



Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego

w Warszawie

Instytut Medycyny Weterynaryjnej

Mateusz Pękacz

**Badanie molekularnych interakcji antygenu Dr20/22
Dirofilaria repens w układzie pasożyt – żywiciel oraz
wytypowanie nowego narzędzia diagnostycznego
dirofilariozy skórnej**

Investigation of the *Dirofilaria repens* Dr20/22 antigen in the parasite-host
relationship and selection of a new diagnostic tool for subcutaneous
dirofilariosis

Rozprawa doktorska

Doctoral thesis

Rozprawa doktorska wykonana pod kierunkiem

Ks. dr. hab. Marcina Wiśniewskiego, prof. SGGW
Zakład Parazytologii i Chorób Inwazyjnych,
Katedra Nauk Przedklinicznych, Instytut Medycyny Weterynaryjnej,
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

Dr hab. inż. Anny Zawistowskiej-Deniziak
Zakład Immunologii, Instytut Zoologii Doświadczalnej,
Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski

Warszawa 2025

Oświadczenie promotora rozprawy doktorskiej

Oświadczam, że niniejsza rozprawa została przygotowana pod moim kierunkiem i stwierdzam, że spełnia warunki do przedstawienia jej w postępowaniu o nadanie stopnia naukowego doktora.

Data 29.01.2025r.

Czytelny podpis promotora Lawicki - Denisek Anna

K. Kowalski

Oświadczenie autora rozprawy doktorskiej

Świadom/a odpowiedzialności prawnej, w tym odpowiedzialności karnej za złożenie fałszywego oświadczenia, oświadczam, że niniejsza rozprawa doktorska została napisana przez mnie samodzielnie i nie zawiera treści uzyskanych w sposób niezgodny z obowiązującymi przepisami prawa, w szczególności z ustawą z dnia 4 lutego 1994 r. o prawie autorskim i prawach pokrewnych (tj. z dnia 28 października 2022 r., Dz.U. z 2022 r. poz. 2509 ze zm.).

Oświadczam, że przedstawiona rozprawa nie była wcześniej podstawą żadnej procedury związanej z uzyskaniem stopnia naukowego doktora.

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

Przyjmuję do wiadomości, że rozprawa doktorska poddana zostanie procedurze antyplagiatowej.

Data 29.01.2025r.

Czytelny podpis autora rozprawy M. Jędrzejko

Szczególne podziękowania składam:

Ks. dr. hab. inż. Marcinowi Wiśniewskiemu
za zaszczerpie nie we mnie naukowej ciekawości

Dr hab. inż. Annie Zawistowskiej-Deniziak
za opiekę, inspirację i wskazanie drogi

Kamilowi
za dobre słowo w chwilach zwątpienia

Rodzicom
za wychowanie i przekazane wartości

Żonie Anecie,
za wszystko - bez niej ta praca nigdy by nie powstała

Dziękuję.

Streszczenie

Dirofilarioza jest przenoszona przez komary parazytą mięsożernych, wywołowaną przez inwazję nicieni z rodzaju *Dirofilaria*. Dwoma najbardziej istotnymi gatunkami, z punktu widzenia medycyny weterynaryjnej oraz medycyny człowieka, są *Dirofilaria repens* oraz *Dirofilaria immitis*, będące czynnikami etiologicznymi odpowiednio dirofilariozy skórnej oraz sercowo-płucnej. Na skutek zmian klimatycznych oraz działalności człowieka dirofilarioza stała się jedną z najszybciej rozprzestrzeniających się chorób wektorowych w Europie. *D. repens* wykazuje przy tym wysoki potencjał zoonotyczny, będąc odpowiedzialnym za większość inwazji u ludzi. Mimo to na przestrzeni lat gatunek ten wzbudzał niewielkie zainteresowanie badawcze, co przekłada się na ograniczoną wiedzę dotyczącą biologii pasożyta i problematyczną diagnostykę. Identyfikacja i charakterystyka białek pasożyta może przyczynić się zarówno do lepszego poznania mechanizmów inwazji, jak i do opracowania nowych metod diagnostycznych oraz rozwoju potencjalnych strategii zapobiegania dirofilariozie. W pierwszym artykule wchodzącym w skład niniejszej pracy dokonano molekularnej charakterystyki antygenu Dr20/22 *Dirofilaria repens*, omówiono potencjalne mechanizmy zaangażowane w regulację ekspresji genu pasożyta, takie jak transplicing zależny od sekwencji liderowej (SLTS) oraz podjęto próbę wykorzystania rekombinowanej formy antygenu jako potencjalnego markera dirofilariozy skórnej. Kolejnym zgłębnym w rozprawie zagadnieniem było poznanie roli Dr20/22 w procesie inwazji. Wykorzystując model ludzkich komórek dendrytycznych pochodzenia monocytarnego (moDC), zbadano wpływ rDr20/22 na proces ich dojrzewania oraz funkcjonalność. W drugim artykule opisano zastosowanie technologii „phage display” w celu wytypowania krótkiego peptydu, który mógłby zostać wykorzystany jako alternatywny marker dirofilariozy, a także wykazano możliwość wykrycia cfDNA (cell-free DNA) *D. repens* w surowicy zarażonych psów. W dalszym etapie dokonano walidacji metody Real-Time PCR w celu umożliwienia molekularnego różnicowania inwazji *D. repens* od *D. immitis* i *A. reconditum* oraz określono aktualną prevalencję filarii w populacji bezdomnych psów i kotów w Ukrainie. W ostatnim manuskrypcie przedstawiono opis przypadku rodzimej inwazji mieszanej *D. repens* i *D. immitis* u psa w Polsce oraz przeprowadzono dyskusję nad skutecznością praktykowanych metod diagnostycznych i możliwości endemizacji na terenie kraju dirofilariozy sercowo-płucnej.

Słowa kluczowe: dirofilarioza, diagnostyka, Dr20/22, komórki dendrytyczne

Summary

Dirofilariosis is a mosquito-transmitted parasitic disease that affects carnivores, caused by infections with nematodes from the *Dirofilaria* genus. The two most important species from both veterinary and human medical perspectives are *Dirofilaria repens* and *Dirofilaria immitis*, which are responsible for subcutaneous and cardiopulmonary dirofilariosis, respectively. Due to climate change and human activity dirofilariosis has become one of the fastest-spreading vector-borne diseases in Europe. *D. repens*, in particular, exhibits a high zoonotic potential, being responsible for the majority of human infections. However, over the years, this species has attracted little research interest, leading to limited knowledge regarding the parasite's biology and problematic diagnostics. The identification and characterization of the parasite's molecules could contribute to a better understanding of the invasion mechanisms, as well as the development of new diagnostic methods and the advancement of potential strategies for preventing dirofilariosis. The first article in this thesis focuses on the molecular characterization of the *Dirofilaria repens* antigen Dr20/22. It explores potential mechanisms involved in the regulation of parasite gene expression, such as leader sequence-dependent trans-splicing (SLTS), and investigates the recombinant antigen's potential as a marker for subcutaneous dirofilariosis. Another key area examined in the dissertation is the role of Dr20/22 in the invasion process. Using a model of human monocyte-derived dendritic cells (moDCs), the effect of rDr20/22 on their maturation and functionality was investigated. The second article describes the use of "phage display" technology to identify a short peptide that could be used as an alternative marker for dirofilariosis, as well as demonstrating the possibility of detecting *D. repens*-specific cfDNA (cell-free DNA) in the serum of infected dogs. The Real-Time PCR method was also validated for molecular differentiation between infections caused by *D. repens*, *D. immitis*, and *A. reconditum*, and the current prevalence of filariae in stray dogs and cats in Ukraine was assessed. The final manuscript presents a case report of an autochthonous *D. immitis* infection in a dog in Poland, along with a discussion of the effectiveness of current diagnostic practices and the potential for endemic establishment of the species within the country.

Keywords: dirofilariosis, diagnostics, Dr20/22, dendritic cells

Spis treści

STRESZCZENIE.....	7
SUMMARY	9
LISTA ARTYKUŁÓW ZAMIESZCZONYCH W PRACY DOKTORSKIEJ WRAZ Z DANymi BIBLIOGRAFICZNYMI:	11
WYKAZ SKRÓTÓW:	13
1. WSTĘP	17
2. CELE PRACY	29
3. ARTYKUŁY OPUBLIKOWANE	30
ARTYKUŁ 1.....	30
ARTYKUŁ 2.....	32
ARTYKUŁ 3.....	34
4. WYNIKI NIEOPUBLIKOWANE – CZĘŚĆ I.....	36
4.1. UZASADNIENIE PODJĘCIA BADAŃ	36
4.2. MATERIAŁY I METODY	38
4.2.1. Izolacja jednojądrzastych komórek krwi obwodowej człowieka.....	38
4.2.2. Izolacja monocytów	38
4.2.3. Izolacja dziewiczych limfocytów T CD4 ⁺	39
4.2.4. Hodowla komórek dendrytycznych oraz stymulacja rDr20/22	39
4.2.5. Analiza stężenia wybranych cytokin	41
4.2.6. Analiza profilu cytokin przy użyciu Human Proteome Profiler XL.....	41
4.2.7. Analiza poziomu markerów powierzchniowych przy użyciu cytometrii przepływowej.....	42
4.2.8. Badanie procesu pobierania wyznakowanych fluorescencyjnie biocząsteczek E. coli przez DCs	44
4.2.9. Założenie kultury mieszanej DCs z dziewiczymi limfocytami CD4 ⁺ oraz analiza proliferacji	44
4.2.10. Analiza statystyczna.....	45
4.3. WYNIKI	46
4.3.1. Analiza profilu cytokin wydzielanych przez DCs stymulowane rDr20/22	46

4.3.2. Analiza poziomu markerów powierzchniowych DCs stymulowanych rDr20/22	47
4.3.3. Analiza zmian funkcjonalności DCs stymulowanych rDr20/22.....	48
4.4. DYSKUSJA	50
5. WYNIKI NIEOPUBLIKOWANE - CZĘŚĆ II.....	56
5.1 UZASADNIENIE BADAŃ	56
5.2. MATERIAŁY I METODY	58
5.2.1. Izolacja DNA genomowego i qPCR.....	58
5.2.2. Ocena czułości i specyficzności reakcji	61
5.2.3. Ocena ogólnej prevalencji oraz czynników ryzyka inwazji filarioz u psów..	61
5.2.4. Analiza statystyczna	64
5.3. WYNIKI.....	65
5.3.1. Ogólna prevalencja filarioz oraz analiza czynników ryzyka u psów	65
5.3.2. Ogólna prevalencja filarioz u kotów.....	69
5.3.3 Ocena czułości i specyficzności reakcji	69
5.4 DYSKUSJA	72
6. WNIOSKI KOŃCOWE	77
7. BIBLIOGRAFIA.....	78

Lista artykułów zamieszczonych w pracy doktorskiej wraz z danymi bibliograficznymi:

Artykuł 1

Pękacz M., Basałaj K., Młocicki D., Kamaszewski M., Carretón E., Morchón R., Wiśniewski M., Zawistowska-Deniziak A. (2024). Molecular insights and antibody response to Dr20/22 in dogs naturally infected with *Dirofilaria repens*. Scientific reports, 14(1), 12979. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-63523-9>

IF=3,8; 140 pkt. MNiE

Artykuł 2

Pękacz M., Basałaj K., Kalinowska A., Klockiewicz M., Stopka D., Baska P., Długosz E., Karabowicz J., Młocicki D., Wiśniewski M., Zawistowska-Deniziak A. (2022). Selection of new diagnostic markers for *Dirofilaria repens* infections with the use of phage display technology. Scientific reports, 12(1), 2288. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-06116-8>

IF=3,8; 140 pkt. MNiE

Artykuł 3

Pękacz M., Basałaj K., Miterpáková M., Rusiecki Z., Stopka D., Graczyk D., Zawistowska-Deniziak A. (2024). An unexpected case of a dog from Poland co-infected with *Dirofilaria repens* and *Dirofilaria immitis*. BMC veterinary research, 20(1), 66. <https://doi.org/10.1186/s12917-024-03921-3>

IF=2,3; 140 pkt. MNiE

Łączny współczynnik Impact Factor (IF) publikacji składających się na rozprawę doktorską wynosi **IF=9,9**, a ich łączna punktacja to **420 pkt.** według kryteriów Ministra Nauki. Punktacja jest zgodna z aktualnym wykazem Journal Citation Reports oraz komunikatem Ministra Nauki z dnia 5 stycznia 2024 r. w sprawie wykazu czasopism naukowych i recenzowanych materiałów z konferencji międzynarodowych.

Wykaz skrótów:

ADCC - cytotoksyczność zależna od przeciwciał (z ang. antibody dependent cell-mediated cytotoxicity)

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

BAFF - czynnik aktywujący limfocyty B należący do rodziny TNF (z ang. B cell activating factor belonging to the tumor necrosis factor family)

BAFF-R - receptor czynnika aktywującego limfocyty B (z ang. B-cell activating factor receptor)

BCMA - antygen dojrzewania komórek B (z ang. B-cell maturation antigen)

C1q - składowa układu dopełniacza 1q (z ang. complement component 1q)

CD - kompleks różnicowania (z ang. cluster of differentiation)

cdNA - komplementarny DNA (z ang. complementary DNA)

cfDNA - wolnokrążący DNA (z ang. cell-free DNA)

CI – przedziały ufności (z ang. confidence intervals)

COX1 - podjednostka 1 oksydazy cytochromu c (z ang. cytochrome c oxidase subunit I)

cytB - cytochrom b (z ang. cytochrome b)

CXCL - ligand chemokiny CXC (z ang. chemokine (C-X-C motif) ligand)

CXCR3 - receptor chemokiny CXC 3 (z ang. CXC motif chemokine receptor 3)

DCs - komórki dendrytyczne (z ang. dendritic cells)

DDC – komórki dendrytyczne skóry (z ang. dermal dendritic cells)

Dkk-1 - z ang. Dickkopf-related protein 1

DNA - kwas deoksyrybonukleinowy (z ang. deoxyribonucleic acid)

DPBS - buforowany roztwór soli fizjologicznej Dulbecco (z ang. Dulbecco's phosphate buffered saline)

DrSA - ekstrakt białek somatycznych *Dirofilaria repens* (z ang. *Dirofilaria repens* somatic antigen)

ELISA - test immunoenzymatyczny (z ang. enzyme-linked immunosorbent assay)

ES - produkty ekskrecyjno-sekrecyjne (z ang. excretory-secretory products)

ESCCAP - Europejska Rada Konsultacyjna do Spraw Parazytoz Zwierząt Towarzyszących (z ang. European Scientific Counsel Companion Animal Parasites)

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

Fzd - receptory Frizzle (z ang. frizzled receptors)

gDNA - DNA genomowy (z ang. genomic DNA)

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

HBSS - zrównoważony roztwór soli Hanksa (z ang. Hank's balanced salt solution)

HDU - jednostka wykorzystywana w sezonowym modelu transmisji dirofilariozy (z ang. heartworm development unit)

HLA-DR - ludzki antygen leukocytarny izotyp DR (z ang. human leukocyte antigen – DR isotype)

IFN - interferon

Ig - immunoglobulina

IL - interleukina (z ang. interleukin)

ILC2 - nieswoiste komórki limfoidalne typu 2 (z ang. type 2 innate lymphoid cells)

ILT3 - immunoglobulinopodobny transkrypt 3 (z ang. immunoglobulin-like transcript 3)

ITS - wewnętrzny region niekodujący (z ang. internal transcribed spacer)

LEF - czynnik wzmacniający komórki limfoidalne (z ang. lymphoid enhancer factor family)

LPS - lipopolisacharyd (z ang. lipopolysaccharide)

LRP - białko pokrewne receptorowi lipoproteiny o niskiej gęstości (z ang. low-density lipoprotein receptor-related protein)

Mf - mikrofilarie (z ang. microfilariae)

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

moDC - komórki dendrytyczne pochodzenia monocytarnego (z ang. monocyte-derived dendritic cells)

mRNA - matrycowy RNA (z ang. messenger RNA)

NF- κ B - jądrowy czynnik transkrypcyjny NF kappa B (z ang. nuclear factor kappa-light-chain enhancer of activated B cells)

NGO - organizacje pozarządowe (z ang. non-governmental organization)

MAMP - molekularne wzorce związane z mikroorganizmami (z ang. microbe-associated molecular patterns)

PBMC - jednojądrzaste komórki krwi obwodowej (z ang. peripheral blood mononuclear cell)

PCR - reakcja łańcuchowa polimerazy (z ang. polymerase chain reaction)

PD-L1 - ligand receptora programowanej śmierci 1 (z ang. programmed death-ligand 1)

PGE2 - prostaglandyna E2 (z ang. prostaglandin E2)

PLA2 - fosfolipaza A2 (z ang. phospholipase A2)

PRR - receptory rozpoznające wzorce (z ang. pattern recognition receptors)

qPCR – ilościowa reakcja łańcuchowa polimerazy w czasie rzeczywistym (z ang. quantitative polymerase chain reaction)

S16 - (z ang. 16S ribosomal RNA)

SL - sekwencja liderowa (z ang. spliced leader)

SLTS - trans-splicing zależny od sekwencji liderowej (z ang. spliced leader trans-splicing)

rDr20/22 - rekombinowany Dr20/22

RPMI - podłoże do hodowli komórkowych RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute)

RPL37A - rybosomalne białko L37A (z ang. ribosomal protein L37A)

RT - temperatura pokojowa (z ang. room temperature)

TACI - aktywator transbłonowy i interaktor białkowy CAML (z ang. transmembrane activator and calcium-modulating cyclophilin ligand interactor)

TCF - czynnik transkrypcyjny komórek T (z ang. T cell factor)

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

Th - limfocyty T pomocnicze (z ang. T helper cells)

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

Tm - temperatura topnienia (z ang. melting curve)

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

Tol-DC - tolerogenne komórki dendrytyczne (z ang. tolerogenic dendritic cells)

Tr1 - limfocyty T regulatorowe typu 1 (z ang. type 1 regulatory cells)

TRAIL - ligand czynnika martwicy nowotworu indukującego apoptozę (z ang. tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand)

Treg - limfocyty T regulatorowe (z ang. regulatory T cells)

TSLP - limfopoetyna zrębu grasicy (z ang. thymic stromal lymphopoietin)

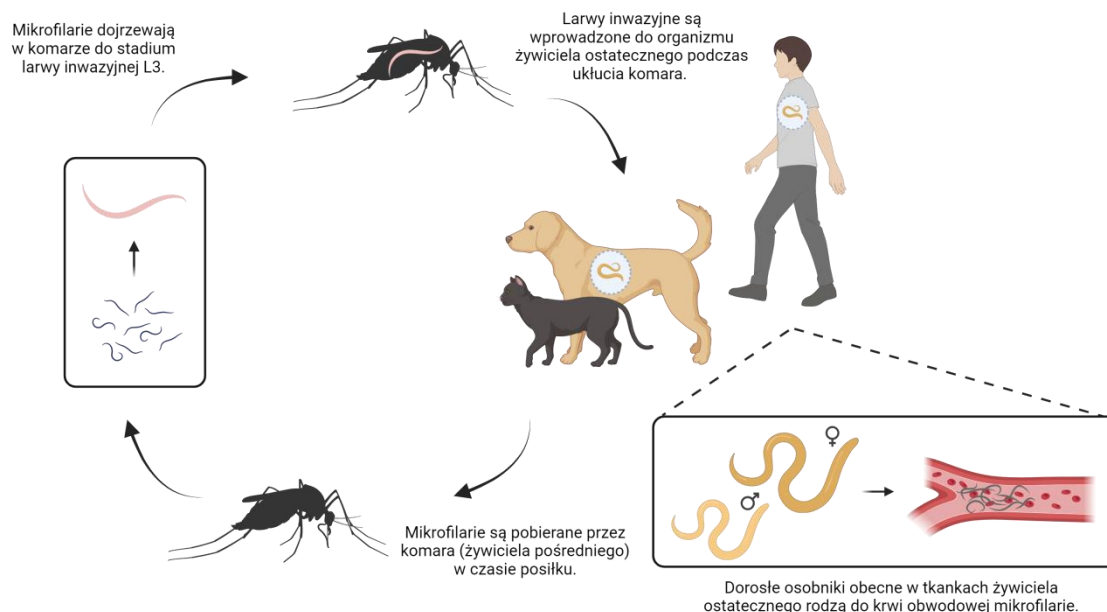
UNHCR - Wysoki Komisarz Narodów Zjednoczonych ds. Uchodźców (z ang. United Nations High Commissioner for Refugees)

Wnt - rodzina białek uczestniczących w szlaku sygnałowym Wnt/ β -katenina

1. Wstęp

Dirofilarioza to choroba wektorowa wywoływana przez inwazję nicieni z rodzaju *Dirofilaria*. Dwoma najbardziej istotnymi gatunkami z punktu widzenia medycyny weterynaryjnej oraz medycyny człowieka są *Dirofilaria repens* oraz *Dirofilaria immitis*, będące czynnikami etiologicznymi odpowiednio dirofilariozy skórnej oraz sercowo-płucnej ^[1,2]. Wektory kompetentne do transmisji choroby to komary z rodzajów *Aedes*, *Ochlerotatus*, *Anopheles*, *Coquillettidia*, *Culex*, *Armigeres*, *Mansonia* oraz *Psorophora* ^[3], spośród których najważniejszymi wydają się być przedstawiciele *Aedes*, *Anopheles* i *Culex*. Opisywane gatunki filarii dzielą nie tylko wspólnych żywicieli pośrednich (wektory), ale również żywicieli ostatecznych. *D. repens* i *D. immitis* są pasożytami mięsożernych, głównie psów i kotów. Jednakże występowanie naturalnych inwazji wśród zwierząt wolno żyjących, takich jak wilk szary (*Canis lupus*), lis rudy (*Vulpes vulpes*), borsuk europejski (*Meles meles*) ^[4], szakal złocisty (*Canis aureus*), żbik europejski (*Felis silvestris*) ^[5] czy kuna domowa (*Martes foina*) ^[6], prowadzi do dyskusji na temat potencjalnych rezerwuarów choroby.

Dorosłe nicienie *Dirofilaria* spp. mogą przetrwać w organizmie żywiciela ostatecznego nawet 10 lat. Przez cały ten czas stanowią ryzyko transmisji na kolejne osobniki, uwalniając do krwiobiegu mikrofilarie (stadium larwalne). Mikrofilarie zasysane przez komara w trakcie posiłku przedostają się przez jelita do cewek Malphigiego, gdzie dojrzewają, przechodząc przez stadia L1 i L2 do stadium larwy inwazyjnej (L3). Proces dojrzewania larwy inwazyjnej jest uzależniony od temperatury otoczenia i może trwać od 8 do nawet 30 dni. W przypadku, gdy temperatura spada poniżej 14°C, rozwój larwy zostaje zahamowany. Do zarażenia żywiciela ostatecznego dochodzi w trakcie kolejnego posiłku komara. Larwy inwazyjne wydostają się przez labellum komara i zdeponowane na skórze w kropli hemolimfy, aktywnie wnikają do tkanek żywiciela, wykorzystując miejsce wkłucia ^[7,8]. Larwy stadium L3 *D. repens* migrują przez tkanki podskórne żywiciela, gdzie rozwijają się poprzez stadium L4 do osobników dorosłych. Osobniki dorosłe, osiągając dojrzałość płciową, kopulują zamykając cykl rozwojowy i rodząc do krwiobiegu kolejne pokolenie mikrofilarii. W przypadku *Dirofilaria immitis*, larwy inwazyjne linieją do stadium L4, które następnie przedostają się do naczyń krwionośnych i rozpoczynają wędrówkę w kierunku naczyń płucnych i serca, dojrzewając i zamykając cykl. Okres prepatentny inwazji trwa zazwyczaj od 6 do 9 miesięcy (Rycina 1).



Rycina 1. Cykl rozwojowy *Dirofilaria* spp.

Dirofilarioza skórna u psów często przebiega bezobjawowo lub nie manifestując specyficznych objawów. Najbardziej rozpoznawalnym symptomem choroby jest formowanie guzków podskórnych. Z rozmów przeprowadzonych z lekarzami weterynarii, dzięki których uprzejmości pozyskiwany był materiał badawczy, wynika, że mimo lokalizacji dorosłych osobników w tkankach podskórnych, zjawisko to występowało niezwykle rzadko. Sporadycznie filarie były odnajdywane również w strukturach anatomicznych, takich jak powróżek nasienny czy gruczoł sutkowy. Docelowe miejsce bytowania pasożyta jest prawdopodobnie zależne od miejsca ukłucia komara. Co więcej, pasożyty te wykazują syndrom larwy migrującej, tzn. zdolność do aktywnego przemieszczania się między tkankami. Innymi objawami występującymi w trakcie inwazji mogą być zmiany skórne i świąd [9,10].

Groźniejsza z punktu widzenia medycyny weterynaryjnej dirofilarioza sercowo-płucna prezentuje szerokie spektrum objawów nasilających się w zależności od stopnia zaawansowania choroby oraz intensywności inwazji. Wyróżnia się 4 klasy tej jednostki chorobowej: klasa 1 - brak objawów, sporadyczny kaszel; klasa 2 - nietolerancja wysiłku fizycznego, nieprawidłowe odgłosy płuc; klasa 3 - nieprawidłowe odgłosy serca, duszności, utrata przytomności, hepatomegalia, wodobrzusze, klasa 4 - najbardziej zaawansowane stadium choroby, określane mianem syndromu Caval'a,

rozwijają się w wyniku umiejscowienia się dorosłych nicieni w prawej komorze serca, prawym przedsionku oraz często w żyłę główną dolną, co może prowadzić do niewydolności serca oraz śmierci. Objawami towarzyszącymi temu stanowi są zazwyczaj nagłe osłabienie i letarg, hemoglobinemia czy hemoglobinuria [9,10].

