

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

Instytut Medycyny Weterynaryjnej

lek. wet. Magdalena Elżbieta Wismołek

156879

Badanie odpowiedzi immunologicznej
w przebiegu zarażenia *Dirofilaria repens* u psa
(*Canis familiaris*)

Immune response during *Dirofilaria repens* infection in dogs (*Canis
familiaris*)

Praca doktorska

Doctoral thesis

Rozprawa doktorska pod kierunkiem

ks. dr. hab. inż. Marcina Wiśniewskiego

Promotor pomocniczy: dr inż. Ewa Długosz

Instytut Medycyny Weterynaryjnej

Katedra Nauk Przedklinicznych

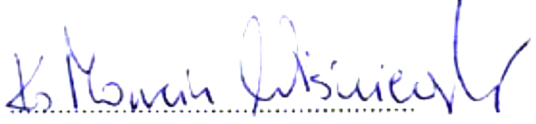
Zakład Parazytologii i Chorób Inwazyjnych

Warszawa, 2022

Oświadczenie promotora pracy

Oświadczam, że niniejsza praca została przygotowana pod moim kierunkiem i stwierdzam, że spełnia ona warunki do przedstawienia tej pracy w postępowaniu o nadanie stopnia naukowego.

Data 04.10.2022.....

Podpis promotora pracy .....

Oświadczenie autora pracy

Świadom odpowiedzialności prawnej, w tym odpowiedzialności karnej za złożenie fałszywego oświadczenia, oświadczam, że niniejsza praca doktorska została napisana przeze mnie samodzielnie i nie zawiera treści uzyskanych w sposób niezgodny z obowiązującymi przepisami prawa.

Oświadczam, że przedstawiona praca nie była wcześniej podstawą żadnej procedury związanej z uzyskaniem stopnia naukowego w wyższej uczelni.

Oświadczam, że niniejsza wersja pracy jest identyczna z załączoną wersją elektroniczną.

Data 29.09.2022.....

Podpis autora pracy .....

Szczególne podziękowania składam

Ks. dr. hab. inż. Marcinowi Wiśniewskiemu oraz dr. inż. Ewie Długosz

za przekazaną wiedzę, inspirację, nieopisaną troskę i przyjaźń

Dr. n. wet. Maciejowi Klockiewiczowi

za hojne i nieustanne dzielenie się ze mną Swoją ogromną wiedzą parazytologiczną i kawą

Całemu Zespołowi Zakładu Parazytologii i Chorób Inwazyjnych

za wspaniałą atmosferę pracy

Przyjaciołom rozumiejącym przygodę robienia doktoratu

Uli Latek, Irenie Pruszyńskiej, Ani Niwińskiej, Mateuszowi Pękaczowi i Justynie Karabowicz

za poczucie humoru i wsparcie w chwilach wątpliwości

Moim Niezwykłym Rodzicom

za poświęcenie życia Nauce i Edukacji i przekazanie mi ich wartości

Moim niesamowicie utalentowanym siostronom Pauli, Marcie, Justynie i Agnieszce

za śmiech, rozmowy, radość, przeżyte przygody i za to, że są najlepsze na świecie

Mojemu Narzeczonemu

za nieocenione wsparcie merytoryczne i emocjonalne doktoratu

Babci Heni, Przyjaciołom, całej Rodzinie

za wszystko.

Streszczenie

Badanie odpowiedzi immunologicznej w przebiegu zarażenia *Dirofilaria repens* u psa (*Canis familiaris*)

Dirofilaria repens jest czynnikiem etiologicznym choroby pasożytniczej psów, zwanej dirofilariozą podskórną. Mimo wysokiej ekstensywności inwazji *D. repens* w Europie istnieje szczątkowa wiedza na temat jego wpływu na organizm żywiciela ostatecznego. Celem niniejszej rozprawy było zbadanie odpowiedzi immunologicznej psa w przebiegu zarażenia *D. repens*. Pierwszy załączony artykuł stanowi opis zmian morfologicznych i biochemicznych występujących u psów zarażonych *D. repens* i niewykazujących uchwytnych objawów klinicznych inwazji. Drugi załączony artykuł stanowi opis zjawiska wysokiej mikrofilareмии w kontekście współistnienia inwazji *D. repens* z innymi chorobami. Trzeci artykuł zawiera analizę odpowiedzi humoralnej w przebiegu dirofilariozy podskórnej u psów mikrofilaremicznych i amikrofilaremicznych.

Kolejnym zagadnieniem opisywanym w pracy było poznanie przebiegu komórkowej odpowiedzi immunologicznej podczas zarażenia *D. repens* oraz mechanizmu umożliwiającego pasożytom przeżycie w organizmie żywiciela. W tym celu wyizolowano jednojądrzaste komórki krwi obwodowej (PBMC) od psów zarażonych i niezarażonych. Wśród izolowanych PBMC określano odsetek komórek charakteryzujących się obecnością powierzchniowego antygeny różnicowania komórkowego CD4 / CD8 / CD21. Zbadano odsetek określonych populacji o immunofenotypach limfocytów T regulatorowych. Wykorzystano linie komórkowe HEK293 transfekowane cDNA receptorów rozpoznających wzorce molekularne i zaobserwowano, że antygeny somatyczne *D. repens* indukują szlaki sygnałowe zależne od NLRC1, NLRC2 i TLR2. Użyto również komórek dendrytycznych pochodzących ze szpiku kostnego myszy, aby ocenić wpływ antygenów *D. repens* na polaryzację odpowiedzi immunologicznej. Zaobserwowano, że IL-1 β odgrywa kluczową rolę w rozwoju odpowiedzi immunologicznej przeciwko *D. repens* oraz, że inwazja *D. repens* powiązana jest ze wzrostem populacji Treg o immunofenotypie T CD4⁺Foxp3⁺. Ostatecznie, stan przewlekłego stresu, jak również korelacja pomiędzy wysoką mikrofilaremią, a obecnością chorób towarzyszących przeczą powszechnemu przekonaniu o niechorobotwórczości *D. repens*.

Słowa kluczowe: dirofilarioza podskórna; pies; limfocyty T CD4⁺Foxp3⁺; mikrofilaremia; naturalne zarażenie *Dirofilaria repens*, IL-1 β

Summary

Immune response during *Dirofilaria repens* infection in dogs (*Canis familiaris*)

Dirofilaria repens is the causative agent of the canine skin condition called subcutaneous dirofilariosis. Despite its increasing prevalence in Europe, there is a large gap in knowledge of the impact of the parasite on the canine host. The aim of this thesis was to determine if natural canine *D. repens* infection leads to biological changes in the host, with a focus on the immune response. The first attached article is a description of hematological and biochemical changes occurring in dogs infected with *D. repens* and showing no overt clinical signs of infection. The second attached article is a description of the phenomenon of high microfilaremia in the context of coexistence of *D. repens* infection and other diseases. The third article analyzes the humoral response to subcutaneous dirofilariosis in microfilaremic and occult dogs.

Next, experiments enabling a better understanding of the course of the cellular immune response in *D. repens* infection, and of the mechanisms that allow the parasites to survive have been conducted. Canine peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from uninfected and infected individuals were isolated. The participation of CD4 / CD8 / CD21 expressing cells in the lymphocyte population and the presence of Treg immunophenotype populations within the canine PBMCs from *D. repens* infected individuals were studied. It has been observed, that T cells expressing CD4⁺Foxp3⁺ were more prevalent in infected animals. Finally, we used HEK293 cell lines transfected with cDNA of different pattern recognition receptors and observed that *D. repens* somatic antigens induce signaling pathways dependent on NLRC1, NLRC2 and TLR2. Bone marrow derived dendritic cells were used to evaluate the effect of *D. repens* antigens on the polarization of the immune response. It has been observed that IL-1 β plays a crucial role in the development of the immune response against *D. repens*. It has been also observed that *D. repens* infection is associated with an increase in the Treg population characterized by CD4⁺Foxp3⁺ immunophenotype. Finally, the state of chronic stress as well as the correlation between high microfilaremia and the presence of concomitant diseases contradict the common belief, as subcutaneous dirofilariosis is non-pathogenic.

Keywords: subcutaneous dirofilariosis; dog; T CD4⁺Foxp3⁺ cells; microfilaremia; natural *Dirofilaria repens* infection, IL-1 β

Spis treści

Streszczenie	7
Summary.....	9
Lista artykułów zamieszczonych w pracy doktorskiej wraz z danymi bibliograficznymi... ..	13
Wykaz stosowanych skrótów	14
1. Wstęp	17
1.1. Cykl życiowy	17
1.2. Inwazje mikrofilaremiczne i amikrofilaremiczne	18
1.3. Patogeneza inwazji.....	19
1.4. Odpowiedź immunologiczna w przebiegu inwazji nicieni	19
2. Cele pracy doktorskiej	23
3. Materiały i metody	25
3.1. Materiały i metody opublikowane	25
3.2. Materiały i metody nieopublikowane	27
3.2.1. Oznaczanie immunofenotypu jednojądrzastych komórek krwi obwodowej psów zarażonych <i>D. repens</i>	27
3.2.2. Przygotowywanie komórek do analizy cytometrycznej.....	27
3.2.3. Wpływ antygenów somatycznych <i>D. repens</i> na syntezę cytokin przez komórki jednojądrzaste krwi izolowane od psów zarażonych i niezarażonych	29
3.2.4. Aktywacja szlaków sygnałowych przez antygeny <i>D. repens</i>	29
3.2.5. Wpływ antygenów <i>D. repens</i> na dojrzewanie komórek prezentujących antygen	30
3.2.6. Izolacja szpiku kostnego	31
3.2.6.1. Hodowla i różnicowanie komórek pochodzenia szpikowego	31
3.2.7. Pozyskiwanie produktów wydaliniczo-wydzielniczych <i>D. repens</i>	32
3.2.8. Oznaczanie markerów komórkowych z wykorzystaniem cytometrii przepływowej	32
3.2.8.1. Procedura znakowania komórek.....	32
3.2.9. Oznaczenie cytokin wydzielanych przez BMDC stymulowanych antygenami <i>D. repens</i>	34
4. Wyniki.....	35
4.1. Badanie obecności fenotypu limfocytów T CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺ , T CD8 ⁺ oraz limfocytów B CD21 ⁺	36
4.2. Wpływ antygenów <i>D. repens</i> na aktywację szlaków sygnałowych zależnych od NLRC1, NLRC2, TLR2, TLR4	40
4.3. Wpływ antygenów <i>D. repens</i> na dojrzewanie i aktywność komórek dendrytycznych pochodzenia szpikowego	41

5.	Dyskusja.....	47
6.	Wnioski.....	51
7.	Piśmiennictwo.....	53
8.	Publikacje wchodzące w skład jednotematycznego cyklu.....	57
	<i>Hematological and biochemical changes in dogs naturally infected with Dirofilaria repens.</i>	59
	<i>Case studies of severe microfilaremia in four dogs naturally infected with Dirofilaria repens as the primary disease or a disease complicating factor.....</i>	67
	<i>Canine antibody response against Dirofilaria repens in natural occult and microfilaremic infections.....</i>	73
9.	Deklaracje współautorów.....	81
10.	Zgoda na udostępnienie pracy w czytelniach Biblioteki SGGW.....	97

Lista artykułów zamieszczonych w pracy doktorskiej wraz z danymi bibliograficznymi. Wszystkie trzy publikacje stanowią spójny tematycznie cykl i zostały opublikowane w czasopiśmie naukowych znajdujących się w części „A” w wykazie czasopism Ministerstwa Edukacji i Nauki.

Autorzy	Tytuł	Rok	Czasopismo	Impact Factor	5-year Impact Factor	Punkty MNiSW
Wysmolek M.E.* Dobrzyński A. Długosz E. Czopowicz M. Wiśniewski M. Jurka P. Klockiewicz M.	(1) Hematological and biochemical changes in dogs naturally infected with <i>Dirofilaria repens</i>	2020	Frontiers in Veterinary Science	3.412	3.131	70
Wysmolek M.E.* Klockiewicz M. Sobczak-Filipiak M. Długosz E. Wiśniewski M.	(2) Case studies of severe microfilaremia in four dogs naturally infected with <i>Dirofilaria repens</i> as the primary disease or a disease complicating factor	2020	Frontiers in Veterinary Science	3.412	3.131	70
Wysmolek M.E.* Klockiewicz M. Długosz E. Wiśniewski M.	(3) Canine antibody response against <i>Dirofilaria repens</i> in natural occult and microfilaremic infections	2022	Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases	2.268	2.303	70
			Total	9.092	8.565	210

* autor korespondencyjny

Wykaz stosowanych skrótów

APC – (z ang. antigen presenting cells) komórki prezentujące antygen

BMDC – (z ang. bone marrow-dendritic cells) komórki dendrytyczne uzyskane ze szpiku kostnego

DMEM – (z ang. Dulbecco's modified Eagle's medium) modyfikowana pożywka Eagle'a Dulbecco

DrSA – (*Dirofilaria repens* somatic antigens) antygeny somatyczne dorosłych osobników *D. repens*

FBS – (z ang. fetal bovine serum) płodowa surowica bydlęca

Foxp3 – (z ang. forkhead box P3) czynnik transkrypcyjny Foxp3

GM-CSF – (z ang. granulocyte-macrophage colony-stimulating factor) czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów

HEK293 – (z ang. Human embryonic kidney 293 cells) ludzkie embrionalne komórki nerki

IL-10 – (z ang. interleukin 10) interleukina 10

IL-12p40 – (z ang. interleukin 12 subunit p40) podjednostka 40 interleukiny 12

IL-12p70 – (z ang. interleukin 12 subunit p70) podjednostka 70 interleukiny 12

IL-1 β – (z ang. interleukin 1 beta) interleukina 1 beta

IL-23 – (z ang. interleukin 23) interleukina 23

IL-6 – (z ang. interleukin 6) interleukina 6

Mf – (z ang. microfilariae) mikrofilarie

MHC – (z ang. major histocompatibility complex) główny układ zgodności tkankowej

NLR – (z ang. NOD-like receptors) receptory NOD-podobne

PBMC – (z ang. peripheral blood mononuclear cells) jednojądrzaste komórki krwi obwodowej

PBS – (z ang. phosphate buffered saline) buforowana fosforanem sól fizjologiczna

PRR – (z ang. pattern recognition receptor) receptory rozpoznające wzorce

R10 – pożywka RPMI z dodatkiem 10% inaktywowanej termicznie płodowej surowicy bydlęcej (FBS), wzbogacona penicyliną i streptomycyną (100 $\mu\text{g/ml}$ każda), 2 mM L-glutaminą oraz 20 ng/mL GM-CSF

RT – (z ang. room temperature) temperatura pokojowa

TGF- β – (z ang. transforming growth factor beta) transformujący czynnik wzrostu beta

TLR – (z ang. Toll-like receptors) receptory Toll-podobne

TNF- α – (z ang. tumor necrosis factor α) czynnik martwicy nowotworu α

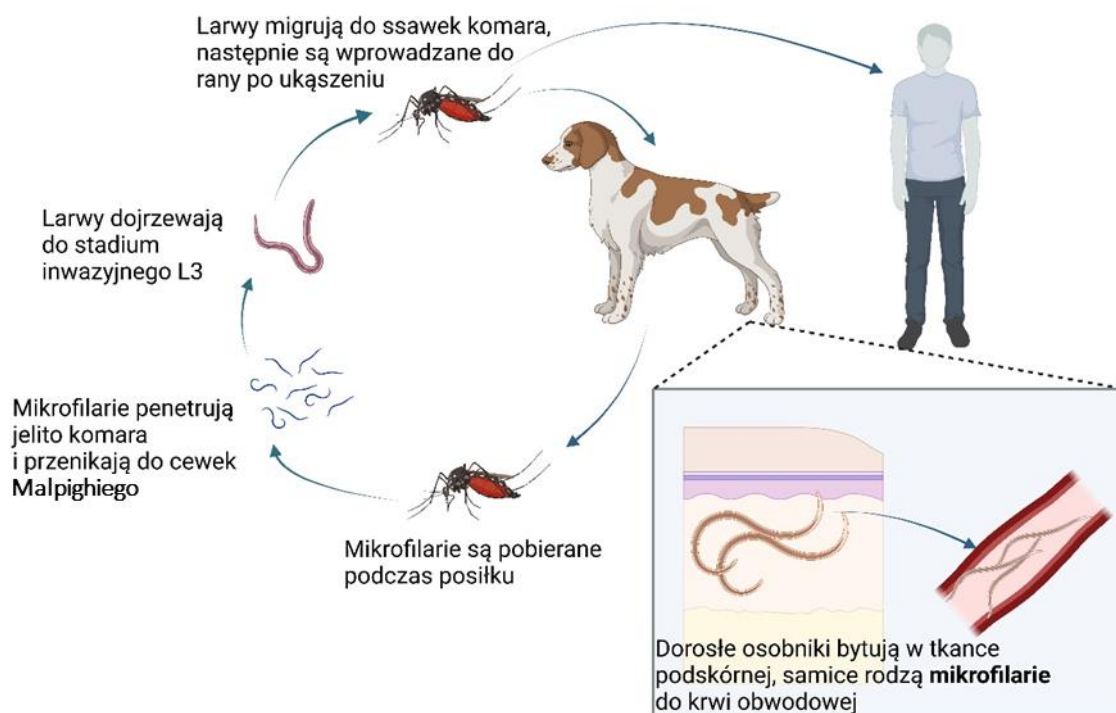
WT – (z ang. wild type) szczep typu dzikiego

1. Wstęp

Przebieg inwazji *Dirofilaria repens*, ze względu na wiele niepoznanych do tej pory mechanizmów interakcji pasożyt – żywiciel, stanowi dla badaczy niewątpliwie, z punktu widzenia medycyny ludzkiej i weterynaryjnej, uzasadniony obszar badawczy. Żywiciel ostateczny, a zarazem rezerwuar pasożyta, czyli zarażony pies, zwykle nie wykazuje uchwytnych dla lekarza weterynarii objawów. Z kolei bezobjawowość inwazji sprawia, że zwalczanie dirofilariozy podskórnej większość lekarzy weterynarii traktuje jako istotne tylko dlatego, że jest to zoonoza. Obecność nicienia *D. repens* została stwierdzona w Polsce kilkanaście lat temu. Wraz z pokrewnym gatunkiem, *Dirofilaria immitis* (będącym czynnikiem etiologicznym dirofilariozy sercowo-płucnej), *D. repens* rozprzestrzenił się w Europie i w niedługim czasie wiele krajów europejskich stało się obszarami endemicznego występowania obydwu pasożytów (Capelli i wsp., 2018; Genchi & Kramer, 2020).

1.1. Cykl życiowy

Pasożyty *Dirofilaria repens* są przenoszone przez komary należące do rodzaju *Aedes*, *Anopheles*, i *Culex*, które pełnią rolę zarówno wektora, jak i żywiciela pośredniego. Wnikanie inwazyjnych larw L3 do rany żywiciela ostatecznego następuje w trakcie odżywiania się zarażonego komara. Po 6-9 miesiącach następuje dojrzewanie pasożytów do postaci dorosłej w tkance podskórnej i ich kopulacja. Zapłodnione samice rodzą mikrofilarie, które przedostają się do krążenia obwodowego, skąd też pobierane są przez komary. Po pobraniu mikrofilarii w organizmie komara następuje dojrzewanie postaci larwalnych do stadium inwazyjnego L3, gotowego do zarażenia kolejnych żywicieli, co zamyka cykl życiowy *D. repens* (ryc. 1).



Ryc. 1. Cykl życiowy *Dirofilaria repens*. Opracowanie własne, sporządzone przy pomocy BioRender.com.

1.2. Inwazje mikrofilaremiczne i amikrofilaremiczne

Powyżej omówiono pełny cykl rozwojowy pasożyta skutkujący pojawieniem się embrionalnego stadium mikrofilarii we krwi żywiciela ostatecznego. W trakcie przeprowadzonych badań, w ramach tej pracy doktorskiej, stwierdzono występowanie zjawiska inwazji amikrofilaremicznych, cechujących się brakiem krążących we krwi mikrofilarii przy obecności dorosłych pasożytów. Takie inwazje zostały wcześniej opisane w przebiegu zarażeń innymi filariami (Kwarteng & Ahuno, 2017). Inwazje amikrofilaremiczne mogą występować w przypadku zarażeń jednopłciowych, mogą być również związane z niedojrzałością płciową dorosłych osobników albo jako konsekwencja jednorazowego zastosowania chemioterapeutyków nicienobójczych, takich jak makrocycliczne laktony. Ze względu na to, że w przebiegu dirofilariozy skórnej zaobserwowano istotne zmiany profilu przeciwciał w badanych surowicach osobników mikrofilaremicznych i amikrofilaremicznych, mikrofilaremia lub jej brak są

najprawdopodobniej związane z cechami osobniczymi żywiciela, co opisano w trzecim artykule tej dysertacji (Canine antibody response against *Dirofilaria repens* in natural occult and microfilaremic infections).

1.3. Patogeneza inwazji

Pierwsze przypadki dirofilariozy podskórnej stanowiły zaskoczenie dla lekarzy klinicystów, którzy znajdowali dorosłe nicienie w formujących się guzkach podskórnych. Po kilkuletnich badaniach poświęconych *D. repens* okazało się, że występowanie guzów podskórnych, mimo że jest klasyczną formą choroby, często opisywaną u pacjentów we Włoszech, rzadko występuje u psów w Polsce. Oprócz znalezienia dorosłych pasożytów w opisywanych już wcześniej lokalizacjach, takich jak powrózek nasienny, moszna czy gruczoł mlekowy, pracownicy Zakładu Parazytologii i Chorób Inwazyjnych Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego stwierdzali obecność dorosłych *D. repens* w nietypowych lokalizacjach takich jak ścięgno kolana czy prawa komora serca. Sugeruje to, że nicienie *D. repens* mogą swobodnie migrować w organizmie żywiciela ostatecznego, zmieniając miejsce bytowania, zapewne niejednokrotnie w ciągu życia żywiciela. To z kolei tłumaczy dlaczego u większości mikrofilaremicznych pacjentów nigdy nie zidentyfikowano dorosłych pasożytów, a po serii leczenia, zgodnego z zaleceniami European Society of Dirofilariosis and Angiostrongylosis – ESDA, opartego o comiesięczne podawanie milbemycyny przez okres sześciu miesięcy, u żadnego z pacjentów po roku nie stwierdzono obecności mikrofilarii. Założono wówczas, że doszło do zabicia dojrzałych *D. repens*, jako że moksydektyna wykazuje działanie bójcze w stosunku do dorosłych nicieni.

1.4. Odpowiedź immunologiczna w przebiegu inwazji nicieni

Odpowiedź immunologiczna przeciwko filariom została dokładniej opisana w przebiegu inwazji innych filarioidalnych nicieni (Kurniawan i wsp., 1993; Kwarteng & Ahuno, 2017; Madeleine P. J. White, 2020; Maizels i wsp., 2004; McSorley i wsp., 2013; Wammes i wsp., 2012). Nadal jednak niewiele wiadomo na temat odpowiedzi immunologicznej psa, ani w przebiegu dirofilariozy podskórnej, ani innych inwazji filarioidalnych. Większość dostępnych artykułów naukowych na temat mechanizmów odpowiedzi immunologicznej w przebiegu dirofilariozy dotyczy *D. immitis*. Mimo wielu podobieństw obydwu gatunków, w przypadku *D. immitis* dorosłe pasożyty lokalizują się

w sercu oraz naczyniach płucnych, za to *D. repens* stale migrują w tkance podskórnej i jamach ciała żywiciela. Różnice w rozmieszczeniu pasożytów, w przypadku obydwu inwazji, najprawdopodobniej skutkują różnicami w pobudzaniu mechanizmów odpowiedzi immunologicznej żywiciela.

Helminy słyną ze swoich zdolności modulowania odpowiedzi immunologicznej żywiciela. W wielu badaniach naukowych zauważono, że nicienie strategicznie promują rozwój odpowiedzi immunologicznej w kierunku odpowiedzi zależnej od limfocytów Th2, która zapewnia im dojrzewanie i przetrwanie w organizmie żywiciela (Maizels i wsp., 2004). Już w 1968 roku Greenwood zaobserwował niską częstość występowania reumatoidalnego zapalenia stawów i innych zaburzeń autoimmunologicznych w krajach afrykańskich o wysokiej częstości występowania pasożytów (Greenwood, 1968). Ponadto zauważono, że spadek częstości występowania inwazji pasożytniczych jest skorelowany ze zwiększoną częstością występowania zaburzeń alergicznych i autoimmunologicznych. Na podstawie tych obserwacji sformułowano tak zwaną hipotezę higieny, która opisuje odwrotną zależność pomiędzy warunkami sanitarnymi, a występowaniem alergii. W oparciu o tę hipotezę, poprawa warunków sanitarnych społeczeństwa prowadzi do zmniejszenia częstości występowania i intensywności zarażeń pasożytniczych, co z kolei skutkuje statystycznie zwiększonym występowaniem alergii i zaburzeń autoimmunologicznych wśród populacji (Greenwood, 1968).

Mimo że ciężkie zarażenia pasożytnicze mogą prowadzić do znacznych, długoterminowych problemów zdrowotnych, w tym śmierci żywiciela, coraz więcej badań wskazuje, że małe obciążenia robakami mogą mieć charakter komensalny (Navarro i wsp., 2013). Zaobserwowano, że w przeciwieństwie do okresowych i lekkich inwazji, które mogą nawet sprzyjać rozwojowi alergii, przewlekłe i ciężkie obciążenia pasożytnicze czasami wykazują korzystne działanie ochronne przed alergią (Pinelli & Aranzamendi, 2012).

Jednym z głównych mechanizmów umożliwiających helmintom wywoływanie przewlekłych inwazji i promowanie ich przetrwania jest modulowanie aktywacji receptorów rozpoznawania wzorca (PRR) żywiciela, takich jak receptory Toll-podobne (TLR) oraz receptory NOD-podobne (NLR) (Jackson i wsp., 2009; Zakeri i wsp., 2016). Odgrywają one kluczową rolę zarówno w nieswoistej, jak i swoistej odporności oraz w eliminacji pasożytów. PRR rozpoznają wzorce molekularne związane z patogenami (PAMP), co uruchamia kaskadę sygnałów prowadzącą do aktywacji komórek prezentujących antygen (APC). Dojrzałe APC wydzielają następnie cytokiny polaryzując odpowiedź

immunologiczną żywiciela dostosowaną do zwalczania konkretnego patogenu (Gutcher & Becher, 2007).

Negatywna regulacja sygnalizacji TLR prowadzi do spadku syntezy cytokin prozapalnych, co może stanowić działanie ochronne przed chorobami autoimmunologicznymi (Sun i wsp., 2011). Na przykład, mikrofilarie *B. malayi* znacząco wpływają na obniżenie ekspresji mRNA kodujących TLR3, TLR4, TLR5 i TLR7 w komórkach dendrytycznych żywiciela. Ponadto u osób zarażonych *B. malayi* opisano obniżoną ekspresję genów kodujących białka TLR1, TLR2, TLR4 i TLR9 w limfocytach B, zarówno na poziomie mRNA, jak i samego białka (Anwar i wsp., 2019).

Kontakt z antygenem prowadzi do dojrzewania APC, które z kolei polaryzują odpowiedź immunologiczną, pobudzając różnicowanie limfocytów T. Czasami na drodze tej stymulacji, dochodzi do polaryzacji limfocytów T pomocniczych w kierunku immunofenotypu regulatorowego (Treg). Limfocyty Treg to subpopulacja limfocytów T wykazujących zdolność do supresji innych komórek immunokompetentnych, co skutkuje efektywnym wyciszeniem odpowiedzi immunologicznej. Limfocyty T regulatorowe stanowią jeden z kluczowych elementów układu odpornościowego zabezpieczający organizm przed autoagresją. Dzieli się na powstające w grasicy w odpowiedzi na antygeny własne, naturalne limfocyty T regulatorowe (nTreg) mające największe znaczenie dla utrzymania tolerancji immunologicznej, stanowiące dominującą populację limfocytów T regulatorowych oraz na limfocyty T regulatorowe indukowane (iTreg), czyli naiwne obwodowe limfocyty T ulegające przekształceniu w limfocyty Treg pod wpływem TGF- β . Klasycznie nTreg charakteryzuje obecność powierzchniowych cząsteczek różnicujących CD4 oraz CD25 (łańcuch α receptora dla IL-2) (Fehérvári & Sakaguchi, 2004) i czynnika transkrypcyjnego Foxp3 (forkhead box P3), działającego jako represor transkrypcji interleukiny 2 (IL-2). Obecnie uważa się, że to aktywacja Foxp3, a niekoniecznie obecność cząsteczki różnicującej CD25, bezpośrednio koreluje z właściwościami supresyjnymi Treg, a komórki CD4⁺CD25⁻Foxp3⁺ wykazują podobne zdolności supresyjne do CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ (Fontenot i wsp., 2005). W PBMC ludzi zarażonych nicieniami filaroidalnymi obserwuje się wyższy odsetek właściwie każdej subpopulacji limfocytów T regulatorowych (Metenou & Nutman, 2013).

W przypadku dirofilariozy podskórnej większość pacjentów stanowią psy bezobjawowe, u których mikrofilaremia lub obecność dorosłych pasożytów stwierdzana jest przypadkowo, co sugeruje, że nicienie *D. repens* również wykazują zdolności

immunomodulujące, pozwalające na długoletnie przeżycie w organizmie żywiciela ostatecznego.

Wysoka intensywność mikrofilaremii (definiowana jako liczba Mf/ml we krwi obwodowej żywiciela) wynosząca czasem powyżej 10000 Mf/ml, w połączeniu z brakiem objawów inwazji u większości osobników, wskazuje nie tylko na potencjalną immunosupresyjną aktywność *D. repens*, ale najprawdopodobniej również na zaburzenia immunologiczne w organizmie żywiciela ostatecznego.

Na niniejszą dysertację składa się cykl monotematycznych publikacji oraz omówienie najważniejszych wyników, które jeszcze nie zostały opublikowane. Należy doprecyzować, że pierwsza prezentowana publikacja (Hematological and biochemical changes in dogs naturally infected with *Dirofilaria repens*) składa się z dwóch części. Pierwsza opisuje analizę, która nie zostaje tutaj szczegółowo opisana i stanowi istotną część pracy doktorskiej dr. Artura Dobrzyńskiego. Dotyczy klinicznie istotnego algorytmu diagnostycznego dirofilariozy podskórnej (Dobrzyński, 2016). Druga część pracy, będąca częścią tej dysertacji, oparta została o drugą analizę, wykonaną w oparciu o wyniki badań psów klinicznie zdrowych i jednocześnie zarażonych *D. repens*, u których pomimo braku uchwytnych objawów klinicznych, zaobserwowano pewne zależności świadczące o polaryzacji odpowiedzi komórkowej psów zarażonych w kierunku odpowiedzi immunologicznej zależnej od limfocytów typu Th2 oraz wystąpienia reakcji przewlekłego stresu u zarażonych osobników.

2. Cele pracy doktorskiej

1. Porównanie wskaźników hematologicznych i biochemicznych psów klinicznie zdrowych w kontekście zrozumienia ogólnego wpływu obecności *D. repens* na organizm psa.
2. Analiza występowania zjawiska wysokiej mikrofilaremii występującej u psów zarażonych *D. repens* w kontekście konkretnych przypadków klinicznych.
3. Analiza profilu przeciwciał wytwarzanych przeciwko *D. repens* u psów mikrofilaremicznych i amikrofilaremicznych.
4. Ocena występowania populacji limfocytów T CD4⁺, T CD8⁺, B CD21⁺ wśród jednojądrzastych komórek krwi obwodowej psa (PBMC) izolowanych z krwi osobników zarażonych *D. repens* i zdrowych oraz ocena wpływu antygenów somatycznych *D. repens* (DrSA) na PBMC.
5. Analiza ścieżek sygnałowych zależnych od receptorów rozpoznających wzorce oraz dojrzewania komórek dendrytycznych, w odpowiedzi na DrSA.

