be analyzed in an attempt to diagnose and interpret the extent and severity of cardiopulmonary disease (9). Visceral leishmaniasis, a global parasitic zoonosis, may cause myocarditis and heart rate changes in canine and human hosts. In CVL, myocarditis has already been already described (5,10). In the present study, we measured levels of troponin I, NT-proBNP as indicative of the myocardial damage and D-dimer levels as a marker of thrombolysis in CVL.

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 (11). Specifically detectable elevations in circulating cTnI were reported in Canine Monocytic Ehrlichiosis (11). Regarding the relation between cTnI and leishmaniasis limited portion of study took place in the literature. Detailed literature search revealed case reports (12), and some limited original studies (13,14).

basado en cTnI, D-dímero y NT-proBNP análisis de acuerdo a las etapas de CVL no se informó anteriormente.

Teniendo en cuenta las directrices de Leishvet serológicas (IFAT títulos y pruebas adicionales de ELISA), los hallazgos clínicos y la evaluación de laboratorio (TP, Alb y creatinina) perros inscritos en este estudio participaron en 4 diferentes grupos infectados (etapa 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 (6), las etapas I y II (a las de los grupos con el mismo número) revelaron un perfil renal normal, los perros de la fase III de weheras 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.

Los biomarcadores cardiopulmonares, es decir, los marcadores de procesamiento biológico, pueden ser fácilmente analizados, por lo que podrían utilizarse como indicadores de la respuesta a las intervenciones de tratamiento y la detección de patógenos (8). En cuanto a la medicina veterinaria, se pueden analizar diferentes biomarcadores cardíacos en un intento de diagnosticar e interpretar el grado y la gravedad de la enfermedad cardiopulmonar (9). La leishmaniasis visceral, una zoonosis parasitaria global, puede causar miocarditis y cambios en la frecuencia cardíaca en huéspedes caninos y humanos. En CVL, ya se ha descrito miocarditis (5,10). En el presente estudio, se midieron los niveles de troponina I, NT-proBNP como indicativo del daño miocárdico y los niveles de D-dímero como un marcador de la trombólisis en CVL.

Las troponinas cardíacas (cTn) se utilizan como biomarcadores sanguíneos con alta especificidad y sensibilidad para detectar la degeneración miocárdica. Las últimas proteínas contráctiles, podrían ser liberadas del miocardio en relación con la gravedad de la lesión tisular y la alteración de la membrana de los miocitos (11). Se detectaron elevaciones específicamente detectables en la cTnI circulante en Ehrlichiosis monocítica canina (11). En cuanto a la relación entre cTnI y leishmaniasis, parte limitada del estudio tuvo lugar en la literatura. La investigación bibliográfica detallada reveló casos (12), y algunos estudios originales limitados (13,14).

Un estudio reciente informó que la miocarditis en CVL podría estar asociada a alteraciones inmunológicas debidas a infección por *Leishmania* (4,5). 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

A recent study reported that myocarditis in CVL could be in association within immunological alterations due to *Leishmania* infection (4,5). 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 (5).

A prior study was the subject of an evaluation for serum cTnI as an indicator of myocardial injury in dogs with leishmaniasis (13). 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 (13). However serum cTnI concentration might have interaction with age, thus could be elevated with marked azotemia, a finding frequently associated with canine leishmaniasis (14). In the present study 2 cases in the second group (0.09-0.01 ng/mL), 3 cases in the III. group (0.09-0.16 ng/mL) and 5 cases in the IV. (0.09-0.8 mg/L) group (Table 4) revealed elevated values, evidencing that as stage progressed cases with elevated cTnI values increased. There was significant differences ($p=0.018$) between stage IV (group IV) and healthy control group, besides between group IV and group I, indicating that myocarditis might be participated in advanced stages of CVL. Although it is not possible to make interpretation solely analyzing cTnI levels, it was an interesting finding. The severity of elevation was in correlation with the extent of myocardial damage (15). Taking into account this data, elevated cTnI levels observed in this study, in advanced stages of the infection, could be due to myocardial injury.