Obydwa gatunki (*D. repens* i *D. immitis*) są pasożytami kosmopolitycznymi, szeroko rozprzestrzenionymi w Europie, Ameryce oraz częściowo w Azji, Australii i Afryce [11–13]. Co ciekawe, ostatnie badania wskazują na ewoluujące wzorce występowania gatunków *Dirofilaria* spp., w tym ich wykrycie na obszarach wcześniej nieobjętych zasięgiem, a w niektórych przypadkach na zmianę dominacji pomiędzy gatunkami [1,14,15]. Dirofilarioza jest uważana za jedną z najszybciej rozprzestrzeniających się chorób wektorowych w Europie, a w zależności od regionu prevalencja może wynosić od kilku do nawet kilkudziesięciu procent w skali kraju [11,13]. Jeszcze kilkanaście lat temu uważana była za chorobę raczej „egzotyczną”, występującą głównie w południowej części kontynentu, w krajach charakteryzujących się cieplejszym klimatem. Obecnie obydwie gatunki rozszerzają swój zakres występowania na terytorium kolejnych państw. Bezpośrednią przyczyną dynamiki ekspansji są zmiany klimatu, które prowadzą do introdukcji nowych gatunków wektorów kompetentnych do transmisji choroby, oraz działalność człowieka, skupiająca się na podróżach do krajów endemicznych z nieodpowiednio zabezpieczonymi zwierzętami towarzyszącymi.

D. repens występuje endemicznie niemalże w całej Europie Środkowej i Wschodniej oraz stopniowo opanowuje kraje Bałtyckie [13,16]. Zakres występowania inwazji *D. immitis* jest mniejszy, jednak na przestrzeni ostatnich 10 lat można zauważyć zmiany we wzorcach epidemiologicznych. Parazytoza rozprzestrzenia się w Europie Środkowej i Wschodniej, stwarzając ryzyko endemizacji krajów takich jak Niemcy, Austria, Czechy czy Słowacja [1,13]. Co więcej, najnowsze badania przeprowadzone przez Jokelainen i wsp. (2024) donoszą o obecności zarówno rodzimych, jak i importowanych przypadków dirofilariozy sercowo-płucnej u psów w Estonii [17]. Importowane przypadki dirofilariozy oraz obecność wektorów kompetentnych do transmisji choroby były rejestrowane nawet w krajach skandynawskich. W niektórych z nich odnotowano miejscowo wartość graniczną niezbędną do rozwoju larw inwazyjnych (130 HDU (Heartworm Development Unit), wykorzystywaną

w sezonowym modelu transmisji pasożyty, umożliwiającym przewidywanie jej występowania ^[13].

Mimo podobieństw w biologii obu pasożytów, wspólnych gatunków wektorów i żywicieli ostatecznych, *D. repens* wydaje się być gatunkiem szybciej rozprzestrzeniającym. Alsarraf i wsp. (2023) sugerują, że różnice w ekspansywności gatunków *Dirofilaria* mogą być uwarunkowane różnorodnością genetyczną, która może być kluczowa dla adaptacji i przetrwania pasożyta w nowych warunkach środowiskowych. Na przykładzie kilku mitochondrialnych markerów genetycznych wykazał, że *D. repens* jest znacznie bardziej zróżnicowana genetycznie niż *D. immitis*, wykrywając odpowiednio 18 i 9 różnych haplotypów każdego z gatunków. Zagadką nadal jednak pozostaje, czy gatunki genetycznie konserwatywne, takie jak *D. immitis*, są mniej skuteczne w kolonizacji nowych obszarów w porównaniu do gatunków bardziej zróżnicowanych genetycznie, takich jak *D. repens*. Być może alternatywnie rozprzestrzenianiu się gatunku na nowy obszar towarzyszy utrata różnorodności genetycznej, z dominacją jednej, skutecznej linii genetycznej ^[18,19].

Pomimo opisywania kolejnych gatunków potencjalnych żywicieli *D. repens* i *D. immitis*, najważniejszym rezerwuarem choroby pozostają psy, które pełnią kluczową rolę w transmisji choroby. Chociaż opisywano również obecność mikrofilarii każdego z gatunków *Dirofilaria* w krwiobiegu kotów ^[20,21], są one uważane za mniej kompetentnych żywicieli. Aktywna mikrofilaremia występuje jedynie u około 20% zarażonych kotów i jest zazwyczaj krótkotrwała oraz charakteryzuje się niską intensywnością ^[20,22]. Przyczyną jest fakt, że jedynie niewielka liczba larw L3 rozwija się do stadium dorosłego ^[23]. Co więcej, szacuje się, że 25% kotów jest naturalnie odpornych na zarażenie *D. immitis* ^[22].

W Polsce występowanie dirofilariozy jest zdominowane przez *D. repens*, a pierwszy rodzimy przypadek inwazji u psa został opisany w 2009 roku ^[24]. Od tego czasu częstotliwość występowania zarażeń wydaje się wzrastać. W 2014 roku ogólna prevalencja we wszystkich 16 województwach wynosiła niemal 16% ^[25], natomiast w 2016 roku w samym tylko Mazowszu odsetek zarażonych psów wynosił 38,3% ^[26]. W badaniu przeprowadzonym w latach 2017-2019 częstość zarażeń w Polsce wynosiła 12% ^[16]. Inwazje *D. immitis* obserwowane są sporadycznie. Do tej pory opisano jedynie 2 rodzime przypadki u psów ^[27,28], jednakże importowane inwazje zdarzają się coraz

częściej, szczególnie w przypadku psów importowanych lub podróżujących poza granice kraju. W świetle zmian klimatycznych oraz bezpośredniego sąsiedztwa z krajami uznawanymi za regiony pre-endemiczne (Niemcy) lub endemiczne (Słowacja, Ukraina) dla *D. immitis* ^[13], powinniśmy być przygotowani na zwiększone ryzyko rozwoju nowych ognisk w Polsce w najbliższych latach.

Szczególnym zagrożeniem wydają się być migracje zwierząt zza wschodniej granicy Polski. Kryzys humanitarny wywołany zbrojną napaścią Rosji na Ukrainę eskaluje problem bezdomnych zwierząt w tym kraju. Od wybuchu wojny niemal 6,5 miliona obywateli Ukrainy opuściło kraj w celu poszukiwania schronienia, a ponad 3,5 miliona migrowało w jego obrębie ^[29]. W wielu przypadkach wiązało się to również z przemieszczaniem zwierząt lub pozostawieniem ich bez odpowiedniej opieki. Jeszcze przed wybuchem wojny szacowano, że w Ukrainie znajduje się ponad 200 000 bezdomnych psów i prawdopodobnie jeszcze więcej pozostających bez opieki kotów ^[30]. Mimo nielicznych opracowań, szczególnie anglojęzycznych, na temat prevalencji dirofilariozy, powszechnie wiadomo, że obydwie gatunki (*D. repens* i *D. immitis*) występują w Ukrainie endemicznie. Jak donoszą Bajer i wsp. (2023), od rozpoczęcia konfliktu prawdopodobnie ponad 10 000 zwierząt przekroczyło polsko-ukraińską granicę, a część z nich została umieszczona w schroniskach. Wśród 53 importowanych psów przebywających w schronisku dla zwierząt w województwie mazowieckim, 18,9% było zarażonych *D. repens*, 3,6% *D. immitis*, a u 2 z nich wykryto współistniejące inwazje *D. repens* i *D. immitis* ^[31]. Fakt ten podkreśla wzmożoną potrzebę diagnostyki oraz profilaktyki zwierząt towarzyszących przekraczających granice kraju, ale również stałe monitorowanie obecnej sytuacji epidemiologicznej w Ukrainie. Panujące warunki w połączeniu z brakiem regularnej profilaktyki przeciwpasożytnej, zwiększają ryzyko zagrożenia biologicznego, w tym niekontrolowanego rozprzestrzeniania się chorób wektorowych oraz ich przeniesienia na człowieka.

Mimo że główny rezerwuár choroby stanowią psy, należy podkreślić, że nicienie *Dirofilaria* spp. wykazują wysoki potencjał zoonotyczny, a liczba przypadków odnotowanych na całym świecie wynosi kilka tysięcy. Powszechnie uważa się, że człowiek jest jedynie żywicielem przypadkowym, jednak jak donoszą Simon i wsp. (2022), 42,95% nicieni pozyskanych w trakcie interwencji chirurgicznych było dojrzałych, a większość z nich stanowiły samice. Co więcej, u 26,42% z nich

stwierdzono macice wypełnione mikrofilariami. Ponadto na przestrzeni lat odnotowano również kilka przypadków ludzkiej dirofilariozy z aktywną mikrofilaremią, co może sugerować o potencjalnej roli człowieka jako rezerwuaru choroby. Co ciekawe, 72,22% przypadków zarażeń u człowieka wywołuje inwazja *D. repens*, a zaledwie 6,94% *D. immitis*. W zależności od lokalizacji anatomicznej wyróżnić możemy dirofilariozę skórno/oczną, łączoną głównie z inwazjami *D. repens* i płucną z *D. immitis* [32].

U znakomitej większości pacjentów dirofilarioza skórna objawia się obecnością guzka, któremu może towarzyszyć zaczerwienienie, obrzęk czy bolesność. W przypadku dirofilariozy ocznej filarie mogą powodować guzki lub torbiele zlokalizowane w spojówce, powiece lub innych częściach oka, co objawiać się może dyskomfortem, zaczerwienieniem, obrzękiem, a czasami zaburzeniem widzenia. Z kolei dirofilarioza płucna może powodować łagodne objawy ze strony układu oddechowego - kaszel, ból w klatce piersiowej oraz łagodna gorączka, przez co może przypominać zapalenie płuc [9,10,32]. Co więcej, pomimo zazwyczaj łagodnego charakteru guzków, ich odkrycie budzi niepokój związany z możliwością złośliwości takich zmian. To podejrzenie prowadzi do stosowania procedur chirurgicznych w celu diagnozy i usunięcia, czasami w bardzo wrażliwych lub trudnodostępnych lokalizacjach anatomicznych, co może mieć poważne konsekwencje dla zdrowia pacjenta. Nie należy również lekceważyć stresu, jaki pacjent odczuwa w czasie od odkrycia guzka do identyfikacji pasożytów, lub gdy wykrywane są migrujące lub pojawiające się robaki w krytycznych obszarach, takich jak oko, genitalia czy pierś [32–34]. Na przestrzeni lat pasożyty były odnajdywane również w miejscach takich jak wyrostek łokciowy [35], ściana jamy brzucha, węzeł chłonny pachwinowy [36], wewnątrz jamy ustnej [37], a nawet język [38].

W Polsce pierwszy przypadek zarażenia *D. repens* u człowieka został odnotowany w 2007 roku [39,40]. Jednakże, ponieważ pacjent kilka lat wcześniej podróżował do Grecji, istniało podejrzenie o importowanym statusie inwazji. Za pierwszy rodzimy przypadek uważa się zarażenie odnotowane w 2010 roku [41]. Od tamtego czasu opisano kilkanaście kolejnych przypadków [35,41–44], w tym również jeden z pierwszych na świecie z aktywną mikrofilaremią [45]. Należy jednak pamiętać, że ze względu na niską świadomość wśród lekarzy klinicystów, niespecyficzne objawy oraz utrudnioną diagnostykę, realna liczba zachorowań może być zdecydowanie większa. W Ukrainie, która bezpośrednio sąsiaduje z Polską, dirofilarioza jest chorobą

podlegającą obowiązkowi rejestracji. W latach 1997–2012 odnotowano tam 1465 przypadków inwazji *D. repens* [46] oraz kilkanaście *D. immitis* [47]

Obecnie „złotym standardem” w diagnostyce pozostaje metoda Knott'a oraz uzupełniająca ją łańcuchowa reakcja polimerazy (polymerase chain reaction; PCR). Obie metody bazują jednak na wykrywaniu mikrofilarii w krwiobiegu, przez co są nieskuteczne w przypadku inwazji amikrofilaremicznych, (tj. nie manifestujących aktywnej mikrofilareмии), których przyczyną może być obecność osobników tylko jednej płci lub wywołana przez leki sterylność dorosłych nicieni. Co więcej, obie metody pozostają nieskuteczne w okresie prepatentnym, co w praktyce oznacza, że przez 6-9 miesięcy rozwijająca się inwazja nie może być wykryta. W przypadku dirofilariozy sercowo-płucnej, na rynku obecnych jest kilka testów opartych na technikach serologicznych, umożliwiających wykrywanie antygenów wydzielanych przez dorosłe nicienie *D. immitis*, które osiągają niemal 100% specyficzności w przypadkach inwazji obejmujących więcej niż jedną dorosłą samicę [48]. Jednak czułość i swoistość tych testów mogą znacznie się różnić, szczególnie w przypadku niskiej intensywności inwazji [49–51]. Co więcej, niektóre opracowania przestrzegają przed możliwością występowania reakcji krzyżowych z antygenami innych pasożytów psów, takich jak *Angiostrongylus vasorum*, *Spirocerca lupi*, *Taenia taeniaeformis*, *Toxocara canis*, *Toxocara cati*, *Dipylidium caninum* czy *D. repens* [52–55]. Na skuteczność stosowanych testów może wpływać również sposób wstępnego przygotowania badanej próby. Jak donoszą Gruntmeir i wsp. (2021), uprzednia obróbka termiczna próbki surowicy (immune-complex dissociation; ICD), prowadząca do rozbicia wiązań w kompleksach immunologicznych oraz inaktywacji dopełniacza, zwiększa czułość wykrywania zarażeń *D. immitis* z 78% na 98% [55].

Mimo wyraźnie zwiększonej ekspansywności oraz potencjału zoonotycznego, obecnie brak jest dostępnego testu wykrywającego zarażenie *D. repens*. Fakt ten podkreśla, że gatunek był przez lata zaniedbywany zarówno przez środowisko akademickie, jak i medyczne, w szczególności w porównaniu do *D. immitis*. Ostatnimi czasy coraz częściej wykorzystywaną metodą diagnostyczną w przypadku dirofilariozy skórnej jest test immunoenzymatyczny ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) wykorzystujący antygeny somatyczne dorosłych nicieni do oceny poziomu przeciwciał w surowicy pacjenta. Jak donoszą Ciuca i wsp. (2020), metoda ta umożliwia wykrycie w surowicy zarażonych zwierząt przeciwciała specyficzne dla

antygenów pasożyta już 121 dni od zarażenia ^[56], ale pozostaje również skuteczna w przypadku rozwiniętych inwazji amikrofilaremicznych ^[57]. Niestety, ze względu na wymagany stały dostęp do materiału biologicznego (dorosłych nicieni), skomercjalizowanie metody wydaje się niemożliwe. Dlatego priorytetem w kontekście zatrzymania rozprzestrzeniania się dirofilariozy skórnej jest opracowanie nowego narzędzia diagnostycznego, które umożliwi szybką oraz skuteczną identyfikację zarażenia w dowolnym miejscu opieki. W tym celu niezbędne wydaje się zgłębianie molekularnych mechanizmów i interakcji występujących między pasożytem i żywicielem, a także charakterystyka zaangażowanych w te procesy antygenów. Niestety, kolejnym dowodem na to, jak mało poznany i słabo scharakteryzowany gatunkiem jest *D. repens*, może być liczba sekwencji DNA kodujących białka pasożyta umieszczonych w bazach danych takich jak GenBank, która wynosi 13. Wszystkie z nich są autorstwa naszego zespołu i zostały zdeponowane w trakcie realizacji niniejszej rozprawy.

Dzięki cząsteczkom obecnym w antygenach somatycznych lub produktach wydaliniczno-wydzielniczych (excretory-secretory products; ES) uwalnianych podczas inwazji, helminty są jednymi z najskuteczniejszych organizmów w modulowaniu układu odpornościowego swojego żywiciela, co pozwala im z powodzeniem zarażać miliony ludzi i zwierząt na całym świecie. Wywoływana odpowiedź jest zazwyczaj ukierunkowana korzystnie zarówno dla pasożyta jak i żywiciela. Za typową reakcję na inwazję helmintów, w tym filarii, uważa się indukcję odpowiedzi typu Th2 z zaangażowaniem limfocytów T CD4⁺ regulatorowych (Treg). Odpowiednia równowaga Th2/Treg umożliwia pasożytom przetrwanie oraz rozwinięcie przewlekłych inwazji, jednocześnie zapobiegając nadmiernemu stanowi zapalnemu i minimalizując uszkodzenia tkanek żywiciela ^[58]. Potencjał do wyciszenia nadmiernej odpowiedzi układu odpornościowego przez helminty, popierany przez hipotezę higieny, został również dostrzeżony w leczeniu chorób autoimmunizacyjnych, które stanowią współcześnie coraz większy problem medyczny ^[59].

Ze względu na brak prowadzonych w tym kierunku badań, wiedza na temat odpowiedzi immunologicznej wywołanej w trakcie zarażenia *Dirofilaria repens* pozostaje znikoma. Podobieństw możemy się doszukiwać na podstawie analogii z blisko spokrewnionym gatunkiem *D. immitis*, w przypadku którego obserwuje się

indukcję mieszanej odpowiedzi Th1/Th2 oraz towarzyszącej jej wydzielaniu interleukiny (IL) 10 [60–63].

Rozwój właściwej odpowiedzi swoistej zależy od rozpoznania i reakcji na cząsteczki patogenu, a w jej kształtowaniu główną rolę pełnią profesjonalne komórki prezentujące antygen (antigen presenting cells; APC), takie jak komórki dendrytyczne (dendritic cells; DCs) oraz makrofagi. Komórki te, szczególnie DCs, pełnią kluczową rolę w inicjacji i polaryzacji swoistej odpowiedzi układu odpornościowego żywiciela, przez co są głównym celem helmintów w kontekście manipulacji odpowiedzi immunologicznej [64–66]. Manipulacja APC może być skutkiem zaangażowania receptorów rozpoznających wzorce (pattern recognition receptor, PRR), identyfikujące wzorce molekularne związane z mikroorganizmami (microbe-associated molecular patterns, MAMP), co uruchamia kaskadę sygnałów prowadzącą do aktywacji komórek oraz wydzielania cytokin polaryzujących odpowiedź immunologiczną [58].

Jedną z najlepiej scharakteryzowanych cząsteczek o właściwościach immunomodulacyjnych wydzielanych przez filarie jest ES-62 (glikoproteina zawierająca reszty fosforylocholiny) *A. viteae* oraz jej homolog (aminopeptydaza leucynowa) u *W. bancrofti* i *B. malayi*. Antygeny te blokują ścieżkę sygnałową zależną od receptora Toll-podobnego (Toll-like receptor; TLR) 4, zatrzymując dojrzewanie komórek dendrytycznych, prezentację antygenów w kontekście białek głównego układu zgodności tkankowej (major histocompatibility complex; MHC) klasy II oraz wydzielanie cytokin prozapalnych, takich jak IL-6, IL-12p70 czy czynnik martwicy nowotworów (tumor necrosis factor; TNF) α , tym samym hamując polaryzację odpowiedzi w kierunku Th1. Kolejnym przykładem dobrze poznanych antygenów filarii może być reduktaza tioredoksyn (TrxR), która hamuje w makrofagach szlak sygnałowy zależny od TLR4/jądrowy czynnik transkrypcyjny NF kappa B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells; NF- κ B), uniemożliwiając formowanie inflamasomu oraz polaryzując makrofagi w kierunku M2. Procesowi temu towarzyszy zwiększenie syntezy IL-10 i jednocześnie zahamowanie wydzielania cytokin prozapalnych [67].

IL-10 jest kluczową cytokiną z punktu widzenia rozwoju przewlekłej inwazji pasożytniczej. Wydzielana przez komórki dendrytyczne i makrofagi M2 w odpowiedzi na antygeny pasożyta promuje różnicowanie limfocytów T w kierunku fenotypu Treg,

ale również bezpośrednio hamuje aktywność efektorowych limfocytów T, redukuje zapalenie i razem z transformującym czynnikiem wzrostu (transforming growth factor; TGF) β współtworzy mikrośrodowisko cytokinowe sprzyjające rozwojowi odpowiedzi tolerogenicznej. Pod wpływem IL-10 dochodzi m.in. do przełączania klasy wydzielanych przeciwciał przez limfocyty B na IgG4. Ze względu na brak zdolności aktywacji układu dopełniacza oraz cytotoksyczności zależnej od przeciwciał (antibody dependent cell-mediated cytotoxicity; ADCC), uważa się, że pozytywna regulacja izotypu IgG4 umożliwia rozwój patentnych, przewlekłych inwazji. Co więcej, dowiedziono, że IgG4 konkurują o miejsce wiązania z IgE, które pełnią istotną rolę w eliminacji helmintów. W badaniach nad filariozami, takimi jak brugioza, wuchererioza czy onchocerkozę, wykazano, że pacjenci z aktywną mikrofilariemią, która zapewnia sukces rozrodczy oraz możliwość dalszej transmisji pasożyta, są zazwyczaj bezobjawowi. Inwazji towarzyszy wysoki poziom IL-10 i IgG4 oraz ekspansja populacji naturalnych Treg. Przeciwnie, u pacjentów amikrofilaremicznych obserwowano silne objawy kliniczne prowadzące do schorzeń takich jak śloniowaczica [67–69].

Powszechnie wiadomo, że helminty mogą modulować odpowiedź również dzięki mechanizmom niezależnym od ścieżek sygnałowych związanych z PRR. Wydzielając cząsteczki o aktywności enzymatycznej/biologicznej, skutecznie unieszkodliwiają komórki układu odpornościowego oraz neutralizują wydzielane przez nie białka. Cystatyny (inhibitory proteaz cysteinowych) *B. malayi* hamują aktywność proteaz cysteinowych żywiciela biorących udział w formowaniu kompleksu peptyd/MHC klasy II, uniemożliwiając tym samym prezentowanie antygenów przez DCs [58]. Serpiny, białka należące do rodziny inhibitorów proteaz serynowych, wytwarzane przez mikrofilarie tego pasożyta, hamują działanie elastazy czy katepsyny G wydzielanych przez neutrofile żywiciela. Innymi białkami wydzielanymi przez mikrofilarie tego gatunku są antygeny imitujące cytokiny żywiciela, takie jak TGF- β czy prostaglandyna E2 (prostaglandin E2; PGE2), które chronią larwy przed eliminacją, prowadząc do immunosupresji oraz rozwoju odpowiedzi zależnej od Treg. Kolejnym kluczowym antygenem obecnym we wszystkich stadiach rozwojowych jest kalretikulina, która wiążąc składową dopełniacza C1q uniemożliwia klasyczną aktywację drogi dopełniacza. Równie ważną rolę w unikaniu mechanizmów obronnych układu immunologicznego żywiciela pełnią antygeny powierzchniowe [64]. Jak dowodzą Semnani i wsp. (2003), filarie mają zdolność nie tylko do zmieniania funkcji DCs, ale

również do tworzenia agregatów z komórkami żywiciela, co może prowadzić do ich śmierci na drodze apoptozy zależnej od ligandu czynnika martwicy nowotworu indukującego apoptozę (TNF-related apoptosis-inducing ligand; TRAIL) i TNF- α [67].

Strategie takie jak zmienność czy mimikra antygenowa umożliwiają pasożytom skuteczną ucieczkę przed mechanizmami obronnymi żywiciela na każdym etapie inwazji. Larwy inwazyjne L3, będąc pierwszym stadium rozwojowym, które ma kontakt z układem odpornościowym żywiciela, wydają się być szczególnie uprzywilejowane immunologicznie. Sukces inwazji zależy od strategii unikania mechanizmów odpornościowych wykorzystywanych przez te larwy. W ciągu pierwszych 24 godzin obecność migrujących podskórnio larw inicjuje wczesną ostrą odpowiedź zapalną z zaangażowaniem cytokin profilu Th1 (interferon [IFN] γ , TNF- α , IL-1 α , ligand chemokiny CXC [C-X-C motif chemokine ligand; CXCL] 8). Jednak ze względu na znaczne i niepożądane uszkodzanie tkanek, siedem dni od rozpoczęcia inwazji, odpowiedź zostaje zdominowana przez IL-10 oraz spolaryzowana w kierunku Th2, charakteryzującą się dysfunkcją APC, zwiększonym stężeniem cytokin przeciwzapalnych, ekspansją komórek Treg oraz polaryzacją makrofagów w kierunku M2 [67].

W trakcie inwazji patogenów przez skórę, uszkodzone komórki żywiciela wydzielają alarminy (np. IL-25, IL-33, limfopoetyna zrębu grasicy [thymic stromal lymphopoietin; TSLP]), które aktywują nieswoiste komórki limfoidalne (innate lymphoid cells, ILC) typu 2. Aktywowane ILC2 szybko wydzielają cytokiny typu 2 (IL-4, IL-5, IL-9, IL-13), które rekrutują i aktywują eozynofile, bazofile i komórki tuczne, kluczowe dla eliminacji pasożytów. W przypadku larw inwazyjnych *Brugia malayi* nie zaobserwowano zainicjowania odpowiedzi zależnej od ILC2, a za jedną z przyczyn uważa się brak aktywności komórek Langerhansa (Langerhans cells; LC) oraz komórek dendrytycznych skóry (dendritic cells; DDC). Cotton i wsp. (2015) w swoich badaniach wykazali, że larwy L3 nie zmieniły profilu oraz stężenia syntetyzowanych cytokin ani poziomu markerów powierzchniowych w DDC oraz LC, co sugeruje, że larwy te sprawnie unikają wykrycia przez APC skóry człowieka [70]. Konkrete cząsteczki odpowiedzialne za wyciszenie odpowiedzi pozostają jednak niezbadane. Ich identyfikacja oraz charakterystyka stwarzają szerokie perspektywy badawcze oraz mogą kłaść nowe światło na biologię helmintów.

Jedną z molekuł specyficznych dla larw L3 jest antygen ALT (abundant larval transcript). Na przestrzeni lat, białka należące do tej rodziny zostały zidentyfikowane u kilku gatunków filarii, jednak nigdy u *D. repens* ^[71–75]. Ze względu na udowodnione zdolności do immunomodulacji, ALT *B. malayi* był wykorzystywany w próbach leczenia chorób autoimmunizacyjnych, takich jak wrzodziejące zapalenie jelita grubego ^[76] czy cukrzyca typu 1 ^[77,78]. Co więcej, mimo że biologiczna aktywność antygeny oraz jego dokładna rola w trakcie inwazji pozostaje zagadką, brak znanego homologa u ssaków premiuje jego wybór jako wczesny marker diagnostyczny oraz potencjalny kandydat szczepionkowy.