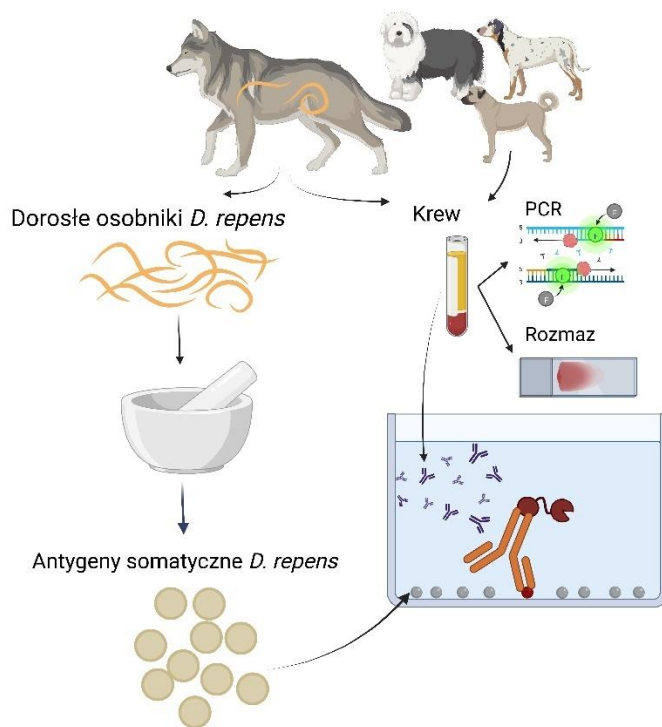
3. Materiały i metody

3.1. Materiały i metody opublikowane

Pierwszym celem było porównanie wskaźników morfologicznych i biochemicznych klinicznie zdrowych psów zarażonych *D. repens* (grupy reprezentującej naturalnie występujące osobniki bezobjawowe) w porównaniu do zdrowych, niezarażonych psów. W tym celu od 415 pacjentów, z którymi właściciele zgłosili się do lecznicy weterynaryjnej, pobrano próbkę krwi i wykonano badanie kliniczne. Psy, u których wykryto mikrofilarie we krwi obwodowej (za pomocą rozmazu manualnego lub multipleks PCR), bądź od których wyizolowano dorosłe nicienie zakwalifikowano do grupy zarażonych *D. repens*. Wśród tej grupy osobniki, które były klinicznie zdrowe i których wszystkie wskaźniki morfologiczne i biochemiczne mieściły się w zakresach referencyjnych, zostały zakwalifikowane jako grupa psów zarażonych bezobjawowych, reprezentujących najczęściej występującą odmianę dirofilariozy podskórnej. Badania morfologiczne i biochemiczne krwi wykonane zostały w komercyjnym laboratorium weterynaryjnym. Szczegółowy opis metodyki oraz analizy statystycznej zawarto w sekcji „Materials and Methods” pierwszego załączonego artykułu (Hematological and biochemical changes in dogs naturally infected with *Dirofilaria repens*).

W drugim załączonym artykule (Case studies of severe microfilaremia in four dogs naturally infected with *Dirofilaria repens* as the primary disease or a disease complicating factor) przeanalizowane zostały przypadki kliniczne psów, u których stwierdzono bardzo wysoką mikrofilarię (WMf; definiowaną jako intensywność powyżej 10000 Mf/ml krwi pełnej). Wyniki badań klinicznych oraz parametrów biochemicznych i morfologicznych przeanalizowano pod kątem powiązania wystąpienia u pacjentów mikrofilaremii o wysokiej intensywności z chorobami towarzyszącymi tych pacjentów. U pacjentów wykonano podstawowe badanie kliniczne obejmujące pomiar temperatury, osłuchanie klatki piersiowej (serca oraz płuc) i jamy brzusznej, zmierzenie czasu kapilarnego, obejrzenie śluzówek jamy ustnej oraz spojówek, badanie palpacyjne jamy brzusznej oraz dostępnych węzłów chłonnych. Ponadto, wykonano biochemiczne i morfologiczne badanie krwi w komercyjnym laboratorium diagnostycznym, a z wykorzystaniem testu Knott’a określono intensywność mikrofilaremii. Szczegółowy opis metodyki oraz analizy statystycznej zawarto w sekcji „Materials and Methods” drugiego załączonego artykułu.

W ostatnim załączonym artykule oprócz powyżej opisanych metod, wykorzystano test immunoenzymatyczny (ELISA) do oznaczenia przeciwciał rozpoznających antygeny somatyczne dorosłych *D. repens* (DrSA). Schemat opisanego postępowania przedstawia Ryc. 2.



Ryc. 2. Schemat metodyki badań opisanych w trzeciej załączonej publikacji. Opracowanie własne, sporządzono przy pomocy BioRender.com.

Próbki krwi od psów podejrzanych o dirofilariozę podskórną oraz zdrowych pobrano i przeanalizowano w komercyjnym laboratorium diagnostycznym. W tym celu wykonano multipleks PCR (różnicujący *D. immitis* i *D. repens*) oraz rozmaz krwi. Za pomocą ELISA zbadano obecność swoistych przeciwciał klasy IgM, IgE oraz IgG oraz podklas IgG1 i IgG2 skierowanych przeciwko DrSA w zebranych surowicach.

DrSA zostały pozyskane z dorosłych paszytów *D. repens* otrzymanych od naturalnie zarażonych psów w trakcie rutynowych lub innych planowych zabiegów chirurgicznych. Niczenie homogenizowano w jałowym buforze PBS przy użyciu mechanicznego homogenizatora Glas-Col. Ekstrakt odwirowywano, a stężenie białek w nadsączu hodowlanym oznaczono przy użyciu zestawu BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific)

zgodnie z protokołem producenta. Szczegółowy opis metodyki oraz analizy statystycznej zawarto w sekcji „Materials and Methods” trzeciego załączonego artykułu.

3.2. Materiały i metody nieopublikowane

3.2.1. Oznaczanie immunofenotypu jednojądrzastych komórek krwi obwodowej psów zarażonych *D. repens*

W kolejnych etapach badań porównano udział procentowy limfocytów T CD4⁺, T CD8⁺, B CD21⁺ oraz stosunek limfocytów T CD4 do T CD8 w populacji wszystkich limfocytów izolowanych od osobników zarażonych i zdrowych. W tym celu wyizolowano jednojądrzaste komórki krwi obwodowej (PBMC) psów. W sumie przebadano PBMC od 9 psów niezarażonych i 9 zarażonych przydzielonych do obydwu grup na podstawie zmodyfikowanego testu Knott'a.

PBMC uzyskiwano poprzez odwirowanie (800 x g, 30 min, 22°C) krwi pełnej antykoagulowanej EDTA i rozcieńczonej w stosunku 1:2 w jałowym roztworze soli fizjologicznej buforowanej fosforanami (PBS) w gradiencie stężeń roztworu separującego (Histopaque®-1077, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Niemcy). Po odwirowaniu otrzymywano następujące warstwy (od góry): osocze, kożuszek leukocytarny zawierający PBMC (interfaza), warstwę roztworu rozdzielającego i osad krwinek czerwonych. Ostrożnie zbierano kożuszek do nowej probówki, do zawiesiny komórek dodawano 10 ml PBS z 2% dodatkiem FBS (Biowest, Francja), a następnie odwirowano (250 x g, 10 min, 22°C). Płukanie powtarzano dwukrotnie. Osad komórek zawieszano w PBS z 2% FBS. Wyizolowane komórki liczone były przy użyciu automatycznego licznika komórek za pomocą testu wychwyty błękitu trypanu (Countess II Automated Cell Counter, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Komórki zostały zawieszane w pożywce RPMI-1640 z dodatkiem 10% FBS oraz 1% penicyliny i streptomycyny (Biowest, Cytogen, Francja). Schemat doświadczenia przedstawiono na rycinie 3.

3.2.2. Przygotowywanie komórek do analizy cytometrycznej

1 x 10⁵ PBMC wyznakowano przeciwciałami monoklonalnymi skierowanymi przeciwko antygenom powierzchniowym CD4, CD8, CD21 (eBioScience, ThermoFisher Scientific, USA). Kolejne 1 x 10⁵ komórek wyznakowano przeciwciałami monoklonalnymi anti-CD4, anti-CD8, anti-CD25 oraz anti-Foxp3 (wszystkie eBioscience, ThermoFisher Scientific, USA). Charakterystykę obu paneli przeciwciał przedstawiono w tabelach 1 i 2.

Po przepłukaniu komórek PBS z 2% FBS, PBMC inkubowano z wyżej wymienionym koktajlem przeciwciał przez 30 minut bez dostępu światła w temperaturze pokojowej. Komórki trzykrotnie płukano PBS z 2% FBS. Komórki znakowane przeciwciałami należącymi do drugiego koktajlu (zawierające anty-Foxp3) utrwalono i permeabilizowano za pomocą komercyjnego zestawu FOXP3 Transcription Factor Fix/Perm buffer (ThermoFisher Scientific, USA). Po zakończeniu permeabilizacji dodano roztwór przeciwciał anty-Foxp3, komórki inkubowano przez 30 minut w temperaturze pokojowej, płukano trzykrotnie. Pomiędzy każdym płukaniem komórki odwirowywano (5 min, 250 x g, RT). Tak przygotowany osad komórek ostatecznie zawieszono w 200 µL PBS z 2% FBS i poddano badaniu cytometrii przepływowej. Do badań użyto cytometru przepływowego BD FACS Aria II (Becton Dickinson, Heidelberg, Niemcy). W każdej próbie zapisano 5×10^4 obiektów, które następnie przeanalizowano przy użyciu programu FlowJo (TreeStar Inc., Ashland, USA). Populację limfocytów wydzielono na podstawie wielkości (FSC) i ziarnistości (SSC), a przed analizą odrzucono dublety komórkowe oraz komórki martwe.

Tabela 1. Charakterystyka przeciwciał użytych do oceny cytometrycznej limfocytów. Panel A.

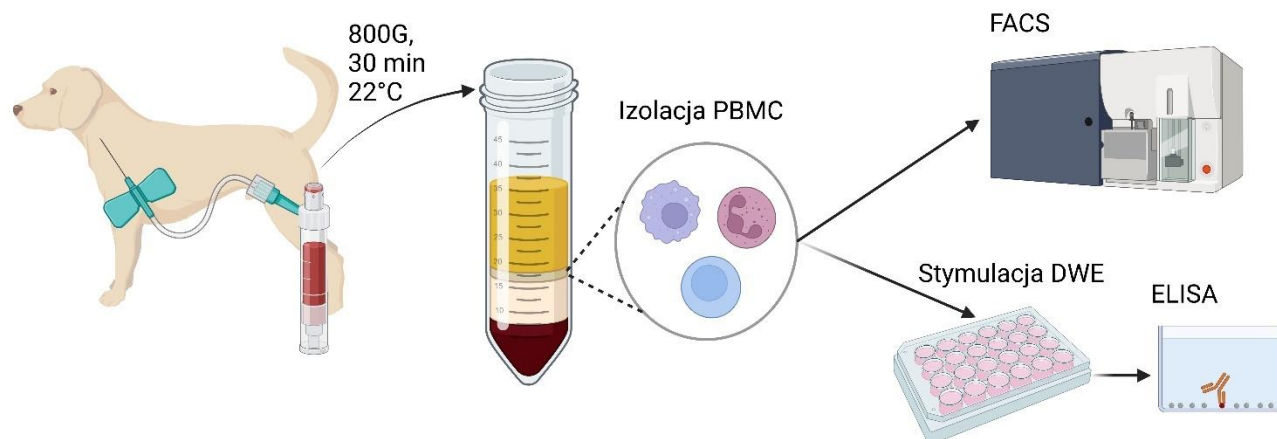
Symbol przeciwciała	Fluorochrom	Klon	Źródło
CD4	APC	YKIX302.9	eBioscience™, ThermoFisher Scientific
CD8a	eFluor™ 450	YCATE55.9	eBioscience™, ThermoFisher Scientific
CD21	PE	CA2.1D6	BioRad

Tabela 2. Charakterystyka przeciwciał użytych do oceny cytometrycznej limfocytów. Panel B.

Symbol przeciwciała	Fluorochrom	Klon	Źródło
CD4	PE-Cy7	YKIX302.9	eBioscience™, ThermoFisher Scientific
CD8	APC	YCATE55.9	eBioscience™, ThermoFisher Scientific
CD25	FITC	P4A10	eBioscience™, ThermoFisher Scientific
Foxp3	PE	FJK-16s	eBioscience™, ThermoFisher Scientific

3.2.3. Wpływ antygenów somatycznych *D. repens* na syntezę cytokin przez komórki jednojądrzaste krwi izolowane od psów zarażonych i niezarażonych

Pozostałe PBMC hodowano *in vitro*. Aby oczyścić PBMC z monocytów wykorzystano ich właściwości przylegania. W tym celu zawiesinę komórek naniesiono na 24-dołkowe płaskodenne płytki do hodowli komórkowej (Corning, New York, USA) i hodowano w pożywce RPMI z 2% FBS i 1% penicyliną ze streptomycyną w temperaturze 37°C i obecności 5% CO₂. Komórki wysiewano w liczbie 2 x 10⁶ komórek/ml i inkubowano przez minimum 18 h. Komórki nieprzylegające pobierano, liczone i wysiewano na nowe 96-dołkowe płaskodenne płytki do hodowli komórkowej (Corning, New York, USA). Komórki hodowano przez następne 72 h w świeżej pożywce bez dodatków / z dodatkiem 5 µg/ml konkanawaliny A (Con A) / 10 µg/ml DrSA / 10 µg/ml DrSA albo 5 µg/ml ConA. Po tym czasie komórki odwirowywano (250 x g, 5 min, RT) i nadsącz hodowlany zamrażano w -20°C do czasu przeprowadzenia ELISA w celu analizy profilu wydzielanych cytokin.



Ryc. 3. Schemat izolacji PBMC z krwi obwodowej psów oraz ich wykorzystanie w dalszych etapach badań, do hodowli, FACS oraz ELISA. Opracowanie własne przy pomocy BioRender.com.

3.2.4. Aktywacja szlaków sygnałowych przez antygeny *D. repens*

W celu ustalenia czy DrSA aktywuje szlaki sygnałowe związane z PRR NLRC1, NLRC2, TLR2 i TLR4 przeprowadzono hodowlę ludzkich komórek HEK-293 transfekowanych cDNA receptorów NLRC1, NLRC2, TLR2, TLR4 (Invivogen, Germany). Komórki HEK 293 hodowane były w pożywce DMEM z dodatkiem: 4,5 g/l glukozy, 4 mM L-glutaminy, 10% (v/v) FBS, 100 µg/ml normocyny (wykazującej działanie bójcze w stosunku

do grzybów oraz bakterii, w tym *Mycoplasma*), aż do trzeciego pasażu, gdy do hodowli HEK-293/ NLRC1 i NLRC2 dodano 10 µg/ml blastycydyny (Invivogen, Francja), do HEK-293/TLR2 1 µg/ml puromycyny (Invivogen, Francja), i 40 µg/ml gentamycyny (Sigma, Niemcy), a do komórek HEK-293/TLR4 dodano 10 µg/ml blastycydyny (Invivogen, Francja) oraz 5 µg/ml hygromycyny B (Invivogen, Francja). Blastycydna / puromycyna / hygromycyna B stanowią czynnik selekcyjny dla wzrostu jedynie stransformowanych komórek. Marker oporności stanowi gen kodujący oporność zakodowany w DNA odpowiednio użytego plazmidu.

Komórki hodowano do osiągnięcia 75% pokrycia powierzchni w butelkach do hodowli komórkowej 25 cm² (Falcon, Francja). Następnie, wysiewano je w objętości 100 µl/dolek w gęstości 4 x 10⁵ komórek/ml na 96-dółkową płaskodenną płytkę do hodowli komórkowej (Falcon, Francja). Po 24 h inkubacji (37°C, 5% CO₂) komórki odwirowywano (300 x g, 7 min, RT), odrzucano nadsącz i dodawano świeżą pożywkę w objętości 100 µl/dolek bez dodatków / z dodatkiem 5 lub 10 µg/ml DrSA / z ligandem (kontrolę pozytywną przedstawiono w Tab. 3).

Tabela 3. Ligandy wykorzystane jako kontrole pozytywne do stymulacji poszczególnych linii komórek HEK-293 eksprymujących receptory TLR2, TLR4, NLRC1, NLRC2.

Receptor	Ligand / Aktywator	Źródło
TLR2	1 µg/ml PAM3C	Invivogen, San Diego, USA
TLR4	1 µg/ml LPS	Invivogen, San Diego, USA
NLRC1	1 µg/ml TriDap	Invivogen, San Diego, USA
NLRC2	1 µg/ml MDP	Invivogen, San Diego, USA

3.2.5. Wpływ antygenów *D. repens* na dojrzewanie komórek prezentujących antygen

W ostatnim etapie pracy, analizowano dojrzewanie komórek prezentujących antygen w odpowiedzi na stymulację DrSA. W tym celu wykorzystano mysie komórki dendrytyczne pochodzenia szpikowego (BMDC), które są dogodnym modelem laboratoryjnym służącym do badania różnych aspektów funkcjonowania komórek dendrytycznych. Schemat doświadczenia przedstawiono na rycinie 4.

3.2.6. Izolacja szpiku kostnego

Szpik kostny został wyizolowany z kości udowych i piszczelowych pobranych pośmiertnie od 20 tygodniowych samców myszy C57BL/6J – dwóch myszy typu dzikiego (WT), dwóch myszy znokautowanych z mutacją w obrębie genu *il-1 β* kodującego IL-1 β (IL-1 $\beta^{-/-}$) oraz dwóch z mutacją w obrębie genu *tlr4* kodującego białko TLR4 (TLR4 $^{-/-}$). Wszystkie myszy zostały zakupione w Charles River Wiga (Sulzfeld, Niemcy). Po pobraniu, kości zostały starannie oczyszczone z otaczającej tkanki mięśniowej. Kości umieszczono na minutę w 70% etanolu, po czym przepłukano je buforowaną fosforanem solą fizjologiczną PBS (Gibco, nr katalogowy, 14040117). Kości przeniesiono na plastikowe szalki Petriego (Greiner, nr katalogowy 633180), w sposób jałowy odcięto nasady nożyczkami, szpik kostny wypłukano używając igły 25G ze strzykawką wypełnioną świeżą pożywką. Po dokładnym wypłukaniu jam szpikowych, zebraną zawiesinę przefiltrowano i odwirowano (7 min, 300 x g). Osad komórkowy zawieszono w pożywce R10 zawierającej RPMI (Gibco) z 10% dodatkiem FBS (Gibco), 100 μ g/ml penicyliny i streptomycyny (Biochrom), 2 mM L-glutaminy (Sigma) oraz 20 ng/mL GM-CSF (PeproTech). Komórki policzono przy użyciu komory zliczeniowej Neubauera, a żywotność komórek określono przy użyciu testu wychwytu błękitu trypanu.

Przed przeprowadzeniem stymulacji komórek zbadano poziom endotoksyn w ekstrakcie DrSA za pomocą zestawu PyroGene™ Recombinant Factor C Endpoint Fluorescent Assay (Lonza) zgodnie z zaleceniem producenta. Stężenie 10 μ g/ml DrSA zawierało 0,3 EU/ml (0,03 ng/mL) LPS.

3.2.6.1. Hodowla i różnicowanie komórek pochodzenia szpikowego

Komórki hodowane były przez 10 dni zgodnie z protokołem opisanym przez Lutz i wsp. (1999). W skrócie, wyizolowane komórki hodowano w pożywce R10. Pierwszego dnia leukocyty w gęstości 2×10^5 /ml wysiano w objętości 10 ml na plastikową szalkę Petriego. Po trzech dniach dodano do każdej szalki Petriego 10 ml świeżej pożywki R10, a następnie co dwa dni przez kolejnych sześć dni wymieniano połowę pożywki na świeżą. Ostatecznie, dziesiątego dnia hodowlę zakończono i pozyskano komórki nieprzylegające do plastiku, które odwirowano (5 minut, 300 x g) i wysiano w gęstości 1×10^6 /ml na jałową płytkę 48 dołkową (Costar®, Primaria™, Falcon).

Hodowlę kontynuowano na płytce 48-dołkowej w standardowych warunkach (21% stężenie tlenu, 5% CO₂, wilgotność 95%, 37°C) w pożywce R10 bez dodatku GM-CSF.

Komórki hodowano w trzech powtórzeniach, w czystej pożywce lub stymulowano dodając do pożywki 1 µg/ml lipopolisacharydu (LPS) / 10 µg/ml DrSA / 10 µg/ml DrSA z dodatkiem 1 µg/ml lipopolisacharydu (LPS) (eBioScience) w szóstej godzinie stymulacji. Stymulacja trwała w sumie 24 godziny. Po tym czasie płyn hodowlany zebrano i zamrożono w -80°C do czasu wykonania ELISA, komórki zaś wykorzystano do analizy w cytometrze przepływowym.

3.2.7. Pozyskiwanie produktów wydalniczo-wydzielniczych *D. repens*

Planowano również pobudzanie komórek produktami wydalniczo-wydzielniczymi (ES) dorosłych pasożytów. Cztery samice i dwa samce *D. repens* hodowane były w osobnych dołkach w 24-dołkowej płytce (Corning® Primaria™, Falcon) w pożywce Minimum Essential Medium (MEM), której połowa objętości wymieniana była co 24 h. W trakcie hodowli samice rodziły mikrofilarie, z których przed zamrożeniem pożywka była oczyszczana za pomocą filtra o średnicy porów 0,22 µm. W piątej dobie, gdy dorosłe osobniki wykazywały bardzo obniżoną motorykę, hodowla została zatrzymana. Uzyskano 133 µg białka z pożywki, w której hodowano samice i 86 µg białka z pożywki, w której hodowane były samce. Ze względu na brak dostępu do większej liczby żywych pasożytów oraz krótki czas aktywności pasożytów hodowanych *in vitro* w pożywce MEM oraz otrzymanie zbyt małej ilości białka, nie udało się przeprowadzić eksperymentów z użyciem ES.

3.2.8. Oznaczanie markerów komórkowych z wykorzystaniem cytometrii przepływowej

3.2.8.1. Procedura znakowania komórek

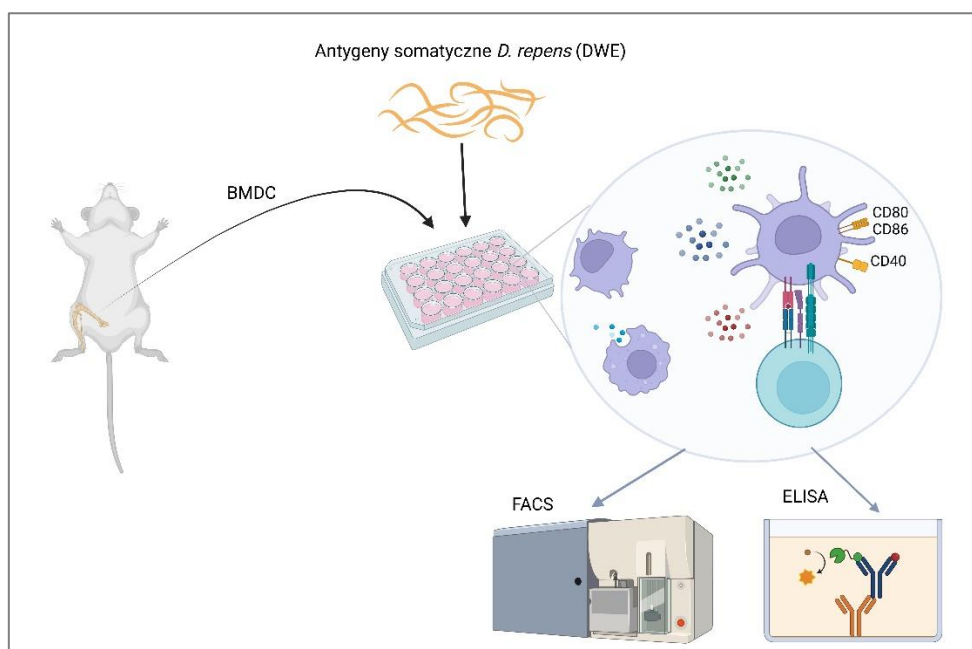
Analizę żywotności komórek sprawdzono przy użyciu testu wychwyty błękitu trypanu, a następnie wykonano barwienie amino-reaktywnym barwnikiem nieprzepuszczalnym dla błon komórkowych (Invitrogen™, LIVE/DEAD™, Thermofisher Scientific). Komórki oznakowano przeciwciałami monoklonalnymi skierowanymi przeciwko antygenom powierzchniowym CD11b, CD11c, F4/80, MHCII, CD40, CD80, CD86 w stężeniu zgodnym z procedurą firmową (BD Bioscience lub Invitrogen eBioscience). Do przeprowadzenia doświadczenia użyto cytometru przepływowego BD FACS CANTO II.

Do ustawienia napięć detektorów cytometru wykorzystano BD Cytometer Setup and Tracking Beads (BD Bioscience). Kompensacje dla wszystkich fluorochromów wykonano, używając pojedynczo wybarwionej próbki, dla każdego fluorochromu z panelu użytych

przeciwciał. Dodatkowo, dla oznaczanych antygenów, wykonano próbki kontrolne (FMO, fluorescence minus one), ustawiając bramki na wykresach tak, by wszystkie komórki próbki kontrolnej zostały uznane za ujemne. Analizy poziomu poszczególnych antygenów dokonano przy użyciu oprogramowania FlowJo™ wersja 10.7.

3.2.9. Oznaczenie cytokin wydzielanych przez BMDC stymulowanych antygenami *D. repens*

Pomiar stężenia wybranych cytokin (TNF- α , IL-1 β , IL-23, IL-6, IL-12p40, IL-12p70, TGF- β , IL-10) dokonano za pomocą ELISA używając komercyjnie dostępnych zestawów (Invitrogen eBioscience, ThermoFisher Scientific). W tym celu pobrano szpik kostny z kości udowych i piszczelowych myszy. Komórki różnicowano do komórek dendrytycznych. Ostatecznie, po różnicowaniu uzyskane BMDC stymulowano DrSA i po 24 h komórki poddano analizie za pomocą cytometrii przepływowej, a płyn hodowlany wykorzystano do pomiaru wydzielania wybranych cytokin.



Ryc. 4. Schemat metodyki badań opisanych w materiałach nieopublikowanych. Opracowanie własne, sporządzano przy pomocy programu BioRender.com.

Eksperymenty z wykorzystaniem myszy zostały zatwierdzone przez Komisję ds. Doświadczeń na Zwierzętach Uniwersytetu Medycznego w Wiedniu oraz Austriackie Federalne Ministerstwo Edukacji, Nauki i Kultury (BMWFV-66.009/0358-WF/V/3b/2015).

4. Wyniki

W pierwszym artykule wyodrębniono 214 psów (98 zarażonych *D. repens* i 112 niezarażonych), których wyniki wszystkich parametrów morfologii i biochemii mieściły się w granicach wartości referencyjnych. Założono, że właśnie ta grupa psów reprezentuje bezobjawowych pacjentów, u których inwazja *D. repens* zostaje zdiagnozowana przypadkowo, co stanowi najwyższy odsetek przypadków dirofilariozy podskórnej.

Analiza porównawcza wyników morfologii i biochemii krwi psów klinicznie zdrowych, ale zarażonych *D. repens* w porównaniu z osobnikami niezarażonymi (opisana w pierwszym z zamieszczonych artykułów) wykazała, że bezobjawowa dirofilarioza podskórna była powiązana z istotnie niższą liczbą erytrocytów ($p = 0,025$), niższym hematokrytem (Ht) ($p = 0,002$) i niższą liczbą limfocytów ($p = 0,031$) oraz istotnie wyższym stężeniem glukozy ($p = 0,023$). Co więcej, aktywność fosfatazy alkalicznej (ALP) była u nich również wyższa, ale w przypadku tej analizy, wartość była na granicy istotności statystycznej ($p = 0,054$) (Tabela 3 artykułu). Mimo że psy ocenione były jako klinicznie zdrowe, zmiany te wskazują, że zarażenie *D. repens* ma wpływ na funkcjonowanie organizmu żywiciela. Zarażenie *D. repens* wydaje się promować przewlekłą reakcję stresową i uwalnianie glikokortykosteroidów charakteryzujące się obniżeniem liczby erytrocytów i limfocytów, wzrostem poziomu glukozy i aktywności ALP. Wyniki te sugerują, że dirofilarioza jest powiązana z przewlekłą reakcją stresową i może predysponować lub przyczyniać się do zaostrzenia chorób współistniejących.

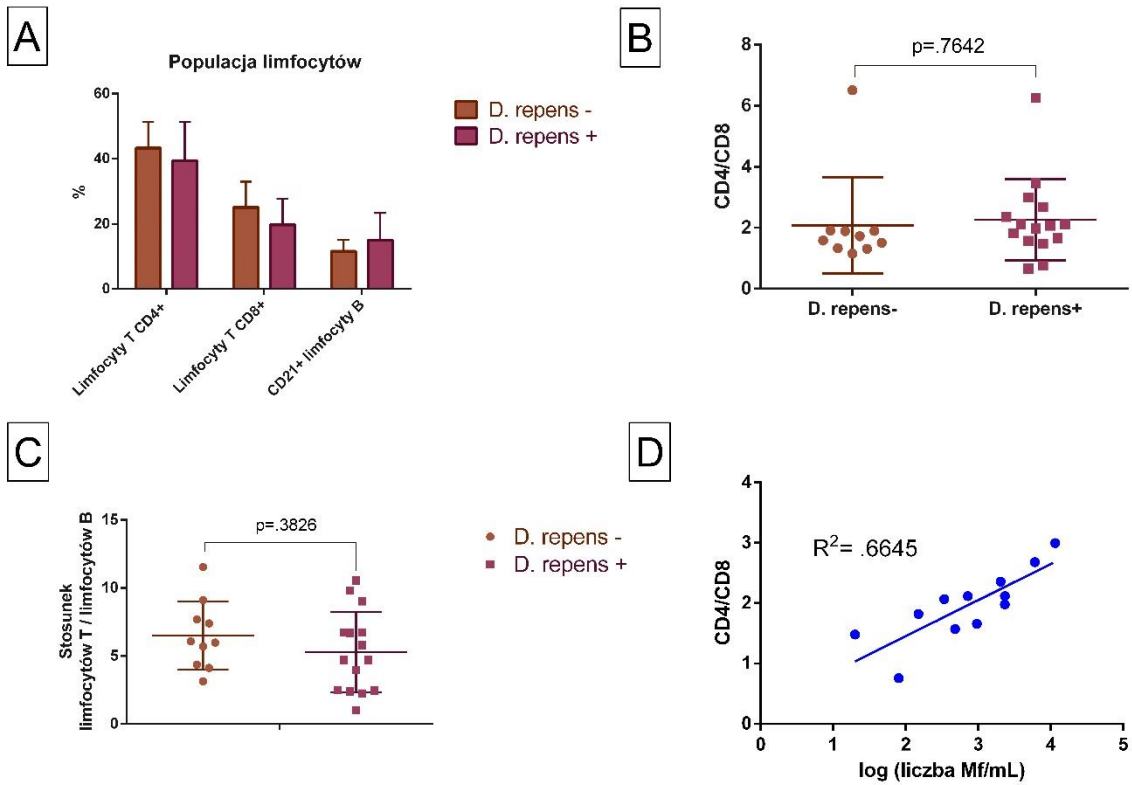
Kolejny artykuł przedstawia analizę i opis czterech przypadków klinicznych psów zarażonych *D. repens* z wysoką mikrofilaremią (powyżej 10000 Mf/ml), u których dirofilarioza podskórna w połączeniu z chorobą współistniejącą doprowadziły do śmierci. Na podstawie wyników zmodyfikowanego testu Knott'a, w 62 próbkach pobranych od mikrofilaremicznych osobników, stwierdzono, że mediana mikrofilaremi *D. repens* we krwi obwodowej u psów wynosi 675 Mf/ml. Opisane przypadki dotyczyły zatem sytuacji, w których mikrofilaremia wielokrotnie przekraczała wartość najczęściej obserwowaną u psów. Zaobserwowano również, że u psów o wysokiej mikrofilaremi leczenie standardową dawką moksydektyny (według wytycznych ESDA) było wystarczające do całkowitego zabicia Mf lub zmniejszenia ich liczby poniżej poziomu wykrywalności, tak samo jak w przypadkach mniej licznych inwazji, po 6 dniach od zastosowania leku.