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 (14). 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)

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 insuficiencia cardíaca (5).

Un estudio previo fue objeto de una evaluación de la cTnI sérica como indicador de lesión miocárdica en perros con leishmaniasis (13). En ese estudio en 40 perros con leishmaniasis, la concentración media 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 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 (13). 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 (14). En el presente estudio 2 casos en el segundo grupo (0.09-0.01 ng/mL), 3 casos en el III. Grupo (0.09-0.16 ng/mL) y 5 casos en el IV. (0.09-0.8 mg/L) grupo (tabla 4) reveló valores elevados, lo que demuestra que a medida que avanzaba etapa casos con elevados valores de cTnI aumentó. Hubo diferencias significativas ($p=0.018$) entre el grupo IV y el grupo control sano, además entre el grupo IV y el grupo I, lo que indica que la miocarditis podría participar en estadios avanzados de CVL. Aunque no es posible hacer la interpretación únicamente analizando los niveles de cTnI, fue un hallazgo interesante. La gravedad de la elevación estaba en correlación con la extensión del daño miocárdico (15). Teniendo en cuenta estos datos, los niveles elevados de cTnI observados en este estudio, en estadios avanzados de la infección, podrían deberse a lesión miocárdica.

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 (14). 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 del tratamiento inicial (14). En el presente estudio, ninguno de los perros involucrados recibió tratamiento médico al inicio del estudio, hasta que se realizó el análisis.

nor cardiotoxicity at 2 and 4 weeks after the initial therapy (14). In the present study none of the dogs involved received medical treatment at the beginning of the study, till analysis were performed.

As aforementioned above limited literature evaluated intravital diagnosis of cardiac alterations in leishmaniasis. Cardiac involvement in dogs (4,5,13) revealed that this protozoan might be also involved in heart, which promptly support the necessity of cardiac evaluation in cases of suspected leishmaniasis.

As a well recognized fibrin degradation product, D-dimer elevations in plasma concentrations might probably denote the occurrence of thrombi and their degradation. Elevated values of D-dimer in dogs with clinical evidence of thromboembolism (16,17) and dirofilariosis (18) have been reported. In the present study, these elevated values might probably be associated with thromboembolic complications caused by the CVL infection. Pulmonary thromboembolism is a common complication in animals infected with CVL (19), due to the nephrotic syndrome and aortic and caudal vena cava thrombosis (20), the three main predisposing factors for thrombus formation, [recognized as Virchow's triad, such as hypercoagulability, endothelial injury or abnormal blood flow, disseminated intravascular coagulation, as was described in dogs with leishmaniasis (21).

Lomtadze et al (22) assessed intravascular active markers before and after treatment for the assessment of 45-man coagulation with VL, and found that D-dimer levels increased 95.6% in severe and advanced forms of the disease. Even if the results of the last mentioned study are examined, it was concluded that the increased D-dimer levels might be in association with activation of DIC involved, probably at severe forms of the disease. The researchers also claimed D-dimer presented diagnostic and prognostic importance (22).

Studies show that serum concentrations of NT-proBNP are higher in dogs with mitral valve disease and dilate cardiomyopathy compared to healthy dogs, using NT-proBNP to assess cardiac disease and severity of the disease. It has also been reported that NT-proBNP concentrations correlate with heart rate, respiratory rate, echocardiographic changes and renal function in cardiac diseased dogs and that NT-proBNP concentrations may be useful in diagnosing cardiac diseases as well as in assessing severity (23,24).

Como se ha mencionado anteriormente, la literatura limitada evalúa el diagnóstico intravital de las alteraciones cardíacas en la leishmaniasis. La afectación cardíaca en los perros (4,5,13) reveló que este protozoario podría estar también implicado en el corazón, lo que prontamente apoya la necesidad de la evaluación cardíaca en casos de sospecha de leishmaniasis.