Niniejsza praca składa się z cyklu powiązanych tematycznie publikacji oraz części wyników nieopublikowanych. Badania przedstawione w rozprawie skupiają się na nowopoznanym antygenie Dr20/22 *D. repens* - homologu antygenów ALT. W trakcie pracy podjęto próbę poznania właściwości immunomodulacyjnych Dr20/22 i wpływu na wybrane komórki układu odpornościowego człowieka oraz wykorzystania go jako potencjalny marker dirofilariozy skórnej. Dodatkowo podjęto próbę opracowania alternatywnej metody diagnostycznej w oparciu o metody serologiczne i molekularne oraz jej dalsze wdrażanie potwierdzając status endemiczny nicieni *Dirofilaria* spp. w Polsce i Ukrainie.

2. Cele pracy

- Molekularna charakterystyka Dr20/22 oraz próba wykorzystania go jako marker diagnostyczny dirofilariozy skórnej.
- Wytypowanie alternatywnego markera diagnostycznego dirofilariozy skórnej przy użyciu technologii phage display.
- Walidacja metody diagnostycznej umożliwiającej molekularne różnicowanie inwazji *Dirofilaria repens*, *Dirofilaria immitis* i *Acanthocheilonema reconditum* oraz określenie prevalencji wymienionych w wybranych regionach Ukrainy.
- Potwierdzenie obecności rodzimych inwazji *D. immitis* oraz dyskusja na temat skuteczności stosowanych metod diagnostycznych oraz kierunku rozwoju dirofilariozy sercowo-płucnej w Polsce.

3. Artykuły opublikowane

Artykuł 1

Pękacz M., Basalaj K., Młocicki D., Kamaszewski M., Carretón E., Morchón R., Wiśniewski M., Zawistowska-Deniziak, A. (2024). Molecular insights and antibody response to Dr20/22 in dogs naturally infected with *Dirofilaria repens*. Scientific reports, 14(1), 12979. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-63523-9>

W pierwszym artykule wchodzącym w skład rozprawy wykonano molekularną charakterystykę antygeny Dr20/22 *D. repens* oraz oszacowano jego potencjał w diagnostyce dirofilariozy skórnej.

W pierwszym etapie pracy opisano sklonowanie cDNA kodującego Dr20/22. Dr20/22 to nieopisany dotychczas w literaturze naukowej, homolog białek z rodziny ALT, charakterystyczny dla larw inwazyjnych (L3) wielu gatunków filarii. Co ciekawe, pomimo widocznej ekspresji mRNA, przeprowadzona przy użyciu metody Western Blott oraz otrzymanej w myszy, poliklonalnej surowicy anti-Dr20/22, próba wykrycia antygeny wśród natywnych białek obu stadiów rozwojowych pasożyta nie powiodła się. Analiza ekspresji genu wykonana przy użyciu Real-Time PCR wykazała ~3-krotnie wyższą ekspresję w dorosłym stadium rozwojowym niż w mikrofilariach. Fakt ten w zestawieniu z literaturą wydaje się potwierdzać specyficzność antygeny dla larw inwazyjnych również w przypadku *D. repens*. Za mechanizm odpowiedzialny za regulację ekspresji genu pomiędzy stadiami rozwojowymi zaproponowano SLTS (Spliced Leader Trans-Splicing). SL (Spliced Leader) to konserwatywna w obrębie rodziny sekwencja liderowa, transkrybowana z innego miejsca w genomie oraz dołączana do 5' końca docelowego mRNA. Proces SLTS może być zależny od czynników środowiskowych czy fizjologicznych, a obecność dodanej do transkryptu sekwencji liderowej może pozytywnie regulować ekspresję docelowego genu.

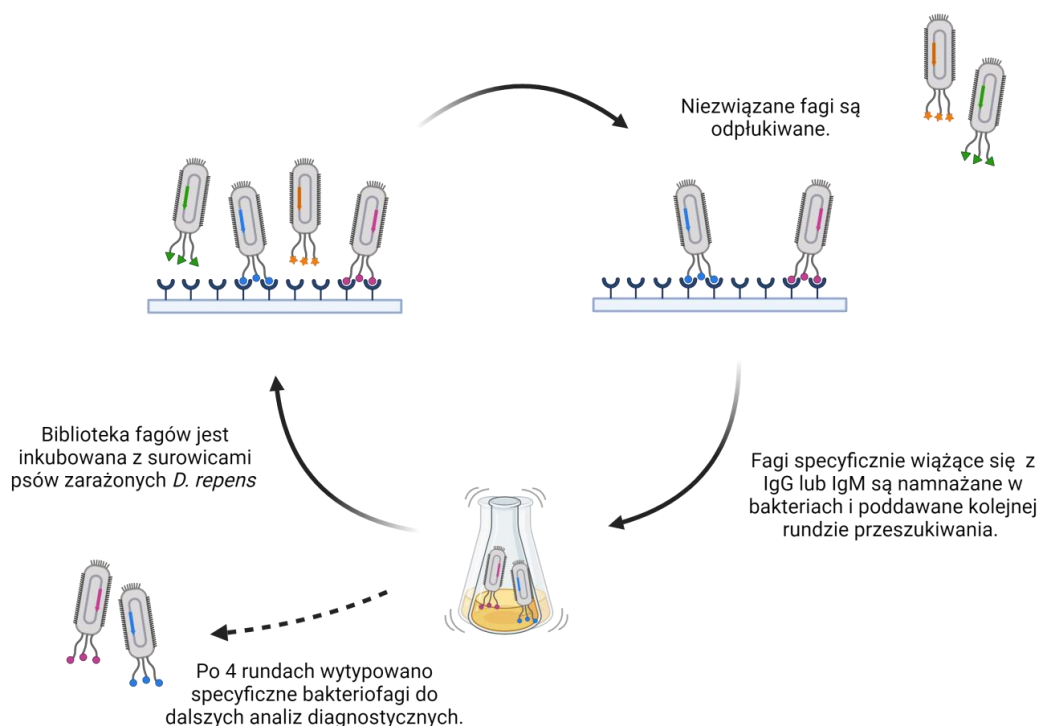
Sklonowane cDNA *dr20/22* wykorzystano do otrzymania rekombinowanego antygeny w drożdżowym systemie ekspresji *Pichia pastoris*. rDr20/22 został wykorzystany do próby poznania aktywności biochemicznej białek z rodziny ALT. Eksperymentalnie wykluczono potencjalną aktywność fosfolipazy A2 (phospholipase A2; PLA2), która była sugerowana w kilku artykułach dotyczących homologów ALT u filarii. Ze względu na specyficzność antygenów ALT dla larw inwazyjnych wielu gatunków filarii oraz potwierdzenie, przy użyciu techniki Western Blot, obecności IgG

specyficznych dla rDr20/22 w surowicach psów zarażonych *D. repens*, antygen został zaproponowany jako wczesny marker dirofilariozy skórnej. Potencjał diagnostyczny antygeny został określony przy użyciu techniki ELISA, a skuteczność porównana do wyników uzyskanych w ELISA z wykorzystaniem ekstraktu z antygenów somatycznych dorosłych nicieni (*Dirofilaria repens* somatic antigen; DrSA). Obecność przeciwciał anti-Dr20/22 w surowicach psów zarażonych, jak i zdrowych oraz występowanie reakcji krzyżowych z surowicami psów zarażonych *D. immitis* wykluczyła jego przydatność w diagnostyce inwazji *D. repens*.

Artykuł 2

Pękacz M., Basałaj K., Kalinowska A., Klockiewicz M., Stopka D., Bąska P., Długosz E., Karabowicz J., Młocicki, D., Wiśniewski M., Zawistowska-Deniziak A. (2022). Selection of new diagnostic markers for *Dirofilaria repens* infections with the use of phage display technology. Scientific reports, 12(1), 2288. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-06116-8>

W drugim artykule stanowiącym część rozprawy podjęto próbę wytypowania alternatywnego markera diagnostycznego dirofilariozy skórnej, wykorzystując technologię „phage display”. Bibliotekę bakteriofagów prezentujących na powierzchni kapsydu 12-merowe peptydy przeszukano w celu wyslekcjonowania klonów specyficznego reagujących z IgG lub IgM obecnymi w surowicy psów zarażonych *D. repens*. Fagi wiążące się specyficznymi przeciwciałami zostały namnożone w bakteriiach *Escherichia coli*, a cały proces przeszukiwania powtórzony 3-krotnie. Potencjał diagnostyczny wytypowanych peptydów został określony przy użyciu „phage ELISA” oraz surowic pozyskanych od psów zdrowych oraz naturalnie zarażonych *D. repens*.



Rycina 2. Schemat przeszukiwania fagowej biblioteki peptydów.

Wszystkie surowice użyte w trakcie eksperymentów zostały uprzednio poddane diagnostyce w kierunku dirofilariozy z wykorzystaniem 3 technik: mikroskopowej - metoda Knott'a, serologicznej - DrSA ELISA oraz molekularnej - Real-Time PCR. Metoda molekularna umożliwiła wykrycie 3 różnych fragmentów cfDNA (cell-free DNA) *D. repens* zarówno w surowicy psów zarażonych z aktywną mikrofileremią jak również w przypadku psów, w których krwiobiegu nie odnaleziono mikrofilarii, ale poziom przeciwciał specyficznych dla DrSA wskazywał na obecną inwazję. Wykrycie cfDNA okazała się metodą szczególnie użyteczną w diagnostyce ukrytych inwazji (z ang. occult infections), w przypadku których obecnie stosowane metody pozostają nieskuteczne.

Przeszukanie biblioteki umożliwiło wytypowanie kilku potencjalnych kandydatów diagnostycznych. Szczególnie obiecujące okazały się fagi prezentujące na swojej powierzchni peptydy L10, C23 oraz HL5, przeciwko którym poziom specyficznych IgG w surowicach psów zarażonych był wyższy w porównaniu do grupy kontrolnej (psów niezarażonych). Potencjalne reakcje krzyżowe między IgG psów, a powierzchniowymi antygenami fagów zostały wykluczone na podstawie porównania reaktywności wytypowanych kandydatów diagnostycznych z fagiem o dzikim fenotypie (nie prezentującym na powierzchni kapsydu 12-merowego peptydu). Dodatkowo specyficzność peptydów została potwierdzona przy użyciu surowicy szczurów immunizowanych ekstraktem z dorosłych nicieni oraz mikrofilarii *D. repens*.

Artykuł 3

Pękacz M., Basalaj K., Miterpáková M., Rusiecki Z., Stopka D., Graczyk D., Zawistowska-Deniziak, A. (2024). An unexpected case of a dog from Poland co-infected with *Dirofilaria repens* and *Dirofilaria immitis*. BMC veterinary research, 20(1), 66. <https://doi.org/10.1186/s12917-024-03921-3>

Ostatnim artykułem składającym się na niniejszą rozprawę jest opis rodzimego przypadku współistniejącej inwazji *Dirofilaria repens* i *Dirofilaria immitis* u psa, który nigdy nie podróżował poza granice kraju.

W Polsce gatunkiem dominującym zarówno wśród zwierząt towarzyszących jak i dzikich jest *D. repens*. Inwazje *D. immitis* są znacznie rzadsze, z zaledwie dwoma rodzimymi przypadkami opisanymi na przestrzeni ostatnich 15 lat. Jednakże z rozmów przeprowadzonych z lekarzami weterynarii wynika, że coraz częściej spotykają się z problemem dirofilariozy sercowo-płucnej. Obserwowane przypadki dotyczą psów podróżujących ze swoimi właścicielami do krajów endemicznych dla *D. immitis*, jak również zwierząt importowanych na terytorium Polski pozbawionych przesiewowej diagnostyki. W pracy przedyskutowano potencjalne czynniki wpływające na niekontrolowane rozprzestrzenianie się dirofilariozy, takie jak zmiany klimatu, działalność człowieka, udział zwierząt dzikich, czy brak regularnego nadzoru molekularnego. Wymienione czynniki ryzyka oraz fakt, że dirofilarioza jest jedną z najszybciej rozprzestrzeniających się chorób wektorowych w Europie, pozwalają sądzić, że obecny status *D. immitis* w Polsce może być marginalizowany, a w najbliższych latach można się spodziewać coraz częstszego występowania, również rodzimych przypadków.

Mimo rosnącej świadomości klinicystów, kluczowym problemem pozostaje diagnostyka dirofilariozy oraz interpretacja uzyskanych wyników. Obecnie stosowane metody diagnostyczne mają ograniczenia wynikające z biologii pasożyta, takie jak długi okres prepatentny inwazji czy periodyczność występowania mikrofilarii w krwiobiegu żywiciela. Na skuteczność diagnozy wpływać może również intensywność inwazji oraz związane z nią objawy manifestowane przez pacjenta. Opisany w artykule przypadek inwazji mieszanej *D. repens* oraz *D. immitis*, zwraca uwagę na potrzebę korzystania z więcej niż jednej metody diagnostycznej. Mimo negatywnego testu serologicznego oraz nieudanej mikroskopowej identyfikacji mikrofilarii *D. immitis*, zastosowanie

metody molekularnej umożliwiło wykrycie DNA obydwu gatunków. Skrupulatna diagnostyka oparta na stosowaniu kilku metod diagnostycznych, zmniejsza ryzyko błędnej diagnozy wynikającej z uzyskania fałszywie pozytywnych lub fałszywie negatywnych wyników.

4. Wyniki nieopublikowane – część I

Badanie właściwości immunomodulacyjnych antygeny Dr20/22 *D. repens* na modelu komórek dendrytycznych pochodzenia monocytarnego wyizolowanych od człowieka

4. 1. Uzasadnienie podjęcia badań

Ze względu na wysoką ekspansywność oraz potencjał zoonotyczny inwazje *D. repens* stały się poważnym problem zarówno dla medycyny weterynaryjnej jak i człowieka. Mimo to poziom wiedzy na temat biologii pasożyta oraz molekularnych mechanizmów zaangażowanych w interakcje z żywicielem pozostaje znikomy. Jednym z aspektów, który pozostaje zagadką jest to jak pasożyt moduluje odpowiedź immunologiczną żywiciela na różnych etapach inwazji. Stadium szczególnie uprzywilejowanym immunologicznie są larwy L3. Antygeny wydzielane przez to stadium rozwojowe nie tylko umożliwiają skuteczną ucieczkę przed odpowiedzią ze strony układu immunologicznego żywiciela, ale również biorą udział w jej modulowaniu w celu rozwinięcia przewlekłych inwazji oraz zapewnienia sukcesu rozrodczego. Jednym z kluczowych antygenów charakterystycznych dla larw inwazyjnych filarii jest rodzina białek ALT, której obecność udokumentowano m.in. u filarii takich jak *D. immitis*, *B. malayi*, czy *W. bancrofti*.

W ramach niniejszej rozprawy doktorskiej po raz pierwszy zidentyfikowano oraz wstępnie scharakteryzowano molekularnie białko ALT u *D. repens* - Dr20/22. Ze względu na to, że Dr20/22 jest prawdopodobnie jednym z pierwszych antygenów *D. repens* wchodzących w interakcję z układem odpornościowym żywiciela, może on odgrywać kluczową rolę w inicjacji i modulacji odpowiedzi immunologicznej. Powszechnie wiadomo, że jednym z głównych celów pasożytów i wydzielanych przez nie antygenów w trakcie inwazji są APC, a szczególnie DCs, które stanowią "pomost" pomiędzy rozwojem odpowiedzi nieswoistej i nabytej. Prowadzi to zazwyczaj do rozwoju zrównoważonej odpowiedzi Th2/Treg, która umożliwia pasożytom przetrwanie przy jednoczesnym minimalizowaniu uszkodzeń tkanek żywiciela. Wobec braku znanych homologów Dr20/22 u człowieka, poznanie jego właściwości immunomodulacyjnych może nie tylko przyczynić się do lepszego zrozumienia biologii pasożyta, ale także stanowić pierwszy krok w opracowaniu skutecznych metod

zapobiegania filariozom oraz potencjalnego wykorzystania w terapii chorób autoimmunizacyjnych.

Celem pracy było określenie wpływu rekombinowanego Dr20/22 na dojrzewanie oraz funkcjonalność komórek dendrytycznych. Ze względu na wysoki potencjał zoonotyczny *D. repens*, do badań wybrano model ludzkich komórek dendrytycznych pochodzenia monocytarnego (ang. monocyte-derived dendritic cells; moDC).

4.2. Materiały i metody

4.2.1. Izolacja jednojądrzastych komórek krwi obwodowej człowieka

Do izolacji jednojądrzastych komórek krwi obwodowej (peripheral blood mononuclear cell; PBMC) użytych do przeprowadzonych eksperymentów opisanych w manuskrypcie wykorzystano kożuszki leukocyarno-płytkowe pozyskane od 10 dawców z Regionalnego Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa w Warszawie przy ulicy Saskiej 63/75.

Do 4 probówek konikalnych 50 ml dodano po 12,5 ml koncentratu leukocyarno-płytkowego oraz uzupełniono do 40 ml jałowym zrównoważonym roztworem soli Hanka (Hank's balanced salt solution; HBSS; Biowest). W celu oddzielenia PBMC od pozostałych składowych morfotycznych krwi na dno probówek wprowadzone zostało 10 ml Gradisol L (AquaMed), a mieszaninę odwirowano (25 min, 400 x g, RT, z wyłączonym hamowaniem). Interfaza zawierająca PBMC została ostrożnie przeniesiona do nowych probówek uzupełnionych następnie do 40 ml HBSS zawierającym 1% płodowej surowicy bydlęcej (fetal bovine serum; FBS; Biowest). Po odwirowaniu mieszaniny (20 min, 300 x g, RT) i usunięciu supernatantu, komórki zostały zawieszone w podłożu HBSS z dodatkiem 1% FBS rozdzielone do 2 probówek oraz uzupełnione do 40 ml podłożem hodowlanym i odwirowane stosując takie same warunki. Ostatnie płukanie PBMC przeprowadzono w jednej probówce, zawieszając ponownie komórki w 40 ml oraz wirując 10 min (500 x g, RT). Ostatecznie komórki zostały zawieszone w 25 ml zimnego buforu MACS, a następnie rozcieńczone w stosunku 1:50 w odczynniku TÜRKA oraz poddane ocenie liczebności w komorze hematologicznej Nuebauer'a.

4.2.2. Izolacja monocytów

Otrzymane w poprzednim etapie PBMC wykorzystano do izolacji monocytów, którą przeprowadzono w oparciu o metodę pozytywnej selekcji używając separatora magnetycznego oraz kulek magnetycznych koniugowanych z przeciwciałami skierowanymi przeciwko cząsteczkom powierzchniowym CD14 (CD14 Micro Beads, Miltenyi Biotec). PBMC zawieszono w stężeniu 10^7 komórek / 95 μ l buforu MACS oraz inkubowano 15 min w 4°C. Po zakończeniu inkubacji do zawiesiny dodano 10 ml zimnego buforu MACS, a następnie całość odwirowano (10 min, 300 x g, 4°C). Uzyskany osad zawieszono w roztworze MACS, osiągając stężenie 2×10^8

komórek/ml oraz przefiltrowano przez sito komórkowe o wielkości porów 70 μ M (Cell strainer 70uM, Corning®). Przygotowana zawiesina komórek została nałożona na kolumny umieszczone w separatorze magnetycznym (Miltenyi Biotec), które następnie zostały trzykrotnie przepłukane 3 ml MACS. W ostatnim etapie monocyty (CD14⁺) zostały dwukrotnie wypłukane z kolumny przy użyciu pożywki hodowlanej RPMI 1640 (Gibco) z dodatkiem 10% FBS, antybiotykami (penicylina 100 U/ml, streptomycyna 100 μ g/ml [Gibco] oraz 2 mM L-glutaminą [Gibco], zliczone używając odczynnika Trypan Blue (Sigma Aldrich) i komory Nuebauer'a oraz zawieszone w stężeniu 5×10^5 komórek/ml.

4.2.3. Izolacja dziewiczych limfocytów T CD4⁺

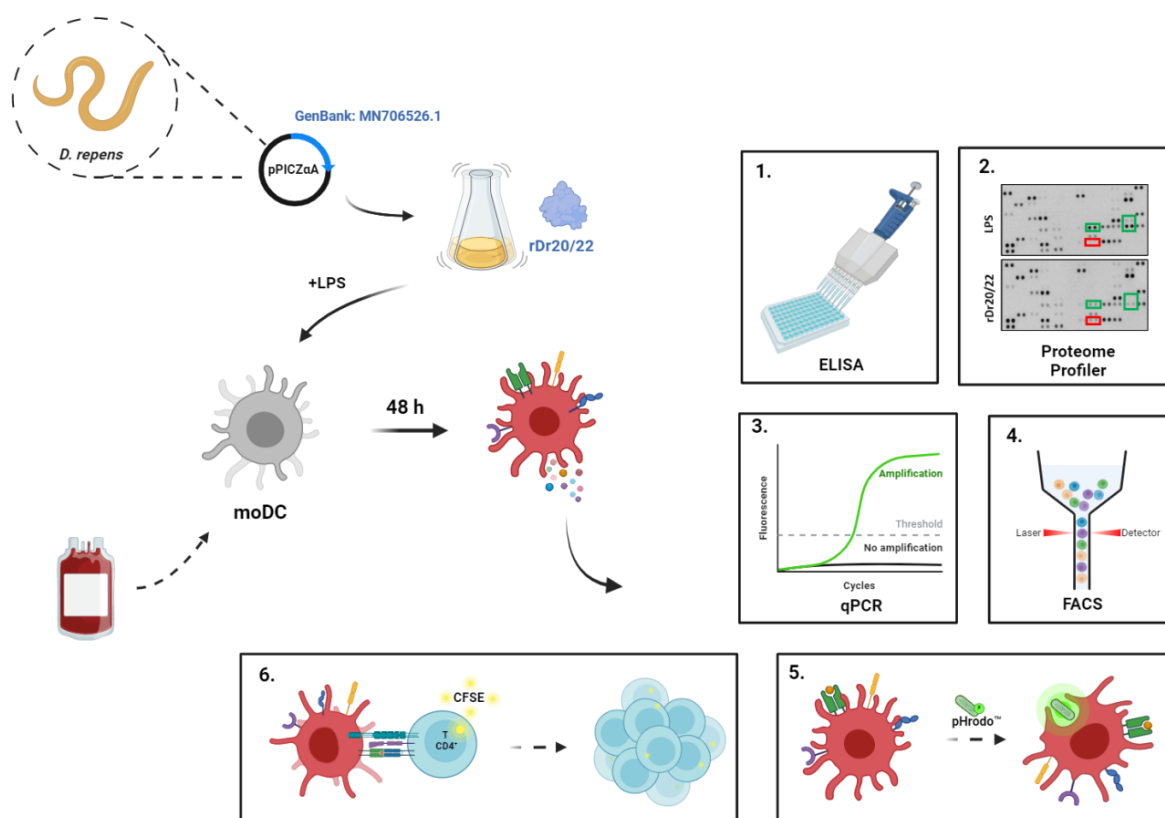
Uzyskane PBMC wykorzystano również do izolacji dziewiczych limfocytów T CD4⁺. W tym celu użyto zestawu MojoSort™ Human CD4 Naïve T Cell Isolation Kit (BioLegend) oraz separatora magnetycznego (MojoSort™ Magnet, BioLegend) wykorzystujące zasadę negatywnej selekcji. PBMC zawieszone w stężeniu 10^8 komórek/ml w buforze MACS inkubowano 15 minut na lodzie z pięciokrotnie rozcieńczonym koktajlem przeciwciał znakowanych biotyną w stosunku 10 μ l : 1×10^7 komórek. Po tym czasie komórki odwirowano (5 min, $300 \times g$, 4°C), zawieszono ponownie w buforze MACS (warunki przedstawiono w pkt. 4.2.1.) oraz kolejno inkubowano 15 min na lodzie z dziesięciokrotnie rozcieńczonymi kulkami magnetycznymi skoniugowanymi ze streptawidyną w stosunku 10 μ l do 1×10^7 komórek. PBMC odwirowano (5 min; $300 \times g$; 4°C), zawieszono w 500 μ l buforu MACS oraz przetrzymywano przez 5 min na lodzie w separatorze magnetycznym. Po zakończeniu inkubacji do próbki z komórkami dodano 3 ml MACS oraz przeniesiono mieszaninę do nowej próbki, odwirowano (5 min, $300 \times g$, 4°C) i zawieszono w 10 ml podłoża hodowlanego RPMI.

4.2.4. Hodowla komórek dendrytycznych oraz stymulacja rDr20/22

Hodowlę monocytów prowadzono w 6-dołkowych płytkach hodowlanych (Nunc™ Multidish 6 Nunclon Delta SI), Thermo Fisher Scientific) w stężeniu 5×10^5 komórek/ml, w podłożu hodowlanym RPMI, w warunkach standardowych (37°C, 5% CO₂). Dodatkowo w celu różnicowania do komórek dendrytycznych pochodzenia monocytarnego (moDC) do hodowli dodano GM-CSF (Recombinant Human Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor, BioSource Life Technologies) oraz IL-4 (Recombinant Human IL-4 Protein, R&D Systems), o stężeniu końcowym

odpowiednio 10 ng/ml i 0,86 ng/ml. Po 72 h znad komórek usunięto połowę pożywki hodowlanej i wymieniono na świeżą, zawierającą dwukrotnie skoncentrowany GM-CSF (20 ng/ml) oraz IL-4 (1,72 ng/ml). Po kolejnych 72 godzinach hodowli komórki dendrytyczne mechanicznie oddzielono od podłoża plastikowego, a żywotność oceniono stosując test wychwyty błękitu trypanu. Po zliczeniu w komorze Neubauera, komórki wysiano na 24-dołkowe płytki hodowlane (Nunc™ Multidish 24 Nunclon Delta SI, Thermo Fisher Scientific) w liczbie 1×10^5 komórek na dołek i poddano stymulacji antygenami.