U jednego z pacjentów, u którego wystąpiło wodobrzusze, w pobranym płynie z jamy otrzewnej stwierdzono Mf, granulocyty i atypowe komórki dwujądrowe z licznymi figurami mitotycznymi sugerującymi proces nowotworowy. Wyniki badań hematologicznych i biochemicznych u psów wysoko filaremicznych były zróżnicowane i obejmowały niedokrwistość, trombocytopenię, leukocytozę, neutrofilie, eozynofilię, monocytosę oraz podwyższone wartości ALP, transaminazy asparaginianowej, aminotransferazy alaninowej, azotu mocznikowego, kreatyniny, bilirubiny, a także hipoalbuminemię. Z danych literaturowych wynika, że intensywność mikrofilareмии nie jest bezpośrednio związana z liczbą dorosłych osobników w organizmie żywiciela. Opisywano przypadki psów, u których pomimo obecności wysokiej liczby dorosłych pasożytów (ponad 300) (Mircean i wsp., 2017), mikrofilaremia wyniosła jedynie około 7000 Mf/ml, podczas gdy u jednego z naszych pacjentów, od którego wyizolowano 26 robaków, mikrofilaremia wynosiła powyżej 14 000 Mf/ml. Rozwój wysoko filaremicznych inwazji jest zatem najprawdopodobniej możliwy u żywicieli, u których występują zaburzenia immunologiczne.

W ostatnim załączonym artykule wykazano, że miana przeciwciał klasy IgG i IgE, ale nie IgM swoistych dla antygenów somatycznych *D. repens* były znacząco podwyższone u zarażonych psów i niezależne od płci osobnika (Ryc. 1, 2 oraz 3 Artykułu). Ponadto, psy mikrofilaremiczne cechowały się wyższym poziomem swoistych IgG1 niż IgG2, podczas gdy inwazje amikrofilaremiczne wiązały się z wyższym poziomem IgG2 niż IgG1 (Ryc. 4 Artykułu). Stwierdzono również, że wiek zarażonych zwierząt nie wpłynął na profil wykrytych przeciwciał. Wykazano również, że samce były predysponowane do inwazji mikrofilaremicznej, podczas gdy inwazje amikrofilaremiczne znacząco przeważały u samic (Ryc. 5 Artykułu).

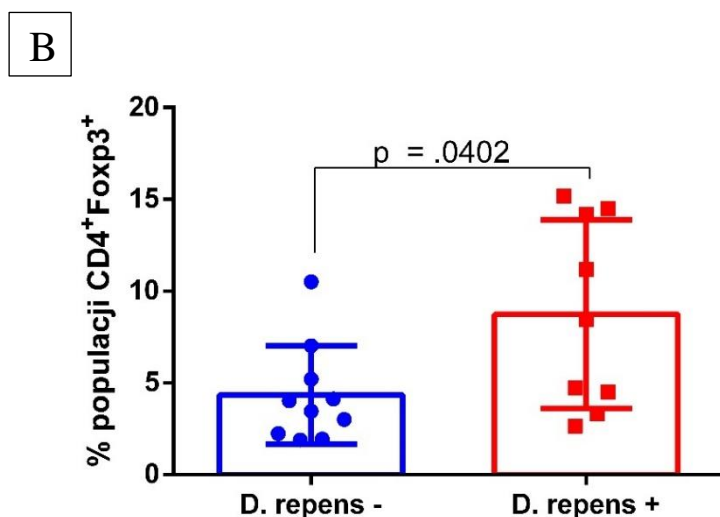
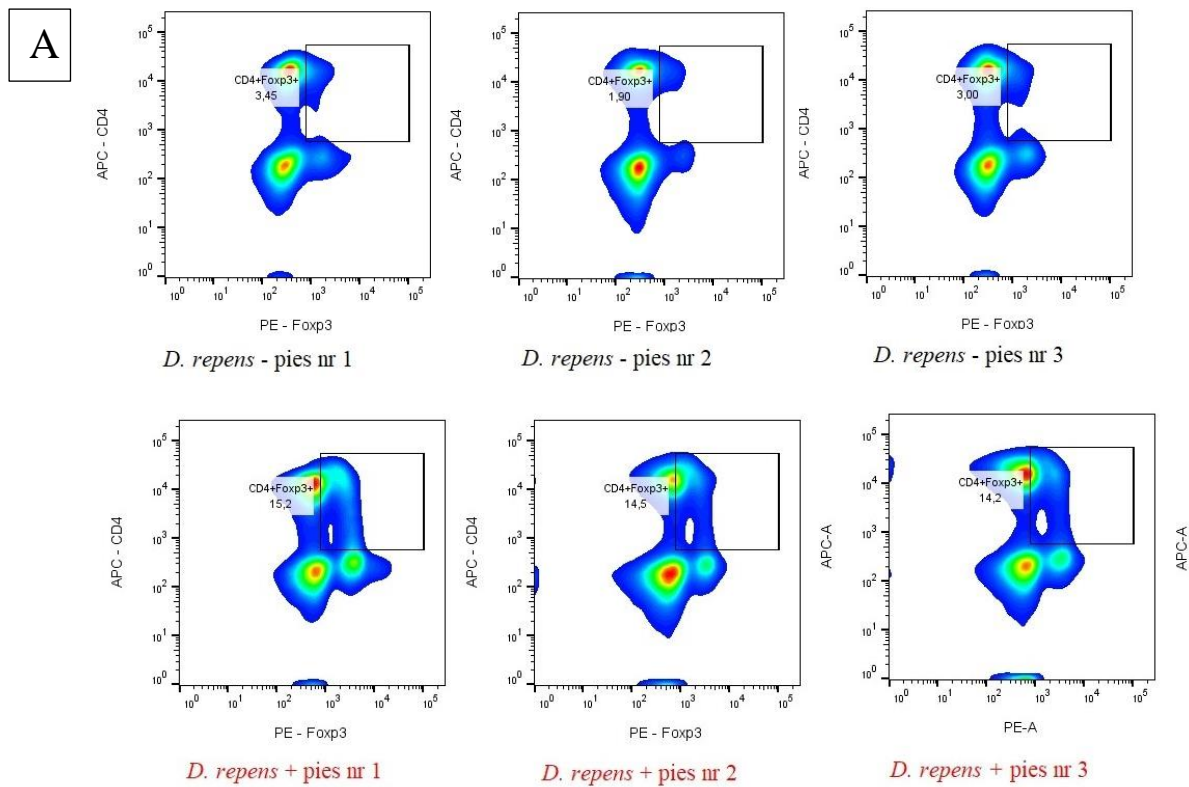
4.1. Badanie obecności fenotypu limfocytów T CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺, T CD8⁺ oraz limfocytów B CD21⁺

Nie stwierdzono różnic w stosunku T CD4⁺ do T CD8⁺ (Ryc. 5A i 5B) ani limfocytów T do limfocytów B (Ryc. 5C), ani ogólnego procentowego udziału limfocytów T CD4⁺, T CD8⁺, B CD21⁺ w puli limfocytów między psami niezarażonymi i zarażonymi. Zaobserwowano za to korelację ($R^2=0,6654$) między stosunkiem T CD4⁺: T CD8⁺ i intensywnością mikrofilareмии (Ryc. 5D). Im intensywniejsza mikrofilaremia, tym bardziej wzrastał odsetek limfocytów T pomocniczych (CD4⁺), a malał odsetek limfocytów T cytotoksycznych (CD8⁺).



Ryc. 5. Graficzne przedstawienie: (A) - średniego odsetka procentowego limfocytów T CD4⁺, CD8⁺ oraz limfocytów B CD21⁺ w ogólnej populacji limfocytów (średnia ± odchylenie standardowe), (B) - stosunku limfocytów T do limfocytów B, (C) - stosunku limfocytów T CD4⁺: TCD8⁺, u psów niezarażonych i zarażonych, (D) - korelacji między stosunkiem limfocytów T CD4⁺: T CD8⁺, a intensywnością Mf (zakres 20 – 11560 Mf/ml przedstawiono w skali logarytmicznej).

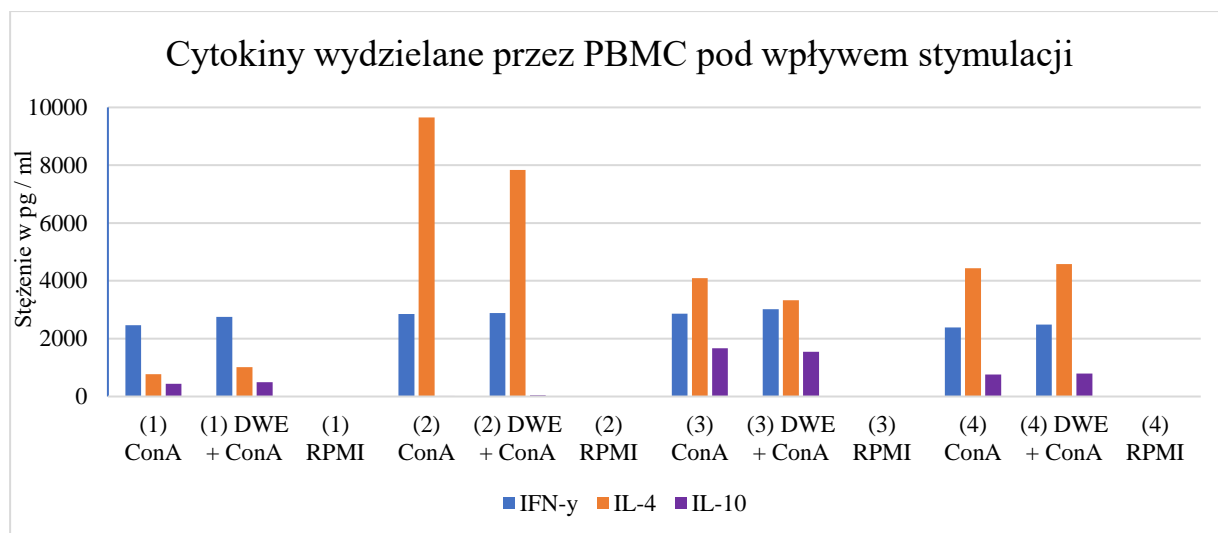
Nie zaobserwowano zmian w odsetku regulatorowych limfocytów T CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ między osobnikami zarażonymi i niezarażonymi, ale psy zarażone miały wyższy odsetek innej populacji T regulatorowej o fenotypie T CD4⁺CD25⁻Foxp3⁺ (Ryc. 6) o znanych właściwościach immunosupresyjnych. Limfocyty regulatorowe T CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ są powiązane z atopią (Lee i wsp., 2020; Majewska i wsp., 2016), a ich niższy odsetek jest charakterystyczny dla nieswoistego zapalenia jelit.



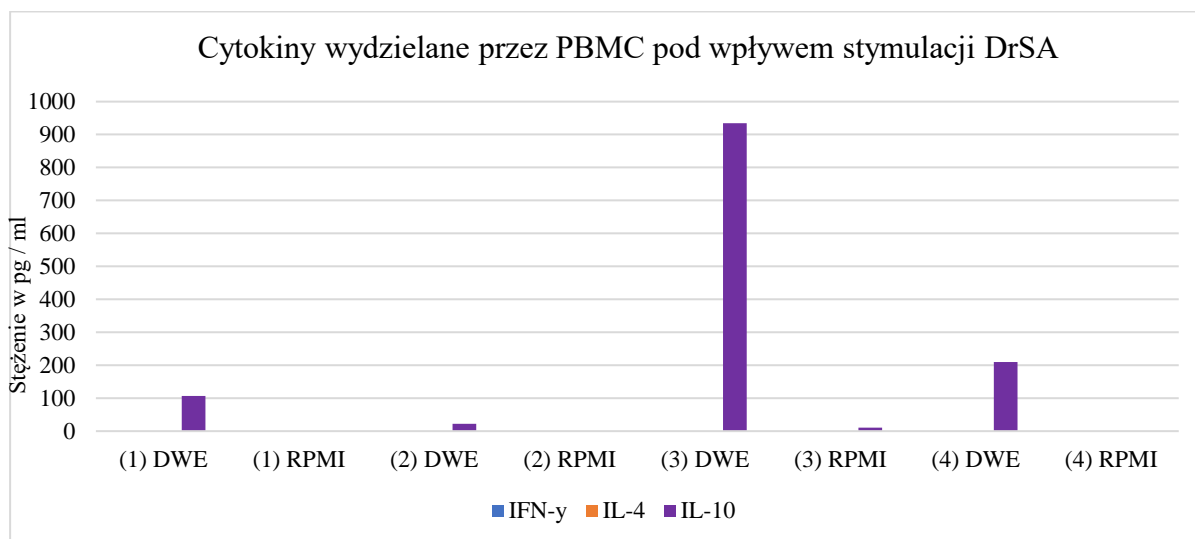
Ryc. 6. Procentowy udział aktywowanych limfocytów T CD4⁺Foxp3⁺ w populacji wszystkich limfocytów u klinicznie bezobjawowych psów niezarażonych (czarny podpis) i zarażonych (czerwony podpis) w postaci indywidualnych dot plotów (A, oznaczenie bramki wykonane zostało przy użyciu komórek niebarwionych oraz z użyciem negatywnej kontroli izotypowej, na rycinie widoczne są trzy reprezentacyjne dot ploty populacji komórek psów zarażonych i niezarażonych). B – psy zarażone miały istotnie wyższy odsetek limfocytów T CD4⁺Foxp3⁺ w puli wszystkich limfocytów niż psy niezarażone (każda kropka reprezentuje wynik jednego psa, wykres przedstawia średnią wyników wszystkich osobników z odchyleniem standardowym).

Ostatecznie, po 72 h stymulacji PBMC psów *D. repens* (+) wydzielały mniejsze ilości IL-10, a większe IFN- γ pod wpływem stymulacji DrSA. Szczegółowe wyniki stężenia cytokin

wydzielanych przez PBMC pochodzących od trzech zarażonych i jednego niezarażonego osobnika po stymulacji LPS lub DrSA z LPS widoczne są na Ryc. 7, a po stymulacji DrSA widoczne są na Ryc. 8.

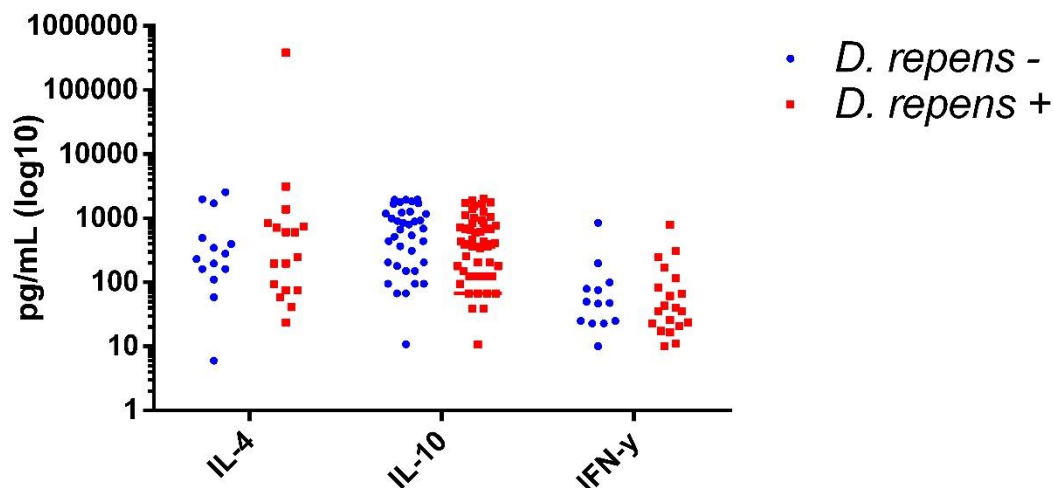


Ryc. 7. Rozkład stężenia IFN- γ , IL-4 oraz IL-10 w supernatancie po 72 h hodowli PBMC psów, niestymulowanych (RPMI) lub stymulowanych konkanawaliną (ConA) bądź DrSA z ConA (DrSA+ConA). Na wykresie przedstawiono wyniki reprezentatywnych osobników: 1 – oznacza psa niezarażonego; 2, 3, 4 reprezentują psy zarażone *D. repens*.



Ryc. 8. Stężenie wybranych cytokin w pożywkach po 72 h hodowli PBMC psów, w czystych pożywkach oraz stymulowanych DrSA.

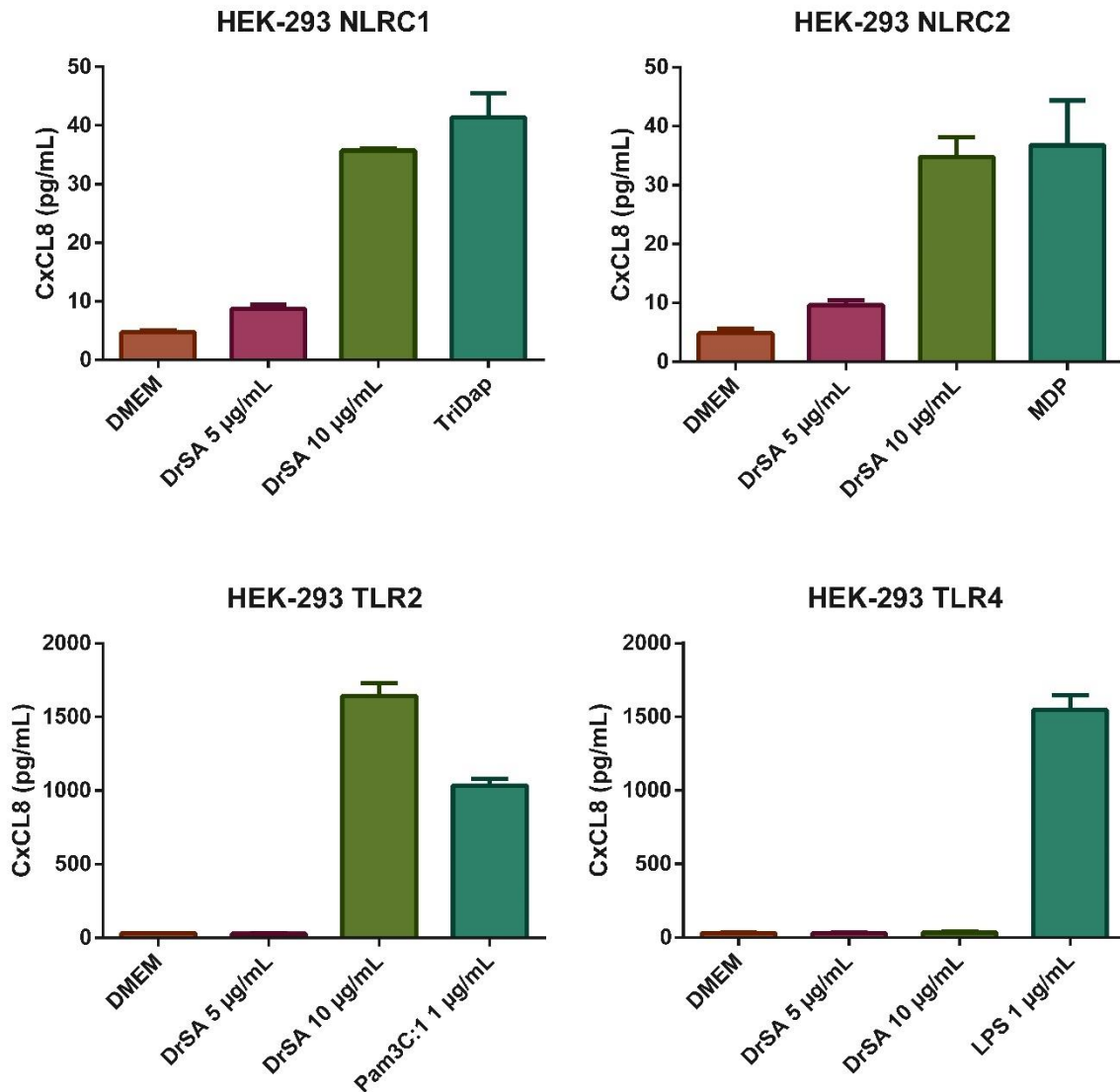
Poza analizą fenotypu komórek, zbadano również stężenie cytokin w surowicach psów niezarażonych i zarażonych, ale nie zaobserwowano różnic między nimi (Ryc. 9), a zakres stężenia cytokin zarówno u zarażonych, jak i niezarażonych psów był bardzo zróżnicowany.



Ryc. 9. Stężenia wybranych cytokin w surowicy psów niezarażonych i zarażonych.

4.2. Wpływ antygenów *D. repens* na aktywację szlaków sygnałowych zależnych od NLRC1, NLRC2, TLR2, TLR4

W celu zbadania, z którymi receptorami łączą się białka pasożytnicze *D. repens*, komórki HEK293 transfekowane cDNA NLRC1 lub NLRC2 lub TLR2 lub TLR4 pobudzano DrSA. Aktywację receptora sprawdzono poprzez pomiar stężenia interleukiny 8 (CxCL8) wydzielanej przez komórki nabłonkowe w odpowiedzi na różne stymulanty. DrSA pobudzało wydzielanie zwiększonej ilości CxCL8 przez komórki HEK293 prezentujące receptory NLRC1, NLRC2 oraz TLR2, ale nie TLR4. Stężenie CxCL8 w tych trzech hodowlach było porównywalne lub większe od wartości uzyskanej podczas stymulacji ligandami kontrolnymi (Ryc.10). Sugeruje to, że białka somatyczne *D. repens* prawdopodobnie aktywują szlaki sygnałowe związane z receptorami NLRC1, NLRC2 oraz TLR2, ale nie TLR4.



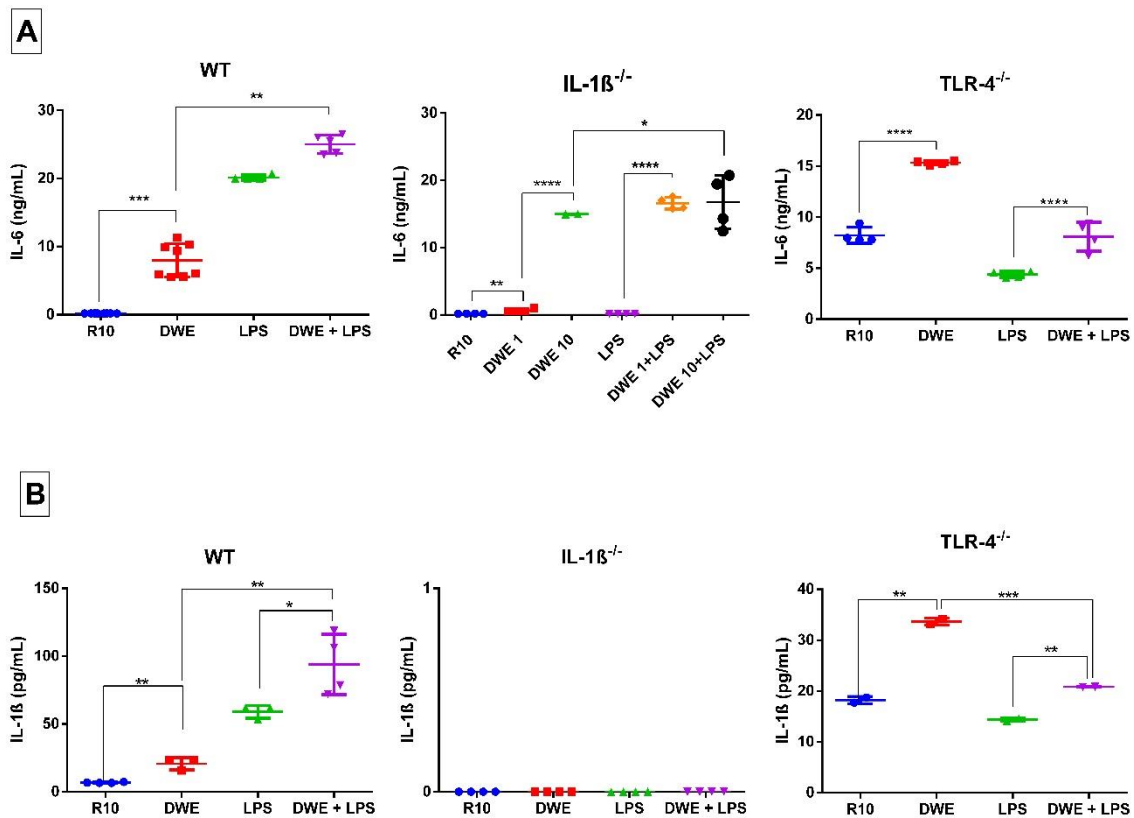
Ryc.10. Stężenie wydzielanej CxCL8 (pg/ml) przez komórki HEK-293 NLRC1 lub NLRC2 lub TLR2 lub TLR4 w odpowiedzi na DrSA.

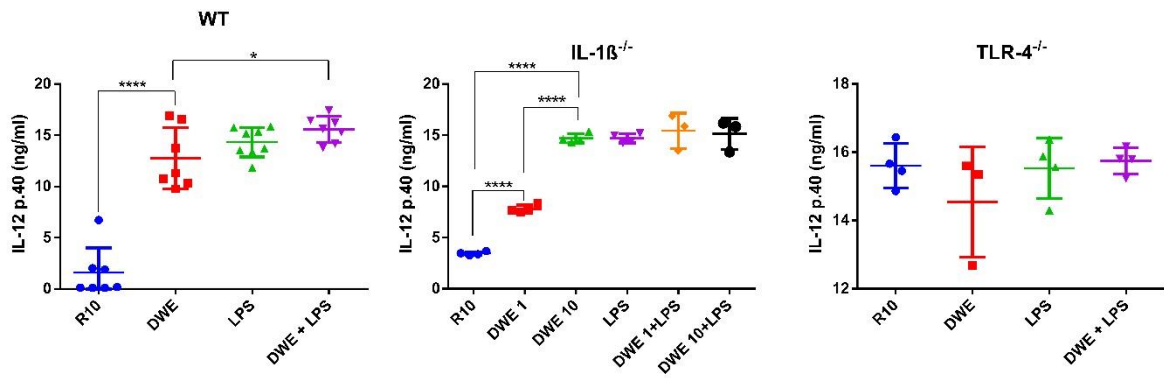
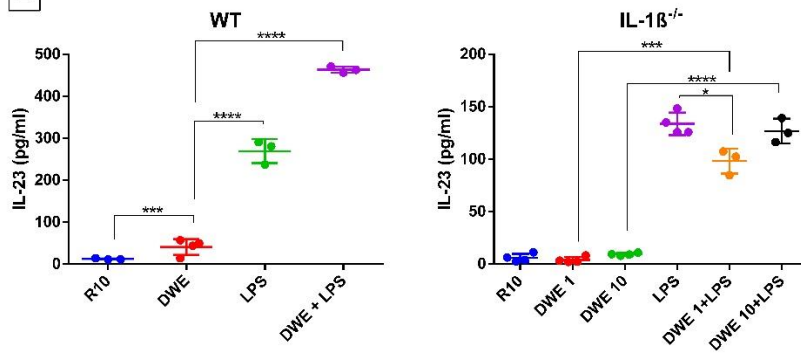
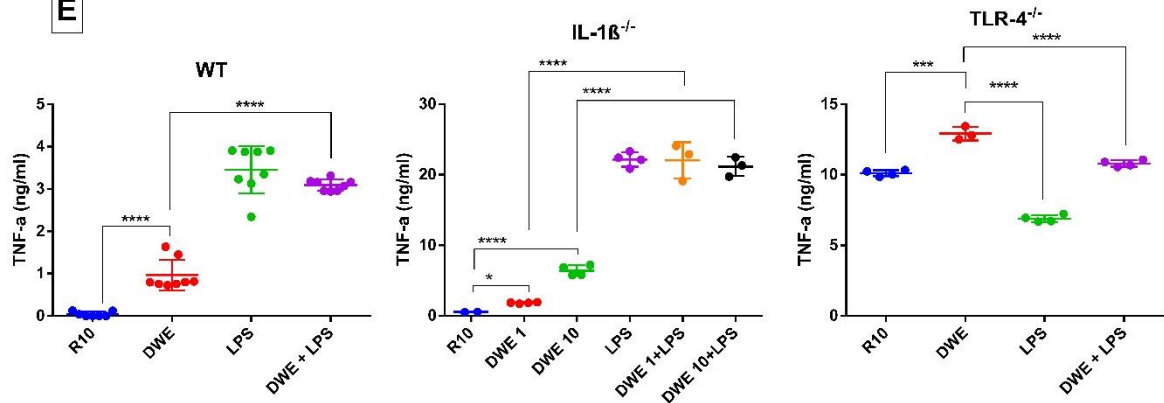
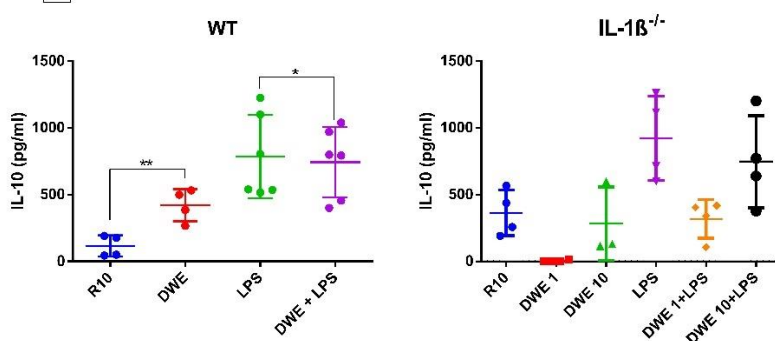
4.3. Wpływ antygenów *D. repens* na dojrzewanie i aktywność komórek dendrytycznych pochodzenia szpikowego

W kolejnym etapie badań zbadano sekrecję cytokin oraz poziom markerów powierzchniowych komórek dendrytycznych traktowanych DrSA. Komórki dendrytyczne izolowane były ze szpiku kostnego myszy WT, *il-1 β* KO oraz *TLR4* KO. Po pobudzeniu DrSA komórki wydzielały zwiększone ilości IL-1 β , IL-23, IL-6, IL-12p40 oraz TNF α (Ryc. 11 A-E). Z drugiej strony, DrSA nie stymulowały wydzielania IL12p70 oraz TGF- β , a tylko w niewielkim stopniu stymulowały wydzielanie IL-10 przez BMDC WT. Pre-inkubacja

z DrSA nie wpłynęła na zmianę w profilu wydzielanych cytokin po pobudzeniu LPS przez komórki WT. Ponadto, DrSA wzmacniało efekt LPS i skutkowało wzrostem stężenia wydzielanych cytokin (Ryc. 11 A-F). Co ciekawe, komórki dendrytyczne *il-1 β* ^{-/-} w przeciwieństwie do komórek dendrytycznych WT oraz *TLR4*^{-/-} nie wydzielają IL-23 pod wpływem DrSA. Ponadto, preinkubacja niższą dawką DrSA złagodziła efekt zapalny LPS, zmniejszając ilość wydzielanej IL-23 (Ryc. 11D) i znacząco złagodziła LPS-zależne wydzielanie IL-10 przez komórki *il-1 β* ^{-/-} (Ryc. 11F).