Como producto de degradación de la fibrina bien reconocido, las elevaciones del dímero D en las concentraciones plasmáticas probablemente denotarían la ocurrencia de los trombos y su degradación. Se han descrito valores elevados de D-dímero en perros con evidencia clínica de tromboembolismo (16,17) y dirofilariosis (18). En el presente estudio, estos valores elevados podrían estar probablemente asociados con complicaciones tromboembólicas causadas por la infección CVL. El tromboembolismo pulmonar es una complicación frecuente en los animales infectados con CVL (19), debido al síndrome nefrótico ya la trombosis de la vena cava aórtica y caudal (20), los tres principales factores predisponentes para la formación de trombos [reconocidos como Virchow Triada, como hipercoagulabilidad, lesión endotelial o flujo sanguíneo anormal, coagulación intravascular diseminada, como se ha descrito en perros con leishmaniasis (21).

Lomtadze et al (22) evaluaron marcadores activos intravasculares antes y después del tratamiento para la evaluación de la coagulación de 45 hombres con LV y encontraron que los niveles de D-dímero aumentaron en un 95.6% en formas graves y avanzadas de la enfermedad. Incluso si se examinan los resultados del último estudio mencionado, se concluyó que el aumento de los niveles de D-dímero podría estar asociado con la activación de la DIC implicada, probablemente en formas graves de la enfermedad. Los investigadores también afirmaron que el D-dímero presentaba importancia diagnóstica y pronóstica (22).

Los estudios muestran que las concentraciones séricas de NT-proBNP son más altas en perros con enfermedad de válvula mitral y miocardiopatía dilatada en comparación con perros sanos, utilizando NT-proBNP para evaluar la enfermedad cardíaca y la gravedad de la enfermedad. También se ha informado de que las concentraciones de NT-proBNP se correlacionan con la frecuencia cardíaca, la frecuencia respiratoria, los cambios ecocardiográficos y la función renal en perros cardíacos enfermos y que las concentraciones de NT-proBNP pueden ser útiles en el diagnóstico de enfermedades cardíacas y en la evaluación de la gravedad (23,24).

In one study, BNP concentration was assessed to distinguish cardiac and noncardiac dyspnoea. BNP concentrations in congestive heart failure dogs (mean 34.97 pg/ml) were reported to be higher than those of non-cardiac dyspnea (mean 12.8 pg/ml) compared to 22 dogs with dyspnea due to congestive heart failure and 26 dogs with noncardiac dyspnea (35). In the present study no increase in NT-proBNP levels was found in the I., II., III. and control groups of the study. An increase of 4 cases in the IV. group (1808.3-1939.73 pmol/L) was determined. There was statistical difference between healthy control group and stage III, IV, besides between stage I and stage III, IV ($p=0.000$). Although echocardiographic examination and related data was not shown in this study 6 out of 28 CVL cases revealed decreased fractional shortening indicating systolic function besides 2 cases in group II, 3 cases in group III and 4 cases in group IV revealed decreased LVIDd and LVIDs probably showing hypertrophic cardiomyopathy which all could contributed to increased NT-proBNP well used detected in this study.

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 cardiopulmonary 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. In summary, available data suggested the possibility of using cTnI and NT-proBNP as markers for cardiac damage and D-dimer as a marker supportive for thromboembolism in dogs with CVL. Detailed studies with additional biomarkers, and repeated analysis should be warranted to achieve more interesting data on the marking capacity of those molecules, as was also denoted in dogs with dirofilariosis (18).

Acknowledgements

This study was summarized partially from a national Project and was funded Adnan Menderes University Research Projects Funding Unit with project number VTF-15047. This article was a PhD study with thesis no:478880 (Ulusal Tez Merkezi: National Thesis Center) regarding undergraduate student Canberk Balikci under advisory of Prof. Dr. Kerem Ural.