Eksperyment obejmował trzy grupy badawcze, traktowane jednocześnie LPS (Lipopolysaccharide from *E. coli* O111:B4 strain, InvivoGen) w stężeniu końcowym 100 ng/ml oraz rDr20/22 w stężeniach 10, 25 lub 50 µg/ml, a także grupę kontrolną, stymulowaną wyłącznie LPS (100 ng/ml). Stymulację zakończono po upływie 48 h. Pożywkę hodowlaną zebraną znad komórek wykorzystano do określenia profilu wydzielanych cytokin przy użyciu techniki ELISA oraz Proteome Profiler XL. Komórki zdrapano, a następnie przeznaczono do analizy obecności i poziomu markerów powierzchniowych oraz oceny zmian funkcjonalnych z wykorzystaniem cytometrii przepływowej lub do założenia hodowli mieszanej z dziewiczymi limfocytami T CD4⁺ (Rycina 3.).



Rycina 3. Schemat metodyki badań.

4.2.5. Analiza stężenia wybranych cytokin

Oceny stężenia wybranych cytokin prozapalnych (TNF- α , IL-6) i przeciwzapalnych (IL-10) w pożywce hodowlanej dokonano przy użyciu komercyjnych zestawów ELISA (Human IL-6 DuoSet ELISA, Human TNF-alpha DuoSet, Human IL-10 DuoSet, R&D Systems) w oparciu o krzywą standardową, zgodnie z procedurą zapewnioną przez producenta. Do doświadczenia wykorzystano podłoże hodowlane z 10 niezależnych eksperymentów (10 różnych dawców). Uzyskane wyniki zostały wyrażone jako zmiana-krotności („fold change”) wartości prób badanych (LPS/rDr20/22) do wartości otrzymanych dla grupy kontrolnej (LPS).

4.2.6. Analiza profilu cytokin przy użyciu Human Proteome Profiler XL

Analizę profilu cytokin wydzielanych przez DCs przeprowadzono przy użyciu zestawu Human Proteome Profiler XL (Bio-Techne). Do doświadczenia wykorzystano podłoże hodowlane z 5 niezależnych eksperymentów (5 różnych dawców) z grup badanych traktowanych rDr20/22 o stężeniu 50 $\mu\text{g/ml}$ oraz grupy kontrolnej LPS. Wszystkie procedury zostały przeprowadzone zgodnie z instrukcją producenta. Kliszę zawierającą odcisk membran poddano analizie densytometrycznej wykorzystując

densytometr Bio-Rad GS800 oraz oprogramowanie Image Lab (Bio-Rad). Wyniki analizy przedstawiono jako „fold change” wartości uzyskanych dla grupy badawczej do wartości uzyskanych dla grupy kontrolnej. Cytokiny których wartość „fold change” zawierała się w przedziale -0,1 - 0,1 zostały odrzucone z dalszych rozważań.

4.2.7. Analiza poziomu markerów powierzchniowych przy użyciu cytometrii przepływowej

Po zakończeniu stymulacji antygenami komórki przeniesiono na stożkowodenną, 96-dołkową konikalną płytkę hodowlaną (Nunc™ 96-Well Polystyrene Conical Bottom MicroWell™ Plates, Thermo Fisher Scientific), odwirowano (5 min, 300 × g, 4°C), przepłukano 150 µl buforowanego roztworu soli fizjologicznej Dulbecco (Dulbecco's phosphate buffered saline; DPBS; Biowest) i ponownie odwirowano (5 min, 300 × g, 4°C). Następnie w celu określenia żywotności komórki zawieszono w rozcieńczonym 1:400 w DPBS odczynniku LIVE/DEAD™ Fixable Aqua Dead (Thermo Fisher Scientific) oraz inkubowano 15 min na lodzie bez dostępu do światła. Po tym czasie komórki zostały odwirowane (5 min, 300 × g, 4°C), przepłukane w 150 µl DPBS oraz po ponownym odwirowaniu (5 min, 300 × g, 4°C) znakowane rozcieńczonymi w MACS przeciwciałami skierowanymi przeciwko wybranym markerom powierzchniowym w dwóch niezależnych panelach (mieszaninach wyznakowanych fluorescencyjnie przeciwciał). Szczegóły dotyczące wykrywanych markerów, użytych przeciwciał oraz użytych rozcieńczeń zostały przedstawione w Tabeli 1. Po 40 min inkubacji na lodzie bez dostępu do światła, komórki przepłukano w 150 µl MACS, odwirowano (5 min, 300 × g, 4°C) oraz zawieszono w 50 µl MACS. Tak przygotowane komórki poddano analizie cytometrycznej (fluorescence-activated cell sorting; FACS) przy użyciu cytometru Northern Lights (Cytex Biosciences). Do doświadczenia wykorzystano komórki dendrytyczne z 10 niezależnych eksperymentów (10 różnych dawców). Wyniki analizy przedstawiono jako „fold change” wartości uzyskanych dla grupy badawczej (LPS/rDr20/22) do wartości uzyskanych dla grupy kontrolnej (LPS).

Tabela 1. Charakterystyka przeciwciał użytych do analizy poziomu markerów powierzchniowych metodą FACS.

	Symbol przeciwciała	Fluorochrom	Użyte rozcieńczenie	Nazwa produktu i producent
Panel 1	CD86	PECy7	1:500	PE-Cy TM 7 Mouse Anti-Human CD86, BD Pharmingen
	CD83	PE	1:100	CD83 Monoclonal Antibody (HB15e), PE, eBioscience
	CD40	APC	1:50	APC Mouse Anti-Human CD40, BD Pharmingen
	CD163	PerCPCy5.5	1:100	PerCP/Cyanine5.5 anti-human CD163 Antibody, BioLegend
	FcR BLOCK	-	1:100	Fc Receptor Binding Inhibitor Polyclonal Antibody, eBioscience
Panel 2	CD103	PECy7	1:150	PE/Cyanine7 anti-human CD103 (Integrin α E) Antibody, BioLegend
	ILT3	APC	1:400	APC anti-human CD85k (ILT3) Antibody, BioLegend
	HLA-DR	APCef780	1:250	HLA-DR Monoclonal Antibody (LN3), APC-eFluor TM 780, eBioscience
	PD-L1	PE	1:2000	CD274 (PD-L1, B7-H1) Monoclonal Antibody (MIH1), PE, eBioscience
	CD80	HV450	1:1000	V450 Mouse Anti-Human CD80, BD Biosciences
	FcR BLOCK	-	1:100	Fc Receptor Binding Inhibitor Polyclonal Antibody, eBioscience

4.2.8. Badanie procesu pobierania wyznakowanych fluorescencyjnie biocząsteczek *E. coli* przez DCs

Ocena zmian w procesie pobierania wyznakowanych fluorescencyjnie biocząsteczek *E. coli* przez komórki dendrytyczne po stymulacji rDr20/22/LPS została zbadana przy użyciu zestawu pHrodo™ BioParticles™ Phagocytosis Kit for Flow Cytometry (Invitrogen). Komórki dendrytyczne wysiane w 96-dołkowych płaskodennych płytkach (Nunc™ MicroWell™ 96-Well, Nunclon Delta-Treated, Flat-Bottom Microplate, Thermo Fisher Scientific) w liczbie 10^5 hodowano oraz stymulowano antygenami jak opisano w podrozdziale 4.2.4. Po 48 h z hodowli usunięto podłoże i zastąpiono je świeżym, zawierającym wyznakowane fluorescencyjnie biocząsteczki *E. coli* rozcieńczone w stosunku 1:10. Po 3 h inkubacji (37°C, 5% CO₂) komórki przeniesiono na konikalno-denną, 96-dołkową płytkę hodowlaną, a następnie płukano, znakowano w celu określenia żywotności oraz przygotowano do analizy cytometrycznej, zgodnie z procedurą opisaną we wcześniejszym rozdziale (4.2.7.). Do doświadczenia wykorzystano komórki dendrytyczne z 5 niezależnych eksperymentów (5 różnych dawców). Wyniki analizy przedstawiono jako „fold change” wartości uzyskanych dla grupy badawczej (LPS/rDr20/22) do wartości uzyskanych dla grupy kontrolnej (LPS). Jako pozytywną kontrolę zahamowania procesu internalizacji wykorzystano komórki stymulowane LPS, do których na pół godziny przed inkubacją z biocząsteczkami *E.coli* dodano inhibitor fagocytozy - cytochalazynę D (Sigma) o końcowym stężeniu wynoszącym 2 µg/ml.

4.2.9. Założenie kultury mieszanej DCs z dziewiczymi limfocytami CD4⁺ oraz analiza proliferacji

Dziewicze limfocyty T CD4⁺ (wyizolowane jak opisano w podrozdziale 4.2.3.) zawieszono w stężeniu 5×10^5 komórek/ml w DPBS zawierającym 0,5 µM CFSE (5,6-carboxy fluorescein diacetate succinimidyl ester, Sigma-Aldrich) oraz inkubowano przez 30 min w 37°C bez dostępu do światła. Po tym czasie, do zawiesiny dodano pięciokrotną objętość pożywki RPMI z dodatkiem 10% FBS i inkubowano przez kolejne 10 minut. Następnie mieszaninę odwirowano, a osad komórkowy zawieszono w świeżej pożywce hodowlanej. Tak przygotowane komórki wykorzystano do założenia kultur mieszanych z DCs po 48 h stymulacji antygenami (rozdział 4.2.4.). Hodowlę prowadzono w 96-dołkowych płaskodennych płytkach (Nunc™ MicroWell™ 96-Well, Nunclon Delta-Treated, Flat-Bottom Microplate, Thermo Fisher Scientific) w czterech

różnych warunkach, które różniły się stosunkiem DCs do limfocytów T CD4⁺ (1:2, 1:4, 1:8 i 1:10), przy początkowej liczbie DCs wynoszącej 5×10^3 na dołek. Po 5 dniach komórki zebrano, odwirowano ($300\text{ g} \times 5\text{ min}$), przepłukano DPBS oraz zawieszono w buforze MACS przygotowując do analizy cytometrycznej.

Eksperyment przeprowadzono 3-krotnie, wykorzystując komórki dendrytyczne pozyskane od 3 niezależnych dawców. Wyniki analizy przedstawiono jako „fold change” wartości uzyskanych dla grupy badawczej (LPS/rDr20/22) do wartości uzyskanych dla grupy kontrolnej (LPS).

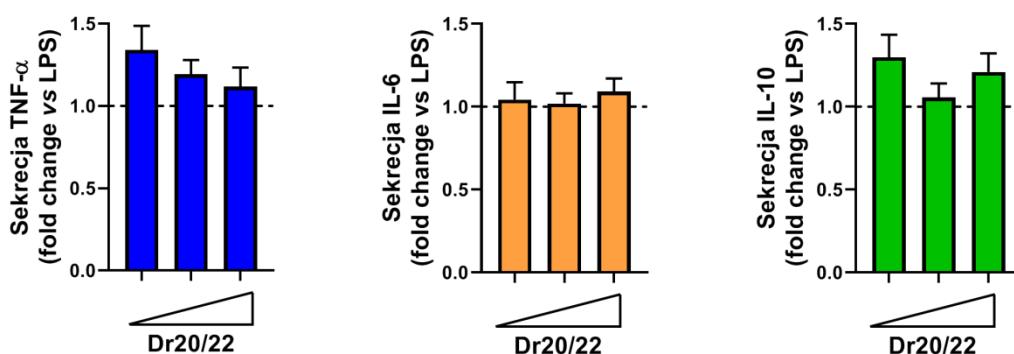
4.2.10. Analiza statystyczna

Wszystkie dane przedstawione są jako średnia $\pm$ błąd standardowy (SEM). Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą programu GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) przy użyciu testu ANOVA do analizy danych uzyskanych w ELISA oraz FACS. Różnice między grupami uznawano za statystycznie istotne przy $p < 0,05$.

4.3. Wyniki

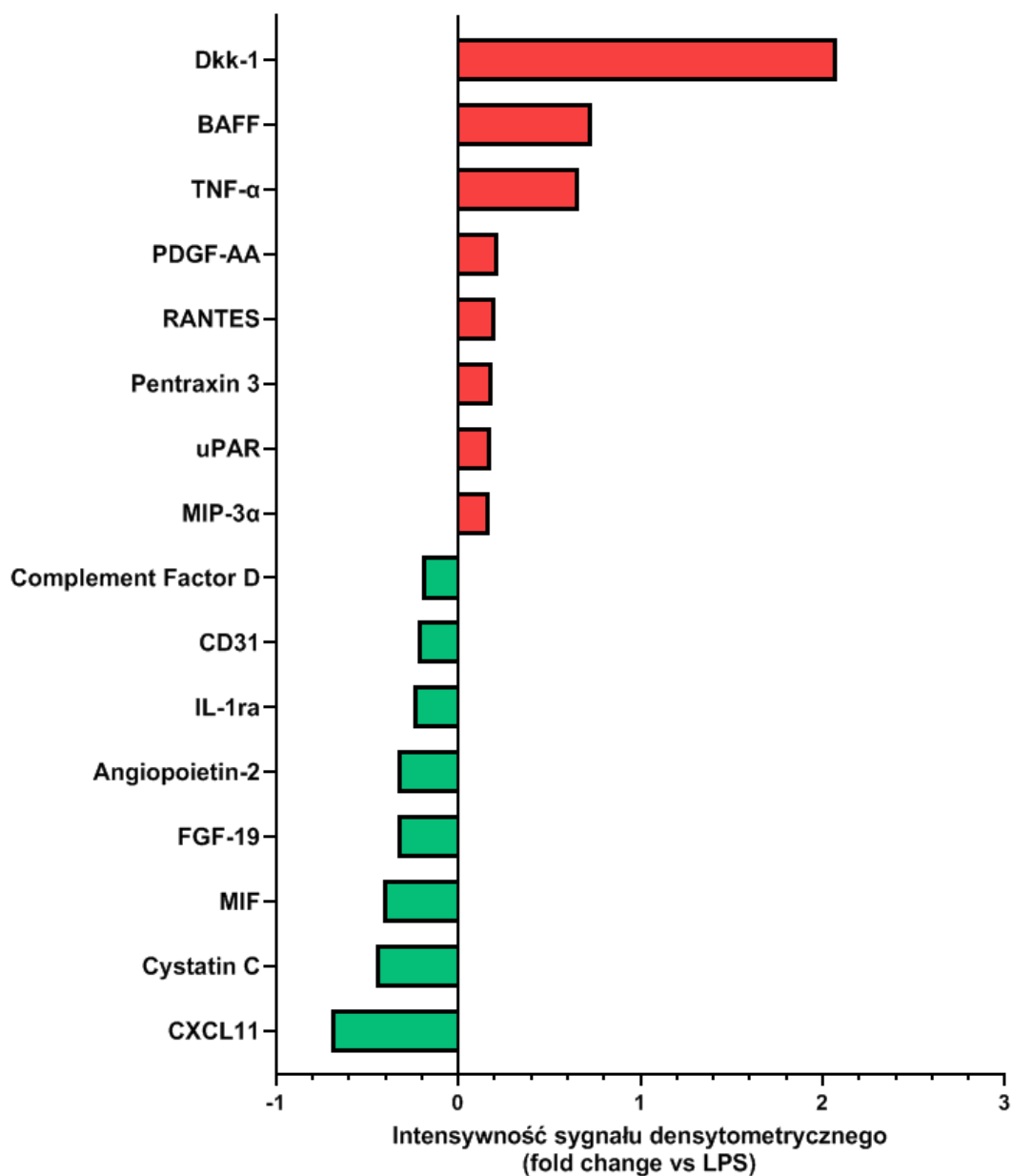
4.3.1. Analiza profilu cytokin wydzielanych przez DCs stymulowane rDr20/22

Analiza ilościowa (ELISA) wybranych cytokin prozapalnych i przeciwzapalnych obecnych w podłożu hodowlanym komórek dendrytycznych stymulowanych rDr20/22 oraz LPS nie wykazała istotnego wpływu antygeny na ich wydzielanie. Żadna z badanych dawek antygeny (10, 25 lub 50 $\mu\text{g/ml}$) nie wywołała zauważalnych zmian w syntezie IL-6. W grupach badawczych zaobserwowano wzrost stężenia TNF- α w porównaniu do grupy kontrolnej, przy czym jego poziom zmniejszał się odwrotnie proporcjonalnie do zastosowanej dawki rDr20/22. W przypadku IL-10 zaobserwowano niewielki wzrost jej stężenia przy dawkach antygeny wynoszących 10 i 50 $\mu\text{g/ml}$ (Rycina 4).



Rycina 4. Stężenie cytokin wydzielanych przez DCs stymulowanych LPS oraz różnymi dawkami rDr20/22 (10, 25 i 50 $\mu\text{g/ml}$) przedstawione jako fold change w porównaniu do grupy kontrolnej stymulowanej wyłącznie LPS (linia przerywana). Analizę statystyczną przeprowadzono stosując test ANOVA; $p^* < 0,05$.

Dalsza półilościowa analiza profilu wydzielanych cytokin przeprowadzona z użyciem Human Proteome Profiler wykazała wpływ rDr20/22 na syntezę kilkunastu spośród 105 czynników obecnych na membranie. Najsilniejszy wzrost zaobserwowano dla Dkk-1 i BAFF, natomiast wyraźnemu obniżeniu uległ m.in. poziom CXCL11 oraz Cystatyny C (Rycina 5).



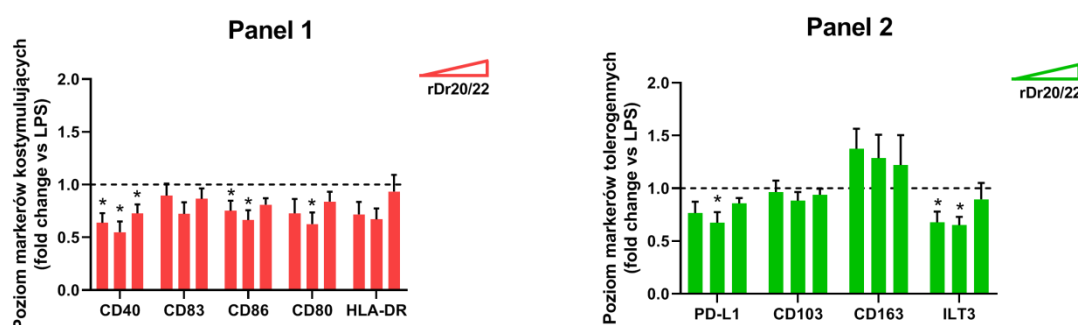
Rycina 5. Poziom wydzielania cytokin pozytywnie (zaznaczone kolorem czerwonym) oraz negatywnie (zaznaczone kolorem zielonym) regulowanych w DCs na skutek stymulacji rDr20/22 (50 μ g/ml) wyrażony jako fold change do grupy kontrolnej LPS.

4.3.2. Analiza poziomu markerów powierzchniowych DCs stymulowanych rDr20/22

Analiza obecności markerów powierzchniowych została podzielona na 2 panele. W zależności od zastosowanej dawki antygeny zaobserwowano spadek poziomu wśród wszystkich badanych markerów kostymulujących oraz MHC klasy II (Panel 1).

Wszystkie dawki antygeny istotnie wpłynęły na prezentowanie na powierzchni komórek cząsteczek CD40. Obecność CD80 oraz CD86 została istotnie obniżona przy stężeniu rDr20/22 wynoszącym odpowiednio 25 $\mu\text{g/ml}$ oraz 10 i 25 $\mu\text{g/ml}$. Te same dawki nieznacznie obniżyły również poziom cząsteczek CD83 i HLA-DR (Rycina 6).

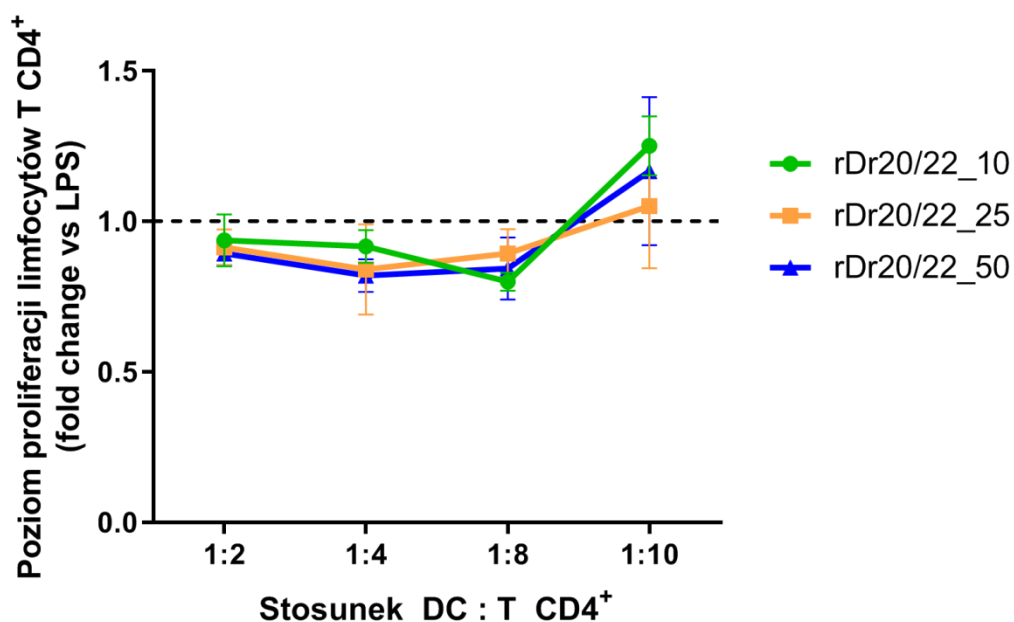
Analiza markerów, które mogą wskazywać na fenotyp tolerogeny (Panel 2) wykazała istotny spadek poziomu cząsteczek PD-L1 oraz ILT3 po zastosowaniu rDr20/22 o stężeniu odpowiednio 25 $\mu\text{g/ml}$ oraz 10 i 25 $\mu\text{g/ml}$. Zaobserwowano również nieznaczny wpływ antygeny na zwiększenie obecności CD163. Nie odnotowano natomiast zauważalnych zmian w poziomie markera CD103 (Rycina 6).



Rycina 6. Poziom badanych kostymulujących (Panel1) oraz tolerogeny (Panel2) markerów komórek dendrytycznych stymulowanych różnymi dawkami rDr20/22 (10, 25 i 50 i 25 $\mu\text{g/ml}$) wyrażony jako fold change do grupy kontrolnej LPS (linia przerywana). Analizę statystyczną przeprowadzono stosując test ANOVA; $p^* < 0,05$.

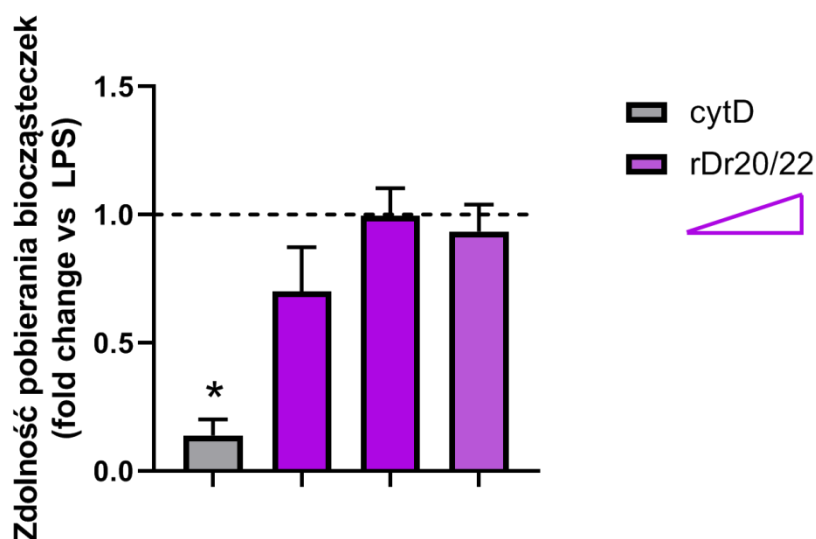
4.3.3. Analiza zmian funkcjonalności DCs stymulowanych rDr20/22

Analiza dziewiczych limfocytów T CD4^+ znakowanych CFSE wykazała zmniejszoną proliferację w kulturze mieszanej prowadzonej w obecności komórek dendrytycznych w stosunkach DCs : CD4^+ wynoszących 1:2, 1:4 oraz 1:8. Najsilniejsze działanie zaobserwowano w przypadku DCs stymulowanych rDr20/22 o stężeniu 50 $\mu\text{g/ml}$ (Rycina 7).



Rycina 7. Wpływ komórek dendrytycznych stymulowanych różnymi dawkami rDr20/22 (10, 25 i 50 µg/ml) na proliferację dziewiczych limfocytów T CD4⁺ znakowanych CFSE, wyrażony jako fold change do grupy kontrolnej LPS (linia przerywana). Analizę statystyczną przeprowadzono stosując test ANOVA; $p^* < 0,05$.

Komórki stymulowane rDr20/22 nie wykazały znaczących różnic w procesie pobierania testowanych biocząsteczek względem grupy kontrolnej LPS (Rycina 8.).



Rycina 8. Wpływ rDr20/22 (10, 25 i 50 µg/ml) na proces pobierania biocząsteczek pHrodo™ Green *E. coli* przez komórki dendrytyczne wyrażony jako fold change do grupy kontrolnej LPS (linia przerywana). Jako kontrolę wyhamowania procesu zastosowano cytochalazynę D (cytD) o stężeniu 2 µg/ml. Analizę statystyczną przeprowadzono stosując test ANOVA; $p^* < 0,05$.