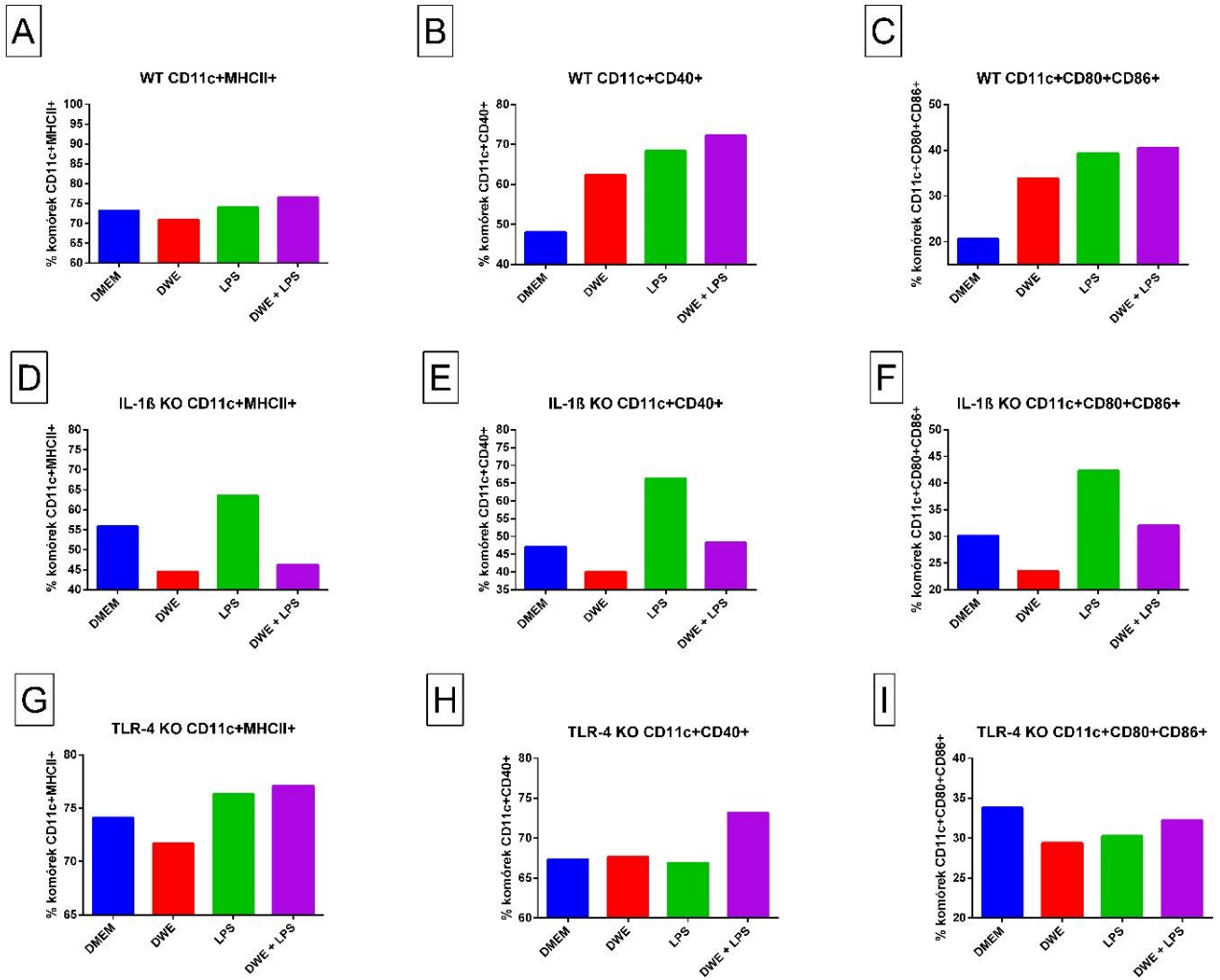
Sam ekstrakt DrSA nie stymulował wydzielania przez komórki IL-12p70, ale preinkubacja DrSA zwiększyła syntezę tej cytokiny po stymulacji LPS (średnio 20 pg/ml w grupie LPS WT oraz *il-1 β* ^{-/-}, oraz 35 pg/mL po preinkubacji z DrSA).



C**D****E****F**

Ryc. 11. Wykresy przedstawiające stężenie cytokin (A) IL-6, (B) IL-1 β , (C) IL-12 p.40, (D) IL-23, (E) TNF- α , (F) IL-10 wydzielonych do pożywki hodowlanej przez BMDC w wyniku stymulacji DrSA, LPS oraz DrSA z LPS.

Oprócz profilu wydzielanych cytokin, sprawdzono wpływ DrSA na dojrzewanie i różnicowanie BMDC w warunkach *in vitro*. 24-godzinna stymulacja komórek dendrytycznych WT zarówno LPS, jak i DrSA nie wpłynęła znacząco na poziom cząsteczek MHC klasy II, ale zwiększyła poziom markerów powierzchniowych CD80/86 i CD40 (Ryc. 12 B i C), niezbędnych do dalszej kostymulacji komórek odpowiedzi immunologicznej. Co ciekawe, zarówno stymulacja czystym DrSA, jak i preinkubacja z DrSA przed stymulacją LPS obniżyła poziom markerów MHC klasy II, CD40 oraz CD80/CD86 na powierzchni komórek dendrytycznych IL-1 β ^{-/-} (Ryc. 12 D-F). W przypadku BMDC TLR4^{-/-} nie zaobserwowano zmian w poziomie receptorów ani pod wpływem LPS czy DrSA (Ryc. 12 G-I). W świetle przedstawionych wyników, IL-1 β ^{-/-} pełni niezbędną rolę w dojrzewaniu BMDC i w rozwoju odpowiedzi immunologicznej w odpowiedzi na inwazję *D. repens*.



Ryc. 12. Odsetek populacji komórek CD11c⁺ wykazujących obecność markerów powierzchniowych CD40, CD80/CD86 wśród BMDC pod wpływem DrSA, LPS lub preinkubowanych DrSA 6 h przed stymulacją LPS.

5. Dyskusja

Nicienie znane są z wydzielania czynników immunomodulujących, które ułatwiają im przeżycie w organizmie żywiciela (Madeleine P. J. White, 2020; Maizels i wsp., 2004; Maizels & Yazdanbakhsh, 2003; McSorley i wsp., 2013; Wammes i wsp., 2012). W przypadku dirofilariozy podskórnej, nawet jeśli przebiega ona pozornie bezobjawowo, u żywiciela również dochodzi do zmian morfologicznych i biochemicznych, które sugerują przewlekłą reakcję stresową. Z kolei reakcja stresowa najprawdopodobniej prowadzi do polaryzacji odpowiedzi odpornościowej w kierunku odpowiedzi immunologicznej zależnej od limfocytów Th2 oraz wyciszenia odpowiedzi zależnej od limfocytów Th1 (Assaf i wsp., 2017). Jest to charakterystyczne działanie strategiczne pasożytów (Maizels i wsp., 2004), które umożliwia im długotrwale przeżywanie w organizmie żywiciela ostatecznego.

Analiza przypadków naturalnie zarażonych psów sugeruje, że inwazja *D. repens* nie jest obojętna dla organizmu żywiciela i że wysoko intensywna mikrofilaremia towarzyszy innym schorzeniom powiązanim z niedoborami odporności zarażonych osobników. Przez okres badań stanowiących temat tej pracy, skupiających się na naturalnie zarażonych pacjentach na terenie Polski, opisano przypadki pacjentów, u których stwierdzona została intrygująco wysoka mikrofilaremia (wcześniej nieraportowana, o wartości ponad 10000 mikrofilarii w 1 ml krwi, z najwyższym wynikiem 178000 Mf/ml) (Wysmołek i wsp., 2020). Wydaje się, że dirofilarioza podskórna może potencjalnie chronić psy przed rozwojem chorób autoimmunologicznych, ale z drugiej strony, prawdopodobnie predysponuje do rozwoju chorób towarzyszących ze względu na wywoływanie stanu przewlekłego stresu charakteryzującego się wysokim poziomem glikokortykosteroidów.

Zauważono również, że odpowiedź immunologiczna przeciwko *D. repens* przebiega inaczej u samców i samic. Samice są częściej predysponowane do amikrofilaremicznych inwazji, podczas gdy samce znacznie częściej przechodzą inwazję mikrofilaremiczną. Co więcej, inwazje mikrofilaremiczne są związane z wyższym poziomem IgG1 niż IgG2, podczas gdy w inwazjach amikrofilaremicznych ta tendencja jest odwrotna. Prawdopodobnie promowanie odmiany mikrofilaremicznej lub amikrofilaremicznej inwazji jest związane z różnicami międzyosobniczymi i polaryzacją układu immunologicznego w kierunku odpowiedzi immunologicznej zależnej od limfocytów Th1 lub Th2. Na tym etapie badań nie zauważono korelacji między stężeniem cytokin IL-4, IL-10 oraz IFN- γ w surowicach,

a zarażeniem *D. repens*. Zakres stężeń badanych cytokin zarówno u zarażonych jak i niezarażonych psów był bardzo zróżnicowany. Podobnie duże zróżnicowanie zaobserwował Calvalido i wsp. (2016), gdy porównywali stężenia gamy cytokin w surowicach psów z białaczką i zdrowych. Jest to najprawdopodobniej związane z fizjologicznym zjawiskiem zmian w wydzielaniu cytokin zgodnie z rytmem dobowym (Cermakian i wsp., 2013; Logan & Sarkar, 2012).

W badaniach poświęconych innym filariom, zaobserwowano, że preinkubacja antygenami Mf *Brugia malayi* znacząco hamuje dojrzewanie komórek dendrytycznych (Semnani i wsp., 2001), a bezpośrednia stymulacja Mf indukuje apoptozę ludzkich APC poprzez hamowanie ich zdolności do wytwarzania IL-12 i IL-10 oraz do aktywacji limfocytów T CD4+ (Semnani i wsp., 2003). Zakładano zatem, że preinkubacja ekstraktem *D. repens* może przyczyniać się do zahamowania dojrzewania komórek dendrytycznych pobudzanych LPS oraz do wydzielania cytokin świadczących o polaryzacji w kierunku odpowiedzi regulatorowej. Zastosowanie ekstraktu z dorosłych pasożytów zamiast produktów wydalniczo-wydzielniczych pozwoliło na zaobserwowanie aktywacji BMDC w warunkach śmierci dorosłych pasożytów w organizmie żywiciela. Najprawdopodobniej DrSA prowadzi do dojrzewania komórek dendrytycznych oraz wzrostu liczby cząsteczek kostymulujących CD80/CD86 oraz CD40 na powierzchni BMDC oraz stymuluje wydzielanie cytokin pro-zapalnych takich jak IL-1 β , IL-23, IL-6 oraz IL-12p40. Wstępne wyniki pozwoliły również na zaobserwowanie, iż komórki dendrytyczne pochodzące od myszy IL-1 β ^{-/-} mimo wydzielania IL-23 pod wpływem LPS, nie wydzielają IL-23 pod wpływem DrSA.

Co więcej, preinkubacja niską dawką, tj. 1 μ g/mL DrSA blokowała w znacznym stopniu wydzielanie IL-23 pod wpływem LPS. Wyniki wskazują, że IL-1 β jest niezbędna do pobudzenia lub utrzymania określonego poziomu CD40, CD80/CD86 na powierzchni komórek CD11c+ oraz wydzielania IL-23 w odpowiedzi na DrSA. Preinkubacja DrSA komórek pochodzących od myszy IL-1 β ^{-/-} prowadziła do znaczącego obniżenia poziomu cząsteczek kostymulujących CD40, CD80/CD86 na powierzchni komórek CD11c+ stymulowanych LPS. W przypadku inwazji *Heligmosomoides polygyrus bakeri* IL-1 β jest konieczna do dostosowania przez pasożyty środowiska śluzówki jelit do utrzymania stanu przewlekłej inwazji (Zaiss i wsp., 2013). Natomiast w przypadku w inwazji *D. repens* zaobserwowano, że IL-1 β jest niezbędna do aktywacji mechanizmów odpowiedzi immunologicznej prawdopodobnie prowadzących do eliminacji pasożytów.

NLR należą do rodziny PRR, które rozpoznają PAMP w cytoplazmie większości komórek, co inicjuje odpowiedź zapalną poprzez formowanie inflamosomów. Z kolei rozpoznanie przez NLR cytoplazmatycznych PAMP i DAMP aktywuje szereg szlaków transdukcji sygnału, co prowadzi do syntezy cytokin prozapalnych. Otrzymane wyniki sugerują, że IL-1 β jest niezbędna do dojrzewania komórek dendrytycznych pod wpływem DrSA. Wyniki naszych eksperymentów *in vitro* wskazują również, że białka *D. repens* aktywują szlaki sygnałowe związane z receptorami NLR. Z kolei, receptory NLR tworzą inflamasomy, czyli kompleksy wielobiałkowe, uczestniczące w uruchamianiu układu kaspaz i uwalnianiu IL-1 β . Dzieje się to dzięki domenie pirynowej 3 (NLRP3), która promuje aktywację pro-IL-1 β , a następnie uwalnianie dojrzałej IL-1 β (Jakubzick i wsp., 2022; Kang i wsp., 2017; Lopez-Castejon & Brough, 2011). Wyciszenie odpowiedzi zależnej od limfocytów Th2 poprzez oddziaływanie na NLRP3 przez helminty zostało szczegółowo opisane (Celias i wsp., 2020). Jest wysoce prawdopodobne, że opisany mechanizm działania inflamosomu oraz aktywacji pro-IL-1 β pełni kluczową rolę w odpowiedzi immunologicznej przeciwko *D. repens*. Co ciekawe, przeciwnie niż białko ES-62 wydzielane przez inny gatunek pasożytniczych filarii *Acanthocheilonema viteae*, DrSA nie wydaje się aktywować ścieżki sygnałowej związanej z TLR4 (Goodridge i wsp., 2005).

Obecność zwiększonej liczby limfocytów Treg u psów ma związek z zaburzeniami układu odpornościowego (Lee i wsp., 2020; Majewska i wsp., 2016). Te i inne doniesienia opisane szerzej w pracy przeglądowej przypisują niektórym subpopulacjom Treg rolę w rozwoju chorób autoimmunologicznych i nowotworowych (Zohouri i wsp., 2021). W innej pracy opisano, że nieswoistemu zapaleniu jelit u psów (IBD, z ang. inflammatory bowel disease) towarzyszy niższy odsetek populacji regulatorowej na terenie jelit niż u psów zdrowych (Junginger i wsp., 2012). Junginger w tym samym artykule zasugerował, że obecność, w tym przypadku korzystnej populacji Treg może być związana z inwazją nicieni jelitowych u osobników wolnych od IBD. W kolejnej pracy, wykazał, że białka wydalniczo-wydzielnicze *Toxocara canis* polaryzują limfocyty psów w kierunku fenotypu regulatorowego T CD8⁺Foxp⁺IL10⁺ (Junginger i wsp., 2017). W innej pracy zaobserwowano obecność zwiększonego odsetka limfocytów T CD4⁺Foxp3⁺ w śledzienie zarażonych psów z otrzewnową postacią leishmaniozy. Ich udział w puli limfocytów wzrastał wraz z intensywnością inwazji.

Ponadto stwierdzono, że limfocyty T CD4⁺Foxp3⁺ są głównym źródłem IL-10 (Silva i wsp., 2014). PBMC psów zarażonych i niezarażonych po stymulacji DrSA wydzielały IL-10, w niektórych przypadkach obserwowano nawet spontaniczne wydzielanie IL-10 u psów

zarażonych *D. repens*. W połączeniu z obecnością zwiększonego odsetka limfocytów o immunofenotypie T CD4⁺Foxp3⁺ można przypuszczać, że jest to populacja odpowiedzialna za regulację odpowiedzi immunologicznej i prowadząca do rozwoju tolerancji, która z kolei mogłaby tłumaczyć brak obecności uchwytanych objawów klinicznych u psów zarażonych. Na podstawie powyższych wyników nie da się jednoznacznie ocenić prawdziwości tej hipotezy. W przyszłych badaniach konieczne jest zbadanie wpływu białek wydaliniczowydzielniczych na dojrzewanie psich komórek dendrytycznych pochodzących od psów zarażonych, jak i kostymulację limfocytów T z wcześniej wyszkolonymi w rozpoznawaniu białek *D. repens* komórkami dendrytycznymi psów niezarażonych i zarażonych. Z drugiej strony, ze względu na to, że inwazja *D. repens* powiązana jest ze stanem przewlekłego stresu w organizmie psa, badania epidemiologiczne łączące pomiar poziomu kortyzolu oraz współistnienie cukrzycy czy niedoczynności tarczycy w przebiegu dirofilariozy podskórnej mogłyby stanowić cenne źródło informacji.

6. Wnioski

1. Klinicznie zdrowe, bezobjawowe psy zarażone *D. repens* wykazują niższy poziom erytrocytów, hematokrytu, limfocytów oraz wyższy poziom glukozy i ALP świadczące o stanie przewlekłego stresu, charakterystycznego również dla polaryzacji odpowiedzi immunologicznej w kierunku odpowiedzi immunologicznej zależnej od limfocytów Th2.
2. Intensywność mikrofilaremii koreluje z wyższym stosunkiem limfocytów T CD4+ do T CD8+.
3. Intensywna mikrofilaremia może być oznaką występowania, jednocześnie z dirofilariozą podskórną, innej choroby współtowarzyszącej oraz niedoborów immunologicznych.
4. Amikrofilaremiczne inwazje częściej występują u samic i są związane z wyższym stosunkiem IgG2:IgG1 (charakterystycznym dla odpowiedzi immunologicznej zależnej od limfocytów Th1), za to mikrofilaremiczne inwazje występują częściej u samców i charakteryzuje je wyższy stosunek IgG1:IgG2 (charakterystyczny dla odpowiedzi immunologicznej zależnej od limfocytów Th2).
5. Wyspecjalizowane komórki prezentujące antygeny w odpowiedzi na DrSA wydzielają zwiększone ilości zarówno prozapalnych jak i regulatorowych cytokin.
6. IL-1 β pełni istotną rolę w dojrzewaniu i / lub pobudzeniu komórek dendrytycznych w odpowiedzi na antygeny somatyczne *D. repens*.
7. Receptory rozpoznające wzorce molekularne NLRC1, NLRC2, oraz TLR2, ale nie TLR4 są aktywowane przez białka pasożytnicze *D. repens*.
8. Mechanizmy, które pozwalają *D. repens* na przeżycie w organizmie żywiciela ostatecznego pozostają nieznane, ale mogą być związane z działaniem populacji T CD4⁺Foxp3⁺.

7. Piśmiennictwo

- Anwar, M. A., Shah, M., Kim, J., & Choi, S. (2019). Recent clinical trends in Toll-like receptor targeting therapeutics. *Medicinal Research Reviews*, 39(3), 1053–1090. <https://doi.org/10.1002/med.21553>
- Assaf, A. M., Al-Abbassi, R., & Al-Binni, M. (2017). Academic stress-induced changes in Th1- and Th2-cytokine response. *Saudi Pharmaceutical Journal: SPJ: The Official Publication of the Saudi Pharmaceutical Society*, 25(8), 1237–1247. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2017.09.009>
- Calvalido, J., Wood, G. A., Mutsaers, A. J., Wood, D., Sears, W., & Woods, J. P. (2016). Comparison of serum cytokine levels between dogs with multicentric lymphoma and healthy dogs. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 182, 106–114. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2016.10.009>
- Capelli, G., Genchi, C., Baneth, G., Bourdeau, P., Brianti, E., Cardoso, L., Danesi, P., Fuehrer, H., Giannelli, A., Monica, A., Maia, C., Modrý, D., Montarsi, F., Krücken, J., Padadopoulos, E., Petrić, D., Pfeffer, M., Savić, S., Otranto, D., ... Silaghi, C. (2018). Recent advances on *Dirofilaria repens* in dogs and humans in Europe. *Parasites & Vectors*, 11:663. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-3205-x>
- Celias, D. P., Motrán, C. C., & Cervi, L. (2020). Helminths Turning on the NLRP3 Inflammasome: Pros and Cons. *Trends in Parasitology*, 36(2), 87–90. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2019.10.012>
- Cermakian, N., Lange, T., Golombek, D., Sarkar, D., Nakao, A., Shibata, S., & Mazzocchi, G. (2013). Crosstalk between the circadian clock circuitry and the immune system. *Chronobiology International*, 30(7), 870–888. <https://doi.org/10.3109/07420528.2013.782315>
- Dobrzyński, A. (2016). Kliniczne aspekty dirofilariozy skórnej u psów - algorytm postępowania [Rozprawa doktorska, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie]. *Repozytorium Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie*.
- Fehérvári, Z., & Sakaguchi, S. (2004). A paragon of self-tolerance: CD25+CD4+ regulatory T cells and the control of immune responses. *Arthritis Research & Therapy*, 6(1), 19–25. <https://doi.org/10.1186/ar1037>
- Fontenot, J. D., Rasmussen, J. P., Williams, L. M., Dooley, J. L., Farr, A. G., & Rudensky, A. Y. (2005). Regulatory T Cell Lineage Specification by the Forkhead Transcription Factor Foxp3. *Immunity*, 22(3), 329–341. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.immuni.2005.01.016>
- Genchi, C., & Kramer, L. (2017). Subcutaneous dirofilariosis (*Dirofilaria repens*): an infection spreading throughout the old world. *Parasites & Vectors*, 10(Suppl 2), 517. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2434-8>
- Genchi, C., & Kramer, L. H. (2020). The prevalence of *Dirofilaria immitis* and *D. repens* in the Old World. *Veterinary Parasitology*, 280:108995. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2019.108995>

- Goodridge, H. S., Marshall, F. A., Else, K. J., Houston, K. M., Egan, C., Al-Riyami, L., Liew, F.-Y., Harnett, W., & Harnett, M. M. (2005). Immunomodulation via novel use of TLR4 by the filarial nematode phosphorylcholine-containing secreted product, ES-62. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 174(1), 284–293. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.174.1.284>
- Greenwood, B. M. (1968). Autoimmune disease and parasitic infections in Nigerians. *Lancet (London, England)*, 2(7564), 380–382. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(68\)90595-3](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(68)90595-3)
- Gutcher, I., & Becher, B. (2007). APC-derived cytokines and T cell polarization in autoimmune inflammation. *The Journal of Clinical Investigation*, 117(5), 1119–1127. <https://doi.org/10.1172/JCI31720>
- Jackson, J. A., Friberg, I. M., Little, S., & Bradley, J. E. (2009). Review series on helminths, immune modulation and the hygiene hypothesis: immunity against helminths and immunological phenomena in modern human populations: coevolutionary legacies? *Immunology*, 126(1), 18–27. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2008.03010.x>
- Jakubzick, C., Redente, E. F., Riches, D. W., & Martin, T. R. (2022). Innate Immunity. In V. C. Broaddus, J. Ernst, K. T. E, S. Lazarus, K. F. Sarmiento, L. M. Schnapp, R. Stapleton, & M. B. Gotway (Eds.), *Murray & Nadel's Textbook of Respiratory Medicine* (Seventh, pp. 15, 191-207.e7). Elsevier.
- Junginger, J., Raue, K., Wolf, K., Janecek, E., Stein, V. M., Tipold, A., Günzel-Apel, A. R., Strube, C., & Hewicker-Trautwein, M. (2017). Zoonotic intestinal helminths interact with the canine immune system by modulating T cell responses and preventing dendritic cell maturation. *Scientific Reports*, 7(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-10677-4>
- Junginger, J., Schwittlick, U., Lemensieck, F., Nolte, I., & Hewicker-Trautwein, M. (2012). Immunohistochemical investigation of Foxp3 expression in the intestine in healthy and diseased dogs. *Veterinary Research*, 43, 23. <https://doi.org/10.1186/1297-9716-43-23>
- Kang, M.-J., Jo, S.-G., Kim, D.-J., & Park, J.-H. (2017). NLRP3 inflammasome mediates interleukin-1 β production in immune cells in response to *Acinetobacter baumannii* and contributes to pulmonary inflammation in mice. *Immunology*, 150(4), 495–505. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/imm.12704>
- Korten, S., Badusche, M., Büttner, D. W., Hoerauf, A., Brattig, N., & Fleischer, B. (2008). Natural death of adult *Onchocerca volvulus* and filaricidal effects of doxycycline induce local FOXP3⁺/CD4⁺ regulatory T cells and granzyme expression. *Microbes and Infection*, 10(3), 313–324. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2007.12.004>
- Kurniawan, A., Yazdanbakhsh, M., R van Ree, R Aalberse, M., Selkirk, E., Partono, F., & Maizels, R. M. (1993). Differential expression of IgE and IgG4 specific antibody responses in asymptomatic and chronic human filariasis. *The Journal of Immunology*, 150, 3941–3950.
- Kwarteng, A., & Ahuno, S. T. (2017). Immunity in Filarial Infections: Lessons from Animal Models and Human Studies. *Scandinavian Journal of Immunology*, 85(4), 251–257. <https://doi.org/10.1111/sji.12533>
- Lee, D., Chung, T., & Park, C. (2020). *T-cells in canine atopic dermatitis in Korea*. 2020(06), 250–257.

- Logan, R. W., & Sarkar, D. K. (2012). Circadian nature of immune function. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 349(1), 82–90. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.mce.2011.06.039>
- Lopez-Castejon, G., & Brough, D. (2011). Understanding the mechanism of IL-1 β secretion. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 22(4), 189–195. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2011.10.001>
- Lutz, M. B., Kukutsch, N., Ogilvie, A. L., Rössner, S., Koch, F., Romani, N., & Schuler, G. (1999). An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. *Journal of Immunological Methods*, 223(1), 77–92. [https://doi.org/10.1016/s0022-1759\(98\)00204-x](https://doi.org/10.1016/s0022-1759(98)00204-x)
- Madeleine P. J. White, C. M. M. and R. M. M. (2020). Regulatory T cells in Helminth Infection : Induction , Function and Therapeutic Potential. *Immunology, Mar 10*. <https://doi.org/10.1111/imm.13190>
- Maizels, R. M., Balic, A., Gomez-Escobar, N., Nair, M., Taylor, M. D., & Allen, J. E. (2004). Helminth parasites - Masters of regulation. *Immunological Reviews*, 201, 89–116. <https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2004.00191.x>
- Maizels, R. M., & Yazdanbakhsh, M. (2003). Immune regulation by helminth parasites: Cellular and molecular mechanisms. *Nature Reviews Immunology*, 3(9), 733–744. <https://doi.org/10.1038/nri1183>
- Majewska, A., Gajewska, M., Dembele, K., Maciejewski, H., Prostek, A., & Jank, M. (2016). Lymphocytic, cytokine and transcriptomic profiles in peripheral blood of dogs with atopic dermatitis. *BMC Veterinary Research*, 12(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s12917-016-0805-6>
- McSorley, H. J., Hewitson, J. P., & Maizels, R. M. (2013). Immunomodulation by helminth parasites: Defining mechanisms and mediators. *International Journal for Parasitology*, 43(3–4), 301–310. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2012.11.011>
- Metenou, S., & Nutman, T. B. (2013). Regulatory T cell subsets in filarial infection and their function. *Frontiers in Immunology*, 4, 305. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00305>
- Mircean, M., Ionică, A. M., Mircean, V., Györke, A., Codea, A. R., Tăbăran, F. A., Taulescu, M., & Dumitrache, M. O. (2017). Clinical and pathological effects of *Dirofilaria repens* and *Dirofilaria immitis* in a dog with a natural co-infection. *Parasitology International*, 66(3), 331–334. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2017.02.003>
- Navarro, S., Ferreira, I., & Loukas, A. (2013). The hookworm pharmacopoeia for inflammatory diseases. *International Journal for Parasitology*, 43(3–4), 225–231. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2012.11.005>
- Pinelli, E., & Aranzamendi, C. (2012). Toxocara infection and its association with allergic manifestations. *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders Drug Targets*, 12(1), 33–44. <https://doi.org/10.2174/187153012799278956>
- Semnani, R. T., Liu, A. Y., Sabzevari, H., Kubofcik, J., Zhou, J., Gilden, J. K., & Nutman, T. B. (2003). *Brugia malayi* microfilariae induce cell death in human dendritic cells, inhibit their ability to make IL-12 and IL-10, and reduce their capacity to activate CD4+ T cells. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 171(4), 1950–1960. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.171.4.1950>

- Semnani, R. T., Sabzevari, H., Iyer, R., & Nutman, T. B. (2001). Filarial antigens impair the function of human dendritic cells during differentiation. *Infection and Immunity*, 69(9), 5813–5822. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.9.5813-5822.2001>
- Silva, K. L. O., de Andrade, M. M. C., Melo, L. M., Perosso, J., Vasconcelos, R. O., Munari, D. P., & Lima, V. M. F. (2014). CD4+FOXP3+ cells produce IL-10 in the spleens of dogs with visceral leishmaniasis. *Veterinary Parasitology*, 202(3), 313–318. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.03.010>
- Sun, S., Wang, X., Wu, X., Zhao, Y., Wang, F., Liu, X., Song, Y., Wu, Z., & Liu, M. (2011). Toll-like receptor activation by helminths or helminth products to alleviate inflammatory bowel disease. *Parasites & Vectors*, 4, 186. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-4-186>
- Wammes, L. J., Hamid, F., Wiria, A. E., Wibowo, H., Sartono, E., Maizels, R. M., Smits, H. H., Supali, T., & Yazdanbakhsh, M. (2012). Regulatory T cells in human lymphatic filariasis: Stronger functional activity in microfilareemics. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 6(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001655>
- Zaiss, M. M., Maslowski, K. M., Mosconi, I., Guenat, N., Marsland, B. J., & Harris, N. L. (2013). IL-1 β Suppresses Innate IL-25 and IL-33 Production and Maintains Helminth Chronicity. *PLOS Pathogens*, 9(8), e1003531. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003531>
- Zakeri, A., Borji, H., & Haghparast, A. (2016). Interaction Between Helminths and Toll-Like Receptors: Possibilities and Potentials for Asthma Therapy. *International Reviews of Immunology*, 35(3), 219–248. <https://doi.org/10.3109/08830185.2015.1096936>
- Zohouri, M., Mehdipour, F., Razmkhah, M., Faghih, Z., & Ghaderi, A. (2021). CD4+CD25-FoxP3+ T cells: a distinct subset or a heterogeneous population? *International Reviews of Immunology*, 40(4), 307–316. <https://doi.org/10.1080/08830185.2020.1797005>

8. Publikacje wchodzące w skład jednotematycznego cyklu



Hematological and Biochemical Changes in Dogs Naturally Infected With *Dirofilaria repens*

Magdalena E. Wyszomolek^{1*}, Artur Dobrzyński², Ewa Długosz¹, Michał Czopowicz³, Marcin Wiśniewski¹, Piotr Jurka² and Maciej Klockiewicz¹

¹ Division of Parasitology, Department of Preclinical Sciences, Institute of Veterinary Medicine, Warsaw University of Life Sciences-SGGW, Warsaw, Poland, ² Department of Small Animal Diseases and Clinic, Institute of Veterinary Medicine, Warsaw University of Life Sciences-SGGW, Warsaw, Poland, ³ Division of Veterinary Epidemiology and Economics, Institute of Veterinary Medicine, Warsaw University of Life Sciences-SGGW, Warsaw, Poland

OPEN ACCESS

Edited by:

Rodrigo Morchón García,
University of Salamanca, Spain

Reviewed by:

J. Alberto Montoya-Alonso,
University of Las Palmas de Gran
Canaria, Spain
Fernando Simón,
University of Salamanca, Spain

*Correspondence:

Magdalena E. Wyszomolek
magdalena_wyszomolek@sggw.edu.pl

Specialty section:

This article was submitted to
Parasitology,
a section of the journal
Frontiers in Veterinary Science

Received: 15 June 2020

Accepted: 22 July 2020

Published: 10 September 2020

Citation:

Wyszomolek ME, Dobrzyński A,
Długosz E, Czopowicz M,
Wiśniewski M, Jurka P and
Klockiewicz M (2020) Hematological
and Biochemical Changes in Dogs
Naturally Infected With *Dirofilaria*
repens. *Front. Vet. Sci.* 7:590.
doi: 10.3389/fvets.2020.00590

Subcutaneous dirofilariosis is a zoonotic disease emerging throughout Europe caused by the filarial nematode *Dirofilaria repens*. Despite its increasing prevalence, there is a large gap in knowledge of the impact of the parasite on the host. Currently classified as being non-pathogenic, recent evidence suggests that skin dirofilariosis is associated with dermatological conditions including concomitant pruritus, neoplastic processes, inflammation, and even blindness in dogs and humans. The aim of this study was to determine if natural canine *D. repens* infection leads to biological changes in the canine host. In a real-life veterinary clinic setting, animals are often presented to clinicians for unrelated issues, and *D. repens* is incidentally identified during inspection. As such, we compared hematological and biochemical parameters of 218 uninfected and 197 dogs naturally infected with *D. repens*. Interestingly, animals infected with *D. repens* had lower numbers of lymphocytes ($p < 0.001$), red blood cells ($p < 0.001$), and thrombocytes ($p = 0.025$), decreased hematocrit ($p < 0.001$), and increased alkaline phosphatase ($p = 0.016$) and creatinine activity ($p = 0.023$) compared to uninfected dogs. We further selected a subpopulation of 214 dogs having *prima facie* hematological and biochemical results within normal reference ranges to evaluate the effect of *D. repens* infections in seemingly healthy dogs. Among these patients, 93 dogs infected with *D. repens* had lower numbers of lymphocytes ($p = 0.031$), red blood cells ($p = 0.025$), and hematocrit ($p = 0.002$), higher glucose levels ($p = 0.023$), and border line elevated alkaline phosphatase levels ($p = 0.054$) compared to 121 uninfected animals. Despite being categorized as asymptomatic, we have observed hematological and biochemical changes associated with *D. repens* infections in dogs, and our data suggest that dirofilariosis may induce a state of chronic stress. These results link the presence of skin dirofilariosis to biological changes in the canine host, suggesting a mechanism for pathogenicity and shedding new light on the host–parasite relationship.