En un estudio, la concentración de BNP se evaluó para distinguir la disnea cardíaca y no cardíaca. Las concentraciones de BNP en los perros con insuficiencia cardíaca congestiva (media de 34.97 pg / ml) fueron superiores a las de la disnea no cardíaca (media de 12.8 pg / ml) en comparación con 22 perros con disnea por insuficiencia cardíaca congestiva y 26 perros con disnea no cardíaca (25). En el presente estudio no se observó aumento en los niveles de NT-proBNP en los grupos I, II, III. Y grupos de control del estudio. Un aumento de 4 casos en el IV. Grupo (1808.3 - 1.939.73 pmol / L). Se encontró diferencia estadística entre el grupo de control sano y el estadio III, IV, además entre el estadio I y el estadio III, IV ($p=0.000$). A pesar de que el estudio ecocardiográfico y los datos relacionados no se mostraron en este estudio, 6 de los 28 casos CVL revelaron disminución del shortening fraccional que indicaba la función sistólica, además de 2 casos en el grupo II, 3 casos en el grupo III y 4 casos en el grupo IV revelaron disminución de LVIDd y LVID probablemente mostrando Hipertrófica cardiomiopatía que todos podrían contribuir al aumento de NT-proBNP bien utilizado detectado en este estudio.

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 diferentes (estadios I a IV) que presentaron alteraciones cardiopulmonares que deben tomarse en consideración. 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. En resumen, los datos disponibles sugieren la posibilidad de utilizar cTnI y NT-proBNP como marcadores de daño cardíaco y D-dímero como un marcador de apoyo para el tromboembolismo en perros con CVL. Se deben realizar estudios detallados con biomarcadores adicionales y análisis repetidos para obtener datos más interesantes sobre la capacidad de marcado de esas moléculas, como también se indica en perros con dirofilariosis (18).

Agradecimientos

Este estudio se resumió parcialmente de un proyecto nacional y fue financiado por la Unidad de Financiación de Proyectos de Investigación de la Universidad Adnan Menderes con el número de proyecto VTF-15047. El presente artículo fue un estudio Tesis de Doctorado no. 478880 (Ulusal Tez Merkezi: Centro Nacional de Tesis) a cargo de Canberk Balikci bajo la asesoría del Dr. Kerem Ural.