4.4. Dyskusja

Dr20/22 jest przedstawicielem rodziny białek ALT, które na przestrzeni lat zostały opisane u wielu gatunków filarii takich jak np. *B. malayi* [71], *D. immitis* [75], *W. bancrofti* [74] czy *A. vitae* [73]. Ze względu na specyficzność dla larw inwazyjnych L3 oraz brak znanego homologa u ssaków, przez lata antygen cieszył się dużym zainteresowaniem w kontekście opracowania skutecznej szczepionki ochronnej przeciwko filariozom człowieka [79–85]. Gregory i wsp. (2000) w badaniach na myszokoczkach wykazali redukcję przeżywalności larw inwazyjnych *B. malayi* w grupie immunizowanej ALT aż o 76% [79]. Co więcej, badania serologiczne wykazały, że obecność przeciwciał anti-ALT w surowicy ludzi zamieszkujących tereny endemiczne może być powiązane z nabywaniem odporności na filariozy [74,79]. Niestety pomimo licznych prób praktycznego wykorzystania antygenów ALT nadal nie została zgłębiona ich biologiczna funkcja oraz mechanizmy w których uczestniczą w trakcie inwazji. W ramach niniejszej pracy podjęto próbę określenia wpływu rekombinowanego Dr20/22 *D. repens* na ludzkie komórki dendrytyczne pochodzenia monocytarnego (moDC).

W trakcie przeprowadzonych badań zaobserwowano wzrost stężenia TNF- α wydzielanego przez DC stymulowane rDr20/22, przy jednocześnie zwiększonej syntezie IL-10. Biorąc pod uwagę specyficzność antygeny dla larw inwazyjnych wywoływana mieszana odpowiedź Th1/Th2 wydaje się odnajdywać odzwierciedlenie w biologii pasożyta. Proces inwazji rozpoczyna się od indukcji odpowiedzi zapalnej w wyniku penetracji larw L3 oraz uszkodzania tkanek, którą już w trakcie pierwszych godzin/dni inwazji, pasożyty starają się zmienić na swoją korzyść polaryzując ją w kierunku Th2/Treg [67]. Badania przeprowadzone na ludzkich PBMC wykazały, że wczesna odpowiedź immunologiczna wywoływana przez żywe larwy inwazyjne *Brugia malayi* jest zdominowana przez odpowiedź prozapalną związaną ze zwiększonym wydzielaniem IFN- γ , TNF- α , GM-CSF, IL-1 α czy CXCL8 [86]. Rozwijająca się w kolejnych dniach odpowiedź przeciwzapalna charakteryzuje wiodącą rolę IL-10 oraz dysfunkcją APC [87]. Obecność IL-10 w mikrośrodkowisku nie tylko pozytywnie reguluje odpowiedź w kierunku Th2, ale może również hamować wydzielanie cytokin prozapalnych takich jak IFN- γ , IL-12, czy TNF- α [88]. Co ciekawe podwyższony poziom współczynnika IL-10/TNF- α został również zaobserwowany w surowicach pacjentów naturalnie zarażonych filariami takimi jak *Loa loa* czy *Mansonella perstans* [89].

Obecnie w literaturze brakuje informacji na temat wpływu antygenów ALT na komórki układu immunologicznego człowieka, jednak zwiększone wydzielanie IL-10 na skutek działania homologów ALT *B. malayi* i *W. bancrofti* zaobserwowano również w splenocytach myszy oraz suwaka mongolskiego (*Meriones unguiculatus*) [74,77,78,90]. Niektóre opracowania wskazują również wpływ antygenów na hamowanie wydzielania cytokin prozapalnych takich jak TNF- α , IFN- γ , IL-6, IL-17 [76,77]. Co ciekawe, Aparnaa i wsp. (2014) zaproponowali mechanizm w którym działanie immunomodulacyjne ALT towarzyszące dysregulacji TLR4 ma się przyczyniać do rozwoju antygenowo-specyficznej hiporeaktywności oraz rozwoju tolerancji immunologicznej związanej ze zwiększonym wydzielaniem IL-10 [88].

Komórki dendrytyczne stanowią pomost pomiędzy rozwojem odpowiedzi nieswoistej i nabytej, dlatego są częstym celem pasożytów. Powszechnie wiadomo, że związki wydzielane przez pasożyty mogą wpływać na proces dojrzewania komórek dendrytycznych oraz prowadzić do upośledzenia ich funkcji. W moDC traktowanych rDr20/22 obecność cząsteczek kostymulujących (CD40, CD80, CD83, CD86) oraz MHC klasy II (HLA-DR) uległa obniżeniu. Wszystkie z nich biorą bezpośrednio lub pośrednio (jako sygnał kostymulujący) udział w procesie prezentacji antygenów i aktywacji limfocytów T oraz charakteryzują się wysokim poziomem na dojrzałych DCs. Przeciwnie, w przypadku niedojrzałych DCs poziom wymienionych cząsteczek jest niski, a komórki nie wykazują zdolności do prezentacji antygenów, podczas gdy ich główną funkcją pozostaje pobieranie antygenów [91,92]. Co ciekawe mimo niedojrzałego fenotypu badanych komórek, w przeprowadzonych badaniach nie zaobserwowano wzrostu ich zdolności do internalizacji znakowanych biocząsteczek *E. coli*. DCs traktowane rDr20/20 o stężeniu 10 $\mu\text{g/ml}$ wykazywały niższą aktywność w porównaniu do komórek z grupy kontrolnej (LPS). Zaburzony proces dojrzewania komórek dendrytycznych ma również bezpośrednie konsekwencje w kontekście aktywacji limfocytów T. Przypuszczenia te potwierdza test z wykorzystaniem CFSE, w którym odnotowano niewielki spadek proliferacji dziewiczych limfocytów T hodowanych w obecności DCs stymulowanych rDr20/22.

Przeprowadzona w ramach rozprawy analiza cytometryczna obejmowała również ocenę poziomu markerów powierzchniowych powszechnie określanych jako tolerogenne, takich jak CD103, CD163, ILT3 oraz PD-L1. ILT3 oraz PD-L1 są kluczowymi cząsteczkami prezentowanymi przez tolerogenną populację DC (Tol-DC).

Obecność tych markerów umożliwia Tol-DC indukcję anergii czy aktywację komórek T regulatorowych [93,94]. Rozwój antygenowo-specyficznej tolerancji na skutek nadekspresji genów kodujących wymienione markery został udowodniony w badaniach nad *Schistosoma mansoni* [95] czy *Trichinella spiralis* [96]. Wbrew przewidywaniom, rDr20/22 nie tylko nie zwiększył poziomu ILT3 i PD-L1, ale spowodował ich istotny spadek przy dawce antygeny wynoszącej 25 µg/ml, co mogłoby świadczyć o zachowaniu prozapalnego immunofenotypu DCs. Co ciekawe, niektóre źródła donoszą, że ILT3 może być również zaangażowany w proces pobierania antygeny [97]. Fakt ten mógłby tworzyć powiązanie niskiej frekwencji markera ze zmniejszoną zdolnością komórek do pobierania antygeny.

Wykonana analiza ujawniła również niewielki wzrost poziomu markera powierzchniowego CD163. Należący do receptorów zmiataczy CD163 wiąże krążące kompleksy hemoglobina-haptoglobina (Hb-Hp) zapobiegając stresowi oksydacyjnemu oraz stanom zapalnym związanym z pozakomórkowym metabolizmem hemoglobiny. Interakcja kompleksu Hb-Hp/CD163 prowadzi do uwolnienia IL-10, która dodatkowo zwiększa ekspresję genu *cd163*, tworząc pozytywne sprzężenie zwrotne [98]. Wykazano również, że zwiększona frekwencja CD163 na ludzkich makrofagach wpływa na bardziej efektywne gojenie ran [99,100]. Mimo że przez wiele lat uważano, iż cząsteczki CD163 są prezentowane głównie na makrofagach o immunofenotypie M2 [101], w badaniach nad moDC, Comi i wsp. (2019) wykazali, że CD163 jest również markerem specyficznym dla tolerogenicznej subpopulacji komórek dendrytycznych, znanych jako DC-10 [102]. Wśród populacji zaobserwowano dodatnią korelację w ekspresji genów kodujących CD163 i IL-10, ale również niski poziom cząsteczek kostymulujących. Cechy te pozwalają im wpływać na mikrośrodowisko odgrywając istotną rolę w indukcji różnicowania limfocytów T regulatorowych typu 1 (type 1 regulatory cells; Tr1) [102–105].

Do lepszego zrozumienia obserwowanych mechanizmów niezbędne jest również zgłębienie zmian w mikrośrodowisku oraz poznanie cytokin, czy szlaków sygnałowych prowadzących do zaburzenia funkcji efektorowych. Wykonana w tym celu analiza proteomiczna (Human Proteome Profiler XL) umożliwiła identyfikację kilkunastu cytokin, których synteza przez moDC zmieniła się na skutek działania rDr20/22. Wśród nich szczególną uwagę należy zwrócić na regulowane pozytywnie - BAFF i Dkk-1 oraz negatywnie - CXCL11 oraz cystatynę C.

Cystatyna C należy do rodziny inhibitorów proteaz cysteinowych. Białka te pełnią szereg funkcji immunomodulacyjnych w komórkach układu odpornościowego, również w DCs, gdzie kontrolują aktywność proteaz cysteinowych zaangażowanych w proces prezentacji antygenów. Ponadto cystatyny mogą być również wydzielane zewnątrzkomórkowo, a w kontekście inwazji pasożytniczych odpowiedzialne za neutralizację aktywnych enzymatycznie antygenów pasożyta ^[106]. Do takich związków można zaliczyć między innymi należące do rodziny proteaz cysteinowych katepsyny L. Białka te są jednymi z najintensywniej uwalnianych antygenów przez larwy L3 filarii, co dzięki ich zdolności do rozkładu macierzy pozakomórkowej umożliwia im wnikanie oraz migrację między tkankami żywiciela ^[107]. Katepsyny L pełnią również kluczową rolę w remodelacji kutikuli podczas procesu linienia ^[108].

CXCL11 jest czynnikiem chemotaktycznym indukowanym w odpowiedzi na cytokiny prozapalne, szczególnie IFN- γ . Chemokina ta pełni kluczową rolę w organizowaniu odpowiedzi immunologicznej, odpowiadając za rekrutację do miejsc inwazji lub zapalenia komórek odpornościowych, takich jak makrofagi, komórki dendrytyczne, komórki NK czy limfocyty T CD4⁺ subpopulacji Th1. Wysoki poziom CXCL11 może korelować z ciężkim stanem zapalnym i uszkodzeniem tkanek, co przyczynia się do wystąpienia objawów klinicznych obserwowanych w przypadku rozwoju niektórych pasożytów ^[109]. Niektóre badania, jak te nad *F. hepatica* sugerują, że antygeny helmintów mogą prowadzić do zmniejszenia stężenia CXCL11 wydzielanej przez moDC, tym samym regulując środowisko prozapalne oraz marginalizując uszkodzenia tkanek żywiciela podczas rozwijającej się inwazji ^[110]. W literaturze brak jest jednak jakichkolwiek informacji na temat, czy i jakie antygeny filarii wpływają na syntezę CXCL11 przez komórki układu odpornościowego żywiciela. Z badań dotyczących inwazji *Mansonella perstans* wynika, że u zarażonych ludzi zaobserwowano obniżone stężenie, dzielących z CXCL11 wspólny receptor (CXCR3), CXCL9 oraz CXCL10 ^[111].

BAFF jest należącym do ligandów czynnika martwicy nowotworów transbłonowym białkiem występującym między innymi na powierzchni makrofagów czy DC, które może być jednak odcięte, generując rozpuszczalny fragment białkowy. Oddziałując z receptorami na powierzchni limfocytów B (BAFF-R, TACI, BCMA), odgrywa kluczową rolę w aktywacji i różnicowaniu komórek plazmatycznych, a także przyczynia się do ich przetrwania zapobiegając apoptozie. Co więcej BAFF może

uczestniczyć w przełączaniu izotypów Ig w sposób niezależny od sygnału kostymulującego CD40^[112–114]. Proces przełączania klas immunoglobulin, jest jednym z najważniejszych mechanizmów immunomodulacyjnych stosowanych przez filarie w celu rozwinięcia przewlekłej, patentnej inwazji. Helminy te premiują wydzielanie IgG4, które nie tylko nie wykazują zdolności do aktywacji układu dopełniacza i ADCC, ale również konkurują o miejsce wiązania z IgE.

Dkk-1 (Dickkopf-related protein 1) jest głównym inhibitorem szlaku sygnałowego Wnt/ β -katenina odgrywającego istotną rolę w regulowaniu odpowiedzi immunologicznej. Wnt wiążąc się z receptorami Fzd/LRP5/6 rozpoczyna klasyczną aktywację szlaku, który prowadzi do zwiększonego poziomu β -kateniny w cytoplazmie, a następnie jej translokacji do jądra komórkowego, gdzie tworząc kompleks z czynnikami transkrypcyjnymi z rodziny TCF/LEF aktywuje ekspresję genów zależnych od szlaku. Brak sygnału pochodzącego od kompleksu Wnt/Fzd/LRP5/6 prowadzi do fosforylacji β -kateniny, a następnie do jej ubikwitynacji oraz degradacji w proteasomie. W rezultacie kompleks TCF/LEF działa jako represor transkrypcji. Ze względu na plejotropową naturę szlaku ciężko wskazać jego dokładną funkcję. Jest on zaangażowany m. in. w dojrzewanie APC czy różnicowanie oraz proliferację limfocytów T. Rodzaj odpowiedzi wywołanej poprzez jego aktywację jest prawdopodobnie dostosowany do specyficznej natury patogenu, co powoduje, że może mieć właściwości zarówno prozapalne jak i przeciwzapalne^[115–117]. W mysim modelu leishmaniozy wykazano, że Dkk-1 indukuje polaryzację w kierunku Th2 i wzmacnia wydzielanie IL-4 oraz IL-10, a jego wyhamowanie chroni żywiciela przed rozwojem inwazji, znacznie redukując przetrwanie pasożytów^[118]. Przeciwnie, w przypadku inwazji *T. cruzi* zaobserwowano, że zahamowanie szlaku Wnt/ β -katenina prowadzi do zwiększonego wydzielania cytokin prozapalnych (IFN- γ , IL-12, TNF- α , IL-6) przy jednoczesnym zahamowaniu uwalniania TGF- β ^[119]. Niektóre opracowania wskazują również na udział szlaku Wnt (którego głównym regulatorem jest Dkk-1) na różnicowanie tolerogennych DCs oraz Treg^[120].

Podsumowując, przeprowadzone badania wykazały, że antygen rDr20/22 *Dirofilaria repens* moduluje proces dojrzewania moDC, prowadząc do powstania immunofenotypu charakteryzującego się współwystępowaniem cech właściwych zarówno niedojrzałym, jak i dojrzałym DCs. Z jednej strony zaobserwowano cechy typowe dla komórek niedojrzałych, takie jak obniżony poziom cząsteczek

kostymulujących (CD40, CD80, CD83, CD86) i MHC klasy II (HLA-DR) oraz zmniejszoną zdolność do indukcji proliferacji naiwnych limfocytów T. Z drugiej strony, komórki wykazują cechy charakterystyczne dla fenotypu prozapalnego, o czym świadczy wydzielanie TNF- α oraz obniżony poziom cząsteczek immunoregulacyjnych ILT3 i PD-L1. Dodatkowo, zachowana zdolność do pobierania biocząsteczek na poziomie porównywalnym z komórkami stymulowanymi LPS potwierdza częściowo dojrzały charakter badanych komórek. Obrany fenotyp komórek można by zatem określić jako „częściowo dojrzały”, z ang. „semi-mature”.

Taki złożony fenotyp sugeruje, że antygen rDr20/22 może odgrywać specyficzną rolę w strategii przetrwania pasożyta. Zamiast indukcji pełnej tolerancji immunologicznej, komórki dendrytyczne wydają się przejmować funkcje związane z utrzymaniem homeostazy i kontrolą miejscowego zapalenia. Obserwowany nieznaczny wzrost wydzielania IL-10 oraz występowania CD163 może sprzyjać procesom gojenia ran i regeneracji tkanek, ułatwiając pasożyтови migrację między tkankami żywiciela oraz tworząc korzystne dla jego przetrwania mikrośrodowisko. Mimo że do pełnego zrozumienia roli Dr20/22 w trakcie inwazji *D. repens* niezbędna jest kontynuacja badań, a uzyskane wyniki otwierają jednak nowe perspektywy badawcze. Zrównoważona odpowiedź Th1/Th2 wywoływana przez antygen wydaje się być szczególnie interesująca w kontekście opracowania potencjalnych, nowych metod zapobiegania filariozom.

5. Wyniki nieopublikowane - część II

Wykorzystanie metody Real-Time PCR w wykrywaniu oraz różnicowaniu inwazji *Dirofilaria repens*, *Dirofilaria immitis* i *Acanthocheilonema reconditum* oraz określenie prevalencji wśród populacji bezdomnych psów i kotów w wybranych regionach Ukrainy.

5.1 Uzasadnienie badań

Konflikt zbrojny wywołany inwazją Rosji na Ukrainę w lutym 2022 roku zapoczątkował kryzys humanitarny, w wyniku którego według raportu Wysokiego Komisarza Narodów Zjednoczonych ds. Uchodźców (United Nations High Commissioner for Refugees; UNHCR) z stycznia 2024 roku, ponad 6,3 miliona osób opuściło Ukrainę, a dodatkowe 3,7 miliona zostało przesiedlonych wewnątrz kraju ^[121]. Kryzys wpłynął również na znaczący wzrost populacji bezdomnych zwierząt, których liczebność przed wojną szacowana była na około 200 000 bezdomnych psów oraz prawdopodobnie jeszcze więcej kotów ^[122]. Pozbawione odpowiedniej opieki oraz środków zapobiegawczych bezdomne zwierzęta stają się nosicielami wielu chorób, w tym pasożytów, stanowiąc realne zagrożenie biologiczne. Brak odpowiedniego nadzoru w połączeniu ze zmianami klimatu wpływa na ryzyko niekontrolowanego rozprzestrzeniania się chorób oraz ich przeniesienia na człowieka. Niniejsze badania skupiają się na dirofilariozie, która jest obecnie jedną z najszybciej rozprzestrzeniających się chorób wektorowych w Europie oraz wykazującej wysoki potencjał zoonotyczny. Dirofilarioza w Ukrainie ma status choroby podlegającej obowiązkowej rejestracji, a tylko na przestrzeni lat 1995-2012 odnotowano 1465 zachorowań u ludzi ^[46]. Mimo to wiedza na temat występowania tej pasożytozy u zwierząt towarzyszących pozostaje ograniczona, a jej aktualny status epidemiologiczny niepewny. W czasach kryzysu, takiego jak wojna, znaczenie przestrzegania koncepcji „One Health” - które uznaje wzajemne powiązanie zdrowia ludzi, zwierząt i środowiska - staje się jeszcze bardziej kluczowe, zapewniając kompleksową strategię zarządzania chorobami zoonotycznymi.

Celem pracy był rozwój i walidacja metody molekularnej Real-Time PCR w kontekście diagnozowania i różnicowania inwazji *D. repens*, *D. immitis* i *A. reconditum* oraz jej zastosowanie w prowadzeniu nadzoru epidemiologicznego dirofilariozy wśród populacji bezdomnych psów i kotów w Ukrainie. Badania

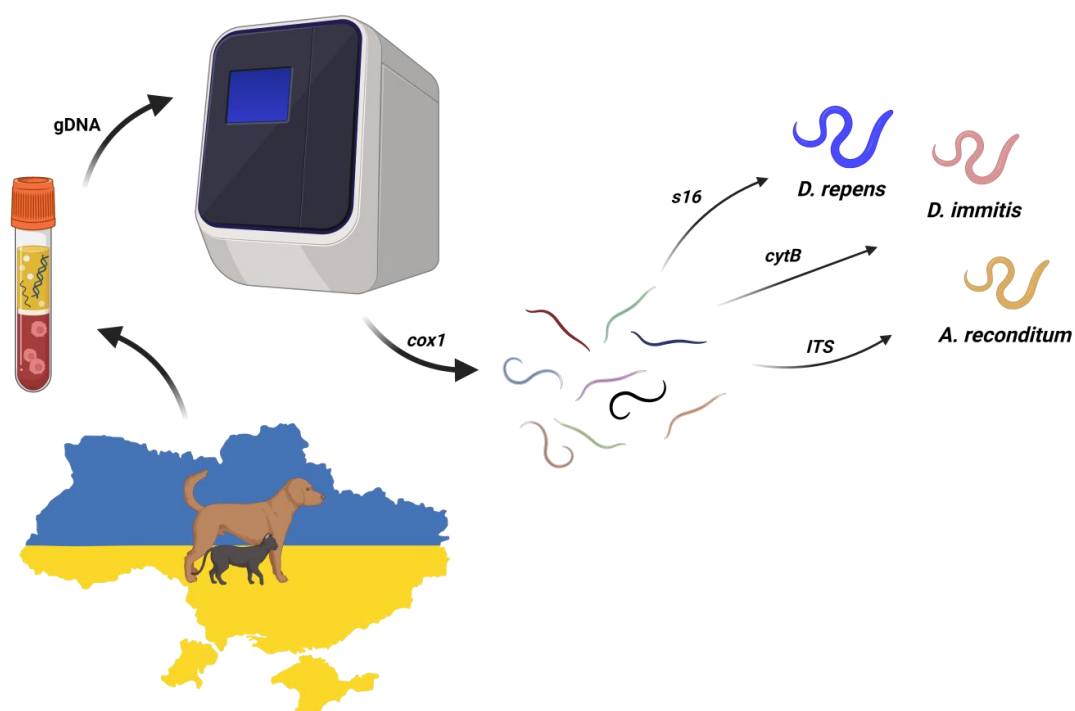
przeprowadzone zostały we współpracy z Europejską Radą Konsultacyjną do spraw Parazytoz Zwierząt Towarzyszących (European Scientific Counsel Companion Animal Parasites; ESCCAP) oraz Ukrainскими organizacjami pozarządowymi (non-governmental organization; NGO) w ramach narodowego programu sterylizacji oraz szczepień bezdomnych zwierząt.

5.2. Materiały i metody

5.2.1. Izolacja DNA genomowego i qPCR

Do badań wykorzystano próbki krwi pobrane od 457 bezdomnych psów ($n = 233$) i kotów ($n = 224$) w okresie od marca do grudnia 2023 roku z pięciu obszarów miejskich na terenie Ukrainy: Charkowa ($49^{\circ}59'33''N$ $36^{\circ}13'52''E$), Sum ($50^{\circ}54'43''N$ $34^{\circ}48'10''E$), Zwienigorodki ($49^{\circ}4'11''N$ $30^{\circ}58'4''E$), Berdyczowa ($49^{\circ}54'0''N$ $28^{\circ}34'0''E$) oraz Lwowa ($49^{\circ}50'33''N$ $24^{\circ}01'56''E$). Odpowiednio 300 μ l i 100 μ l krwi od psów i kotów wykorzystano do izolacji DNA genomowego (gDNA) przy użyciu zestawu Blood Mini Kit (AA Biotechnology).

Na początku każda próbka została wykorzystana w Real-Time PCR z oligonukleotydami namnażającymi fragment genu *LINE-1* u psów^[123] oraz 28s *rRNA* u kotów^[124], pełniącymi funkcję wewnętrznej kontroli pozytywnej potwierdzającej skuteczność procesu izolacji. Następnie wszystkie izolaty zostały poddane dwuetapowemu procesowi wykrywania oraz rozróżniania inwazji *Dirofilaria* spp. W pierwszym etapie przeprowadzono reakcję z oligonukleotydami namnażającymi konserwatywny dla rodziny Onchocercidae fragment genu *cox1*, pozwalającymi na wykrycie dowolnego gatunku filarii. Pozytywne próbki zostały poddane kolejnym niezależnym reakcjom z specyficznymi-gatunkowo oligonukleotydami umożliwiającymi identyfikację oraz rozróżnienie inwazji *Dirofilaria repens*, *Dirofilaria immitis* i *Acanthocheilonema reconditum* (Rycina 9).



Rycina 9. Schemat przeprowadzonego badania. Próbkki krwi pobrane od psów i kotów z wybranych regionów Ukrainy wykorzystano do izolacji DNA genomowego oraz wykrywania i różnicowania inwazji *D. repens*, *D. immitis* i *A. reconditum* przy użyciu Real-Time PCR z gatunkowo-specyficznymi oligonukleotydami.

Oligonukleotydy wykorzystane w reakcjach zostały przedstawione w Tabeli 2.

Tabela 2. Lista oligonukleotydów użytych w Real-Time PCR.

Nazwa oligonukleotydu	Sekwencja (5' -> 3')	Gen/region	Gatunek/rodzina
For_LINE1_dog	CAAATGCAATGAAACGCCGGGACA	LINE1	<i>Canis lupus familiaris</i>
Rev_LINE1_dog	TCTTTCGTTGGACACCGAGGCTC		
For_28s_cat	CGCTAATAGGGAATGTGAGCTAG	28S rRNA	<i>Felis catus</i>
Rev_28s_cat	TGTCTGAACCTCCAGTTTCTCTG		
For_cox1_filariae	GGGTAATCCTTTGTTGTATCAGCATTTG	cox1	<i>Onchocercidae</i>
Rev_cox1_filariae	GCCAAACAAACGATCCTTATCAGTCAA		
For_s16_Dr	CTCCGGAGTTAACAGGGTTGTAGA	16S rRNA	<i>D. repens</i>
Rev_s16_Dr	CAGTCTCAAAAAAAAAACAATCTCTCCTCC		
For_CytB_Di	CTATTCTTATTTGACCGGGTGCG	cytB	<i>D. immitis</i>
Rev_CytB_Di	GATAATCAGTAGGATAATACCCAGCT		
For_ITS_Ar	GTCAGGTGATGTTTGATGTGC	ITS	<i>A. reconditum</i>
Rev_ITS_Ar	ATTGTGTGCCAACTGTATACTGCT		

Każdą reakcję przeprowadzono w trzech powtórzeniach z wykorzystaniem aparatury Real-Time PCR QuantStudio 6 (Applied Biosystems) zgodnie z protokołem PowerUp SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems), uwzględniając analizę krzywej topnienia. Skład mieszaniny reakcyjnej zawierał 3 µl gDNA, 5 µl PowerUp SYBR Green Master Mix Buffer (Applied Biosystems), mieszaninę oligonukleotydów o końcowym stężeniu 0,6 µM oraz wodę wolną od nukleaz uzupełniającą objętość mieszaniny do 10 µl. Warunki reakcji zostały przedstawione w Tabeli 3.