Keywords: *Dirofilaria repens*, subcutaneous dirofilariosis, dog, hematology, biochemistry

INTRODUCTION

Dirofilaria immitis and *Dirofilaria repens* are both filarial nematodes that have zoonotic potential and cause canine heartworm disease and skin dirofilariosis in dogs, respectively. Despite its predominance throughout Europe and being the primary causative agent of human dirofilariosis, *D. repens* has received much less attention and study than *D. immitis* (1).

Briefly, dirofilariosis is a vector-borne disease transmitted by mosquitos. Mosquitos uptake microfilariae (Mf) circulating in the bloodstream of a definitive host during blood meals. After 2 weeks, Mf develop into infective larvae and are injected into a new host when the mosquito takes another blood meal. In the new host, the L3 larvae penetrate into subcutaneous tissue where they mature into adult skin filarial worms, copulate, and release Mf into the circulating bloodstream. Adult *D. repens* can survive and reproduce in a host for as long as 5–10 years (2) and may actively migrate within the host tissues during this period what considerably hampers their detection (3).

Dirofilaria spp. infections can be divided into microfilaremic and amicrofilaremic (occult). Microfilaremic infections are diagnosed using a modified Knott's test or by examining blood smears; Mf can be differentiated between species by morphology or using multiplex PCR. Although *D. immitis* amicrofilaremic infection may be diagnosed using a standard commercial test for adult female parasite antigens, there is no such rapid test available for the detection of *D. repens* occult infection in dogs (1).

In humans, the adult worms can migrate to subcutaneous tissue of different parts of the body (commonly in the head, mainly the periorbital region and neck), but they can also localize in the epididymis, the spermatic cords, the lungs, the breasts, the visceral cavity, or under the conjunctive tissue, lymph nodes, and muscles (4). In dogs, they are usually incidentally found in the scrotum during castration, but they can reach other locations including the periorbital or ectopic regions, such as mesenteric tissue and pelvic cavity (1). Infection with *D. repens* is usually considered asymptomatic, but a growing body of evidence suggest that it can cause significant morbidity, and increasing cases have been reported of severe disease leading to liver or kidney failure (5). *Dirofilaria repens* infections were also connected to neoplastic, sometimes malignant, processes in dogs (6, 7) and humans (8). Furthermore, the presence of adult *D. repens* and circulating Mf in blood or parenchymal organs can influence the course of coexisting diseases in infected animals (5, 9). General emaciation has been observed during massive *D. repens* infections associated with peritonitis, jaundice, degeneration of the liver, and renal failure (5, 10). In such conditions, numerous Mf were found in histopathology of internal organs (5–7). Microfilariae remaining in capillaries or disseminated into parenchymal tissues may be involved in the

pathogenesis of tissue lesions and progress of the ongoing disease (5).

Infections presenting with conspicuous clinical signs and a severe course of disease progression are clear indicators to employ anthelmintic intervention for the welfare of infected host, but those that are asymptomatic should not be neglected. Untreated infection increases the zoonotic risk (1), can lead to the development of predisposition to other diseases, and may cause silent undiagnosed morbidity. Unfortunately, there are currently no biochemical markers to assess the impact of *D. repens* infections.

The aim of this study was to determine if natural *D. repens* infection leads to biological changes, which may be detected in a real-life clinical situation, where animals are presented to clinicians for unrelated issues, and *D. repens* comorbidity is incidentally identified during inspection.

MATERIALS AND METHODS

Study Design

The flow chart of the study design is shown in **Figure 1**.

Animals

A total of 415 dogs of different breeds, sexes, body weights, health, and breeding status, aged 1–17 years were admitted to the study. Those patients were presented to veterinary clinics for regular health issues and/or because they used to live with dogs previously infected with *D. repens*. All examined dogs lived in Poland and had never left the country before the study.

Sampling

Patients underwent routine physical examination and blood test. *Dirofilaria repens* infection was diagnosed by direct analysis of blood smears, stained blood smears, adult worm examination (if obtained surgically, $n = 24$), and multiplex PCR.

Five dogs with confirmed *Babesia canis* infections were excluded from the data analysis to obtain the pattern characteristic for only one vector-borne disease.

Dogs were assigned to the infected group if at least one of the three parasitological examinations was positive for *D. repens*, and the rest of animals with negative results were qualified to the uninfected group.

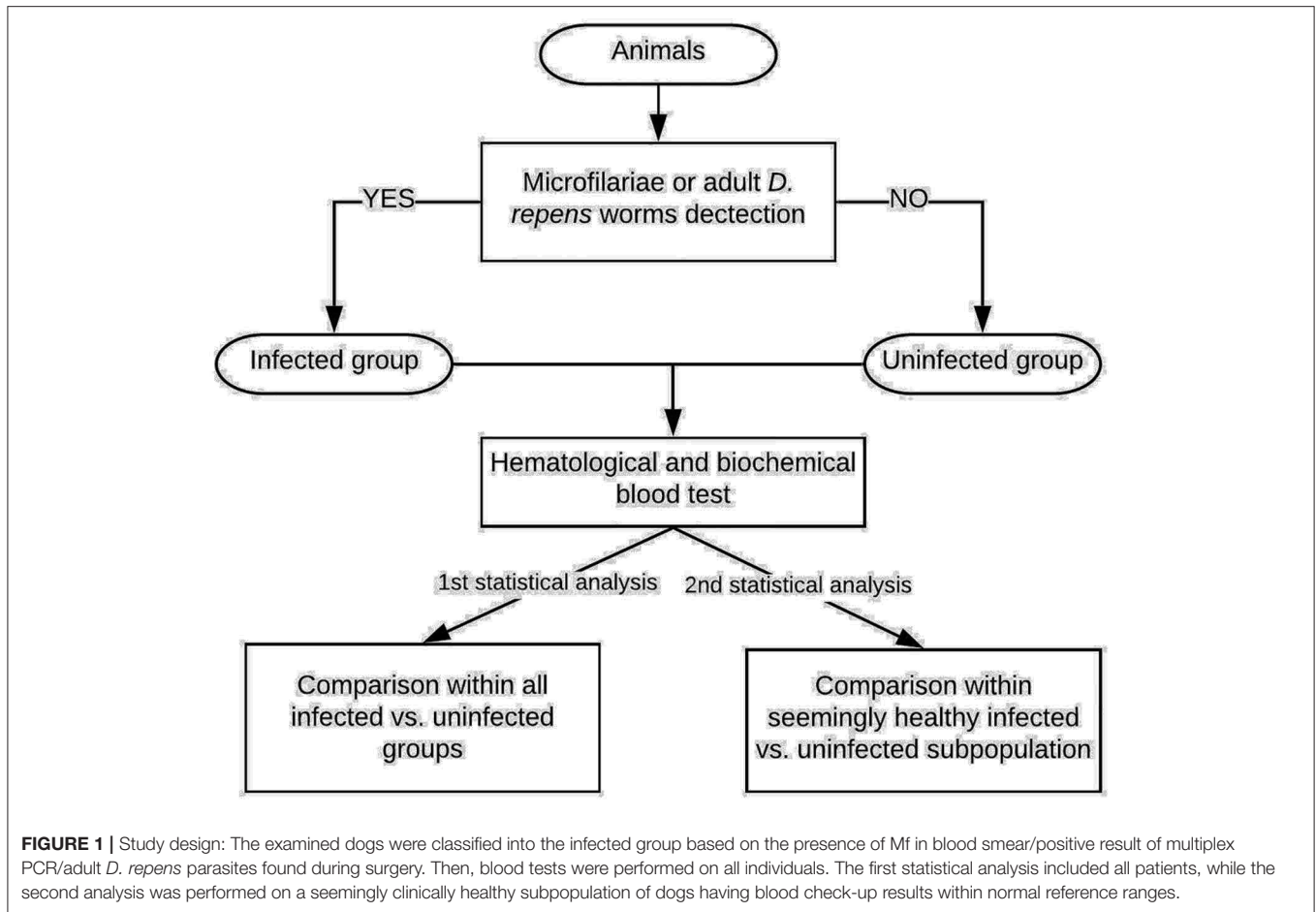
We initially compared the parameters within all 415 dogs; 197 were infected, and 218 were uninfected with *D. repens*. Then, within the entire study population, we selected a subpopulation of 214 (98 infected and 112 uninfected) dogs having hematological and biochemical blood parameters within normal reference ranges. We believe that this group represents the asymptomatic patients diagnosed with *D. repens* incidentally.

Laboratory Analysis

Parasitological Examination

Adult worms isolated during surgical procedures were examined under a light microscope and, based on their morphology, were identified as *D. repens*. Microfilariae were detected by microscopic examination of blood smear. Subsequently, genomic DNA was isolated from blood samples using the Blood Mini kit

Abbreviations: ALP, alkaline phosphatase; ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate transaminase; EDTA, ethylene diamine tetraacetic acid; MCH, mean corpuscular hemoglobin; MCHC, mean corpuscular hemoglobin concentration; MCV, mean corpuscular volume; PCR, polymerase chain reaction; RBC, red blood cell; PMN, polymorphonuclear leukocytes; WBC, white blood cells; leukocytes; Mf, microfilariae.



(AA Biotechnology, Poland) and used as a template for multiplex PCR in order to discriminate between *D. immitis* and *D. repens* species according to Gioia et al. (11). PCR results were analyzed by electrophoresis on 2% agarose gels. All infected dogs tested positive for *D. repens* and none for *D. immitis*.

Hematological and Biochemical Analysis

Hematological and biochemical analysis were performed in commercial veterinary diagnostic laboratories. The following standard blood check-up parameters were determined and evaluated according to reference ranges (Table 1): white blood cell count (WBC), neutrophil count, lymphocyte count, eosinophil count, red blood cell count (RBC), packed cell volume (hematocrit, HCT), mean corpuscular volume (MCV), platelet count (PLT), enzyme activity [alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), alkaline phosphatase (ALP)], and metabolite concentration [total protein (TP), glucose, urea, and creatinine].

Statistical Analysis

The number of dogs included in both statistical analyses with respect to their hematological and biochemical blood parameters differed due to missing data of some individuals.

TABLE 1 | Normal reference values of investigated hematological and biochemical parameters.

	Unit	Reference intervals
RBC	T/L	5–8
HCT	%	35–60
MCV	fL	55–80
PLT	G/L	100–500
WBC	G/L	5–16
AST	U/L	<100
ALT	U/L	<100
ALP	U/L	<200
TP	g/L	50–80
Glucose	mmol/L	3.8–6.7
Urea	mmol/L	3–12
Creatinine	μmol/L	<150

Data were presented as a mean \pm standard deviation (SD) or a median and interquartile range (IQR) and compared between groups using the unpaired-sample Student's *t*-test or Mann–Whitney U-test depending on the asymmetry of a variable distribution assessed on the basis of histograms. The range was

always presented. Categorical variables were presented as the number and proportion of dogs in a given group and compared between groups using the Pearson's chi-square test. Ninety-five percent confidence intervals (95% CI) for proportions were calculated with the Wilson score method (12). A two-tailed significance level (α) was set at 0.05. Total study population analysis was performed in Statistica 12 (StatSoft Inc., Tulsa, OK). The analysis of the subpopulation of dog parameters within normal reference range was performed in TIBCO Statistica 13.3.0 (TIBCO StatSoft Inc., Palo Alto, CA).

The Analysis of Check-Up Parameters Within the Total Study Population

This included 415 dogs: 225 males (54.2%) and 190 females (35.8%). Their age ranged from 8 months to 17 years with the median of 7 years (IQR from 4 to 10 years) and did not differ between sexes ($p = 0.655$). There were 56 castrated dogs (13.5%) and 112 (27.0%) pedigree dogs. Their body weight varied from 1 to 75 kg with the median of 16 kg (IQR from 10 to 25 kg).

Two hundred eighteen dogs (52.5%) were allocated to the infected group and 197 (47.5%) to the uninfected group, respectively. Infected dogs were significantly heavier ($p = 0.041$) and more often belonged to a particular breed ($p < 0.001$).

The Analysis of Parameters Within the Subpopulation Having Results Within Normal Range Values

This included 214 out of 415 dogs with blood check-up within or only slightly (by not more than 25% of the upper limit) deviated from the reference intervals. There were 121 males (56.5%) and 93 females (43.5%). Their age ranged from 1 to 14 years with the arithmetic mean (SD) of 6.8 (3.2) years and did not differ significantly between males and females ($p = 0.190$). There were 171 cross-breed dogs (79.9%) and 43 pedigree dogs (20.1%) belonging to the following breeds: German shepherd ($n = 9$), Yorkshire terrier ($n = 5$), Border collie ($n = 4$), Labrador retriever ($n = 3$), French bulldog ($n = 3$), Chesapeake retriever ($n = 2$), Boxer ($n = 2$), Bavarian mountain dog ($n = 2$), Belgian shepherd ($n = 2$), and Alaskan malamute, Amstaff, Polish hound, Black Russia terrier, Akita Inu, Dachshund, Chinese Crested dog, Bernese Mountain dog, Pug, Poodle, and Welsh terrier ($n = 1$ each).

RESULTS

We first compared blood hematology and biochemistry results within the entire study population. Dogs infected with *D. repens* compared to uninfected individuals had significantly lower lymphocyte count ($p < 0.001$), RBC ($p < 0.001$), Ht ($p = 0.001$), and thrombocyte count ($p = 0.025$) and higher ALP ($p = 0.016$) and creatinine ($p = 0.023$) activity (Table 2).

In order to determine if observed changes were present only in patients with abnormal blood test results, we decided to select a subpopulation of dogs having parameters within normal values, which we believe mainly represents the undiagnosed dogs infected with skin dirofilariosis in real-clinical practice. Interestingly, in clinically healthy dogs, animals infected with *D. repens* had significantly reduced RBC ($p = 0.025$), Ht (p

$= 0.002$), and lymphocyte ($p = 0.031$) count and significantly elevated glucose concentration ($p = 0.023$). ALP activity was boarder line elevated ($p = 0.054$) (Table 3).

DISCUSSION

D. repens is by far the most prevalent causative agent of human and canine dirofilariosis in Europe (1). It is generally believed that *D. repens* infections in dogs are asymptomatic, but several case reports (5–7) and the results of blood parameters in our study suggest that the illness is not non-pathogenic but goes rather undetected.

Underdiagnosis of skin dirofilariosis is mainly due to the lack of diagnostic tools to detect occult infections. Amicrofilaremic infections can occur after previous antiparasitic treatment based on macrocyclic lactones, long prepatent time of the infection or monosex infection. Microfilariae periodicity and low intensity of microfilaremia also contribute to obtaining false negative results while investigating a dog for skin dirofilariosis. In contrast, clinicians are left to their own devices for diagnosing and interpreting importance of *D. repens* infections. Thus, having hematological and biochemical biomarker to suggest the presence and severity of infection might be a supportive tool for managing the disease progression, especially in asymptomatic patients.

Our first analysis of all dogs admitted to the study mirrored the real-clinical scenario of dogs brought for different reasons and showed that dogs additionally infected with *D. repens* compared to those uninfected had significantly lower RBC, thrombocyte, and lymphocyte counts, decreased Ht, and increased ALP activity.

The second analysis included a subpopulation of dogs having parameters within normal reference ranges, and in this group, differences were observed in infected animals, such as lower RBC, Ht, lymphocytes, and higher glucose and elevated boarder line ALP activity comparing to the uninfected group. Despite presenting as clinically healthy dogs, these alterations indicate that *D. repens* infection influenced the functioning of their body.

Statistically significant hematological alterations and ALP increase in dogs infected with *D. repens* are similar to those observed in other filarial disease, especially *D. immitis* infections (13), so the pathogenicity, as claimed by other authors (5, 14), is rather correlated with Mf than the presence of adult parasites.

The lower RBC, hematocrit, and hemoglobin characterize anemia in dogs and may be a result of destructive capability of Mf associated with severe intravascular hemolysis as reported in dogs infected with *Diptelonema reconditum* (15). It also might be connected to inflammation-associated production of pro-inflammatory cytokines resulting in suppression of erythrocytes production and inhibition of iron absorption and utilization (16). Lower thrombocyte count may be due to platelet consumption or presence of antiplatelet antibodies observed in dogs infected with other vector-borne diseases (17) or might be assigned to immune-mediated platelet destruction as reported in dogs infected with *D. immitis* (13). Lymphopenia was not only observed in infected patients in this study but also reported

TABLE 2 | Hematological and biochemical parameters in the total study population.

Parameter	Infected		Uninfected		t-test p-value
	n	Mean ± SD (range)	n	Mean ± SD (range)	
Hematology					
WBC (G/L)	206	14.9 ± 9.2 (4.7–84.7)	192	14.5 ± 6.2 (3.5–50.4)	0.640
Neutrophils (G/L)	177	10.4 ± 6.5 (1.6–63.8)	189	10.1 ± 5.4 (1.4–39.8)	0.636
Lymphocytes (G/L)	177	2.4 ± 1.5 (0–9.0)	189	3.1 ± 1.6 (0–9.4)	<0.001
Eosinophils (G/L)	177	0.9 ± 0.9 (0–5.1)	189	0.9 ± 1.0 (0–6.2)	0.904
Erythrocytes (T/L)	206	6.7 ± 1.1 (3.6–10.0)	191	7.1 ± 1.0 (3.7–9.9)	<0.001
Haematocrit (%)	206	43.2 ± 6.8 (22–60)	192	45.5 ± 6.3 (22–65)	0.001
MCV (fl)	206	64.8 ± 4.5 (36–77)	192	64.5 ± 3.5 (53–79)	0.404
PLT (G/L)	206	316 ± 160 (13–1000)	192	351 ± 169 (33–1000)	0.025
Biochemistry					
	n	Median, IQR (range)	n	Median, IQR (range)	Mann-Whitney U-test p-value
AST (U/L)	178	32.1, 25.7–43.1 (2.0–689)	167	33.1, 27.5–40.7 (10.5–178)	0.604
ALT (U/L)	182	41.4, 30.0–73.4 (1.3–3026)	167	41.5, 31.2–56.0 (6.9–765)	0.476
ALP (U/L)	168	48.3, 32.3–84.4 (1.0–2015)	167	42.0, 31.3–59.6 (15.0–1302)	0.016
Total protein (g/L)	143	60, 56–64 (40–99)	166	59, 55–63 (38–88)	0.263
Glucose (mmol/L) ^a	152	4.6, 3.8–5.4 (1.1–19.3)	164	4.5, 3.6–5.3 (1.3–17.2)	0.320
Urea (mmol/L) ^b	184	5.4, 4.2–6.9 (1.2–44.6)	165	5.2, 4.3–6.5 (2.0–39.0)	0.663
Creatinine (μmol/L) ^c	184	88.4, 70.7–106.1 (26.5–539.2)	166	79.6, 70.7–97.2 (44.2–592.3)	0.023

^aTo convert into mg/dL multiply by 18.

^bTo convert into mg/dL multiply by 6.03.

^cTo convert into mg/dL multiply by 0.011.

in another dog infected with *D. repens* (5) and during other canine-borne vector diseases. The mechanism of lymphopenia might be associated to endogenous glucocorticoids release that occurs in response to infectious stimuli or stress, which leads to lymphocyte apoptosis or sequestration of lymphocytes in lymphoid organs (18).

The increase in creatinine was observed in the first analysis in the infected group compared to the uninfected group in our study but was not shown to be statistically significant in dogs infected with *D. immitis*. On the contrary, another parameter suggesting renal damage (urea) was increased in *D. immitis*-infected patients but not in our *D. repens*-infected group (13). A case report describing the most severe course of skin dirofilariosis of a dog coinfecting with *D. immitis* suggested that only *D. repens* Mf were involved in kidney damage. However, other reports suggest that microfilaremic (not occult) dogs infected with *D. immitis* show marked signs of kidney damage (14, 19, 20).

ALP was significantly higher in infected dogs. Although not being highly liver specific (21), ALP is a marker having a good sensitivity for liver diseases in dogs, suggesting cholestatic disease or chronic hepatitis/cirrhosis. Other parameters suggesting liver

injuries, as ALT and AST were reported to be increased in case reports of dogs infected with *D. repens* (5, 22) and in some dogs in our study. This difference, however, was not statistically significant while comparing the infected and uninfected group, suggesting a rather big variability between infected individuals. Interestingly, the ALP increase was also the only liver parameter changed in *D. immitis*-infected dogs (13). The increase in ALP activity, with AST and ALT activity within normal values, makes a hepatocellular damage unlikely and might be rather due to chronic stress associated with increase in endogenous glucocorticoids (23), although, in patients having elevated AST, ALT, and ALP activity, an injury of the liver was very likely.

A higher level of glucose was observed in dogs infected with *D. repens* having all blood parameters within normal ranges. This also may be the result of higher glucocorticoids levels in these animals, which again suggests a correlation between *D. repens* and development of chronic stress response. Interestingly, glucose level was not significantly changed while the whole population was analyzed, which might suggest that, after development of concomitant disease, the host's body reaction to the infection changes.

TABLE 3 | Hematological and biochemical parameters in clinically healthy dogs with blood check-up results within normal reference ranges.

Parameter	Infected		Uninfected		t-test ^p -value
	n	mean ± SD (range)	n	mean ± SD (range)	
Hematology					
WBC (G/L)	93	11.89 ± 3.39 (5.1–18.4)	121	12.67 ± 3.65 (5.3–19.6)	0.110
Neutrophils (G/L)	93	8.33 ± 2.98 (1.6–16.2)	121	8.74 ± 3.23 (2.7–16.9)	0.343
Lymphocytes (G/L)	93	2.65 ± 1.46 (0.1–6.4)	121	3.07 ± 1.33 (0.6–7.0)	0.031
		2.3 (1.6–3.4) ^a		2.8 (2.1–4.0) ^a	0.007 ^b
Eosinophils (G/L)	93	0.93 ± 0.87 (0–3.5)	121	0.86 ± 0.85 (0–5.6)	0.580
		0.7 (0.3–1.2) ^a		0.7 (0.3–1.1) ^a	0.645 ^b
RBC (T/L)	93	7.03 ± 0.78 (5.2–8.9)	121	7.25 ± 0.69 (5.6–9.5)	0.025
Ht (%)	93	45.1 ± 4.5 (35–55)	121	47.0 ± 4.3 (36–56)	0.002
MCV (fl)	93	64.4 ± 3.8 (53–74)	121	65.1 ± 3.3 (58–79)	0.173
PLT (G/L)	93	320 ± 103 (110–598)	121	300 ± 98 (99–565)	0.136
Biochemistry					
AST (U/L)	84	31.9 ± 10.3 (13–66)	101	34.4 ± 10.1 (11–66)	0.095
ALT (U/L)	84	42.1 ± 19.2 (1–99)	101	42.4 ± 17.2 (14–94)	0.900
ALP (U/L)	82	54.3 ± 35.7 (1–163)	101	45.3 ± 23.5 (15–167)	0.054
		43 (30–63) ^a		40 (31–53) ^a	0.258 ^b
Total Protein (g/L)	75	60.3 ± 5.8 (50–76)	100	60.2 ± 6.2 (50–77)	0.902
Glucose (mmol/L) ^c	80	4.76 ± 1.08 (1.6–7.6)	100	4.39 ± 1.07 (2.1–7.6)	0.023
Urea (mmol/L) ^d	85	5.29 ± 1.49 (3.0–12.0)	99	5.42 ± 1.46 (2.1–9.0)	0.537
Creatinine (μmol/L) ^e	85	83.83 ± 19.81 (23.9–130.0)	100	84.33 ± 20.84 (43.3–138.8)	0.868

^aMedian (IQR).^bMann-Whitney U-test.^cTo convert into mg/dL multiply by 18.^dTo convert into mg/dL multiply by 6.03.^eTo convert into mg/dL multiply by 0.011.

Sometimes parasitological coinfection might positively influence the course of the main disease. For example, it has been reported that coinfection of malaria and hookworms seems to increase malaria incidence but at the same time might protect from malaria severe manifestations in humans (24). Moreover, dogs infected solely with *Babesia canis* compared to those coinfecting with *D. repens* displayed more pronounced biochemical changes, implying coinfection with *D. repens* was somehow beneficially counteracting against renal and liver damage characteristic for the course of babesiosis in dogs (9), although in the same study, the authors reported that thrombocytopenia and anemia concomitant with babesiosis in dogs were aggravated in individuals coinfecting with *D. repens*. Our results show differences in blood parameters between seemingly asymptomatic *D. repens* patients and uninfected dogs. *D. repens* infection seems to promote glucocorticoids release as chronic stress response associated with lymphopenia, glucose level, and ALP activity increase that may predispose infected individuals to develop other infectious, metabolic, or hormonal diseases in the future. This in turn might explain why dogs presented with different diseases and at the same time coinfecting with *D. repens* had more serious alternations in blood parameters than uninfected dogs. We suspect that the chronic stress response observed in seemingly healthy dogs may lead to more deepened alternations of concomitant diseases in the future.

There are several limitations in the presented study, such as no checkups or no final diagnosis of concomitant disease available for all admitted dogs. However, we aimed to show a trend in blood parameter changes related to *D. repens* infection. In dogs with different ailments as well as in asymptomatic dogs, significant differences in blood parameters were noted. Our data suggest that *D. repens* infection indeed induces some biological changes in the host. The length of the infection is not known either, but in naturally infected dogs, it cannot be evaluated. However, this mirrors more adequately the real clinical approach to the problem of increasing spread of *D. repens* parasite.

Our results indicate that *D. repens* infection complicates concomitant diseases, and animals develop more serious and detectable changes such as lower numbers of erythrocytes, lymphocytes, and thrombocytes and higher activity of ALP and creatinine. Even among dogs with blood results within normal reference ranges, individuals infected with *D. repens* showed detectable differences compared to uninfected ones, suggesting that seemingly healthy animals may still have altered biological processes or early indications of disease. The analysis of parameters within dogs having results within normal reference ranges, where the differences between groups are indeed within normal values, suggests a trend and perhaps a predisposition of development of other diseases in the future. Further studies with cortisol level evaluation, the measurements of total but also differentiation between liver ALP (L-ALP) and corticosteroid

ALP (C-ALP) isoforms in infected dogs with full follow-ups could be valuable.

CONCLUSIONS

Our paper describes hematological and biochemical changes in dogs naturally infected with *D. repens*. Alterations such as a decrease in RBC, lymphocytes, thrombocytes, hematocrit, as well as increases in ALP and creatinine could be indicators of coinfection with *D. repens*, especially in endemic regions. Furthermore, the results in clinically healthy dogs suggest that the presence of *D. repens* might lead to development of anemia and a state of chronic stress response, characterized by the combination of lymphopenia and increase in glucose level and ALP activity and, as such, predispose infected dogs to other ailments. This could explain the existence of more serious statistically significant blood parameters alternations in dogs with different ailments simultaneously coinfecting with *D. repens*.

Our results strongly indicate that *D. repens* infection has a pejorative influence on the health of the canine host independent of their clinical condition. Finally, the pathogenicity of *D. repens* remains a mystery but needs further investigation in order to comprehend its association with chronic stress response in infected individuals.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The raw data supporting the conclusions of this article will be made available by the authors, without undue reservation.

ETHICS STATEMENT

Ethical review and approval was not required for the animal study because the blood samples were collected for direct benefit of the patients and the analysis was performed on leftover samples (Act of 15th January 2015 on the protection of animals used for scientific purposes). The director of veterinary services of local dog shelters and the owners of privately owned dogs were informed about the results of *Dirofilaria* testing of the dogs

under their care. Written informed consent for participation was not obtained from the owners because no interventions outside routine care were performed. All blood samples were taken during routine checkups or process of diagnosis in veterinary clinics and only then the results were used to compare the results between *D. repens* infected and uninfected groups of dogs. Multiplex PCR was run on the leftover blood samples. A verbal consent of the owners' to voluntarily test their animals for skin dirofilariosis was present for all dogs admitted in the study. All data were de-identified before running statistical analysis and the entire anonymity of data has been assured. The director of local dog shelters and the owners of client-owned dogs were informed about the results of *Dirofilaria* testing of the dogs under their care. Doctors of veterinary medicine were provided with all information that could help them to introduce the best treatment to infected dogs.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

AD and MK collected clinical data, parasitic, biological specimens, and performed blood smears. ED and MEW performed PCR. MC performed the statistical analysis of the results. MEW, AD, MK, ED, PJ, and MW planned and discussed the study and the results. MEW wrote the manuscript. All authors read and approved the final version of the manuscript.

FUNDING

The reagents used in the study were supplied by Bayer Animal Health Poland. The article publication fee was funded by the Institute of Veterinary Medicine, Warsaw University of Life Sciences—SGGW.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to Bayer Animal Health Poland for supplying reagents to perform laboratory works of the study and providing the possibility to collect the samples and to Mark Kaji for constructive criticism and proofreading the article.