REFERENCES

1. Kaszak I, Planellas M, Dworecka-Kaszak B. Canine leishmaniosis-an emerging disease. *Ann Parasitol* 2015; 61(2):69-76.
2. Rossi E, Bongiorno G, Ciolli E, Di Muccio T, Scalone A, Gramiccia M, Maroli M. Seasonal phenology, host-blood feeding preferences and natural *Leishmania* infection of *Phlebotomus perniciosus* (Diptera, Phlebotomidae) in a high-endemic focus of canine leishmaniasis in Rome province, Italy. *Acta Tropica* 2008; 105(2):158-165.
3. Baneth G, Koutinas AF, Solano-Gallego L, Bourdeau P, Ferrer L. Canine leishmaniosis-new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. *Trend parasitol* 2008; 24(7):324-330.
4. Rosa FA, Leite HAC, Braga ET, Moreira PRR, Baltazar FH, Biondo AW. Cardiac lesions in 30 dogs naturally infected with *Leishmania infantum chagasi*. *Vet Pathol* 2013; 51(3):603-606.
5. 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.
6. Solano-Gallego L, Miró G, Koutinas A, Cardoso L, Pennisi MG, Ferrer L. LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. *Parasit Vectors* 2011; 4:86.
7. Weber M, Hamm C. Role of B-type natriuretic peptide (BNP) and NT-proBNP in clinical routine. *Heart* 2006; 92(6):843-849.
8. Singh VP, Ranjan A, Topno RK, Verma RB, Siddique NA, Ravidas VN, Das P. Estimation of under-reporting of visceral leishmaniasis cases in Bihar, India. *Am J Trop Med Hyg* 2010; 82(1):9-11.
9. Boswood, A. Biomarkers in cardiovascular disease: beyond natriuretic peptides. *J Vet Cardiol* 2009; 11(1):23-32.
10. Dos Santos FP, Pascon JPE, Pereira DTP, Anjos BL, Mistieri MLA, Silveira ID, Porciuncula ML. Clinical and histopathological features of myocarditis in dogs with visceral leishmaniasis. *Arq Bras Med Vet Zootec* 2015; 67(6):1519-1527.
11. Diniz SA, Silva FL, Neta ACC, Bueno R, Guerra RM, Abreu-Silva, AL, Santos RL. Animal reservoirs for visceral leishmaniasis in densely populated urban areas. *J Infect Dev Ctries*, 2008; 2(01):24-33.
12. Mendes RS, Gurjãoi TA, Oliveira LM, Santana V, Tafuri WL, Santos JRS. 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.
13. Silvestrini P, Piviani M, Alberola J, Rodrigues-Cortes A, Planellas M, Roura X. Serum cardiac troponin I concentrations in dogs with leishmaniasis: correlation with age and clinicopathologic abnormalities. *Vet Clin Pathol* 2012; 41(4):568-574.
14. Xenoulis PG, Saridomichelakis MN, Chatzis MK, Kasabalis D, Petanides T, Suchodolski JS. 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.
15. 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.
16. Griffin A, Callan MB, Shofer FS, Giger U. Evaluation of a canine D-dimer point-of-care test kit for use in samples obtained from dogs with disseminated intravascular coagulation, thromboembolic disease, and hemorrhage. *Am J Vet Res* 2003; 64:1562-1569.
17. Stokol T. Plasma D-dimer for the diagnosis of thromboembolic disorders in dogs. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 2003; 33:1419-1435.
18. Carretón E, Corbera JA, Juste MC, Morchón R, Simón F, Montoya-Alonso JA. *Dirofilaria immitis* infection in dogs: cardiopulmonary biomarker levels. *Vet parasitol* 2011; 176(4): 313-316.

19. Honse CO, Figueiredo FB, Alencar NX, De Fátima Madeira M, Gremião ID, Schubach TM. Disseminated intravascular coagulation in a dog naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi* from Rio de Janeiro–Brazil. BMC Vet Res 2013; 9(1): 43.
20. Félix N, Mouro S, Vilela CL, Peleteiro MC, Ferreira AJ, Niza M. M. R. Canine leishmaniasis with nephrotic syndrome and aortic and caudal vena cava thromboembolism. J Vet Emerg Crit Care 2008; 18(5): 526-531.
21. Fox PR, Petrie JP, Hohenhaus AE. Peripheral vascular disease, In: EttingerSJ, FeldmanEC, eds. Textbook of Veterinary Internal Medicine, 6th ed. Philadelphia: WB Saunders Co. 2005; pp. 1145–1165.
22. Lomtadze ML, Khochava MA, Shalamberidze IA, Shilakadze MA, Dzhokhtaberidze TG. Functional status of haemostasis system in patients with visceral leishmaniasis. Georgian MedNews 2005; 128: 59-62.
23. Oyama MA, Fox PR, Rush JE, Rozanski EA, Lesser M. Clinical utility of serum N-terminal pro-B-type natriuretic peptide concentration for identifying cardiac disease in dogs and assessing disease severity. J Am Vet Med Assoc 2008; 232: 1496-1503.
24. Baisan RA, Rosa AD, Loria AD, Vulpe V, Piantedosi D. Cardiac biomarkers in clinical practice of dog and cat-a review. HVM Bioflux 2016; 8(1): 50-58.
25. Prosek R, Sisson DD, Oyama MA, Solter PF. Distinguishing cardiac and noncardiac dyspnea in 48 dogs using plasma atrial natriuretic factor, B-type natriuretic factor, endothelin, and cardiac troponin-I. J Vet Int Med 2007; 21: 238-242.