Tabela 3 Warunki Real-Time PCR.

Etap	Temperatura (°C)	Czas	40 cykli
Aktywacja uracylo-DNA glikozylazy	50	2 min	
Denaturacja wstępna	95	2 min	
Denaturacja	95	3 s	
Przyłączanie/wydłużanie	60	30 s	
Krzywa topnienia	Zgodnie z protokołem producenta PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix (Applied Biosystems)		

5.2.2. Ocena czułości i specyficzności reakcji

Czułość metody została określona na podstawie limitu wykrycia pojedynczych mikrofilarii obecnych w badanej próbce. Jedna, trzy lub dziesięć żywych mikrofilarii zostały wyizolowane z kropli krwi, a następnie przeniesione do próbek zawierających 300 μ l świeżej krwi od niezarażonego psa. Każdy z warunków (1 mf, 3 mf, 10 mf) powtórzono w trzech grupach biologicznych, wykorzystując krew od trzech różnych psów. 3 μ l gDNA wyizolowanego z każdej z próbek zostały użyte w qPCR z oligonukleotydami specyficznymi do konserwatywnego dla rodziny Onchocercidae fragmentu genu *cox1*.

Specyficzność użytych oligonukleotydów została zbadana za pomocą analizy krzywej topnienia produktów PCR oraz porównaniu z próbkami referencyjnymi. Analizę tę przeprowadzono zarówno dla oligonukleotydów specyficznych dla rodziny Onchocercidae jak i gatunkowo-specyficznych. Jako wzorce referencyjne wykorzystano pochodzący z wcześniejszych badań gDNA z mikrofilarii i dorosłych nicieni *D. repens* (n = 11) i *D. immitis* (n = 11) ^[125], ale również dodatkowo gDNA wyizolowany z krwi psów z współistniejącymi inwazjami obu gatunków *Dirofilaria* (n = 10), a także psów zarażonych innymi filariami, takimi jak *Acanthocheilonema reconditum* (n = 2), *Brugia patei* (n = 1) oraz *Onchocerca lupi* (n = 1). Dla ostatecznego potwierdzenia wybrane produkty poddano sekwencjonowaniu Sangera. Reakcja sekwencjonowania została zlecona zewnętrznej firmie Genomed S.A.

Wszystkie reakcje przeprowadzone w celu walidacji czułości i specyficzności testu wykonano w trzech powtórzeniach, zgodnie z warunkami opisanymi w rozdziale 5.2.1.

5.2.3. Ocena ogólnej prevalencji oraz czynników ryzyka inwazji filarii u psów

Ogólna prevalencja inwazji *D. repens*, *D. immitis*, *A. reconditum* oraz inwazji mieszanych u psów i kotów została przedstawiona jako udział procentowy z uwzględnieniem przedziałów ufności (confidence intervals, CI) wynoszącymi 95% na podstawie wyników uzyskanych z molekularnej diagnostyki. Szczegółowa lista zarażonych psów i kotów w wybranych regionach została przedstawiona w Tabeli 4.

Tabela 4. Lista zarażonych psów i kotów w regionach objętych badaniem. DR - *D. repens*; DI - *D. immitis*; AR - *A. reconditum*.

Region	Psy/koty	DR	DI	AR	DR+DI	DR+AR	DI+AR	DR+DI+AR	Całkowita liczba
Lwów	Psy	1	-	-	-	-	-	-	1
Berdyczów	Psy	10	-	-	-	-	-	-	10
Zwienigorodka	Psy	23	2	4	1	4	-	1	35
Sumy	Psy	-	-	-	1	2	-	-	3
	Koty	3		-	-	-	-	-	3
Charków	Psy	8	5	-	4	-	-	-	17
	Koty	3	2	-	-	-	-	-	5

Dodatkowo populacja psów została podzielona na podgrupy na podstawie parametrów takich jak płeć (samiec/samica), wiek (<3 lata; 3–10 lat; ≥10 lat) i masa ciała (<10 kg; 10–25 kg; ≥25 kg) w celu przeprowadzania analizy czynników ryzyka inwazji filarii. Z powodu niekompletnych danych dotyczących wymienionych kryteriów 16 psów zostało wykluczonych z analizy. Zostały jednak uwzględnione w określeniu ogólnej prevalencji. Szczegóły dotyczące liczby próbek pobranych od psów/kotów z wybranych regionów oraz ich klasyfikacja do podgrup ze względu na płeć, wiek i masę ciała została przedstawiona w Tabeli 5.

Tabela 5. Szczegółowa dystrybucja próbek krwi psów i kotów w poszczególnych regionach, sklasyfikowanych według płci, wieku i wagi. NA - nie poddane analizie.

Region	Psy/koty	Płeć	Wiek (lata)	Masa ciała (kg)	Całkowita liczba
Lwów	Psy	Samce: 5	<3 : 1	<10: 2	11
		Samice: 3	3-10 : 4	10-25: 2	
			≥10 : 3	≥25: 4	
		Brak informacji: 3			
Berdyczów	Psy	Samce: 9	<3 : 11	<10: 0	29
		Samice: 20	3-10 : 16	10-25: 21	
			≥10 : 2	≥25: 8	
Zwienigorodka	Psy	Samce: 22	<3 : 32	<10: 3	70
		Samice: 48	3-10 : 33	10-25: 64	
			≥10 : 5	≥25: 3	
Sumy	Psy	Samce: 5	<3 : 0	<10: 5	17
		Samice: 12	3-10 : 11	10-25: 8	
			≥10 : 6	≥25: 4	
	Koty	Samce: 17	<3 : 52	NA	97
		Samice: 80	3-10 : 37		
			≥10 : 7		
		Brak informacji: 1			
Charków	Psy	Samce: 16	<3 years: 53	<10: 33	106
		Samice: 77	3-10 years: 38	10-25: 52	
			≥10 years: 2	≥25: 8	
		Brak informacji: 13			
	Koty	Samce: 26	<3 : 79	NA	127
		Samice: 90	3-10 : 37		
			≥10 : 0		
		Brak informacji: 11			

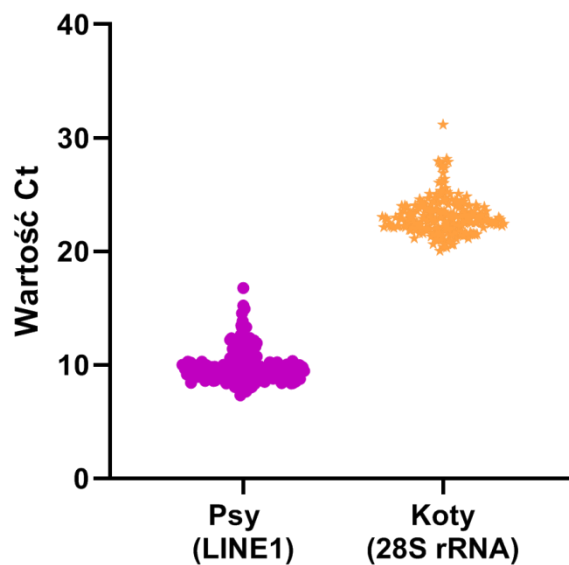
5.2.4. Analiza statystyczna

Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą programu GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) przy użyciu testu chi-kwadrat. Różnice między grupami uznawano za statystycznie istotne przy $p < 0,05$.

5.3. Wyniki

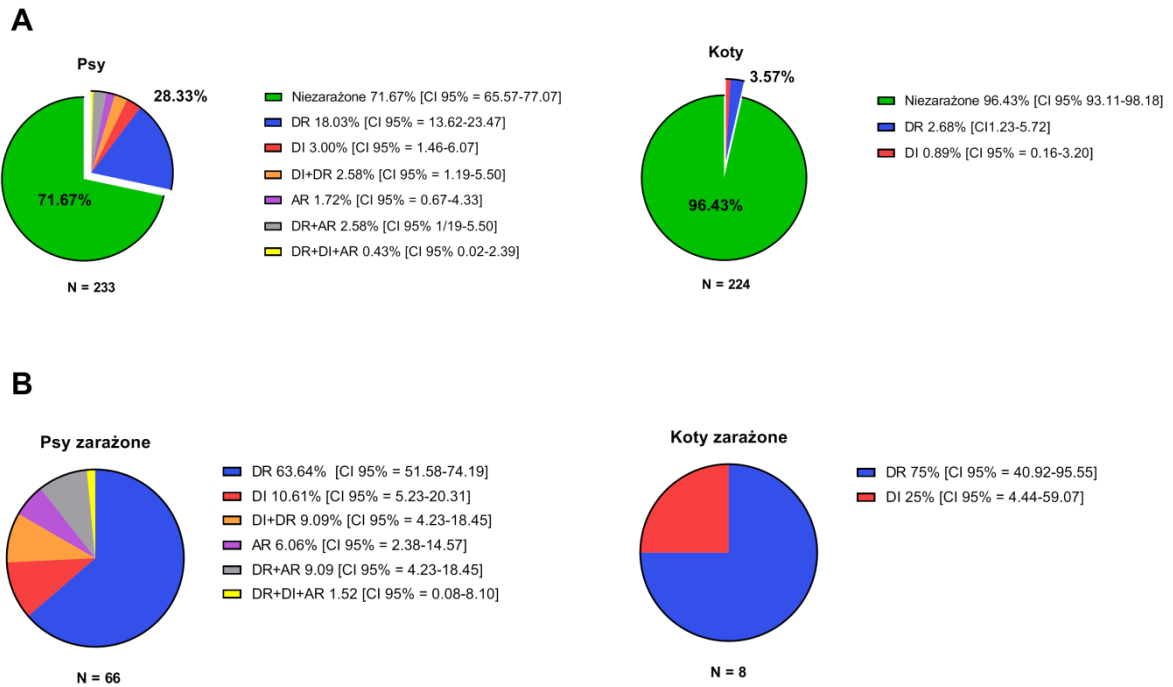
5.3.1. Ogólna prevalencja filarioz oraz analiza czynników ryzyka u psów

We wszystkich próbkach DNA wyizolowanych z krwi psów i kotów z powodzeniem przeprowadzono wewnętrzną kontrolę PCR, namnażającą fragment DNA specyficzny dla psa (*LINE1*) lub kota (*28S rRNA*), co potwierdziło skuteczność procesu izolacji oraz pozwoliło na wykorzystanie w dalszej diagnostyce molekularnej filarioz (Rycina 10).



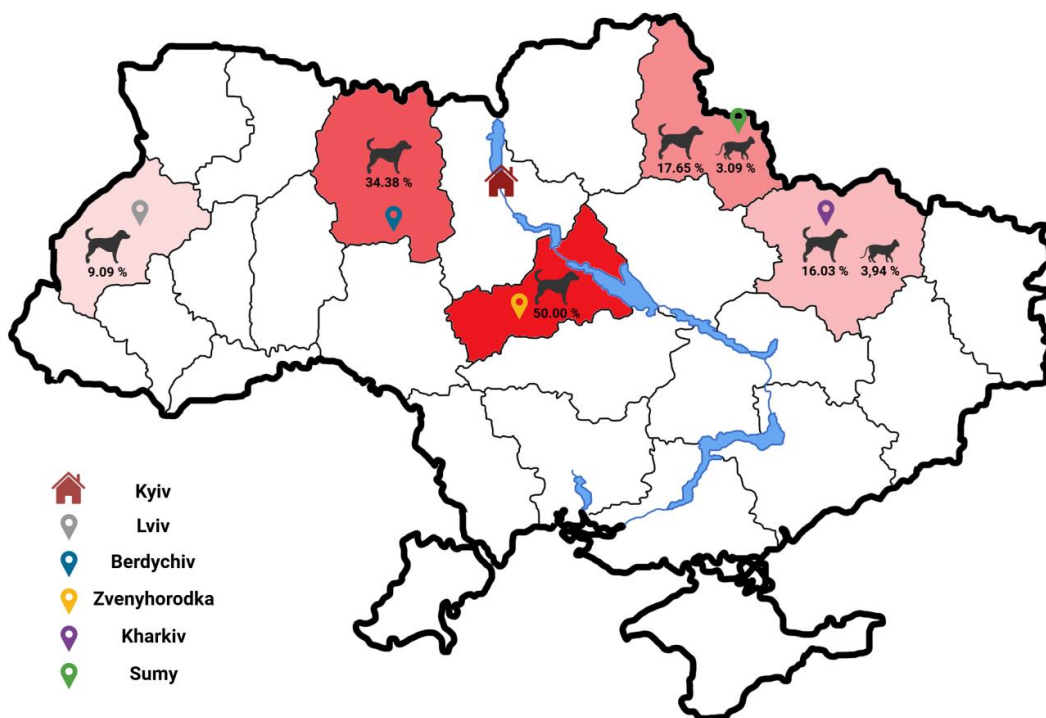
Rycina 10. Porównanie wartości Ct dla kontroli wewnętrznych PCR z wykorzystaniem oligonukleotydów specyficznych dla fragmentu genu *LINE1* u psów oraz *28S rRNA* u kotów.

Inwazje *D. repens*, *D. immitis*, *A. reconditum* lub inwazje mieszane wymienionych gatunków wykryto w 66 z 233 próbek od psów co stanowi ogólną prevalencję wynoszącą 28,33% (95% CI = 22,92–34,42) (Rycina 11). Najczęściej występującym gatunkiem filarii u psów była *D. repens*, natomiast najniższą częstotliwość występowania odnotowano w przypadku *A. reconditum* (Rycina 11, Tabela 4).



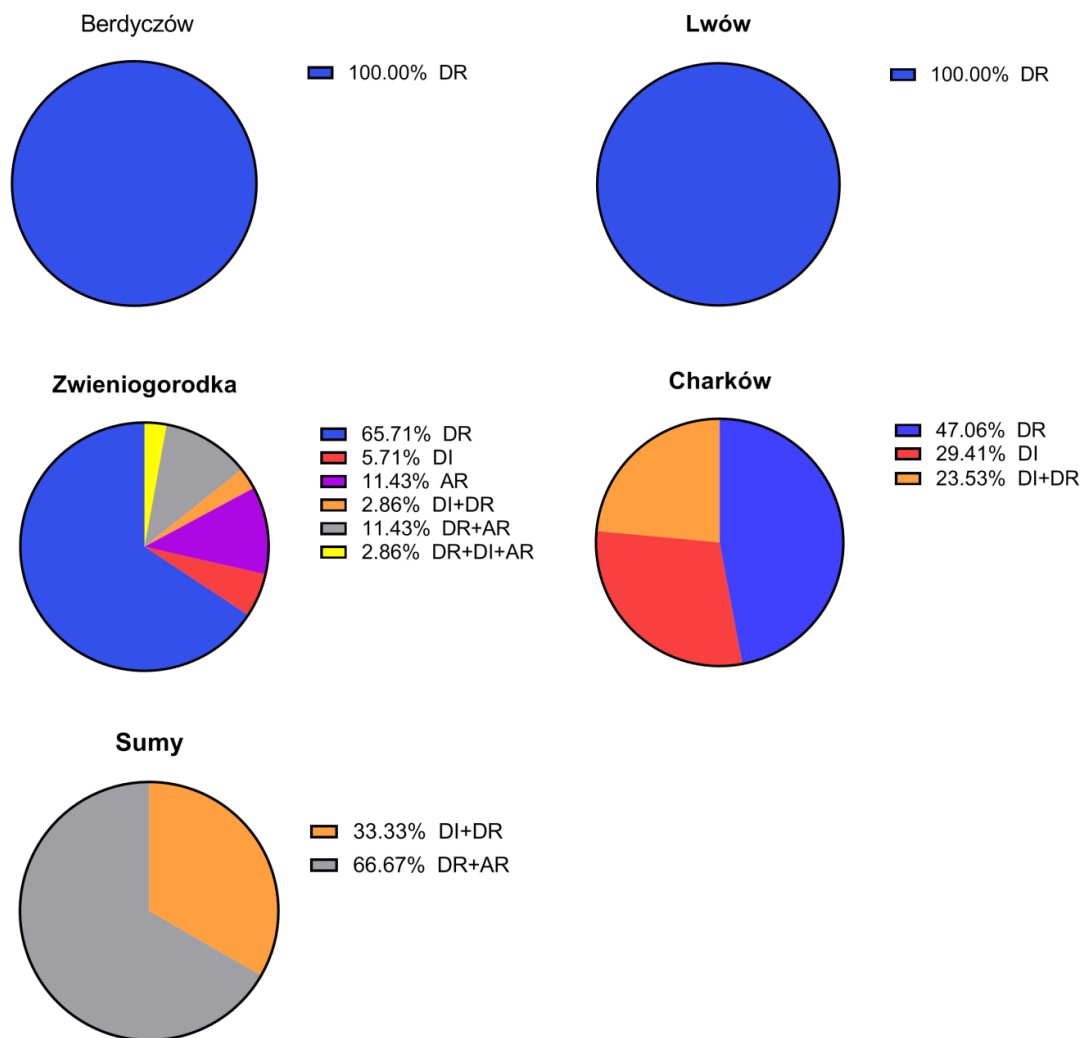
Rycina 11. Prewalencja inwazji *Dirofilaria* i *Acanthocheilonema* u psów i kotów. (A) Udział procentowy inwazji wywoływanych przez jeden lub więcej gatunków filarii u psów i kotów w porównaniu do zwierząt zdrowych (niezarażonych). (B) Udział procentowy typów inwazji wśród zarażonych psów i kotów. DR - *D. repens*; DI - *D. immitis*; AR - *A. reconditum*.

Ze względu na podział geograficzny, najwyższą prewalencję (50%) wśród psów, znacząco przewyższającą inne lokalizacje, odnotowano w regionie Zwienigorodka (Rycina 12).



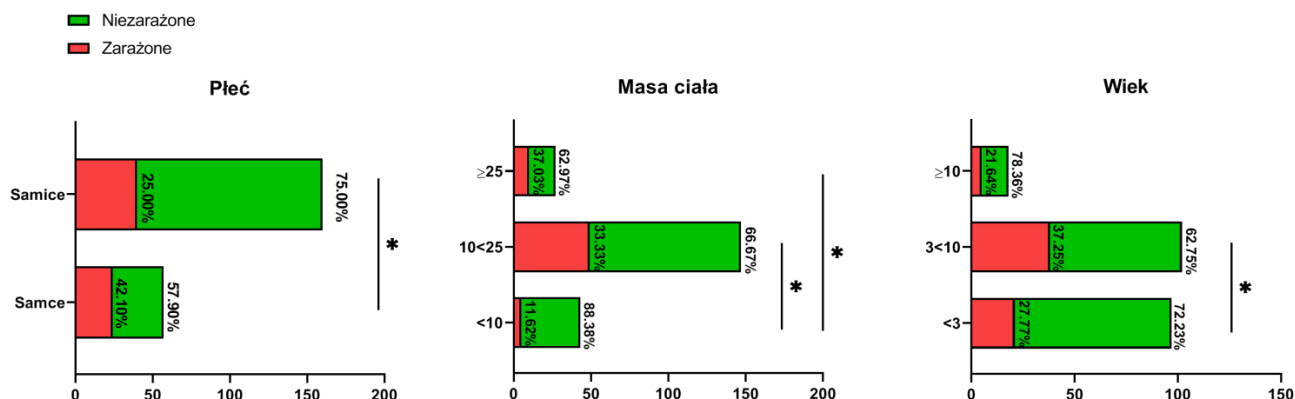
Rycina 12 Prewalencja filarioz u psów i kotów w wybranych regionach Ukrainy. Obszary administracyjne, w których przeprowadzono badanie zostały oznaczone różnymi odcieniami czerwieni, odzwierciedlającymi częstotliwość występowania zachorowań.

W regionie tym zaobserwowano również najszersze spektrum typów zarażenia, stwierdzając zarówno inwazje każdego z badanych gatunków osobno, jak i inwazje mieszane *D. repens* i *D. immitis*, *D. repens* i *A. reconditum*, a także pojedynczy przypadek *D. repens*, *D. immitis* i *A. reconditum*. W Berdyczowie częstotliwość występowania wynosiła 34,38% a wszystkie zachorowania były wywołane inwazją *D. repens*, podobnie jak we Lwowie, w którym zachorowania odnotowano u 9,09% psów. Charków i Sumy wykazały zbliżone wskaźniki prewalencji, odpowiednio 16,03% i 17,65%, przy czym w Sumach obserwowano jedynie inwazje mieszane (Rycina 12, Rycina 13).



Rycina 13 Udział procentowy gatunków odpowiedzialnych za inwazje u zarażanych psów w regionach objętym badaniem. DR - *D. repens*; DI - *D. immitis*; AR - *A. reconditum*.

Analiza czynników ryzyka występowania filarioz u psów wykazała istotne różnice w prevalencji w zależności od płci, masy ciała oraz wieku (Rycina 14).



Rycina 14. Analiza prewalencji filarii u psów w zależności od płci (samiec/samica), masy ciała (<10 kg; 10-25 kg; ≥25 kg) oraz wieku (<10 kg; 10-25 kg; ≥25 kg). Analizę statystyczną przeprowadzono stosując test chi-kwadrat; $p^* < 0,05$.

U samców dochodziło do zarażenia niemal dwukrotnie częściej, inwazje stwierdzono u 42,10% z nich, podczas gdy u samic odsetek ten wynosił 25%. Masa ciała również wpływała na częstość występowania inwazji – psy z wyższych kategorii wagowych (10–25 kg oraz ≥25 kg) charakteryzowały się wyższą prewalencją, osiągającą odpowiednio 33,33% i 37,03%, w porównaniu do najlżejszej grupy (<10 kg), w której wyniosła ona jedynie 11,62%. Najwyższy odsetek zachorowań zaobserwowano w grupie wiekowej 3–10 lat, podczas gdy w grupie najmłodszych (<3 lata) i najstarszych (≥10 lat) psów prewalencja była zbliżona i wynosiła odpowiednio 21,64% i 27,77%.

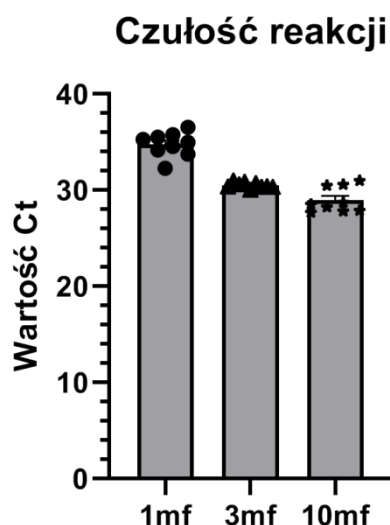
5.3.2. Ogólna prewalencja filarioz u kotów

Wśród 224 badanych próbek pochodzących od kotów, w 8 wykryto DNA *D. repens* lub *D. immitis*, co odpowiada ogólnej prewalencji wynoszącej 3,57% (95% CI = 1,82-6,88). Częstość występowania zarażeń była zbliżona w obu analizowanych regionach, udział procentowy zarażonych zwierząt wynosił 3,94% w Charkowie i 3,09% w Sumach (Rycina 11). Wśród zarażonych kotów 75% przypadków stanowiły inwazje *D. repens*, a 25% *D. immitis*. Dirofilariozę stwierdzono u osobników w przedziale wiekowym od 10 miesięcy do 10 lat, a 75% wszystkich inwazji obserwowano u samic.

5.3.3 Ocena czułości i specyficzności reakcji

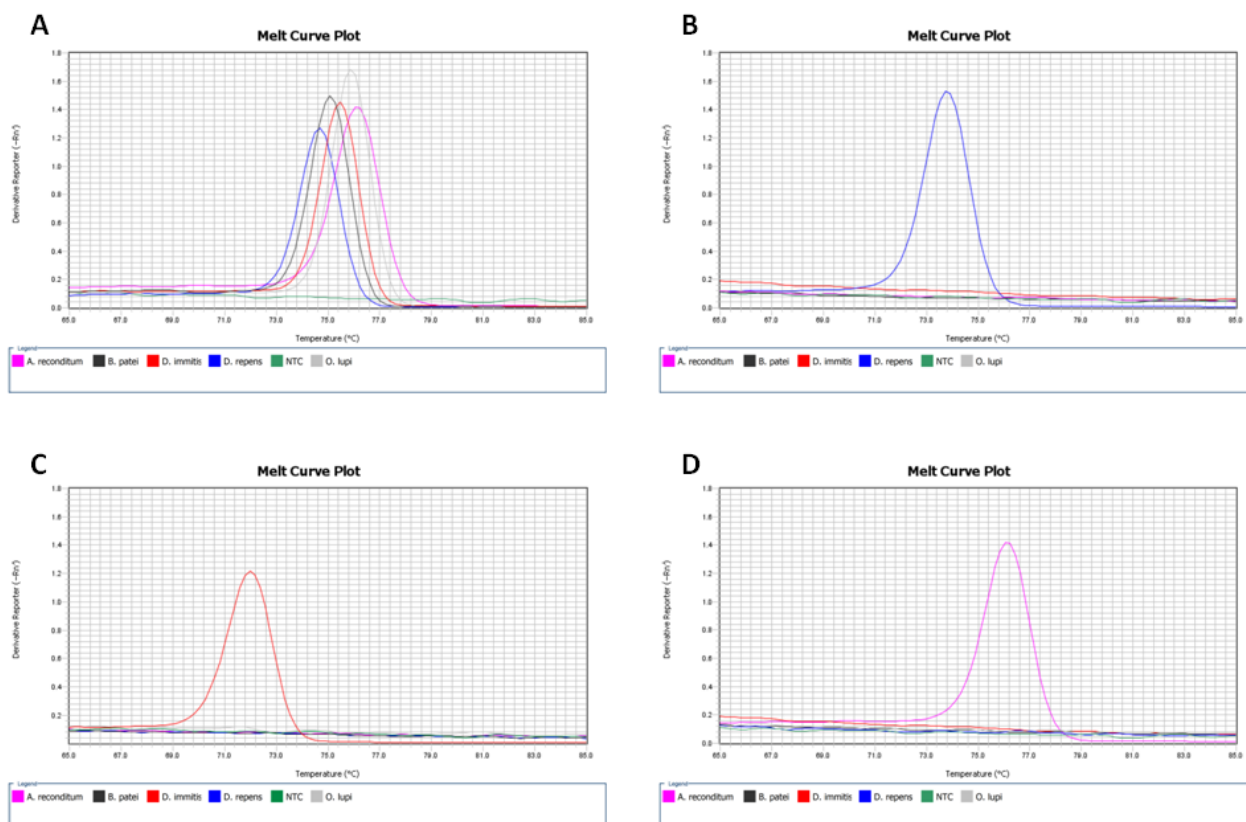
Zastosowanie oligonukleotydów specyficznych dla fragmentów genu *cox1* pozwoliło na wykrycie DNA filarii we wszystkich badanych warunkach (1 mf, 3 mf,

10 mf), co potwierdziło ich przydatność w molekularnej diagnostyce filarioz oraz ustaliło granicę wykrywalności na poziomie 1 mf w 300 μ l pełnej krwi (Rycina 15).