REFERENCES

- Capelli G, Genchi C, Baneth G, Bourdeau P, Brianti E, Cardoso L, et al. Recent advances on *Dirofilaria repens* in dogs and humans in Europe. *Parasites Vectors*. (2018) 11:663. doi: 10.1186/s13071-018-3205-x
- Diaz JH. Increasing risks of human dirofilariosis in travelers. *J Travel Med*. (2015) 22:116–23. doi: 10.1111/jtm.12174
- Ermakova L, Nagorny S, Pshenichnaya N. Clinical and laboratory features of human dirofilariosis in Russia. *IDCases*. (2017) 9:112–5. doi: 10.1016/j.idcr.2017.07.006
- Pampiglione S, Rivasi F, Angeli G, Boldorini R, Incensati RM, Pastormerlo M, et al. Dirofilariosis due to *Dirofilaria repens* in Italy, an emergent zoonosis: report of 60 new cases. *Histopathology*. (2001) 38:344–54. doi: 10.1046/j.1365-2559.2001.01099.x
- Mircean M, Ionică AM, Mircean V, Györke A, Codea AR, Tăbăran FA, et al. Clinical and pathological effects of *Dirofilaria repens* and *Dirofilaria immitis* in a dog with a natural co-infection. *Parasitol Int*. (2017) 66:331–4. doi: 10.1016/j.parint.2017.02.003
- Pazdzior-Czapula K, Ostrocka-Domagala I, Myrdek P, Mikiewicz M, Gesek M. *Dirofilaria repens* — an etiological factor or an incidental finding in cytologic and histopathologic biopsies from dogs. *Vet Clin Pathol*. (2018) 47:307–11. doi: 10.1111/vcp.12597
- Harrus S, Harmelin A, Rodrig S, Favia G. *Dirofilaria repens* infection in a dog in Israel. *Am J Trop Med Hyg*. (1999) 61:639–41. doi: 10.4269/ajtmh.1999.61.639
- Borkowski PK, Rymkiewicz G, Golebiewska J, Nestoros N, Romejko-Jarosinska J, Zarnowska-Prymek H, et al. The first case of human autochthonous subconjunctival dirofilariosis in Poland and MALT lymphoma as possible consequence of this parasitosis. *Infect Agent Cancer*. (2015) 10:1–5. doi: 10.1186/1750-9378-10-1
- Bajer A, Rodo A, Mierzejewska EJ, Tokasz K, Welc-faleciak R. The prevalence of *Dirofilaria repens* in cats, healthy dogs and dogs with concurrent

- babesiosis in an expansion zone in central Europe. *BMC Vet Res.* (2016) 12:183. doi: 10.1186/s12917-016-0816-3
10. Schwan EV, Miller DB, De Kock D, Van Heerden A. *Dirofilaria repens* in a cat with acute liver failure. *J S Afr Vet Assoc.* (2000) 71:197–200. doi: 10.4102/jsava.v71i3.713
 11. Gioia G, Lecová L, Genchi M, Ferri E, Genchi C, Mortarino M. Highly sensitive multiplex PCR for simultaneous detection and discrimination of *Dirofilaria immitis* and *Dirofilaria repens* in canine peripheral blood. *Vet Parasitol.* (2010) 172:160–3. doi: 10.1016/j.vetpar.2010.04.027
 12. Altman DG, Machin D, Bryant TN, Gardner M. *Statistics With Confidence.* 2nd ed. Bristol: BMJ Books (2000).
 13. Niwetpathomwat A, Kaewthamasorn M, Tiawsirisup S, Techangamsuwan S, Suvarnvibhaja S. A retrospective study of the clinical hematology and the serum biochemistry tests made on canine dirofilariasis cases in an animal hospital population in Bangkok, Thailand. *Res Vet Sci.* (2007) 82:364–9. doi: 10.1016/j.rvsc.2006.09.002
 14. Morchón R, Carretón E, Grandi G, González-Miguel J, Montoya-Alonso JA, Simón F, et al. Anti-*Wolbachia* surface protein antibodies are present in the urine of dogs naturally infected with *Dirofilaria immitis* with circulating microfilariae but not in dogs with occult infections. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* (2012) 12:17–20. doi: 10.1089/vbz.2010.0211
 15. Hashem M, Badawy A. Hematological and biochemical studies on filariasis of dogs. *Internet J Vet Med.* (2012) 4:1–7. Available online at: <https://ispub.com/IJVM/4/2/3275>
 16. Sankaran VG, Weiss MJ. Anemia: progress in molecular mechanisms and therapy. *Nat Med.* (2015) 21:221–30. doi: 10.1038/nm.3814
 17. Shaw SE, Day MJ, Birtles RJ, Breitschwerdt EB. Tick-borne infectious diseases of dogs. *Trends Parasitol.* (2001) 17:74–80. doi: 10.1016/S1471-4922(00)01856-0
 18. Harvey JW. Evaluation of leukocytic disorders. *Vet Hematol.* (2012) 122–76. doi: 10.1016/B978-1-4377-0173-9.00005-1
 19. Simón F, Siles-Lucas M, Morchón R, González-Miguel J, Mellado I, Carretón E, et al. Human and animal dirofilariasis: the emergence of a zoonotic mosaic. *Clin Microbiol Rev.* (2012) 25:507–44. doi: 10.1128/CMR.00012-12
 20. Abramowsky CR, Powers KG, Aikawa M, Swinehart G. *Dirofilaria immitis*. 5. Immunopathology of filarial nephropathy in dogs. *Am J Pathol.* (1981) 104:1–2.
 21. Dirksen K, Burgener IA, Rothuizen J, van den Ingh TSGAM, Penning LC, Spee B, et al. Sensitivity and specificity of plasma ALT, ALP, and bile acids for hepatitis in Labrador retrievers. *J Vet Intern Med.* (2017) 31:1017–27. doi: 10.1111/jvim.14716
 22. Osińska B, Demiaszkiewicz AW, Pyziel AM, Kuligowska I, Lachowicz J, Dolka I. Prevalence of *Dirofilaria repens* in dogs in central-eastern Poland and histopathological changes caused by this infection. *Bull Vet Inst Pulawy.* (2014) 58:35–9. doi: 10.2478/bvip-2014-0006
 23. Fernandez NJ, Kidney BA. Alkaline phosphatase : beyond the liver. *Vet Clin Pathol.* (2007) 36:223–3. doi: 10.1111/j.1939-165X.2007.tb00216.x
 24. Nacher M. Interactions between worms and malaria: good worms or bad worms? *Malar J.* (2011) 10:259. doi: 10.1186/1475-2875-10-259
- Conflict of Interest:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.
- Copyright © 2020 Wysmolek, Dobrzyński, Długosz, Czopowicz, Wiśniewski, Jurka and Klockiewicz. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.



Case Studies of Severe Microfilaremia in Four Dogs Naturally Infected With *Dirofilaria repens* as the Primary Disease or a Disease Complicating Factor

Magdalena E. Wyszomolek^{1*}, Maciej Klockiewicz¹, Małgorzata Sobczak-Filipiak², Ewa Długosz¹ and Marcin Wiśniewski¹

¹ Division of Parasitology and Parasitic Diseases, Department of Pre-Clinical Sciences, Institute of Veterinary Medicine, Warsaw University of Life Sciences, Warsaw, Poland, ² Department of Pathology and Veterinary Diagnostics, Institute of Veterinary Medicine, Warsaw University of Life Sciences, Warsaw, Poland

OPEN ACCESS

Edited by:

Rodrigo Morchón García,
University of Salamanca, Spain

Reviewed by:

Anastasia Diakou,
Aristotle University of
Thessaloniki, Greece
J. Alberto Montoya-Alonso,
University of Las Palmas de Gran
Canaria, Spain

*Correspondence:

Magdalena E. Wyszomolek
magdalena_wyszomolek@sggw.edu.pl

Specialty section:

This article was submitted to
Parasitology,
a section of the journal
Frontiers in Veterinary Science

Received: 29 June 2020

Accepted: 18 August 2020

Published: 22 September 2020

Citation:

Wyszomolek ME, Klockiewicz M, Sobczak-Filipiak M, Długosz E and Wiśniewski M (2020) Case Studies of Severe Microfilaremia in Four Dogs Naturally Infected With *Dirofilaria repens* as the Primary Disease or a Disease Complicating Factor. *Front. Vet. Sci.* 7:577466. doi: 10.3389/fvets.2020.577466

Subcutaneous dirofilariosis in dogs, caused by *Dirofilaria repens*, is an underdiagnosed disease, now recognized for its zoonotic potential, and growing distribution and prevalence across Europe and Asia. Our understanding of the pathogenicity in human and canine host remains unclear, but case reports suggest that microfilariae (Mf) as well as adult *D. repens* may directly cause internal organs damage or may be a factor complicating the course of other ailments. The purpose of the study was to report high Mf in dogs and to discuss potential relevance with co-morbidity. Our data from a modified Knott's test performed on 62 infected dogs indicate that the median Mf count in *D. repens* infections is 675 Mf/ml and we consider microfilaremia above 10,000 Mf/ml as high intensity. This collection of case reports discusses 4 cases of high intensity *D. repens* microfilaremia in companion dogs; one presenting pathology from a very high intensity of adult *D. repens* with post-treatment complications, and 3 dogs in which high microfilaremia was detected incidentally during the management of other primary illnesses. To our knowledge this report describes the highest *D. repens* microfilaremia ever detected in a dog, at 178,000 Mf/ml. The issue of high microfilaremic infections in dogs is poorly studied and there is growing need to identify the presentation and understand the mechanisms of associated pathogenesis in the host-parasite relationship.

Keywords: dog, dirofilariosis, microfilaremia, immunology, natural *Dirofilaria repens* infection

INTRODUCTION

Dirofilaria repens is a zoonotic filarial nematode transmitted to dogs by a mosquito vector and is the principal agent of human dirofilariosis in the Old World (1). Humans are considered a dead-end, accidental host for *D. repens*, but a growing body of case reports suggests that humans may instead be a dual facultative host in which the parasite can achieve maturity and release microfilariae (Mf) into the bloodstream (2, 3). Recently, there has been documentation in Poland of

a human patient having microfilaremia (360 Mf/ml) (4). Furthermore, an ocular mucosa associated lymphoid tissue lymphoma (MALT) has been reported in a human patient in Poland as a possible consequence of dirofilariosis (5). The number of human subcutaneous dirofilariosis cases in Europe has increased in recent years and current estimations in some areas is roughly 10 infected out of 100,000 inhabitants (6). True infection prevalence is likely underestimated because of misdiagnosis and under sampling. Additionally, with increasing globalization and climate change (1, 7), these numbers are expected to continue to grow and, therefore, proper diagnosis and treatment in dogs and humans will be increasingly important for managing the spread and disease burden of *D. repens* infections.

Currently, the treatment recommended by the European Society for Dirofilariosis and Angiostrongylosis (ESDA) for *D. repens* infections consists of 2.5 mg/kg moxidectin (in a spot-on formulation containing also 10 mg/kg imidacloprid) given monthly¹. However, because so few cases of high intensity *D. repens* microfilaremia have been reported (8), there are no guidelines for its management (1), or rationale for its cause.

The gold standard for diagnosis of subcutaneous dirofilariosis is the modified Knott's test which allows visual detection and morphological identification of Mf (9), and was used to evaluate the Mf burden in all cases described in this article. Our data from a modified Knott's tests performed on 62 infected dogs indicate that the median Mf count in *D. repens* infections is 675 Mf/ml (unpublished data), and the authors consider microfilaremia above 10,000 Mf/ml as being high. Dogs presented in this report all tested positive for having high microfilaremia with the highest level ever reported in *D. repens* infection at 178,000 Mf/ml. Helminths are known to suppress the host immune response in order to establish infection. It is therefore possible that patients presenting with high Mf counts may represent a population with pre-existing immunosuppression and are thus, unable to naturally control or respond to infection (9). All dogs in this study were diagnosed with terminal conditions which might be correlated with an underlying immunodeficiency.

CASE #1

Clinical Presentation

A 9-year-old entire male Shepherd dog was admitted to a veterinary clinic on 27/05/2016 due to severe weight loss and two infected purulent wounds in the scrotum area, associated with intensive licking. Physical examination revealed the presence of a chronic bilateral *otitis externa* and an inflammation of the interdigital spaces. Swabs from both ears and interdigital spaces were taken.

Diagnosis

During a blood examination on 03/09/2016 we detected severe leucocytosis [33,64 G/l (reference value 6–12 G/l)] related to the increase in band neutrophils [10% (reference value 0–6%)] with

a mild increase in aspartate aminotransferase [91 U/l (reference value 0–45 U/l)], moderate increase in phosphatase kinase [1,160 U/l (reference value 25–467 U/l)], decrease in albumin [1,8 g/dl (reference value 3,3–5,6 g/dl)] and the presence of Mf was observed in the blood smear. Identification of *D. repens* was obtained using multiplex PCR performed using primers designed by Genchi et al. (10). The intensity of microfilaremia was evaluated using a modified Knott's test and revealed 14,512 Mf/ml of blood. The ear swab sample tested positive for *Malassezia pachydermatis*, and the swab from interdigital space was positive for *Pseudomonas aeruginosa*.

Treatment

During surgical castration on 7/09/2016, 26 adult *D. repens* worms were found in the spermatic cord, testicles and scrotum tissue. The external canals were treated with nystatin according to the antifungal susceptibility test, and a general antibiotic was administered for the dermatitis of interdigital space according to the antibiogram.

After castration and wound excision, the dog started to gain weight. *Otitis externa* as well as the dermatitis were ameliorating after appropriate treatment. Beginning on 24/10/2016, 6 monthly treatments of topical moxidectin with imidacloprid were administered as efficacious treatment against adult *D. repens* in dogs (11). One week after the first application no Mf were detected in the peripheral blood. The body condition of the dog changed from very thin to normal within 4 months. Despite amelioration of the general condition, a necrosis and pyogranuloma of interdigital spaces associated with severe dermatitis of the abdomen and limbs developed with episodes of amelioration and deteriorations between 10/11/2016 and 28/08/2018. A course of antibiotics was administered according to the antibiogram but no improvement was observed. A generalized demodicosis, caused by *Demodex canis*, was diagnosed and, as the declining clinical state of the dog was progressing and no amelioration could be established, the owner did not wish to pursue further treatment. Finally, the patient became anorexic and expired on 15/09/2018. The cause of death reported after necropsy was a perforated stomach ulcer. Moreover, the histopathological examination of internal organs revealed a chronic cardiac insufficiency and pathological changes indicating a chronic inflammation in the kidneys, liver and spleen.

Discussion

The presence of 26 adult *D. repens* likely caused severe pain and pruritus. It is noteworthy that there were no noticeable behaviors to indicate the extremely high number of Mf circulating in the blood stream. The only obvious clinical and hematological signs were likely associated with presence of a large number of adult worms in the scrotum area. We suspect that the severe dermatitis which appeared post-treatment might have been associated with *Wolbachia* release after *Dirofilaria* spp. adulticide treatment as reported by previous studies in *D. immitis* infections (12–15). Furthermore, German Shepherds are predisposed to primary immunodeficiency (16) and it has been postulated that high microfilaremia might be associated with a state of

¹<https://www.esda.vet/wp-content/uploads/2017/11/GUIDELINES-FOR-CLINICAL-MANAGEMENT-OF-SUBCUTANEOUS-DIROFILARIOSIS-IN-DOGS-AND-CATS.pdf>

immunosuppression (17). The chronic yeast infection (usually secondary to an immune disorder in dogs) as well as the appearance of generalized demodicosis are possible indicators of immunodeficiency in this patient (18, 19).

CASE #2

Clinical Presentation

A 7-year-old male entire Yorkshire Terrier was admitted to the veterinary clinic on 06/08/2019 due to sudden anorexia, apathy and diarrhea. During the clinical examination the dog presented a hypotonic-hyporesponsiveness concomitant with exophthalmos, severe dehydration, hypothermia, bradycardia and pale mucous membranes. A treatment based on dexamethasone, caffeine, atropine, ceftriaxone and fluid therapy was initiated and a blood sample taken for analysis.

Diagnosis

Hematology revealed a severe leukocytosis [$58.1 \times 10^3/\text{mm}^3$ (reference value $6.0\text{--}12.0 \times 10^3/\text{mm}^3$)] resulting from neutrophilia [$54.2 \times 10^3/\text{mm}^3$ (reference value $3.00\text{--}10.00 \times 10^3/\text{mm}^3$)], and eosinophilia [$23.42 \times 10^3/\text{mm}^3$ (reference value $0\text{--}0.60 \times 10^3/\text{mm}^3$)] with mild anemia [HCT = 39.5% (reference value 44.0–57.0%)], and a severe increase in alkaline phosphatase [551 U/l (reference value 20–150 U/l)], alanine aminotransferase [131 U/l (reference value 10–118 U/l)] and a decrease in albumin [1.5 g/dL (reference value 2.5–4.4 g/dL)]. The glucose level was 99 mg/dl (reference value 80–120 mg/dl) and the modified Knott's test revealed 11,560 Mf/ml. After testing and excluding Canine Coronavirus (CCV), Canine Parvovirus and *Giardia* spp. infections, and according to anamnesis, a diagnosis of poisoning with taxine alkaloid was decided. On 08/08/2019 the state of the patient continued to deteriorate despite intense care therapy, and a decision of euthanasia was made.

Discussion

It is hard to evaluate the impact of co-infection with *D. repens* in this case, but one can suppose that it may have had a negative influence on the development of the condition, as taxine alkaloids (from yew) can cause lethal poisoning, in particular due to the compound's toxic effect on the cardiovascular apparatus (20). It is certainly possible that the severe microfilaremia might create a blood flow disturbance of capillary circulation by mechanical obstruction. Additionally, it has been observed in other filarial parasitic diseases that dead Mf release toxic products that affect the capillaries (21, 22). Unfortunately, the prognosis in taxine alkaloid poisoning without immediate stomach flushing is usually fatal and the presence of subcutaneous dirofilariasis was not likely influential in the course of the intoxication (20), but may be of concern for chronic anemia.

CASE #3

Clinical Presentation

A 10-year-old entire male mix breed dog was admitted to the clinic due to constipation. During the physical examination a

testicular asymmetry, perineal hernia, fecal impaction as well as an anal sac tumor of 2×2 cm were detected.

Diagnosis

The blood test revealed moderate anemia [RBC = 4.98 T/l (reference value 5.5–8.5 T/l), HCT = 32.6% (reference value 37.0–55.0%), HGB = 11.1 g/dl (reference value 12–18 g/dl)], severe leucocytosis [41.04 G/l (reference value 6.0–12.0 G/l)] resulted from: neutrophilia [34.06 G/l (reference value 2.9–13.6 G/l)], monocytosis [2.05 G/l (reference value 0.4–1.6 G/l)], eosinophilia [3.69 G/l (reference value 0–3.1 G/l)], thrombocytopenia [19 G/l (reference value 150–500 G/l)] and 40 150 Mf/ml. In addition, a mild increase in alanine aminotransferase [72 U/l (reference value 0–60.0 U/l)] and a decrease of albumin [3.2 g/dl (reference value 3.3–5.6 g/dl)] were detected, and ultrasonography revealed ascites, which was analyzed. The ascites contained Mf, granulocytes and atypical binucleated cells with many mitotic figures suggesting a neoplastic process. The owner did not wish to pursue any treatment nor euthanize and decided to take the patient home.

Discussion

This is the second report of finding Mf in the body fluid in a dog, the first of which was by Pazdzior-Czapula et al. (23). The issue and association between neoplastic processes and the presence of *D. repens* Mf or adults has been previously observed in cancer of the perianal gland, mast cells, epithelial cells, hemangiopericytoma, and trichoblastoma ribbon in dogs (20), as well as an ocular lymphoma from which the parasite was previously removed from a human patient (5). It has also been reported that parasitic infections or abnormalities of the immune system are at a high risk for developing cancer (5, 24), but the exact relationship between subcutaneous dirofilariasis and neoplastic process is still unknown.

CASE #4

Clinical Presentation

A 10-year-old entire Saint Bernard male was admitted to the clinic due to intolerance of any physical activity and permanent dyspnoea. Four months prior, the dog was pursuing therapy in another clinic and received a treatment of benazepril, spironolactone, theophylline, and nitroglycerin with no diagnosis, but anamnesis of increasing fatigue after physical exercise. During our physical examination, dyspnoea and cyanosis of tongue and mucous membranes (hypoxia) were noted.

Diagnosis

After sedation of the patient, additional diagnostics were performed. Thoracic radiographs revealed a dilation of the esophagus, computed tomography and electrocardiography revealed no alternations. A moderate leucocytosis [$16.7 \times 10^3/\text{mm}^3$ (reference value $6.0\text{--}10.00 \times 10^3/\text{mm}^3$)], mild neutrophilia [$13.90 \times 10^3/\text{mm}^3$ ($3.0\text{--}10.00 \times 10^3/\text{mm}^3$)], and eosinophilia [$1.5 \times 10^3/\text{mm}^3$ (reference value $0.0\text{--}0.60 \times 10^3/\text{mm}^3$)] were observed in the hematology, and the

biochemistry parameters were all in normal reference ranges. The echocardiographic measurements were within standard normal age limits. The rapid CANIV-4 commercial test was positive for *D. immitis*, but multiplex PCR revealed only the presence of *D. repens*. A modified Knott's test was performed which detected 178,000 Mf/ml and a double morphological identification of *D. repens*, not *D. immitis* was confirmed. As systolic dysfunction was suspected aspirin was administered which resulted in mild improvement of clinical signs. A few days later echocardiographic examination was performed and no nematodes were detected in the pulmonary artery. The echocardiographic measurements were within standard normal age limits. Only immobilization brought relief to the dog. A final diagnosis of severe laryngeal paralysis was decided upon, and pharmacological treatment was performed, but with no improvement. Before any surgical interventions could be considered the patient died at home from apparent suffocation. The owners did not permit a necropsy.

Discussion

Laryngeal paralysis is a respiratory disorder that primarily affects older (> 9 years of age), large-breed and giant-breed dogs, such as the Saint Bernard in this case. In many dogs the etiology remains idiopathic, but one possible cause is suggested to involve immune-mediated neuromuscular disease or other immune disorders like systemic lupus erythematosus (25, 26) In humans, a case of a girl treated for systemic lupus erythematosus was diagnosed with concomitant non-human filarial microfilaremic infection. The authors suggested that an immunity disorder might have led to this filarial infection (27). Leucocytosis and eosinophilia are both commonly associated with helminth infections, and neutrophilia can inhibit a Th1 type response, all of which could be expected to be associated with an increased Mf count. However, these numbers alone are very unlikely to facilitate or explain such a high level of microfilaremia. Although it is not possible to come to any conclusions from this case, the incredibly high level of microfilaremia and its co-morbidity with a presentation of symptoms known to be related to compromised immune system function, is highly suggestive of a causal relationship.

FINAL CONCLUSIONS

The goal of this article was to report the details of four cases of high *D. repens* microfilaremia. Hematological and biochemical findings in dogs infected with *Dirofilaria repens* included anemia, thrombocytopenia, leucocytosis, neutrophilia, eosinophilia, monocytosis and increased values of alkaline phosphatase, aspartate transaminase, alanine aminotransferase, blood urea nitrogen, creatinine, bilirubin as well as hypoalbuminemia, which is in keeping with results described by other authors (28, 29).

In the cases presented here, it is difficult to determine how long the animals were infected for or to evaluate the contribution of subcutaneous dirofilariasis to the progression of morbidity in the presence of concomitant conditions. Due to the severity of the underlying diseases and symptoms, anthelmintic treatment

was only administered to one dog seen in this collection of case studies. Even in the presence of a high burden of microfilaria, treatment with a standard dose of moxidectin was sufficient to reduce Mf count below detection 6 days after application. It should be noted that there is a 24-h microfilarial periodicity, which makes the time of sampling a factor influencing the result of a Knott test (30).

We suspect that the severe dermatitis that appeared post-treatment might have been associated with *Wolbachia* release after *Dirofilaria* spp. worm death as reported in *Dirofilaria immitis* infections (12). Recently, a case report of *D. repens* microfilaremic infection in a human showed successful treatment with only doxycycline targeting the *Wolbachia* endosymbiont (31).

All of the *D. repens* infections reported here were diagnosed incidentally while investigating concomitant conditions, suggesting that high intensity microfilaremia *per se* may go undiagnosed. This implies that there is a greater reservoir for human infection than previously suspected, and perhaps warrants increased monitoring in endemic areas, such as the regular use of a modified Knott's test. It might be discussed if high microfilaremic dogs represent an epidemiological risk of increased transmission, as most mosquitoes die when feeding on hosts with microfilaremia superior to 7,500 Mf/ml (21). However, the daily microfilarial periodicity permits the possibility that some mosquitoes can survive ingesting blood even from high microfilaremic hosts. Therefore, anthelmintic treatment, even in the absence of parasitic symptoms, should be administered.

It remains unclear why in some patients, *D. repens* infections appear asymptomatic, and in other cases Mf are suspected to be responsible for severe renal or liver damage (28). Veterinarians should consider dirofilariasis as a primary or co-existing disease that may modify or mask the symptoms or progression of a co-morbidity. Furthermore, high intensity microfilaremia in a blood sample should be taken as a potential indicator of the presence of an underlying serious pathology.

Personal correspondence with veterinary practitioners suggest a beneficial effect of adding to the moxidectin standard treatment an anticoagulant, corticosteroids, and doxycycline, depending on the severity of the clinical state of the patient infected with *D. repens*; this is also recommended in high risk thrombosis development with heartworm disease (12). As reported in lymphatic filariasis, doxycycline treatment against *Wolbachia* provides clinical improvement in patients with lymphedema (32). It has also been noted in loiasis that high microfilarial loads (30,000–50,000 Mf/ml) can lead to capillary obstruction from damaged parasites after anthelmintic treatment, and adding corticosteroids to the anti-parasitic treatment should be taken into consideration by ESDA and veterinary practitioners in high intensity microfilaremia (22).

In human *Loa loa* infections occurring with microfilaremia >10,000 Mf/ml of blood, encephalopathy following ivermectin has been well-documented. Treatment with microfilaricidal agents such as ivermectin and diethylcarbamazine may provoke the passage of *L. loa* Mf into the cerebrospinal fluid and precipitate an encephalopathy (33, 34). Those reactions were not yet described in filariasis of dogs, but a case of a human *D. repens*

infection concomitant with meningoencephalitis was successfully treated by initiation of anti-helminth and anti-inflammatory medicine (35). This could be an interesting issue to follow and explain in further studies.

Adult parasite burden cannot be determined precisely in helminth infections (36), especially in *D. repens* where the worms may reside in any number of tissue locations. In Case #1 we found 26 adult worms during castration. Most case reports present findings of just one or few adult worms, however, we cannot exclude the possibility that these are under representations of total adult numbers localized in different tissues. It has been previously documented that a dog infected with over 300 adult *D. repens* showed a microfilaremia of 7,780 Mf/ml (28). This suggests that the quantity of adult worms may be only one of the factor determining Mf in the blood stream, and it is very likely that the immune system of the host plays a large role in regulating microfilariae burden, as is observed in other helminth infections (28, 37). The mechanism regulating the burden of Mf in the bloodstream is not known. It is suspected that certain aspects of host-helminth relationship may be beneficial to the host given the proper balance parasite load and humoral response in the host (37). This relationship is beginning to be investigated pertaining to autoimmune disease, and could be of future interest in the study of *D. repens* infections.

Density-dependent processes play a key role in the transmission dynamics of vector-borne diseases (36). The relationship between microfilarial density and worm burden in *Onchocerca volvulus* infections in humans has been investigated, yet not fully understood. It has been observed that the microfilariae burden increases with host age, suggesting a development of immunological tolerance, while the density of adult parasites correlating with the microfilariae burden has not been confirmed. Since a purely age-related decline in host responsiveness is not shown, it is likely that immunological responsiveness against Mf diminishes as a consequence of cumulative parasite experience, pointing to immunological habituation or tolerance to the parasite (36).

All four cases presented here feature high microfilaremia in animals with severe co-morbidity and suspected immunodeficiency-related conditions. Helminths are known to suppress the host immune response in order to establish infection. For instance, it has been recently reported that *D. repens* may influence the host immune response by inducing a state of chronic in the canine host (29). It is possible that

patients with high Mf counts may represent a population with pre-existing immunosuppression and are unable to naturally control or respond to the parasites. An improved screening and monitoring to determine the impact of chronic immunodeficiency disease on subcutaneous dirofilariosis and its correlation with neoplastic processes should be taken into consideration by investigators and practitioners for better understanding of *D. repens* pathogenicity.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

All datasets generated for this study are included in the article/supplementary material.

ETHICS STATEMENT

Ethical approval was not required for the animal study, because no interventions outside routine care and diagnostics were performed (as per Resolution Number 22/2006 of the National Commission for the Ethics of Experiments on Animals, 7th November 2006 and Act of 15th January 2015 on the protection of animals used for scientific purposes). Written informed consent was obtained from the owners for the participation of their animals in this study.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

MW analyzed the data and wrote the manuscript. MS-F performed the histopathological examination of internal organs of the first case. MK, ED, MW, and MS-F critically revised the manuscript. All authors read and approved the final version of the manuscript.

FUNDING

The article publication fee was funded by the Institute of Veterinary Medicine, Warsaw University of Life Sciences – SGGW.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to Dr. Wojciech Spruch and Dr. Krzysztof Humięcki for providing all clinical data and to Mark Kaji for constructive criticism and proofreading the article.