Rycina 15. Analiza czułości Real-Time PCR z wykorzystaniem oligonukleotydów namnażających konserwatywny dla rodziny Onchocercidae fragment genu *cox1*. Do testu użyto gDNA wyizolowany z krwi psa zawierającej 1 (1mf), 3 (3mf) lub 10 (10mf) mikrofilarii. Reakcje przeprowadzono w trzech powtórzeniach dla trzech grup biologicznych.

Specyficzność dla rodziny Onchocercidae została potwierdzona poprzez namnożenie fragmentu DNA wszystkich analizowanych gatunkach filarii, tj. *D. repens*, *D. immitis*, *A. reconditum*, *B. patei* oraz *O. lupi*. Wykorzystanie DNA wymienionych gatunków dodatkowo potwierdziło również specyficzność oligonukleotydów użytych do różnicowania inwazji, wykazując brak krzyżowego namnażania między wymienionymi filariami (Rycina 16).



Rycina 16. Analiza krzywej topnienia produktów PCR namnażanych przy użyciu oligonukleotydów specyficznych dla rodziny Onchocercidae - gen *cox1* (A); *D. repens* - gen *16S rRNA* (B); *D. immitis* - gen *cytB* (C) i *A. reconditum* - region *ITS* (D). Do oceny specyficzności użyto DNA genomowy wyizolowany z krwi psów zarażonych *D. repens* (niebieski), *D. immitis* (czerwony) i *A. reconditum* (fioletowy), *B. patei* (czarny) oraz *O. lupi* (szary). NTC (zielony) oznacza kontrolę negatywną.

5.4 Dyskusja

Niniejsza rozprawa przedstawia wyniki molekularnego nadzoru epidemiologicznego dirofilariozy w populacjach bezdomnych psów i kotów na terenie Ukrainy. Dotychczasowe dane na temat występowania nicieni *Dirofilaria* spp. w tym regionie są ograniczone, a ich analiza jest utrudniona przez niewielką dostępność literatury, szczególnie w języku angielskim. Co więcej, dirofilarioza u kotów nigdy wcześniej nie była przedmiotem systematycznych badań w Ukrainie. Uzyskane wyniki nie tylko potwierdziły endemiczny charakter inwazji *D. repens* i *D. immitis* w Ukrainie, ale również uwidocznily złożoność chorób przenoszonych przez wektory w tym regionie, poprzez identyfikację pierwszych przypadków psów zarażonych *A. reconditum*. Ogólna prevalencja filarioz wśród psów z pięciu objętych badaniem regionów wynosiła 28,33%. Najbardziej dominującym gatunkiem była *D. repens*, którą wykryto u 18,3% z psów, natomiast po uwzględnieniu inwazji mieszanych udział procentowy wynosił 23,62%. Dirofilariozę sercowo-płucną, wywoływaną przez zarażenie *D. immitis* odnotowano u 3%, a wliczając w to inwazje mieszane u 6,01% psów. Uzyskane wyniki znajdują odzwierciedlenie w literaturze. Bajer i wsp. (2023) w swoich badaniach wykazali, że wśród psów przemieszczonych z Ukrainy do Polski w trakcie trwającego konfliktu zbrojnego, 18,9% i 3,8% było zarażonych odpowiednio *D. repens* i *D. immitis*. Ponadto u dwóch psów wykryto inwazję obu gatunków ^[31].

Na przestrzeni lat badania nad dirofilariozą w Ukrainie skupiały się głównie na obwodzie charkowskim, w którym wykazano obecność zarówno *D. repens* jak i *D. immitis*. W badaniach prowadzonych w latach 2009-2019, odsetek zarażonych psów wynosił 37%, z czego dirofilarioza skórna stanowiła 97,35% wszystkich zachorowań, natomiast dirofilarioza sercowo-płucna zaledwie 2,86% ^[126]. W latach 2018 i 2019, w kolejnych badaniach, dirofilariozę zdiagnozowano u 24 z 120 psów (21,4%) oraz co ciekawe zaobserwowano znacznie większy udział inwazji *D. immitis* - 14 przypadków, w porównaniu do 10 *D. repens* ^[127]. Ponadto, podczas zimowego sezonu łowieckiego 2019/2020, *D. immitis* wykryto również w badaniu pośmiertnym u 6 z 27 (22,2%) lisów rudych z regionu ^[128]. W 11 rejonach obwodu charkowskiego nadzór molekularny wykazał również obecność komarów zarażonych *Dirofilaria* spp. z odsetkiem zarażeń na poziomie 4,46% ^[126]. Wyniki badań przeprowadzonych w ramach rozprawy wykazały, że całkowity współczynnik prevalencji dirofilariozy

u psów w Charkowie wynosi 16,03%. W analizowanej populacji dominowała inwazja *D. repens* (47,06%), podczas gdy *D. immitis* stanowiła 29,41% przypadków. Ponadto u 23,53% psów stwierdzono jednoczesne zarażenie obydwoma gatunkami pasożytów.

W kolejnym regionie objętym badaniem - Sumach - odsetek zachorowań wynosił 17,65%, a wszystkie zidentyfikowane przypadki stanowiły inwazje mieszane. Spośród 17 przebadanych prób, u jednego psa wykryto jednoczesną inwazję *D. repens* i *D. immitis* (33,33%), natomiast u dwóch psów *D. repens* i *A. reconditum* (66,67%). Według dostępnej literatury, w regionie tym w latach 2010-2018 wykazano prevalencję na poziomie 9,4%, z czego 94,8% psów było zarażonych *D. repens* ^[129]. Dodatkowo, nadzór epidemiologiczny komarów wykazał obecność *Dirofilaria* spp. w 0,43% przebadanych owadów ^[130].

W Berdyczowie oraz Zwienigorodce, położonych w centralnej części kraju, stwierdzono znacznie wyższą prevalencję, odpowiednio 34,38% i 50%, w porównaniu do obwodów wschodnich (Sumy; Charków). Co ciekawe, mimo stosunkowo niewielkiej odległości geograficznej między tymi dwoma miastami, zaobserwowano znaczną zmienność w profilu występujących inwazji. W Berdyczowie wszystkie przypadki dirofilariozy były spowodowane przez *D. repens*, natomiast w Zwienigorodce odnotowano inwazje każdego z uwzględnionych w badaniu gatunków (*D. repens* - 65,71%; *D. immitis* - 5,71%; *A. reconditum* - 11,43%) jak również inwazje mieszane *D. repens* i *D. immitis* (2,86%) lub *D. repens* i *A. reconditum* (11,43%), a także pojedynczy przypadek wszystkich trzech gatunków (2,86%). Niestety, w literaturze zarówno w języku angielskim, jak i ukraińskim brak jest publikacji dotyczących problematyki dirofilariozy psów w badanych regionach. Jedyną wzmiankę o dirofilariozie w regionie żytomierskim (Berdyczów) można odnaleźć w pracy z 2016 roku, w której analizowano zmiany hematologiczne u 10 zarażonych psów, jednakże gatunki odpowiedzialne za inwazje nie zostały rozróżnione ^[131]. W graniczącym z obwodem żytomierskim (Berdyczów) i obwodem czerkaskim (Zwienigorodka) Kijowie, oddalonym o około 150 kilometrów od obu miast w linii prostej, wśród 23 próbek zbadanych w 2011 roku, w 2 (9%) wykryto *D. repens*, a w 1 (4%) *D. immitis* ^[132]. W Białej Cerkwi, największym mieście obwodu kijowskiego, 9% psów było zarażonych *Dirofilaria*, jednak nie sprecyzowano gatunków ^[133]. W Kamieńcu Podolskim (sąsiadującym z obwodem żytomierskim) oraz w Winnicy (graniczącej

zarówno z obwodem czerkaskim, jak i żytomierskim), w badaniach przeprowadzonych w latach 2017–2019, Alsarraf i wsp. (2021) wykazali, że 3,8% psów spośród 155 było zarażonych wyłącznie *D. repens* ^[16].

W ostatnim badanym regionie, wysuniętym najbardziej na zachód Lwowie zaobserwowano najniższą prevalencję wynoszącą 9,09%. Niestety, w literaturze brak jest jakichkolwiek doniesień dotyczących dirofilariozy w tym oraz znajdujących się w bezpośrednim sąsiedztwie obwodach.

W niniejszej pracy po raz pierwszy na terenie Ukrainy wykryto inwazje *Acanthocheilonema reconditum* u psów. *A. reconditum* (wcześniej znana jako *Dipetalonema reconditum*) jest pasożytem psowatych, przenoszonym przez stawonogi, takie jak pchły, wszy i kleszcze. Choć inwazje *A. reconditum* są zazwyczaj uznawane za niepatogenne, mogą prowadzić do objawów klinicznych, takich jak niedokrwistość, zmiany skórne czy niewydolność oddechowa ^[134,135], a także do zmian w obrazie hematologicznym (np. leukocytoza, eozynofilia, monocytoza) oraz biochemicznym (np. podwyższony poziom całkowitego białka surowicy, albumin i globulin) krwi ^[135]. Mimo niskiej istotności klinicznej, rosnąca częstość występowania *A. reconditum* w populacjach psów w określonych regionach ^[134,136], a także opisanie w ostatnich latach kilku przypadków zarażenia u ludzi ^[137,138], podkreślają rosnące znaczenie tego nicienia dla zdrowia publicznego. Inwazje *A. reconditum* występują w różnych regionach geograficznych na całym świecie, w tym w basenie Morza Śródziemnego, na Bliskim Wschodzie, w Afryce Południowej, Ameryce Południowej i Oceanii ^[137]. W przeprowadzonym badaniu obecność *A. reconditum* stwierdzono w dwóch regionach Ukrainy (Sumy i Zwienigorodka), a ogólna prevalencja uwzględniająca inwazje mieszane z innymi gatunkami filarii wynosiła 4,73%.

W ramach niniejszej rozprawy, przeanalizowane zostały również czynniki ryzyka występowania filarioz u psów, takie jak płeć, wiek i masa ciała. Powszechnie wiadomo, że inwazje helmintów są zależne od płci, a u samców występują częściej oraz mają większą intensywność niż u samic. Różnice te wynikają z aspektów ekologicznych, behawioralnych i fizjologicznych, w tym interakcji hormonów płciowych, mikrobiomu oraz układu odpornościowego ^[139]. Wszystkie wykryte gatunki filarii występowały istotnie częściej u samców (42,1%) niż u samic (25%), co jest zgodne z wynikami innych badań dotyczących *Dirofilaria* i *Acanthocheilonema*

[16,127,134,140,141]. Uzyskane wyniki wskazują, że ryzyko zachorowania u psów rośnie wraz ze zwiększającą się masą ciała, co potwierdzają również inne badania [127,142]. Chociaż powód nie jest w pełni zrozumiany, korelacja ta może wynikać z różnic behawioralnych większych psów, które mają tendencję do eksplorowania szerszych obszarów, co zwiększa prawdopodobieństwo kontaktu z zarażonymi komarami. Wiek również wpływał na częstość występowania inwazji filarii. Większość badań wskazuje na najniższą prevalencję *Dirofilaria/Acanthocheilonema* w najmłodszych grupach wiekowych [16,127,140], co prawdopodobnie wynika z długiego okresu prepatentnego, który utrudnia wykrycie inwazji, a także ze zwiększonej ekspozycji starszych zwierząt na ukłucia komarów. W ramach niniejszej rozprawy najwyższą prevalencję zaobserwowano u psów w przedziale wiekowym 3–10 lat (37,25%), natomiast najniższą u psów powyżej 10 roku życia (21,64%). Co interesujące, wbrew oczekiwaniom, najmłodsza grupa psów (poniżej 3 lat) nie wykazała najniższej prevalencji, która wynosiła 27,77%. Podobne wyniki przedstawili Ciuca i wsp. (2023), którzy nie zaobserwowali znaczących różnic w odsetku zachorowań u psów w przedziałach wiekowych 1–3 lata oraz 4–6 lat, wynoszących odpowiednio 64,5% i 68% [141].

Niniejsza rozprawa obejmuje również molekularny nadzór epidemiologiczny dirofilariozy u kotów. Przypadki dirofilariozy u kotów, choć rzadziej niż u psów, są obserwowane na całym świecie [11]. Do tej pory w Ukrainie udokumentowano jedynie jeden przypadek dirofilariozy u kota - w 2003 roku w Kijowie, gdy dorosłe osobniki *D. repens* usunięto chirurgicznie z moszny i powrózka nasiennego [143]. W niniejszym badaniu prevalencja dirofilariozy wyniosła 3,57%, z czego 2,68% stanowiły inwazje *D. repens*, a 0,89% – *D. immitis*. Wyniki te są zgodne z danymi z innych krajów, gdzie częstość występowania waha się od mniej niż jednego procenta do kilku procent, w zależności od regionu i zastosowanych metod diagnostycznych [11]. Żaden z badanych kotów nie był zarażony *A. reconditum*. Chociaż udowodniono, że stadium inwazyjne *A. reconditum* może rozwijać się w pchle kociej *Ctenocephalides felis felis*, inwazje u kotów są niezwykle rzadkie, a jedyne przypadki opisano w Tajlandii [144]. Niemniej jednak, biorąc pod uwagę, że ramach przeprowadzonych badań do diagnozy wykorzystano wyłącznie qPCR, który wykrywa DNA pasożyta we krwi, istnieje możliwość, że realna prevalencja może być wyższa. Koty są uważane za mniej podatnych żywicieli dla *Dirofilaria* w porównaniu do psów, a około 25% a z nich jest

naturalnie odpornych na inwazję *D. immitis* ^[22]. U kotów jedynie niewielka część larw L3 rozwija się do stadium dorosłego ^[145]. Chociaż opisywano przypadki aktywnej mikrofilaremii dla obu gatunków *Dirofilaria* ^[20,21], jest ona zazwyczaj krótkotrwała, charakteryzuje się niską intensywnością i występuje jedynie u około 20% zarażonych kotów ^[20,22]. W diagnostyce dirofilariozy u kotów za „złoty standard” często uznaje się testy serologiczne, które są szczególnie przydatne w przypadku inwazji utajonych lub i bezobjawowych, jednakże należy zwrócić szczególną uwagę na prawdopodobieństwo wyników fałszywie dodatnich na skutek utrzymywania się po zarażeniu przeciwciał specyficznych dla *Dirofilaria* lub antygenemii ^[22]. Co więcej, obecnie brak jest dostępnych testów komercyjnych dedykowanych *D. repens*. Nieliczne badania koncentrowały się na wykrywaniu cfDNA jako markera diagnostycznego dirofilariozy u psów ^[123,146], co mogłoby być szczególnie przydatne w przypadku inwazji utajonych. Niestety, brak jest jakichkolwiek badań nad cfDNA pochodzącym od *Dirofilaria* u kotów.

Podsumowując, przeprowadzone badania dostarczają aktualnych danych na temat epidemiologii dirofilariozy w Ukrainie, dotychczas niedostatecznie poznanej ze względu na ograniczoną liczbę badań oraz ich utrudnioną dostępność wynikającą z bariery językowej. Analiza próbek od psów i kotów z zastosowaniem Real-Time PCR potwierdziła endemiczny charakter występowania *D. repens* i *D. immitis* w tym regionie. Wykrycie inwazji *A. reconditum*, mimo jej niskiej chorobotwórczości i ograniczonego ryzyka zoonotycznego, podkreśla złożoność chorób przenoszonych przez wektory w tym regionie. Obecna sytuacja humanitarna związana z trwającym konfliktem zbrojnym zwiększa ryzyko rozprzestrzeniania się oraz endemizacji nowych gatunków pasożytów, co może stanowić zagrożenie dla zdrowia publicznego. Wyniki te podkreślają kluczową rolę koncepcji „One Health” w zarządzaniu chorobami odzwierzęcymi. Wdrożenie skutecznych strategii kontroli wektorów i monitorowania zdrowia zwierząt towarzyszących jest niezbędne do ograniczenia ryzyka transmisji patogenów na ludzi.

6. Wnioski końcowe

- Dr20/22, podobnie jak homologi ALT u innych gatunków filarii, nie jest obecny u dorosłych nicieni ani mikrofilarii, co wskazuje na jego specyficzność dla stadium larwy inwazyjnej L3.
- Brak sekwencji liderowej w mRNA *dr20/22* u dorosłych nicieni i mikrofilarii wskazuje na udział mechanizmu trans-splicingu zależnego od sekwencji liderowej (SLTS) w regulacji ekspresji genów w różnych stadiach rozwojowych *D. repens*.
- rDr20/22 wpływa na proces dojrzewania komórek dendrytycznych człowieka, potencjalnie uczestnicząc w procesie inwazji i migracji przez tkanki żywiciela.
- Pomimo obecności specyficznych przeciwciał przeciwko rDr20/22 w surowicy zarażonych psów, jego zastosowanie nie pozwala na skuteczną diagnozę inwazji *D. repens*.
- Peptydy wytypowane przy użyciu technologii phage display stanowią skuteczną, alternatywną metodę diagnostyczną inwazji *D. repens*.
- Zastosowanie Real-Time PCR i gatunkowo specyficznych oligonukleotydów umożliwia rozróżnienie między inwazjami *D. repens*, *D. immitis* oraz *A. reconditum*.
- Detekcja cfDNA w surowicy umożliwia diagnostykę zarówno u psów mikrofilaremicznych, jak i amikrofilaremicznych.
- Stosowanie kompleksowego podejścia diagnostycznego, obejmującego różnorodne metody, zapewnia skuteczne wykrywanie oraz prawidłową identyfikację inwazji *Dirofilaria* spp.
- W Polsce występują rodzime inwazje mieszane *D. repens* i *D. immitis*.
- Inwazje *D. repens*, *D. immitis* oraz *A. reconditum* są endemiczne wśród populacji bezdomnych psów i kotów w Ukrainie.

7. Bibliografia

1. Morchón, R., Montoya-Alonso, J. A., Rodríguez-Escolar, I., & Carretón, E. (2022). What Has Happened to Heartworm Disease in Europe in the Last 10 Years? *Pathogens* (Basel, Switzerland), 11(9). <https://doi.org/10.3390/PATHOGENS11091042>
2. Capelli, G., Genchi, C., Baneth, G., Bourdeau, P., Brianti, E., Cardoso, L., Danesi, P., Fuehrer, H. P., Giannelli, A., Ionică, A. M., Maia, C., Modrý, D., Montarsi, F., Krücken, J., Papadopoulos, 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(1). <https://doi.org/10.1186/S13071-018-3205-X>
3. Younes, L., Barré-Cardi, H., Bedjaoui, S., Ayhan, N., Varloud, M., Mediannikov, O., Otranto, D., & Davoust, B. (2021). *Dirofilaria immitis* and *Dirofilaria repens* in mosquitoes from Corsica Island, France. *Parasites & Vectors*, 14(1). <https://doi.org/10.1186/S13071-021-04931-Y>
4. Alsarraf, M., Dwużnik-Szarek, D., Hildebrand, J., Mierzejewska, E. J., Kloch, A., Kot, K., Kurek, K., Nowak, S., Mysłajek, R. W., Myśliwy, I., Popiołek, M., Rodo, A., Alsarraf, M., Tołkacz, K., Topolnytska, M., Wężyk, D., & Bajer, A. (2023). Occurrence of *Dirofilaria repens* in wild carnivores in Poland. *Parasitology Research*, 122(5), 1229–1237. <https://doi.org/10.1007/S00436-023-07823-5>
5. Penezić, A., Selaković, S., Pavlović, I., & Ćirović, D. (2014). First findings and prevalence of adult heartworms (*Dirofilaria immitis*) in wild carnivores from Serbia. *Parasitology Research*, 113(9), 3281–3285. <https://doi.org/10.1007/S00436-014-3991-9>
6. Miterpáková, M., Hurníková, Z., Zalešný, G., & Chovancová, B. (2013). Molecular evidence for the presence of *Dirofilaria repens* in beech marten (*Martes foina*) from Slovakia. *Veterinary Parasitology*, 196(3–4), 544–546. <https://doi.org/10.1016/J.VETPAR.2013.02.028>
7. McCrea, A. R., Edgerton, E. B., Oliver, G. T., O'Neill, F. M., Nolan, T. J., Lok, J. B., & Povelones, M. (2021). A novel assay to isolate and quantify third-stage

- Dirofilaria immitis and Brugia malayi larvae emerging from individual Aedes aegypti. *Parasites & Vectors*, 14(1). <https://doi.org/10.1186/S13071-020-04529-W>
8. Genchi, C., Rinaldi, L., Mortarino, M., Genchi, M., & Cringoli, G. (2009). Climate and Dirofilaria infection in Europe. *Veterinary Parasitology*, 163(4), 286–292. <https://doi.org/10.1016/J.VETPAR.2009.03.026>
 9. <https://www.esda.vet/>.
 10. <https://www.heartwormsociety.org/>.
 11. 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>
 12. Smith, R., Murillo, D. F. B., Chenoweth, K., Barua, S., Kelly, P. J., Starkey, L., Blagburn, B., Wood, T., & Wang, C. (2022). Nationwide molecular survey of Dirofilaria immitis and Dirofilaria repens in companion dogs and cats, United States of America. *Parasites & Vectors*, 15(1). <https://doi.org/10.1186/S13071-022-05459-5>
 13. Fuehrer, H. P., Morelli, S., Unterköfler, M. S., Bajer, A., Bakran-Lebl, K., Dwużnik-Szarek, D., Farkas, R., Grandi, G., Heddergott, M., Jokelainen, P., Knific, T., Leschnik, M., Miterpáková, M., Modrý, D., Petersen, H. H., Skírnisson, K., Rataj, A. V., Schnyder, M., & Strube, C. (2021). Dirofilaria spp. and Angiostrongylus vasorum: Current Risk of Spreading in Central and Northern Europe. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, 10(10). <https://doi.org/10.3390/PATHOGENS10101268>
 14. Miterpáková, M., Valentová, D., & Hurníková, Z. (2023). Dirofilaria immitis conquering the regions in Slovakia previously endemic for D. repens. *Parasitology Research*, 122(12), 2945–2950. <https://doi.org/10.1007/S00436-023-07983-4>
 15. Napoli, E., De Benedetto, G., Ciuca, L., Bosco, A., Lia, R. P., Veneziano, V., Bezerra Santos, M. A., Otranto, D., Rinaldi, L., & Brianti, E. (2023). New distribution patterns of Dirofilaria immitis in Italy. *Frontiers in Veterinary Science*, 10. <https://doi.org/10.3389/FVETS.2023.1162403>

16. Alsarraf, M., Levytska, V., Mierzejewska, E. J., Poliukhovych, V., Rodo, A., Alsarraf, M., Kavalevich, D., Dwużnik-Szarek, D., Behnke, J. M., & Bajer, A. (2021). Emerging risk of *Dirofilaria* spp. infection in Northeastern Europe: high prevalence of *Dirofilaria repens* in sled dog kennels from the Baltic countries. *Scientific Reports*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/S41598-020-80208-1>
17. Möttus, M., Mötsküla, P. F., & Jokelainen, P. (2024). Heartworm disease in domestic dogs in Estonia: indication of local circulation of the zoonotic parasite *Dirofilaria immitis* farther north than previously reported. *Parasites & Vectors*, 17(1). <https://doi.org/10.1186/S13071-024-06217-5>
18. Alsarraf, M., Baneth, G., Bogucka-Kocka, A., Ciuca, L., Dwużnik-Szarek, D., Fuehrer, H. P., Kloch, A., Kołodziej, P., Levytska, V., Mierzejewska, E. J., Mihalca, A. D., Ionică, A. M., Mushynskiy, A., Nachum-Biala, Y., Alsarraf, M., & Bajer, A. (2023). Haplotypes of *Dirofilaria repens* from Poland and selected countries of Central, North-Eastern Europe and the Middle East: An evaluation on the relation between the genetic diversity and the geographic distribution of the fast-spreading parasite. *Veterinary Parasitology*, 315. <https://doi.org/10.1016/J.VETPAR.2023.109882>
19. Alsarraf, M., Carretón, E., Ciuca, L., Diakou, A., Dwużnik-Szarek, D., Fuehrer, H. P., Genchi, M., Ionică, A. M., Kloch, A., Kramer, L. H., Mihalca, A. D., Miterpáková, M., Morchón, R., Papadopoulos, E., Pękacz, M., Rinaldi, L., Alsarraf, M., Topolnytska, M., Vismarra, A., ... Bajer, A. (2023). Diversity and geographic distribution of haplotypes of *Dirofilaria immitis* across European endemic countries. *Parasites & Vectors*, 16(1). <https://doi.org/10.1186/S13071-023-05945-4>
20. Alberigi, B., de Oliveira, A. C., Vieira, G. S. R., Fernandes, P. D. A., Labarthe, N., & Mendes-De-almeida, F. (2020). Unusual feline *Dirofilaria immitis* infection: a case report. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria = Brazilian Journal of Veterinary Parasitology: Orgao Oficial Do Colegio Brasileiro de Parasitologia Veterinaria*, 29(3), 1–5. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612020061>
21. Ciuca, L., Roman, C., Prisco, F., Miron, L., Acatrinei, D., Paciello, O., Maurelli, M. P., Vismarra, A., Cringoli, G., & Rinaldi, L. (2020). First report of *Dirofilaria*

- repens infection in a microfilaraemic cat from Romania. *Veterinary Parasitology, Regional Studies and Reports*, 22. <https://doi.org/10.1016/J.VPRSR.2020.100497>
22. Kulmer, L. M., Unterköfler, M. S., Fuehrer, H. P., Janovska, V., Pagac, M., Svoboda, M., Venco, L., & Leschnik, M. (2021). First Autochthonous Infection of a Cat with *Dirofilaria immitis* in Austria. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, 10(9). <https://doi.org/10.3390/PATHOGENS10091104>
 23. Pennisi, M. G., Tasker, S., Hartmann, K., Belák, S., Addie, D., Boucraut-Baralon, C., Egberink, H., Frymus, T., Hofmann-Lehmann, R., Hosie, M., Lloret, A., Marsilio, F., Thiry, E., Truyen, U., & Möstl, K. (2020). Dirofilarioses in cats: European guidelines from the ABCD on prevention and management. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 22(5), 442–451. <https://doi.org/10.1177/1098612X20917601>
 24. Demiaszkiewicz, A. W., Polanczyk, G., Pyziel, A. M., Kuligowska, I., & Lachowicz, J. (2009). Pierwsze ogniska dirofilariozy psów wywołanej przez *Dirofilaria repens* Railliet et Henry, 1911 w centralnej Polsce. *Wiadomości Parazytologiczne*, 55(4), 367–370.
 25. Demiaszkiewicz, A. W., Polańczyk, G., Osńska, B., Pyziel, A. M., Kuligowska, I., Lachowicz, J., & Sikorski, A. (2014). The prevalence and distribution of *Dirofilaria repens* in dogs in the Mazovian Province of central-eastern Poland. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine: AAEM*, 21(4), 701–704. <https://doi.org/10.5604/12321966.1129918>
 26. Bajer, A., Rodo, A., Mierzejewska, E. J., Tołkacz, K., & Welc-Faleciak, R. (2016). The prevalence of *Dirofilaria repens* in cats, healthy dogs and dogs with concurrent babesiosis in an expansion zone in central Europe. *BMC Veterinary Research*, 12(1). <https://doi.org/10.1186/S12917-016-0816-3>
 27. Noszczyk-Nowak, A., Janus, I., Bielewska, J., Nowak, M., & Soltysiak, Z. (2014). Pierwszy w Polsce potwierdzony pośmiertnie przypadek infestacji *Dirofilaria immitis* u psa. Dowód na rozprzestrzenianie się choroby. *Weterynaria w Praktyce*, 11(06).