REFERENCES

- Capelli G, Genchi C, Baneth G, Bourdeau P, Brianti E, Cardoso L, et al. Recent advances on *Dirofilaria repens* in dogs and humans in Europe. *Parasit Vectors*. (2018) 11:663. doi: 10.1186/s13071-018-3205-x
- Sulekova LF, Gabrielli S, de Angelis M, Milardi GL, Magnani C, Marco B Di, et al. *Dirofilaria repens* microfilariae from a human node fine-needle aspirate: a case report. *BMC Infect Dis*. (2016) 16:248. doi: 10.1186/s12879-016-1582-3
- Ermakova L, Nagorny S, Pshenichnaya N, Ambalov Y, Boltachiev K. Clinical and laboratory features of human *Dirofilariasis* in Russia. *IDCases*. (2017) 9:112–5. doi: 10.1016/j.idcr.2017.07.006
- Kłudkowska M, Pielok L, Frackowiak K, Masny A, Gołab E, Paul M. *Dirofilaria repens* infection as a cause of intensive peripheral microfilariemia in a polish patient: process description and cases review. *Acta Parasitol*. (2018) 63:657–63. doi: 10.1515/ap-2018-0077
- Borkowski PK, Rymkiewicz G, Golebiewska J, Nestoros N, Romejko-Jarosinska J, Zarnowska-Prymek H, et al. The first case of human autochthonous subconjunctival dirofilariosis in Poland and MALT lymphoma as possible consequence of this

- parasitosis. *Infect Agent Cancer*. (2015) 10:1–5. doi: 10.1186/1750-9378-10-1
6. Harrus S, Harmelin A, Rodrig S, Favia G. *Dirofilaria repens* infection in a dog in Israel. *Am J Trop Med Hyg*. (1999) 61:639–41. doi: 10.4269/ajtmh.1999.61.639
 7. Mazaki-Tovi M, Reich M, Karnieli A, Kuzi S, Aroch I. Marked subcutaneous mast cell and eosinophilic infiltration associated with the presence of multiple *Dirofilaria repens* microfilariae in 4 dogs. *Vet Clin Pathol*. (2016) 4:703–9. doi: 10.1111/vcp.12410
 8. Genchi C, Kramer LH. The prevalence of *Dirofilaria immitis* and *D. repens* in the old world. *Vet Parasitol*. (2020) 280:108995. doi: 10.1016/j.vetpar.2019.108995
 9. Džaja P, Beck A, Kiš G, Kurilj AG, Živičnjak T, Artuković B, et al. *Dirofilaria repens* infection in a dog in Croatia - a case report. *Vet Arh*. (2008) 78:521–7.
 10. Magnis J, Lorentz S, Guardone L, Grimm F, Magi M, Naucke TJ, et al. Morphometric analyses of canine blood microfilariae isolated by the Knott's test enables *Dirofilaria immitis* and *D. repens* species-specific and *Acanthocheilonema* (syn. *Dipetalonema*) genus-specific diagnosis. *Parasit Vectors*. (2013) 6:48. doi: 10.1186/1756-3305-6-48
 11. Gioia G, Lecová L, Genchi M, Ferri E, Genchi C, Mortarino M. Highly sensitive multiplex PCR for simultaneous detection and discrimination of *Dirofilaria immitis* and *Dirofilaria repens* in canine peripheral blood. *Vet Parasitol*. (2010) 172:160–3. doi: 10.1016/j.vetpar.2010.04.027
 12. Petry G, Genchi M, Schmidt H, Schaper R, Lawrenz B, Genchi C. Evaluation of the adulticidal efficacy of imidacloprid 10%/moxidectin 2.5 % (w/v) spot-on (advocate®, advantage® multi) against *Dirofilaria repens* in experimentally infected dogs. *Parasitol Res*. (2015) 114:131–44. doi: 10.1007/s00436-015-4519-7
 13. Simón F, Siles-Lucas M, Morchón R, González-Miguel J, Mellado I, Carretón E, et al. Human and animal *Dirofilaria* infections: the emergence of a zoonotic mosaic. *Clin Microbiol Rev*. (2012) 25:507–44. doi: 10.1128/CMR.00012-12
 14. Kramer L, Simón F, Tamarozzi F, Genchi M, Bazzocchi C. Is *Wolbachia* complicating the pathological effects of *Dirofilaria immitis* infections? *Vet Parasitol*. (2005) 133:133–6. doi: 10.1016/j.vetpar.2005.04.011
 15. Kramer L, Grandi G, Leoni M, Passeri B, McCall J, Genchi C, et al. *Wolbachia* and its influence on the pathology and immunology of *Dirofilaria immitis* infection. *Vet Parasitol*. (2008) 158:191–5. doi: 10.1016/j.vetpar.2008.09.014
 16. Grandi G, Morchón R, Kramer L, Kartashev V, Simon F. *Wolbachia* in *Dirofilaria repens*, an agent causing human subcutaneous *Dirofilaria* infection. *J Parasitol*. (2008) 94:1421–3. doi: 10.1645/GE-1575.1
 17. Wilson A, Hedhammar A, Reynolds A, Spears J, Satyaraj E, Pelker R, et al. Immunoglobulins in dogs: correspondence and maturation in 15 litters of German shepherd dogs and their dams. *Vet Rec Open*. (2016) 3:e000173. doi: 10.1136/vetreco-2016-000173
 18. Paterson S. Discovering the causes of otitis externa. *Pract*. (2016) 38:7–11. doi: 10.1136/inp.i470
 19. Jorge MFS, Miguel LMZ, Braghioroli CS, Schmitt JV. Demodicosis as treatment complication of amicrobial pustulosis of the folds. *An Bras Dermatol*. (2018) 93:566–9. doi: 10.1590/abd1806-4841.20187171
 20. Vališ M, Kočí J, Tuček D, Lutonský T, Kopová J, Bartoň P, et al. Common yew intoxication: a case report. *J Med Case Rep*. (2014) 8:4. doi: 10.1186/1752-1947-8-4
 21. Ibrahim MS, Trpis M. The effect of *Brugia pahangi* infection on survival of susceptible and refractory species of the *Aedes scutellaris* complex. *Med Vet Entomol*. (1987) 1:329–37. doi: 10.1111/j.1365-2915.1987.tb00363.x
 22. Placinta IA, Pascual-Camps I, Chiari-Toumit C, Mata-Morel L, Sanchez-Cañizal J, Barranco-González H. Ocular loiasis affecting a child and its assessment by anterior segment optical coherence tomography. *Rom J Ophthalmol*. (2019) 63:184–7. doi: 10.22336/rjo.2019.28
 23. Pazdzior-Czapula K, Otrocka-Domaga I, Myrdek P, Mikiewicz M, Gesek M. *Dirofilaria repens* —an etiological factor or an incidental finding in cytologic and histopathologic biopsies from dogs. (2018) 47:307–11. doi: 10.1111/vcp.12597
 24. Mortaz E, Tabarsi P, Mansouri D, Khosravi A, Garssen J, Velayati A, et al. Cancers related to immunodeficiencies: update and perspectives. *Front Immunol*. (2016) 7:365. doi: 10.3389/fimmu.2016.00365
 25. MacPhail CM. Laryngeal disease in dogs and cats: an update. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*. (2020) 50:295–10. doi: 10.1016/j.cvsm.2019.11.001
 26. Kvitko-White H, Balog K, Scott-Moncrieff JC, Johnson A, Lantz GC. Acquired bilateral laryngeal paralysis associated with systemic lupus erythematosus in a dog. *J Am Anim Hosp Assoc*. (2012) 48:60–5. doi: 10.5326/JAAHA-MS-5677
 27. Greene BM, Otto GF, Greenough III WB. circulating non-human microfilaria in a patient with systemic lupus erythematosus. *Am J Trop Med Hyg*. (1978) 27:905–9. doi: 10.4269/ajtmh.1978.27.905
 28. Mircean M, Ionică AM, Mircean V, Györke A, Codea AR, Tăbăran FA, et al. Clinical and pathological effects of *Dirofilaria repens* and *Dirofilaria immitis* in a dog with a natural co-infection. *Parasitol Int*. (2017) 66:331–4. doi: 10.1016/j.parint.2017.02.003
 29. Wysmolek ME, Dobrzyński A, Długosz E, Czopowicz M, Wiśniewski M, Jurka P, et al. Hematological and biochemical changes in dogs naturally infected with *Dirofilaria repens*. *Front. Vet. Sci*. 7:590. doi: 10.3389/fvets.2020.00590
 30. Hawking F. The 24-hour periodicity of microfilariae: biological mechanisms responsible for its production and control. *Proc R Soc London*. (1967) 169:59–76. doi: 10.1098/rspb.1967.0079
 31. Lechner AM, Gastager H, Kern JM, Wagner B, Tappe D. Case report: successful treatment of a patient with microfilaremia *Dirofilaria* using doxycycline. *Am J Trop Med Hyg*. (2020) 102:844–6. doi: 10.4269/ajtmh.19-0744
 32. Bennuru S, Nutman TB. Lymphatics in human lymphatic filariasis: *in vitro* models of parasite-induced lymphatic remodeling. *Lymphat Res Biol*. (2009) 7:215–9. doi: 10.1089/lrb.2009.0022
 33. Twum-Danso NA. Loa loa encephalopathy temporally related to ivermectin administration reported from onchocerciasis mass treatment programs from 1989 to 2001: implications for the future. *Filaria J*. (2003) 2:S7. doi: 10.1186/1475-2883-2-S1-S7s
 34. Gardon J, Gardon-Wendel N, Kamgno J, Chippaux J. Serious reactions after mass treatment of onchocerciasis with ivermectin in an area endemic for *Loa loa* infection. *Lancet*. (1997) 350:18–22. doi: 10.1016/S0140-6736(96)11094-1
 35. Poppert S, Hodapp M, Krueger A, Hegasy G, Niesen W, Kern WV, et al. *Dirofilaria repens* infection and concomitant meningoencephalitis. *Emerg Infect Dis*. (2009) 15:1844–6. doi: 10.3201/eid1511.090936
 36. Duerr HP, Dietz K, Schulz-Key H, Büttner DW, Eichner M. The relationships between the burden of adult parasites, host age and the microfilarial density in human onchocerciasis. *Int J Parasitol*. (2004) 34:463–73. doi: 10.1016/j.ijpara.2003.11.008
 37. Everts B, Smits HH, Hokke CH, Yazdanbakhsh M. Helminths and dendritic cells: Sensing and regulating via pattern recognition receptors, Th2 and Treg responses. *Eur J Immunol*. (2010) 40:1525–37. doi: 10.1002/eji.200940109
- Conflict of Interest:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2020 Wysmolek, Klockiewicz, Sobczak-Filiipiak, Długosz and Wiśniewski. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.



Contents lists available at ScienceDirect

Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases

journal homepage: www.elsevier.com/locate/cimid

Canine antibody response against *Dirofilaria repens* in natural occult and microfilaremic infections

Magdalena E. Wyszomółek^{*}, Maciej Klockiewicz, Ewa Długosz, Marcin Wiśniewski

Warsaw University of Life Sciences, Department of Preclinical Sciences, Division of Parasitology and Infectious Diseases, Poland

ARTICLE INFO

Keywords:

Subcutaneous dirofilariosis
Humoral response
ELISA
Occult infection
IgG1 & IgG2

ABSTRACT

Dirofilaria repens is the causative agent of the zoonotic canine skin condition called subcutaneous dirofilariosis. Despite being endemic throughout much of Europe, little is known about host humoral responses to *D. repens*. To address this, we analyzed serum immunoglobulin isotypes recognizing *D. repens* somatic antigens (DrSA) in naturally infected dogs. Titers of anti-DrSA IgG and IgE, but not IgM were significantly higher in dogs infected with *D. repens* compared to those that were negative. Moreover, microfilaremic infections were associated with higher levels of IgG1 than IgG2, while occult infections occurred with significantly higher levels of IgG2 than IgG1. Finally, the measurement of anti-DrSA IgG antibodies allowed the detection of occult subcutaneous dirofilariosis in dogs.

1. Introduction

Dirofilaria repens is a zoonotic parasitic filarial nematode that infects dogs and has become highly prevalent throughout Europe [19]. *Dirofilaria spp.* infection is propagated when mated adult females within an infected host release microfilariae (Mf) into their bloodstream to be uptaken by mosquitoes and transmitted to another host during a subsequent blood meal. *Dirofilaria repens* worms reach maturity within months and migrate throughout the host's body, which leads to the skin condition known as subcutaneous dirofilariosis.

Subcutaneous dirofilariosis can be divided into two phenotypes: microfilaremic and amicrofilaremic (occult). Microfilaremic infections are defined by the presence of Mf in the host blood circulation. In comparison, occult infections are a state in which the host is infected with the adult parasite, but lacks detectable Mf circulating in their bloodstream. Occult infections have been previously reported for different filarial species, including *D. immitis*, and can be related to single-sex infections, Mf periodicity, previous anti-parasitic treatment, long prepatent time [5,32] or a strong inflammatory response leading to Mf clearance [30]. Infections lacking the presence of Mf are problematic for diagnostics, reporting prevalence and controlling transmission. Available tools for detecting *D. repens* infections such as blood smears, PCRs or the modified Knott's test have a high sensitivity (1 Mf/ml for the modified Knott's test and 4 Mf/ml for PCR) but are based solely on the presence of Mf in the host bloodstream. We have previously reported

that the median Mf count in dogs naturally infected with *D. repens* is 675 Mf/ml [35] and therefore both methods have been sufficient to monitor prevalence. Currently, a serological tool based on the recognition of female antigens of *D. immitis*, a closely related species to *D. repens*, is available to detect heartworm disease in dogs [33], but there is no equivalent method to detect occult *D. repens* infection.

Subcutaneous dirofilariosis is usually described as clinically asymptomatic in the canine host, and therefore even microfilaremic infections often go undiagnosed [28]. This has led to an increased prevalence, as infected animals act as an uncontrolled reservoir of *D. repens* for both dogs and humans [12]. Of relevance for human and canine infections, a growing body of data suggests that subcutaneous dirofilariosis in dogs may be associated with vision loss and neoplastic processes [4,17,26,27]. Recently, we showed an association between *D. repens* infection and a chronic stress profile in the infected dogs [34]. As such, the mechanisms that determine symptomatic and non-symptomatic *D. repens* infections require further investigation. Studying these factors may expand our knowledge on the immune response to filarial nematode infection and provide a better understanding of host-parasite interactions.

Humoral responses against filarial nematodes such as *Wuchereria bancrofti* or *Brugia malayi*, have been well studied and characterized in humans [21,30,7]. In general, it is believed that protection against adult worms is mainly based on Th2 polarization, whereas IgG antibodies play a key role in Mf clearance [18,30].

^{*} Corresponding author.

E-mail address: magdalena.wyszomolek@sggw.edu.pl (M.E. Wyszomolek).

<https://doi.org/10.1016/j.cimid.2022.101818>

Received 28 September 2021; Received in revised form 26 April 2022; Accepted 27 April 2022

Available online 2 May 2022

0147-9571/© 2022 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Here, we report three clinically confirmed occult *D. repens* infections, in which adult *D. repens* worms were incidentally found during routine surgical procedures, but Mf were not detected in the peripheral blood. Occult subcutaneous dirofilariosis were also recently reported by Laidoudi et al. in one naturally infected dog (2019) and by Ciuca et al. [8] in four experimentally infected dogs.

Finally, we evaluated the presence of serum IgM, IgE, IgG, IgG1 and IgG2 recognizing adult *D. repens* somatic antigens (DrSA) in naturally infected dogs presenting microfilaremic and occult phenotypes of subcutaneous dirofilariosis.

2. Materials and methods

A total of 149 dogs of different breeds, sexes, body weights, and breeding status, aged 1–17 years were included in the study. These patients were presented to veterinary clinics for regular health issues and/or because they used to live with dogs previously infected with *D. repens*. All dogs participating in this study lived in the Warsaw metropolitan area, Poland, endemic for subcutaneous dirofilariosis. Firstly, animals were subjected to a routine physical examination and blood testing. Blood samples were collected in the presence or absence of 1 mg/ml of the anticoagulant EDTA. Anticoagulated blood samples were used for direct parasitological examination or frozen and stored until DNA isolation. Serum samples were stored in aliquots at -20°C until use in ELISA. Veterinarians trained to identify Mf preliminarily examined blood samples using light microscopy for direct detection of Mf in fresh or stained blood smears.

Total DNA was isolated from all collected blood samples using a Blood Mini isolation kit (A&A Biotechnology, Gdansk, Poland) and used as a template to perform multiplex PCR according to the protocol of Gioia et al. [13]. This allowed a simultaneous detection of *D. repens* (sensitivity = 4 mf/ml) and differentiation from *D. immitis*. Briefly, primers were designed against a portion of the small ribosomal subunit RNA gene of *D. repens* (12 S rDNA) as follows: 12 S forward primer (5'-GTTCCAGAATAATCGGCTA-3') / 12 S reverse degenerate primer (5'-ATTGACGGATG(AG)TTGTACC-3') / 12SF2B (5'-TTTTTACTTTTTTGGTAATG-3') / 12SR2 (5'-AAAAGCAACAAATAA(CA)A-3').

Adult worms used in this study were incidentally found in naturally infected dogs during routine surgical procedures such as castration or tumor resection. DrSA was prepared by homogenization of mixed gender adult parasites in sterile PBS buffer using a mechanical Glas-Col homogenizer. The extract was centrifuged at 12,000 x g for 15 min at 4°C and the protein concentration in the supernatant was determined using a BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific) according to the manufacturer's protocol to be used for ELISA.

Total IgG, IgM, IgE titers against DrSA were determined using indirect ELISA. An initial concentration range (0.25–5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) of DrSA was tested to determine the optimal protein concentration for coating. Then, 96-well plates were coated with 2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of DrSA in bicarbonate buffer (0.015 M Na_2CO_3 , 0.035 M NaHCO_3 , pH 9.5) for 16 hrs at 4°C . Afterwards, plates were washed three times with PBS-0.05% Tween-20 followed by blocking with 5% skimmed milk in PBS buffer for 2 hrs at 20°C . Then, two-fold serial dilutions of dog sera starting from 1:100 up to 1:204,800 in the case of IgG, from 1:10–1:640 for IgE, and from 1:3200–1:25,600 for IgM were used. Dilutions were added into wells and incubated for 1.5 hr at 20°C , followed by 1 hr incubation with HRP – conjugated rabbit anti-canine IgG (total) (1:30,000) (Jackson ImmunoResearch Laboratories) or goat anti-canine IgM (1:1000) (AbD Serotec, Kidlington, Oxford, UK) or goat anti-canine IgE (1:1000) (AbD Serotec, Kidlington, Oxford, UK). Reactions were developed using TMB substrate (Sigma-Aldrich, Sankt Gallen, Switzerland). After 30 mins, reactions were stopped using 2 M H_2SO_4 and absorbance values were read at 450 nm in a MRX microplate reader (Dynatech Laboratories, USA).

The same ELISA protocol was applied to measure specific anti-DrSA

Table 1

Category of dog infection status and corresponding IgG ratios.

	PCR+IgG+ infected microfilaremic	PCR-IgG+ infected occult	PCR-IgG- uninfected negative	Total no. of dogs
IgG1 > IgG2	61 (100%)	53 (100%)	35	149
IgG2 > IgG1	34 (55%)	12 (77%)		
	27 (45%)	41 (23%)		

serum IgG1 and IgG2 in microfilaremic and occult dogs using goat anti-canine IgG1:HRP and sheep anti-canine IgG2:HRP, both from Bio-Rad (Hercules, California), except only 1:1600 serum dilution was used based on the results of total IgG titers.

Due to the limitations in diagnostics and the fact that Poland is endemic for *D. repens*, we could not consider any sera as negative with certainty using the PCR test only. To separate a true negative group (and detect occult infections) we compared the OD values of DrSA-specific serum IgG in PCR negative sera at the lowest examined dilution (1:100) with serum-free PBS control reactions; thus, we selected sera from 15 dogs with ODs comparable to the serum-free PBS background. The cutoff value was taken as the mean OD of the 15 abovementioned negative samples plus three standard deviations and then applied to quantify DrSA specific IgG, IgM and IgE titers.

We expressed the ELISA titers as the log₁₀ of the reciprocal of the highest dilution showing the OD value higher than the cutoff. For example, a value of 2 means that the highest dilution in which the serum sample was greater than the cutoff was 100, as such log₁₀ of the 100 dilution is equal 2, etc.

Three groups were assigned depending on microfilaremic status and the anti-DrSA specific IgG titer value:

- PCR (+), ELISA IgG ≥ 3.2 (E +) – positive / infected, microfilaremic (PCR(+))E(+)
- PCR (-), ELISA IgG ≥ 3.2 (E +) – positive / infected, occult (PCR(-))E(+)
- PCR (-), ELISA IgG < 3.2 (E-) – negative / uninfected (negative)

The titers of anti-DrSA specific IgG, IgM, IgE were compared between the three groups (PCR(+))E(+), PCR(-))E(+), negative) and the specific IgG1:IgG2 ratio was compared between PCR(+))E(+) and PCR(-))E(+) groups (Table 1).

Data were compared between groups using either t-test with Welch's correction or Kruskal-Wallis test with Dunn's post-hoc depending on the asymmetry of a variable distribution assessed on the basis of histograms. Statistical analysis for comparison of IgG levels between PCR(+) and PCR(-) groups and the ratios of IgG1:IgG2 ODs in the microfilaremic and occult groups was performed using a two-tailed unpaired t-test with Welch's correction. Kruskal-Wallis test with Dunn's post-hoc test was applied to compare the IgG, IgM and IgE levels within PCR(+))E(+), PCR(-))E(+) and negative groups. We also analyzed the differences in the titers of all antibody classes and subclasses within each group (PCR(+))E(+), PCR(-))E(+) and negative groups). Finally, we compared the occurrence of occult and microfilaremic infections between male and female dogs using a Chi-Square test. All analyses were performed using the GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) and all error bars represent the standard deviation (SD). Only p values ≤ 0.05 were considered significant.

3. Results and discussion

A total of 149 dogs were included in this study from which 61 (41%) blood samples presented Mf in blood smears and were confirmed as *D. repens* in the absence of *D. immitis* by multiplex PCR. The remaining 88 (59%) samples were PCR negative for *D. repens* and *D. immitis*.

Serum of blood samples from all 149 animals contained anti-DrSA

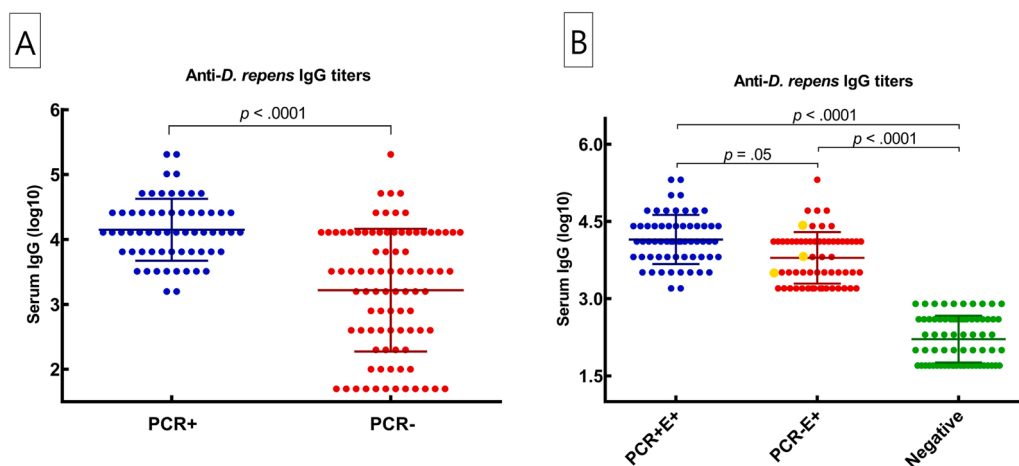


Fig. 1. (A) Comparison of the mean titers (black horizontal bar) \pm standard deviation (SD) of anti-DrSA IgG antibodies in PCR positive and PCR negative dogs. (B) Microfilaremic dogs showed titers of specific anti-DrSA IgG antibodies equal or higher than 3.2 and the negative group was below the positivity threshold. Yellow dots represent the titers of three clinically confirmed occult infections.

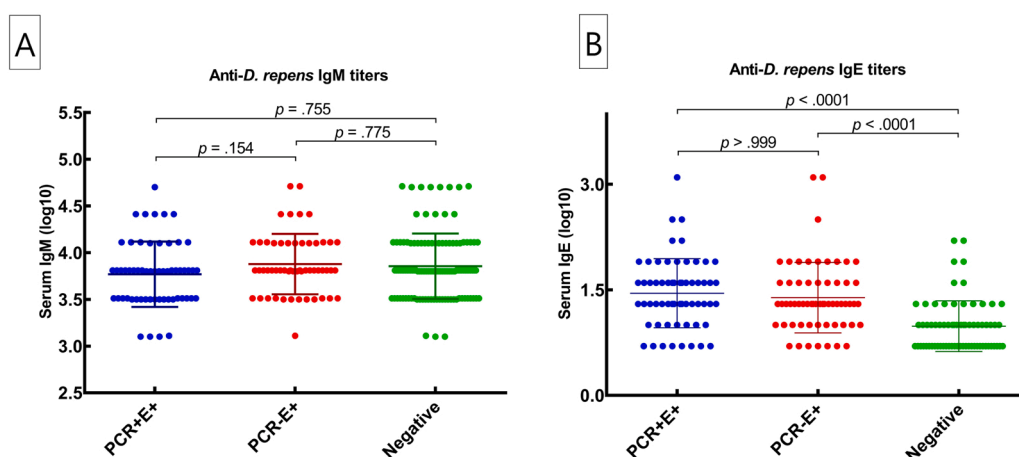


Fig. 2. (A) Comparison of mean titers (black horizontal bar) \pm SD of anti-DrSA IgM antibodies in PCR(+)E(+) (microfilaremic), PCR(-)E(+) (occult) and negative dogs. No significance was found between microfilaremic, occult and negative dogs. (B) Comparison of mean titers (black horizontal bar) \pm SD of anti-DrSA IgE antibodies between microfilaremic, occult and negative dogs. Infected animals had a significantly higher mean titer of IgE antibodies comparing to uninfected individuals.

antibody titers ranging from 2 to 5.3 for IgG (Figs. 1), 3.5 to 4.4 for IgM (Fig. 2A) and 1–2.8 for IgE (Fig. 2B). No differences of IgG, IgM and IgE isotype levels were seen between male and female dogs (Fig. 3).

Because microfilaremic dogs showed IgG titers equal or above 3.2, we considered the titer of 3.2 as a threshold titer for samples to be positive. Among dogs with IgG titers equal or above 3.2, 53 (35%) were PCR negative which indicates that an important proportion of canine subcutaneous dirofilariasis in our study was occult. In support of this positivity threshold, the three dogs with clinically confirmed occult infections all had IgG titers above 3.2 (Fig. 1B). Finally, there were 35 (23.4%) PCR negative dogs with IgG titers below 3.2 that we considered to be uninfected.

Immunoglobulin E titers also significantly differed between the positive (PCR(+)E(+) and PCR(-)E(+)) and the negative groups (Fig. 2B). However, despite significant differences between the infected and uninfected groups there was no clear threshold of IgE titers delineating infection status. Thus, elevated IgE levels may be indicative of infection, but are not suitable for diagnostic purposes (Fig. 2B). Finally, serum IgM did not differ between the negative, PCR(-)E(+) or PCR(+)E(+) groups (Fig. 2A).

To further determine the profile of anti-DrSA IgG subclasses produced in microfilaremic versus occult infections, we investigated the

ratio of IgG1:IgG2 in infected animals (PCR(+)E(+) versus PCR(-)E(+)). Microfilaremic infections occurred more often with higher levels of IgG1 than IgG2. Conversely, dogs with occult infections presented higher levels of IgG2 compared to IgG1 (Fig. 4). Interestingly, infections in female dogs were primarily occult (32 of 49 females), and male dogs were predominantly microfilaremic (37 of 56 males) (Fig. 5). In support of this trend, a recent field study also found a predisposition of male dogs presenting microfilaremic *D. repens* infections [9].

Our study aimed to deepen the knowledge of the antibody immune response during occult and microfilaremic subcutaneous dirofilariasis in naturally infected dogs living in a *D. repens* endemic area. Other studies have reported that in lymphatic filariasis, the IgG response against Mf and adult worm antigens plays an important role in Mf clearance [30]. In light of our IgG findings, it is likely that IgG1 levels increase in response to the presence of adult worms, similar to lymphatic filariasis [30]. Meanwhile, it has been reported that leishmaniosis in dogs is associated with a general increase in all subclasses of IgG and that IgG1 may be a serum marker for active infections, whereas IgG2 could indicate a more advanced infection [25]. In view of this report, it seems likely that the same phenomenon takes place in canine hosts infected with *D. repens*. Fifty five percent of microfilaremic dogs had higher IgG1 than IgG2 antibodies. The difference between IgG1:IgG2 ratio in infected dogs may

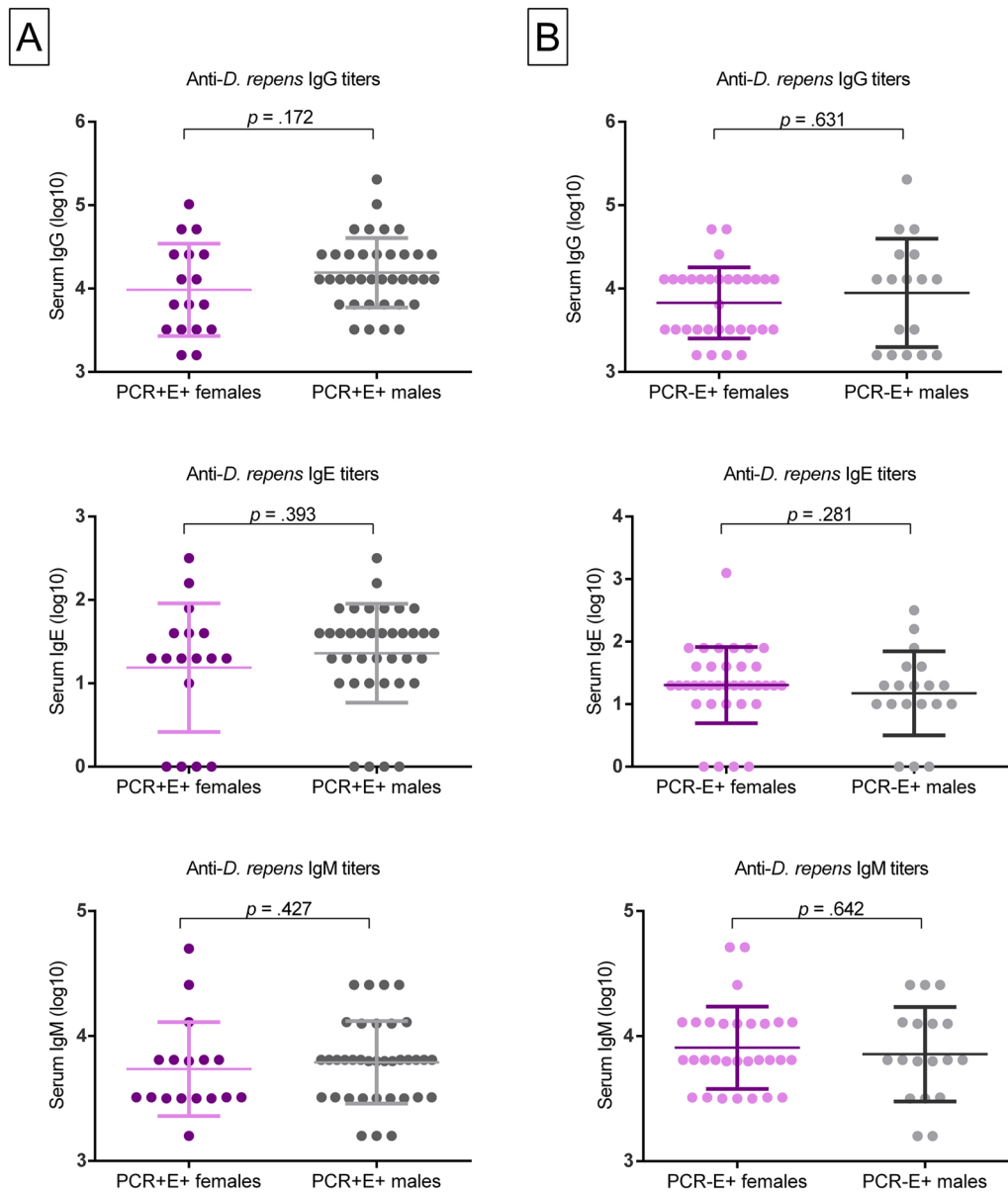


Fig. 3. Comparison of mean titers (horizontal bar) \pm SD of anti-DrSA IgG, IgM and IgE isotype levels between male and female dogs between (A) microfilaremic and (B) occult groups.

be related to the longevity of the infection, which cannot be estimated in naturally infected hosts, but can vary greatly, as the adult worms can live 5–10 years within host tissue [10]. It is therefore very likely that the duration of the disease also influences the host's antibody response. Additionally, *D. repens* carries an obligatory endosymbiont, *Wolbachia pipentis*, and it has been previously reported that IgG antibodies are directed against *Wolbachia pipentis* antigens in dogs experimentally infected with *D. immitis* and *D. repens* [8,23]. However, the immunoproteomic analysis of the DrSA extract used in this study has been previously published by our group and no *Wolbachia* proteins were recognized by serum antibodies from *D. repens* infected dogs [36]. Thus, even if the IgG2 subclass is generally specific for bacterial infections, we ruled out the possibility that the IgG2 antibodies detected in our study are directed against *Wolbachia* antigens.

Moreover, the antibody cross reactivity between *D. repens* and other filarial nematodes reported by Joekel et al. [15] is unlikely to be a factor in our study as *Angiostrongylus vasorum*, *Capillaria aerophila*, *Diptelonea dracunculoides*, *Crenosoma vulpis* or *Acanthoelionema reconditum* have never reported, or are extremely rare in Poland [31]. Furthermore,

Joekel et al. reported that the serum antibodies from dogs infected with *Toxocara canis*, *Trichuris vulpis* and *Ancylostoma caninum* do not cross react with *Dirofilaria* somatic antigens [15]. To conclude, cross-reactions were not a factor negatively influencing the reliability of obtained data.

Immunoglobulin M antibodies are the earliest class appearing in the primary antibody response. El. Sadr et al., observed that IgM and not IgG were responsible for killing *D. immitis* Mf in vitro. Moreover, they reported that *D. immitis* Mf clearance occurred when Mf were incubated in vitro with fresh serum acquired from occult dogs but not in the presence of normal dog serum or serum of microfilaremic individuals [11]. However, in our study the analysis of IgM levels in the three groups did not reveal any significant correlation between infected and uninfected, nor microfilaremic and occult groups. This might be due to the fact that our dogs were naturally infected and living in an area endemic for *D. repens*. Therefore, continuous exposure to *D. repens* may promote a constant production of IgM antibodies. Generally, with prolonged infections, B-cell IgM production is followed by class switching into IgE and IgG. This likely occurs in *D. repens* infected animals as an increase in these classes of antibodies has been observed in our study. Moreover, the

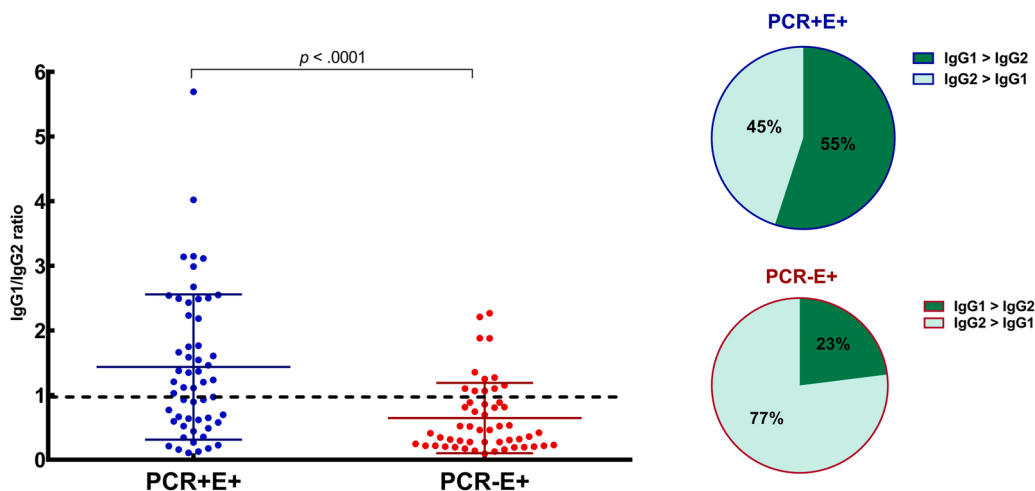


Fig. 4. (A) Comparison of the ratio of IgG1:IgG2 between microfilaremic and occult dogs ($p < .0001$), suggesting different polarization of immune response in microfilaremic compared with occult dogs. (B) Pie chart showing differing predominance of IgG1 or IgG2 isotypes in microfilaremic and (C) occult infections.

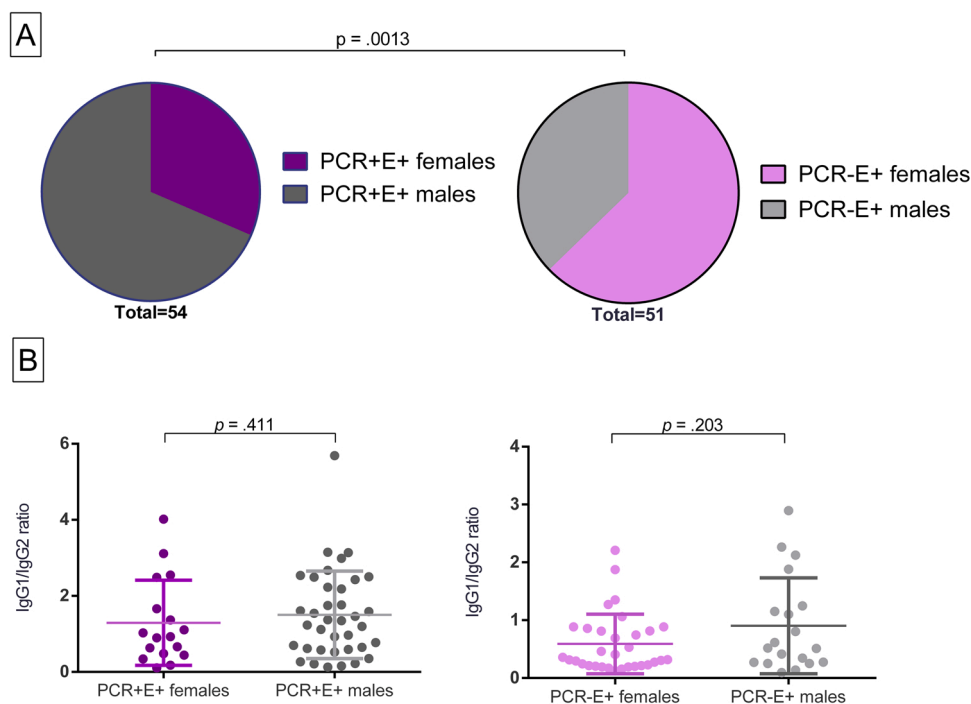


Fig. 5. (A) Comparison of the occurrence of occult and microfilaremic infections in male and female dogs. Female dogs were primarily occult and male dogs were predominantly microfilaremic (Chi-Square, $p = .0013$). (B) Comparison of IgG1:IgG2 ratio between males and females in occult and microfilaremic dogs.

identified antibodies might be natural IgMs, which are characterized by low affinities but broad specificities to foreign structures. That makes them potent in recognizing a variety of antigens and binding to multiple epitopes, perhaps similar to those of adult *D. repens* worms [3].

IgM are commonly known to be involved in the immune response in different infections, yet they are found to be a non-specific biomarker of the disease [1,20,6] in comparison to the IgG isotype [16]. It is important to note however that natural infections occur gradually and likely result from multiple exposures. Therefore, an experimental infection may not reflect the pattern of a natural infection dynamic in endemic regions, where the host is constantly exposed to the pathogen. An investigation similar to our study has been performed on serum samples from humans naturally infected with lymphatic filariasis, and the authors also reported that IgM levels did not differ between infected patients comparing to endemic normals [29].

In studies concerning lymphatic filariasis, IgE antibodies were found to be antigen non-specific [2]. Our study shows that anti-DrSA IgE were detectable in dog sera. In some cases serum-samples assigned to the negative group, had high anti-DrSA IgE levels. However, infected dogs (PCR+E + and PCR-E +) had significantly higher IgE levels than the negative group (Fig. 2B). It has been reported that memory B cells producing specific IgE against filarial nematodes may be present many years after infection in humans [22], but there are no reports on the persistence of IgE following *Dirofilaria* spp. infection. In our study, all sera were collected from dogs living in a region endemic for subcutaneous dirofilariasis and as such the high titers of IgE may be against antigens of an earlier stage of the parasite, perhaps sharing epitopes with adult worms, that could have been eradicated by the host immune response.

Other studies on lymphatic filariasis indicate that an increase in

serum anti-parasite-specific IgE is correlated with the severity of pathology [24]. However, adult worms in lymphatic filariasis locate in the lymphatic vessels causing their occlusion, while in subcutaneous dirofilariasis they locate in the skin therefore capable of limiting the infection by granuloma formation in response to pathogens. Thus, the antibody response during *D. repens* infection likely differs from the antibody response in lymphatic filariasis and it may be the main reason why we did not observe any significant difference in IgE antibodies between microfilaremic and occult phenotypes of the disease (Fig. 2B).

It is believed that in human filarial infections, the parasite potential to infect is related to the immune state of the host [14]. On the other hand, we have recently reported that *D. repens* infections may lead to a state of chronic stress in the canine host, which may influence the outcome of the immune response [34]. This, in accordance to other studies, suggests that the immunosuppression may contribute to the development of intense microfilaremic phenotype of the disease [35]. It seems that the promotion of occult or microfilaremic disease phenotype depends on inter-individual variations and polarization to Th1 or Th2 phenotype of the immune response.

Our studies were conducted on naturally infected mixed-breed dogs allowing us to represent a real-life clinical setting of the antibody response in *D. repens* infection. Future investigations focusing on the occult phenotype may elucidate whether the IgG2 isotype plays a role in Mf clearance in subcutaneous dirofilariasis in dogs. Finally, the detection of parasite-specific IgG class in dog serum may enable the detection of occult subcutaneous dirofilariasis in the canine host. Therefore, our research contributes to a better understanding of the antibody immune response in *D. repens* infections and identifies putative biomarkers of infection status.

Ethical statement: Ethical review and approval were not required because the blood samples were collected for direct benefit of the patients and the analysis was performed on leftover samples (Act of 15th January 2015 on the protection of animals used for scientific purposes). Adult worms were obtained only during surgical procedures and neither of the dogs has been euthanized in order to extract the worms. A verbal consent of the owners' to voluntarily test their animals for subcutaneous dirofilariasis was present for all dogs included in the study. All data were de-identified before running statistical analysis and the entire anonymity of the owners' data has been assured. The director of local dog shelters and the owners of client-owned dogs were informed about the results of *Dirofilaria* testing of the dogs under their care. Doctors of veterinary medicine were provided with all information that could help them to introduce the best treatment to infected dogs.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgments

The authors are grateful to Bayer Animal Health Poland for supplying reagents for ELISA.

References

- H.M. Aboshady, M.J. Stear, A. Johansson, E. Jonas, J.C. Bambou, Immunoglobulins as biomarkers for gastrointestinal nematodes resistance in small ruminants: a systematic review, *Sci. Rep.* 10 (2020) 1–14, <https://doi.org/10.1038/s41598-020-64775-x>.
- S. Babu, T.B. Nutman, Immunopathogenesis of lymphatic filarial disease, *Semin. Immunopathol.* 34 (6) (2012) 847–861, <https://doi.org/10.1007/s00281-012-0346-4>.
- M. Boes, Role of natural and immune IgM antibodies in immune responses, *Mol. Immunol.* 37 (2000) 1141–1149, [https://doi.org/10.1016/s0161-5890\(01\)00025-6](https://doi.org/10.1016/s0161-5890(01)00025-6).
- P.K. Borkowski, G. Rymkiewicz, J. Golebiewska, N. Nestoros, J. Romejko-Jarosinska, H. Zarnowska-Prymek, A. Masny, J. Palucki, D. Cielecka, The first case of human autochthonous subconjunctival dirofilariasis in Poland and MALT lymphoma as possible consequence of this parasitosis, *Infect. Agent. Cancer* 10 (2015) 1–5, <https://doi.org/10.1186/1750-9378-10-1>.
- S.K. Borthakur, D.K. Deka, S. Islam, P.C. Sarmah, Occult dirofilariasis in dogs of North Eastern Region in India, *J. Arthropod. Borne. Dis.* 10 (2015) 92–97.
- A.E.C. Cardoso, A.E.O. Cardoso, C. Talhari, M. Santos, Update on parasitic dermatoses, *An. Bras. Dermatol.* 95 (2020) 1–14, <https://doi.org/10.1016/j.abd.2019.12.001>.
- K. Cheiramaraj, B.C. Harinath, Humoral immune response to infective larval antigen in *Brugia malayi* infected Mastomys natalensis, *Acta Trop.* 48 (1991) 305–312, [https://doi.org/10.1016/0001-706X\(91\)90018-F](https://doi.org/10.1016/0001-706X(91)90018-F).
- L. Ciuca, A. Vismarra, W. Lebon, F. Beugnet, R. Morchon, L. Rinaldi, G. Cringoli, L. Kramer, M. Genchi, New insights into the biology, diagnosis and immune response to *Dirofilaria repens* in the canine host, *Vet. Parasitol.* X 4 (2020), 100029, <https://doi.org/10.1016/j.vpoo.2020.100029>.
- R. Dasanayake, T. Balendran, D. Atapattu, D. Iddawela, A study on canine dirofilariasis in selected areas of Sri Lanka, *BMC Res. Notes* 15 (2022) 1–6, <https://doi.org/10.1186/s13104-022-06024-0>.
- J.H. Diaz, Increasing risks of human dirofilariasis in travelers, *J. Travel Med.* 22 (2015) 116–123, <https://doi.org/10.1111/jtm.12174>.
- W.M. El-Sadr, M. Aikawa, B.M. Greene, In vitro immune mechanisms associated with clearance of microfilariae of *Dirofilaria immitis*, *J. Immunol.* 130 (1983) 428–434.
- C. Genchi, L.H. Kramer, The prevalence of *Dirofilaria immitis* and *D. repens* in the Old World, *Vet. Parasitol.* 280 (2020), 108995, <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2019.108995>.
- G. Gioia, L. Lecová, M. Genchi, E. Ferri, C. Genchi, M. Mortarino, Highly sensitive multiplex PCR for simultaneous detection and discrimination of *Dirofilaria immitis* and *Dirofilaria repens* in canine peripheral blood, *Vet. Parasitol.* 172 (2010) 160–163, <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.04.027>.
- B.M. Greene, G.F. Otto, W.B. Greenough III, Circulating non-human microfilaria in a patient with systemic lupus erythematosus, *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 27 (1978) 905–909, <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1978.27.905>.
- D.E. Joekel, S. Maier, K. Huggel, R. Schaper, P. Deplazes, Specific antibody detection in dogs with filarial infections, *Parasitol. Res.* 116 (2017) S81–S90, <https://doi.org/10.1007/s00436-017-5494-y>.
- S. Kaewmongkol, E. Suwan, T. Sirinarumit, S. Jittapalpong, S.G. Fenwick, G. Kaewmongkol, Detection of specific IgM and IgG antibodies in acute canine monocytic ehrlichiosis that recognize recombinant gp36 antigens, *Heliyon* 6 (2020), e04409, <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04409>.
- M. Khudkowska, L. Pielok, K. Frackowiak, A. Masny, E. Golab, M. Paul, *Dirofilaria repens* infection as a cause of intensive peripheral microfilariemia in a Polish patient: Process description and cases review, *Acta Parasitol.* 63 (2018) 657–663, <https://doi.org/10.1515/ap-2018-0077>.
- A. Kwarteng, S.T. Ahuno, Immunity in filarial infections: lessons from animal models and human studies, *Scand. J. Immunol.* 85 (4) (2017) 251–257, <https://doi.org/10.1111/sji.12533>.
- Y. Laidoudi, D. Ringot, S. Watier-Grillot, B. Davoust, O. Mediannikov, A cardiac and subcutaneous canine dirofilariasis outbreak in a kennel in central France TT - Un foyer de dirofilariose canine cardiaque et sous-cutanée dans un chenil du centre de la France, *Parasite* 26 (2019) 72, <https://doi.org/10.1051/parasite/2019073>.
- P.J. Madeleine, C.M.M. White, R.M.M. White, Regulatory T cells in helminth infection: induction, function and therapeutic potential, *Immunol. Mar.* (2020) 10, <https://doi.org/10.1111/imm.13190>.
- I. Malhotra, J.H. Ouma, A. Wamachi, J. Kioko, P. Mungai, M. Njzovu, J.W. Kazura, C.L. King, Influence of maternal filariasis on childhood infection and immunity to *Wuchereria bancrofti* in Kenya influence of maternal filariasis on childhood infection and immunity to *Wuchereria bancrofti* in Kenya, *Infect. Immun.* 71 (2003) 5231–5237, <https://doi.org/10.1128/IAI.71.9.5231>.
- E. Mitre, T.B. Nutman, IgE memory: Persistence of antigen-specific IgE responses years after treatment of human filarial infections, *J. Allergy Clin. Immunol.* (2006) 939–945, <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2005.12.1341>.
- R. Morchón, E. Carretón, G. Grandi, J. González-Miguel, J.A. Montoya-Alonso, F. Simón, C. Genchi, L.H. Kramer, Anti-Wolbachia surface protein antibodies are present in the urine of dogs naturally infected with *Dirofilaria immitis* with circulating microfilariae but not in dogs with occult infections, *Vector-Borne Zoonot. Dis.* 12 (2012) 17–20, <https://doi.org/10.1089/vbz.2010.0211>.
- N.O. Nielsen, P. Bloch, P.E. Simonsen, Lymphatic filariasis-specific immune responses in relation to lymphoedema grade and infection status. II. Humoral responses, *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 96 (2002) 453–458, [https://doi.org/10.1016/S0035-9203\(02\)90392-5](https://doi.org/10.1016/S0035-9203(02)90392-5).
- A.I. Ollás-Molero, I. Moreno, M.J. Corral, M.D. Jiménez-Antón, M.J. Day, M. Domínguez, J.M. Alunda, Infection of dogs by *Leishmania infantum* elicits a general response of IgG subclasses, *Sci. Rep.* 10 (2020) 18826, <https://doi.org/10.1038/s41598-020-75569-6>.
- S. Pampiglione, F. Rivasi, G. Angeli, R. Boldorini, R.M. Incensati, M. Pastormerlo, M. Pavesi, A. Ramponi, *Dirofilaria repens* in Italy, an emergent zoonosis: report of 60 new cases, *Histopathology* 38 (2001) 344–354, <https://doi.org/10.1046/j.1365-2559.2001.01099.x>.
- Paździor-Czapula, K., Otrocka-Domagala, I., Myrdek, P., Mikiwicz, M., Gesek, M., 2018. *Dirofilaria repens* — An etiological factor or an incidental finding in cytologic and histopathologic biopsies from dogs 307–311. <https://doi.org/10.1111/vcp.12597>.

- [28] G. Petry, M. Genchi, H. Schmidt, R. Schaper, B. Lawrenz, C. Genchi, Evaluation of the adulticidal efficacy of imidacloprid 10%/Moxidectin 2.5% (w/v) Spot-on (Advocate®, Advantage® Multi) against *Dirofilaria repens* in experimentally infected dogs, *Parasitol. Res.* 114 (2015) 131–144, <https://doi.org/10.1007/s00436-015-4519-7>.
- [29] U.F. Prodjinotho, C. von Horn, A.Y. Debrah, L. Batsa Debrah, A. Albers, L. E. Layland, A. Hoerauf, T. Adjobimey, Pathological manifestations in lymphatic filariasis correlate with lack of inhibitory properties of IgG4 antibodies on IgE-activated granulocytes, *PLoS Negl. Trop. Dis.* 11 (2017) 1–25, <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005777>.
- [30] P.K. Sahoo, S.K. Panda, A.K. Satapathy, S. Pati, Anti-filarial immunity blocks parasite development and plays a protective role, *PLoS One* 13 (2018) 1–9, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0199090>.
- [31] M. Schnyder, R. Schaper, N. Pantchev, D. Kowalska, A. Szwedko, P. Deplazes, *Angiostrongylus vasorum* antigen- and parasite-specific antibodies, *Parasitol. Res.* (2013) 109–117, <https://doi.org/10.1007/s00436-013-3285-7>.
- [32] L. Stogdale, Testing for occult heartworm infection, *Can. Vet. J.* 25 (1984) 171–174.
- [33] G.J. Weil, *Dirofilaria immitis*: identification and partial characterization parasite antigens in the serum of infected dogs, *Exp. Parasitol.* 64 (1987) 244–251, [https://doi.org/10.1016/0014-4894\(87\)90149-4](https://doi.org/10.1016/0014-4894(87)90149-4).
- [34] M.E. Wyszomolek, A. Dobrzyński, E. Długosz, M. Czopowicz, M. Wiśniewski, P. Jurka, M. Klockiewicz, Hematological and biochemical changes in dogs naturally infected with *Dirofilaria repens*, *Front. Vet. Sci.* 7 (2020) 1–8, <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.00590>.
- [35] M.E. Wyszomolek, M. Klockiewicz, M. Sobczak-Filipiak, E. Długosz, M. Wiśniewski, Case studies of severe microfilaremia in four dogs naturally infected with *Dirofilaria repens* as the primary disease or a disease complicating factor, *Front. Vet. Sci.* 7 (2020) 1–6, <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.577466>.
- [36] A. Zawistowska-Deniziak, K. Powazka, M. Pękacz, K. Basałaj, M. Klockiewicz, M. Wiśniewski, D. Młocicki, Immunoproteomic analysis of *Dirofilaria repens* microfilariae and adult parasite stages, *Pathogens* 10 (2021) 1–18, <https://doi.org/10.3390/pathogens10020174>.

9. Deklaracje współautorów

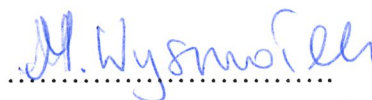
Warszawa, dn. 29.09.2022

Lek. wet. Magdalena E. Wyszmołek
Zakład Parazytologii i Chorób Inwazyjnych, KNP
IMW, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego
Tel. +225936052
Email: magdalena_wyszmołek@sggw.edu.pl

Oświadczenie o współautorstwie

Oświadczam, że mój wkład w powstanie pracy:

Wyszmołek M.E., Dobrzyński A., Długosz E., Czopowicz M., Wiśniewski M., Jurka P., Klockiewicz M. *Hematological and biochemical changes in dogs naturally infected with *Dirofilaria repens**. Front Vet Sci. 2020 Sep 10;7:590, doi: 10.3389/fvets.2020.00590. eCollection 2020 polegał na uczestnictwie w konceptualizacji badania, wykonaniu multipleks PCR, interpretacji wyników analizy statystycznej oraz napisanie publikacji, co stanowi 43% pracy.



Podpis

Warszawa, dn. 29.09.2022

Dr Artur Dobrzyński
Katedra Chorób Małych Zwierząt i Klinika
IMW, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego
Tel. +225936052
Email: artur_dobrzynski@sggw.edu.pl

Oświadczenie o współautorstwie

Oświadczam, że mój wkład w powstanie pracy:

Wysmołek M.E., **Dobrzyński A.**, Długosz E., Czopowicz M., Wiśniewski M., Jurka P., Klockiewicz M. *Hematological and biochemical changes in dogs naturally infected with *Dirofilaria repens** Front Vet Sci. 2020 Sep 10;7:590, doi: 10.3389/fvets.2020.00590. eCollection 2020 polegał na uczestnictwie w konceptualizacji badania, zgromadzeniu bazy danych pacjentów, wykonaniu rozmazów krwi oraz analizie wyników, co stanowi 42% pracy.



Podpis

Warszawa, dn. 29.09.2022

Dr inż. Ewa Długosz

Zakład Parazytologii i Chorób Inwazyjnych, KNP

IMW, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego

Tel. +225936052

Email: ewa_dlugosz@sggw.edu.pl

Oświadczenie o współautorstwie

Oświadczam, że mój wkład w powstanie pracy:

Wysmołek M.E., Dobrzyński A., **Długosz E.**, Czopowicz M., Wiśniewski M., Jurka P., Klockiewicz M. *Hematological and biochemical changes in dogs naturally infected with *Dirofilaria repens** Front Vet Sci. 2020 Sep 10;7:590, doi: 10.3389/fvets.2020.00590. eCollection 2020 polegał na krytycznej ocenie analizy wyników badań oraz edycji manuskryptu, co stanowi 2% pracy.

.....
E. Długosz

Podpis

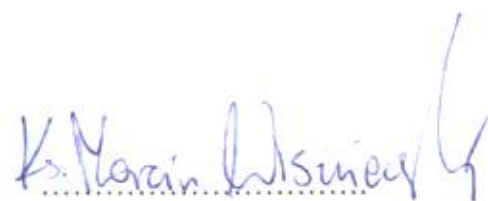
Warszawa, dn. 29.09.2022

Ks. dr hab. inż. Marcin Wiśniewski
Zakład Parazytologii i Chorób Inwazyjnych, KNP
IMW, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego
Tel. +225936044
Email: marcin_wisniewski@sggw.edu.pl

Oświadczenie o współautorstwie

Oświadczam, że mój wkład w powstanie pracy:

Wysmołek M.E., Dobrzyński A., Długosz E., Czopowicz M., **Wiśniewski M.**, Jurka P., Klockiewicz M. *Hematological and biochemical changes in dogs naturally infected with *Dirofilaria repens** Front Vet Sci. 2020 Sep 10;7:590, doi: 10.3389/fvets.2020.00590. eCollection 2020 polegał na krytycznej ocenie analizy wyników badań oraz edycji manuskryptu, co stanowi 2% pracy.



Podpis

Warszawa, dn. 29.09.2022 r.

Dr Maciej Klockiewicz

Zakład Parazytologii i Chorób Inwazyjnych, KNP

IMW, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

tel. +225936049

e-mail: maciej_klockiewicz@sggw.edu.pl

Oświadczenie o współautorstwie

Oświadczam, że mój wkład w powstanie pracy:

Wysmołek M.E., Dobrzyński A., Długosz E., Czopowicz M., Wiśniewski M., Jurka P., **Klockiewicz M.** *Hematological and biochemical changes in dogs naturally infected with *Dirofilaria repens** Front Vet Sci. 2020 Sep 10;7:590, doi: 10.3389/fvets.2020.00590. eCollection 2020 polegał na zgromadzeniu bazy danych pacjentów, wykonaniu rozmazów krwi, analizie wyników, co stanowi 5% pracy.



Podpis

Warszawa, dn. 29.09.2022

Lek. wet. Magdalena E. Wyszmołek
Zakład Parazytologii i Chorób Inwazyjnych, KNP
IMW, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego
Tel. +225936052
Email: magdalena_wyszmołek@sggw.edu.pl

Oświadczenie o współautorstwie

Oświadczam, że mój wkład w powstanie pracy:

Wyszmołek M.E., Klockiewicz M., Sobczak-Filipiak M., Długosz E., Wiśniewski M. *Case studies of severe microfilaremia in four dogs naturally infected with *Dirofilaria repens* as the primary disease or a disease complicating factor* Front Vet Sci. 2020 Sep 22;7:577466. doi: 10.3389/fvets.2020.577466 polegał na konceptualizacji badania, przeprowadzeniu analizy wyników oraz napisaniu publikacji co stanowi 86% pracy.



Podpis

Warszawa, dn. 29.09.2022. r.

Dr Maciej Klockiewicz

Zakład Parazytologii i Chorób Inwazyjnych, KNP

IMW, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

tel. +225936049

e-mail: maciej_klockiewicz@sggw.edu.pl

Oświadczenie o współautorstwie

Oświadczam, że mój wkład w powstanie pracy:

Wysmołek M.E., **Klockiewicz M.**, Sobczak-Filipiak M., Długosz E., Wiśniewski M. *Case studies of severe microfilaremia in four dogs naturally infected with *Dirofilaria repens* as the primary disease or a disease complicating factor* Front Vet Sci. 2020 Sep 22;7:577466. doi: 10.3389/fvets.2020.577466 polegał na krytycznej ocenie analizy wyników badań oraz edycji manuskryptu co stanowi 3% pracy.



Podpis

Warszawa, dn. 29.09.2022

dr hab. Małgorzata Sobczak-Filipiak

Katedra Patologii i Diagnostyki Weterynaryjnej

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego

tel. +225936158

e-mail: malgorzata_sobczak_filipiak@sggw.edu.pl

Oświadczenie o współautorstwie

Oświadczam, że mój wkład w powstanie pracy:

Wysmołek M.E., Klockiewicz M., **Sobczak-Filipiak M.**, Długosz E., Wiśniewski M. *Case studies of severe microfilaremia in four dogs naturally infected with *Dirofilaria repens* as the primary disease or a disease complicating factor* Front Vet Sci. 2020 Sep 22;7:577466. doi: 10.3389/fvets.2020.577466 polegał na przeprowadzeniu sekcji pośmiertnej oraz badań histopatologicznych co stanowi 5% pracy.



Podpis

Warszawa, dn. 29.09.2022

Dr inż. Ewa Długosz

Zakład Parazytologii i Chorób Inwazyjnych, KNP

IMW, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego

Tel. +225936052

Email: ewa_dlugosz@sggw.edu.pl

Oświadczenie o współautorstwie

Oświadczam, że mój wkład w powstanie pracy:

Wysmołek M.E., Klockiewicz M., Sobczak-Filipiak M., **Długosz E.**, Wiśniewski M. *Case studies of severe microfilaremia in four dogs naturally infected with *Dirofilaria repens* as the primary disease or a disease complicating factor* Front Vet Sci. 2020 Sep 22;7:577466. doi: 10.3389/fvets.2020.577466 polegał na krytycznej ocenie przeprowadzonej analizy wyników oraz edycji manuskryptu co stanowi 3% pracy.

.....
EDługosz.....

Podpis

Warszawa, dn. 29.09.2022

Ks. dr hab. inż. Marcin Wiśniewski
Zakład Parazytologii i Chorób Inwazyjnych, KNP
IMW, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego
Tel. +225936044
Email: marcin_wisniewski@sggw.edu.pl

Oświadczenie o współautorstwie

Oświadczam, że mój wkład w powstanie pracy:

Wysmołek M.E., Klockiewicz M., Sobczak-Filipiak M., Długosz E., **Wiśniewski M.** *Case studies of severe microfilaremia in four dogs naturally infected with Dirofilaria repens as the primary disease or a disease complicating factor* Front Vet Sci. 2020 Sep 22;7:577466. doi: 10.3389/fvets.2020.577466 polegał na krytycznej ocenie przeprowadzonej analizy wyników oraz edycji manuskryptu co stanowi 3% pracy.



Podpis

Warszawa, dn. 29.09.2022

Lek. wet. Magdalena E. Wyszmołek
Zakład Parazytologii i Chorób Inwazyjnych, KNP
IMW, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego
Tel. +225936052
Email: magdalena_wyszmołek@sggw.edu.pl

Oświadczenie o współautorstwie

Oświadczam, że mój wkład w powstanie pracy:

Wyszmołek M.E., Klockiewicz M., Długosz E., Wiśniewski M. *Canine antibody response against *Dirofilaria repens* in natural occult and microfilaremic infections, Comp Immunol Microbiol Infect Dis. 2022 Jul;86:101818. doi: 10.1016/j.cimid.2022.101818* polegał na konceptualizacji badania, wykonaniu części doświadczalnej (ELISA, PCR), analizie statystycznej wyników oraz napisaniu publikacji co stanowi 86% pracy.



Podpis

Warszawa, dn. 29.09.2022. r.

Dr Maciej Klockiewicz

Zakład Parazytologii i Chorób Inwazyjnych, KNP

IMW, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

Tel. +225936049

e-mail: maciej_klockiewicz@sggw.edu.pl

Oświadczenie o współautorstwie

Oświadczam, że mój wkład w powstanie pracy:

Wysmołek M.E., **Klockiewicz M.**, Długosz E., Wiśniewski M. *Canine antibody response against *Dirofilaria repens* in natural occult and microfilaremic infections*, *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 2022 Jul;86:101818. doi: 10.1016/j.cimid.2022.101818 polegał na zgromadzeniu próbek krwi, wykonaniu rozmazów krwi oraz krytycznej edycji manuskryptu co stanowi 4% pracy.



Podpis

Warszawa, dn. 29.09.2022

Dr inż. Ewa Długosz

Zakład Parazytologii i Chorób Inwazyjnych, KNP

IMW, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego

Tel. +225936052

Email: ewa_dlugosz@sggw.edu.pl

Oświadczenie o współautorstwie

Oświadczam, że mój wkład w powstanie pracy:

Wysmołek M.E., Klockiewicz M., **Długosz E.**, Wiśniewski M. *Canine antibody response against Dirofilaria repens in natural occult and microfilaremic infections, Comp Immunol Microbiol Infect Dis. 2022 Jul;86:101818. doi: 10.1016/j.cimid.2022.101818* polegał na konceptualizacji badania oraz krytycznej edycji manuskryptu co stanowi 8% pracy.

.....
EDługosz

Podpis

Warszawa, dn. 29.09.2022

Ks. dr hab. inż. Marcin Wiśniewski
Zakład Parazytologii i Chorób Inwazyjnych, KNP
IMW, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego
Tel. +225936044
Email: marcin_wisniewski@sggw.edu.pl

Oświadczenie o współautorstwie

Oświadczam, że mój wkład w powstanie pracy:

Wysmołek M.E., Klockiewicz M., Długosz E., **Wiśniewski M.** *Canine antibody response against *Dirofilaria repens* in natural occult and microfilaremic infections, Comp Immunol Microbiol Infect Dis. 2022 Jul;86:101818. doi: 10.1016/j.cimid.2022.101818* polegał na krytycznej edycji manuskryptu co stanowi 2% pracy.



Podpis

Wyrażam zgodę na udostępnienie mojej pracy w czytelniach Biblioteki SGGW
w tym w Archiwum Prac Dyplomowych SGGW

M. Wyszniak
.....
(czytelny podpis autora pracy)