28. Swiatalska, A., & Demiaszkiewicz, A. W. (2012). Pierwszy w Polsce rodzimy przypadek inwazji nicieni *Dirofilaria immitis* u psa. *Życie Weterynaryjne*, 87(08).
29. <https://www.unrefugees.org/emergencies/ukraine/>.
30. <https://www.four-paws.org/campaigns-topics/topics/help-for-stray-animals/stray-animal-care-in-ukraine>.
31. Bajer, A., Alsarraf, M., Topolnytska, M., Tołkacz, K., Dwużnik-Szarek, D., & Rodo, A. (2023). Vector-borne parasites in dogs from Ukraine translocated to Poland following Russian invasion in 2022. *Parasites & Vectors*, 16(1). <https://doi.org/10.1186/S13071-023-06042-2>
32. Simón, F., Diosdado, A., Siles-Lucas, M., Kartashev, V., & González-Miguel, J. (2022). Human dirofilariosis in the 21st century: A scoping review of clinical cases reported in the literature. *Transboundary and Emerging Diseases*, 69(5), 2424–2439. <https://doi.org/10.1111/TBED.14210>
33. Kartashev, V., & Simon, F. (2018). Migrating *Dirofilaria repens*. *The New England Journal of Medicine*, 378(25). <https://doi.org/10.1056/NEJM1716138>
34. Ermakova, L. A., Nagorny, S. A., Krivorotova, E. Y., Pshenichnaya, N. Y., & Matina, O. N. (2014). *Dirofilaria repens* in the Russian Federation: current epidemiology, diagnosis, and treatment from a federal reference center perspective. *International Journal of Infectious Diseases : IJID : Official Publication of the International Society for Infectious Diseases*, 23, 47–52. <https://doi.org/10.1016/J.IJID.2014.02.008>
35. Kołodziej, P., Szostakowska, B., Jarosz, B., Pojasek, S., Romak, M., Kocki, J., & Bogucka-Kocka, A. (2019). The First Case of Elbow Bursitis Caused by *Dirofilaria repens* in Humans. *Open Forum Infectious Diseases*, 6(4). <https://doi.org/10.1093/OFID/OFZ157>
36. Ermakova, L., Nagorny, S., Kornienko, I., Kiosova, J., Todorov, S., Pshenichnaya, N., & Kuandykova, A. (2020). Description of the rare localization of *Dirofilaria repens* in human in the right inguinal lymph node. *IDCases*, 23. <https://doi.org/10.1016/J.IDCR.2020.E01010>

37. Jayasinghe, R. D., Gunawardane, S. R., Sitheeqe, M. A. M., & Wickramasinghe, S. (2015). A Case Report on Oral Subcutaneous Dirofilariasis. *Case Reports in Infectious Diseases*, 2015, 1–4. <https://doi.org/10.1155/2015/648278>
38. Velev, V., Popov, M., Pavlova, M., Karageorgiev, M., & Mangarov, A. (2019). Tongue infection caused by *Dirofilaria repens*. *QJM: Monthly Journal of the Association of Physicians*, 112(8), 619–620. <https://doi.org/10.1093/QJMED/HCZ135>
39. Cielecka, D., Szymanska, K., Salamatin, R., & Tomaszewska, A. (2007). Przypadek inwazji *Dirofilaria repens* [Leidy, 1856] [Nematoda: Filarioidea: Onchocercidae] u pacjenta w Warszawie. *Wiadomości Parazytologiczne. Supplement*, 53.
40. Żarnowska-Prymek, H., Cielecka, D., & Salamatin, R. (n.d.). Dirofilarioza - *Dirofilaria repens*, po raz pierwszy opisana u polskich pacjentów. *Przegląd Epidemiologiczny - Epidemiological Review*, 62(3), 547–551. Retrieved October 7, 2024, from <https://www.przglepidemiol.pzh.gov.pl/Dirofilarioza-Dirofilaria-repens-po-raz-pierwszy-opisana-u-polskich-pacjentow,179677,0,1.html>
41. Cielecka, D., Żarnowska-Prymek, H., Masny, A., Salamatin, R., Wesołowska, M., & Gołab, E. (2012). Human dirofilariosis in Poland: the first cases of autochthonous infections with *Dirofilaria repens*. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine: AAEM*, 19(3), 445–450. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23020037/>
42. Rymgayłło-Jankowska, B., Ziaja-Sołtys, M., Flis, B., Bogucka-Kocka, A., & Żarnowski, T. (2023). Subcutaneous Dirofilariosis of the Eyelid Brought to Poland from the Endemic Territory of Ukraine. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, 12(2). <https://doi.org/10.3390/PATHOGENS12020196>
43. Mazur-Melewska, K., Figlerowicz, M., Masny, A., Cielecka, D., Mania, A., Trejster, E., Kemnitz, P., & Słuzewski, W. (2013). The first autochthonous infection with *Dirofilaria repens* in a child in Poland. *Journal of Pediatric Infectious Diseases*, 8(4), 187–190. <https://doi.org/10.3233/JPI-130403/BIB>
44. Czyżewska, J., Zajkowska, J., Sałamatin, R., Kamińska, J., Koper-Lenkiewicz, O. M., & Matowicka-Karna, J. (2023). Multiple-site subcutaneous *Dirofilaria repens*

- infection in a Polish patient with a history of rheumatic disease. *Polish Archives of Internal Medicine*, 133(10). <https://doi.org/10.20452/PAMW.16557>
45. Kludkowska, M., Pielok, L., Frackowiak, K., Masny, A., Gołab, E., & Paul, M. (2018). *Dirofilaria repens* infection as a cause of intensive peripheral microfilariemia in a Polish patient: process description and cases review. *Acta Parasitologica*, 63(3), 657–663. <https://doi.org/10.1515/AP-2018-0077>
 46. Sałamatin, R. V., Pavlikovska, T. M., Sagach, O. S., Nikolayenko, S. M., Korniyushin, V. V., Kharchenko, V. O., Masny, A., Cielecka, D., Konieczna-Sałamatin, J., Conn, D. B., & Golab, E. (2013). Human dirofilariasis due to *Dirofilaria repens* in Ukraine, an emergent zoonosis: Epidemiological report of 1465 cases. *Acta Parasitologica*, 58(4), 592–598. <https://doi.org/10.2478/s11686-013-0187-x>
 47. Rossi, A., Peix, Á., Pavlikovskaya, T., Sagach, O., Nikolaenko, S., Chizh, N., Kartashev, V., Simón, F., & Siles-Lucas, M. (2015). Genetic diversity of *Dirofilaria* spp. isolated from subcutaneous and ocular lesions of human patients in Ukraine. *Acta Tropica*, 142, 1–4. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2014.10.021>
 48. Genchi, M., Mangia, C., Ferrari, N., & Loukeri, S. (2018). Evaluation of a rapid immunochromatographic test for the detection of low burden *Dirofilaria immitis* (heartworm) in dogs and cats. *Parasitology Research*, 117(1), 31–34. <https://doi.org/10.1007/S00436-017-5709-2>
 49. Lee, A. C. Y., Bowman, D. D., Lucio-Forster, A., Beall, M. J., Liotta, J. L., & Dillon, R. (2011). Evaluation of a new in-clinic method for the detection of canine heartworm antigen. *Veterinary Parasitology*, 177(3–4), 387–391. <https://doi.org/10.1016/J.VETPAR.2010.11.050>
 50. Courtney, C. H., & Zeng, Q. Y. (2001). Comparison of heartworm antigen test kit performance in dogs having low heartworm burdens. *Veterinary Parasitology*, 96(4), 317–322. [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(01\)00374-0](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(01)00374-0)
 51. Atkins, C. E. (2003). Comparison of results of three commercial heartworm antigen test kits in dogs with low heartworm burdens. *Journal of the American Veterinary*

- Medical Association*, 222(9), 1221–1223.
<https://doi.org/10.2460/JAVMA.2003.222.1221>
52. Schnyder, M., & Deplazes, P. (2012). Cross-reactions of sera from dogs infected with *Angiostrongylus vasorum* in commercially available *Dirofilaria immitis* test kits. *Parasites & Vectors*, 5(1). <https://doi.org/10.1186/1756-3305-5-258>
 53. Aroch, I., Rojas, A., Slon, P., Lavy, E., Segev, G., & Baneth, G. (2015). Serological cross-reactivity of three commercial in-house immunoassays for detection of *Dirofilaria immitis* antigens with *Spirocera lupi* in dogs with benign esophageal spirocercosis. *Veterinary Parasitology*, 211(3–4), 303–305.
<https://doi.org/10.1016/J.VETPAR.2015.06.010>
 54. Venco, L., Manzocchi, S., Genchi, M., & Kramer, L. H. (2017). Heat treatment and false-positive heartworm antigen testing in ex vivo parasites and dogs naturally infected by *Dirofilaria repens* and *Angiostrongylus vasorum*. *Parasites & Vectors*, 10(Suppl 2). <https://doi.org/10.1186/S13071-017-2444-6>
 55. Gruntmeir, J. M., Thompson, N. M., Long, M. T., Blagburn, B. L., & Walden, H. D. S. (2021). Detection of heartworm antigen without cross-reactivity to helminths and protozoa following heat treatment of canine serum. *Parasites & Vectors*, 14(1). <https://doi.org/10.1186/S13071-020-04573-6>
 56. Ciuca, L., Vismarra, A., Lebon, W., Beugnet, F., Morchon, R., Rinaldi, L., Cringoli, G., Kramer, L., & Genchi, M. (2020). New insights into the biology, diagnosis and immune response to *Dirofilaria repens* in the canine host. *Veterinary Parasitology*: X, 4. <https://doi.org/10.1016/j.vpoa.2020.100029>
 57. Wyszomolek, M. E., Klockiewicz, M., Długosz, E., & Wiśniewski, M. (2022). Canine antibody response against *Dirofilaria repens* in natural occult and microfilaremic infections. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 86. <https://doi.org/10.1016/J.CIMID.2022.101818>
 58. Everts, B., Smits, H. H., Hokke, C. H., & Yazdanbakhsh, M. (2010). Helminths and dendritic cells: sensing and regulating via pattern recognition receptors, Th2 and Treg responses. *European Journal of Immunology*, 40(6), 1525–1537.
<https://doi.org/10.1002/EJI.200940109>

59. Okada, H., Kuhn, C., Feillet, H., & Bach, J. F. (2010). The “hygiene hypothesis” for autoimmune and allergic diseases: an update. *Clinical and Experimental Immunology*, 160(1), 1–9. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2249.2010.04139.X>
60. Marcos-Atxutegi, C., Kramer, L. H., Fernandez, I., Simoncini, L., Genchi, M., Prieto, G., & Simón, F. (2003). Th1 response in BALB/c mice immunized with *Dirofilaria immitis* soluble antigens: A possible role for Wolbachia? *Veterinary Parasitology*, 112(1–2), 117–130. [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(02\)00419-3](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(02)00419-3)
61. Simón, F., Kramer, L. H., Román, A., Blasini, W., Morchón, R., Marcos-Atxutegi, C., Grandi, G., & Genchi, C. (2007). Immunopathology of *Dirofilaria immitis* infection. *Veterinary Research Communications*, 31(2), 161–171. <https://doi.org/10.1007/S11259-006-3387-0>
62. Tezuka, H., Imai, S., Hidano, S., Tsukidate, S., & Fujita, K. (2003). Various Types of *Dirofilaria immitis* Polyproteins Selectively Induce a Th2-Type Immune Response. *Infection and Immunity*, 71(7), 3802. <https://doi.org/10.1128/IAI.71.7.3802-3811.2003>
63. Dong, X., Xu, J., Song, H., Liu, Y., Wu, M., Zhang, H., Jing, B., Lai, W., Gu, X., Xie, Y., Peng, X., & Yang, G. (2019). Molecular Characterization of a *Dirofilaria immitis* Cysteine Protease Inhibitor (Cystatin) and Its Possible Role in Filarial Immune Evasion. *Genes*, 10(4). <https://doi.org/10.3390/GENES10040300>
64. 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>
65. Perrigoue, J. G., Marshall, F. A., & Artis, D. (2008). On the hunt for helminths: innate immune cells in the recognition and response to helminth parasites. *Cellular Microbiology*, 10(9), 1757–1764. <https://doi.org/10.1111/J.1462-5822.2008.01174.X>
66. Carvalho, L., Sun, J., Kane, C., Marshall, F., Krawczyk, C., & Pearce, E. J. (2009). Review series on helminths, immune modulation and the hygiene hypothesis: mechanisms underlying helminth modulation of dendritic cell function. *Immunology*, 126(1), 28–34. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2567.2008.03008.X>

67. Bhoj, P., Togle, N., Khatri, V., & Goswami, K. (2022). Harnessing Immune Evasion Strategy of Lymphatic Filariae: A Therapeutic Approach against Inflammatory and Infective Pathology. *Vaccines*, 10(8). <https://doi.org/10.3390/VACCINES10081235>
68. 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>
69. Gazzinelli-Guimaraes, P. H., & Nutman, T. B. (2018). Helminth parasites and immune regulation. *F1000Research*, 7. <https://doi.org/10.12688/F1000RESEARCH.15596.1/DOI>
70. Cotton, R. N., McDonald-Fleming, R., Boyd, A., Spates, K., Nutman, T. B., & Tolouei Semnani, R. (2015). *Brugia malayi* infective larvae fail to activate Langerhans cells and dermal dendritic cells in human skin. *Parasite Immunology*, 37(2), 79–91. <https://doi.org/10.1111/PIM.12169>
71. Gregory, W. F., Blaxter, M. L., & Maizels, R. M. (1997). Differentially expressed, abundant trans-spliced cDNAs from larval *Brugia malayi*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 87(1), 85–95. [https://doi.org/10.1016/S0166-6851\(97\)00050-9](https://doi.org/10.1016/S0166-6851(97)00050-9)
72. Wu, Y., Egerton, G., Pappin, D. J. C., Harrison, R. A., Wilkinson, M. C., Underwood, A., & Bianco, A. E. (2004). The Secreted Larval Acidic Proteins (SLAPs) of *Onchocerca* spp. are encoded by orthologues of the alt gene family of *Brugia malayi* and have host protective potential. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 134(2), 213–224. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2003.12.002>
73. Pogonka, T., Oberländer, U., Marti, T., & Lucius, R. (1999). *Acanthocheilonema viteae*: characterization of a molt-associated excretory/secretory 18-kDa protein. *Experimental Parasitology*, 93(2), 73–81. <https://doi.org/10.1006/EXPR.1999.4445>
74. Aparnaa, R., Mahalakshmi, N., Harini, A., Jeyaprita, P. J., Anugraha, G., Amdare, N. P., Khatri, V. K., Reddy, M. V. R., & Kaliraj, P. (2014). *Wuchereria bancrofti* 20/22 a homologue of abundant larval transcript L3 stage filarial antigen:

- molecular and immunological characterization. *Parasite Immunology*, 36(10), 475–484. <https://doi.org/10.1111/PIM.12120>
75. Frank, G. R., Tripp, C. A., & Grieve, R. B. (1996). Molecular cloning of a developmentally regulated protein isolated from excretory-secretory products of larval *Dirofilaria immitis*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 75(2), 231–240. [https://doi.org/10.1016/0166-6851\(95\)02534-0](https://doi.org/10.1016/0166-6851(95)02534-0)
 76. Khatri, V., Amdare, N., Yadav, R. S., Tarnekar, A., Goswami, K., & Reddy, M. V. R. (2015). *Brugia malayi* abundant larval transcript 2 protein treatment attenuates experimentally-induced colitis in mice. *Indian Journal of Experimental Biology*, 53(11), 732–739. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26669016/>
 77. Amdare, N. P., Khatri, V. K., Yadav, R. S. P., Tarnekar, A., Goswami, K., & Reddy, M. V. R. (2017). Therapeutic potential of the immunomodulatory proteins *Wuchereria bancrofti* L2 and *Brugia malayi* abundant larval transcript 2 against streptozotocin-induced type 1 diabetes in mice. *Journal of Helminthology*, 91(5), 539–548. <https://doi.org/10.1017/S0022149X1600064X>
 78. Reddy, S. M., Reddy, P. M., Amdare, N., Khatri, V., Tarnekar, A., Goswami, K., & Reddy, M. V. R. (2017). Filarial Abundant Larval Transcript Protein ALT-2: An Immunomodulatory Therapeutic Agent for Type 1 Diabetes. *Indian Journal of Clinical Biochemistry : IJCB*, 32(1), 45–52. <https://doi.org/10.1007/S12291-016-0572-Y>
 79. Gregory, W. F., Atmadja, A. K., Allen, J. E., & Maizels, R. M. (2000). The abundant larval transcript-1 and -2 genes of *Brugia malayi* encode stage-specific candidate vaccine antigens for filariasis. *Infection and Immunity*, 68(7), 4174–4179. <https://doi.org/10.1128/IAI.68.7.4174-4179.2000>
 80. Ramachandran, S., Kumar, M. P., Rami, R. M. V., Chinnalah, H. B., Nutman, T., Kaliraj, P., & McCarthy, J. (2004). The larval specific lymphatic filarial ALT-2: induction of protection using protein or DNA vaccination. *Microbiology and Immunology*, 48(12), 945–955. <https://doi.org/10.1111/J.1348-0421.2004.TB03624.X>

81. Thirugnanam, S., Pandiaraja, P., Ramaswamy, K., Murugan, V., Gnanasekar, M., Nandakumar, K., Reddy, M. V. R., & Kaliraj, P. (2007). *Brugia malayi*: comparison of protective immune responses induced by Bm-alt-2 DNA, recombinant Bm-ALT-2 protein and prime-boost vaccine regimens in a jird model. *Experimental Parasitology*, 116(4), 483–491. <https://doi.org/10.1016/J.EXPPARA.2007.02.017>
82. Vanam, U., Pandey, V., Prabhu, P. R., Dakshinamurthy, G., Reddy, M. V. R., & Kaliraj, P. (2009). Evaluation of immunoprophylactic efficacy of *Brugia malayi* transglutaminase (BmTGA) in single and multiple antigen vaccination with BmALT-2 and BmTPX for human lymphatic filariasis. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 80(2), 319–324. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2009.80.319>
83. Anand, S. B., Kodumudi, K. N., Reddy, M. V., & Kaliraj, P. (2011). A combination of two *Brugia malayi* filarial vaccine candidate antigens (BmALT-2 and BmVAH) enhances immune responses and protection in jirds. *Journal of Helminthology*, 85(4), 442–452. <https://doi.org/10.1017/S0022149X10000799>
84. Dakshinamoorthy, G., Samykutty, A. K., Munirathinam, G., Reddy, M. V., & Kalyanasundaram, R. (2013). Multivalent fusion protein vaccine for lymphatic filariasis. *Vaccine*, 31(12), 1616–1622. <https://doi.org/10.1016/J.VACCINE.2012.09.055>
85. Dakshinamoorthy, G., Von Gegerfelt, A., Andersen, H., Lewis, M., & Kalyanasundaram, R. (2014). Evaluation of a multivalent vaccine against lymphatic filariasis in rhesus macaque model. *PloS One*, 9(11). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0112982>
86. Babu, S., & Nutman, T. B. (2003). Proinflammatory cytokines dominate the early immune response to filarial parasites. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 171(12), 6723–6732. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.171.12.6723>
87. Allen, J. E., & Maizels, R. M. (2011). Diversity and dialogue in immunity to helminths. *Nature Reviews. Immunology*, 11(6), 375–388. <https://doi.org/10.1038/NRI2992>

88. Redpath, S. A., Fonseca, N. M., & Perona-Wright, G. (2014). Protection and pathology during parasite infection: IL-10 strikes the balance. *Parasite Immunology*, 36(6), 233–252. <https://doi.org/10.1111/PIM.12113>
89. M'bondoukwé, N. P., Moutongo, R., Gbédandé, K., Ngomo, J. M. N., Hountohotegbé, T., Adamou, R., Lengongo, J. V. K., Bello, K. P., Mawili-Mboumba, D. P., Luty, A. J. F., & Bouyou-Akotet, M. K. (2022). Circulating IL-6, IL-10, and TNF-alpha and IL-10/IL-6 and IL-10/TNF-alpha ratio profiles of polyparasitized individuals in rural and urban areas of gabon. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 16(4). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PNTD.0010308>
90. Paul, R., Ilamaran, M., Khatri, V., Amdare, N., Reddy, M. V. R., & Kaliraj, P. (2019). Immunological evaluation of fusion protein of *Brugia malayi* abundant larval protein transcript-2 (BmALT-2) and Tuftsin in experimental mice model. *Parasite Epidemiology and Control*, 4. <https://doi.org/10.1016/J.PAREPI.2019.E00092>
91. Kim, M. K., & Kim, J. (2019). Properties of immature and mature dendritic cells: phenotype, morphology, phagocytosis, and migration. *RSC Advances*, 9(20), 11230–11238. <https://doi.org/10.1039/C9RA00818G>
92. Kiama, S. G., Karlsson, L., Gehr, P., Cochand, L., & Nicod, L. P. (2001). Evaluation of phagocytic activity in human monocyte-derived dendritic cells. *Journal of Aerosol Medicine : The Official Journal of the International Society for Aerosols in Medicine*, 14(3), 289–299. <https://doi.org/10.1089/089426801316970240>
93. Manavalan, J. S., Rossi, P. C., Vlad, G., Piazza, F., Yamilina, A., Cortesini, R., Mancini, D., & Suci-Foca, N. (2003). High expression of ILT3 and ILT4 is a general feature of tolerogenic dendritic cells. *Transplant Immunology*, 11(3–4), 245–258. [https://doi.org/10.1016/S0966-3274\(03\)00058-3](https://doi.org/10.1016/S0966-3274(03)00058-3)
94. Selenko-Gebauer, N., Majdic, O., Szekeres, A., Höfler, G., Guthann, E., Korthäuer, U., Zlabinger, G., Steinberger, P., Pickl, W. F., Stockinger, H., Knapp, W., & Stöckl, J. (2003). B7-H1 (programmed death-1 ligand) on dendritic cells is involved in the induction and maintenance of T cell anergy. *Journal of*

- Immunology* (Baltimore, Md. : 1950), 170(7), 3637–3644.
<https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.170.7.3637>
95. Smith, P., Walsh, C. M., Mangan, N. E., Fallon, R. E., Sayers, J. R., McKenzie, A. N. J., & Fallon, P. G. (2004). *Schistosoma mansoni* worms induce anergy of T cells via selective up-regulation of programmed death ligand 1 on macrophages. *Journal of Immunology* (Baltimore, Md. : 1950), 173(2), 1240–1248.
<https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.173.2.1240>
 96. Ilic, N., Gruden-Movsesijan, A., Cvetkovic, J., Tomic, S., Vucevic, D. B., Aranzamendi, C., Colic, M., Pinelli, E., & Sofronic-Milosavljevic, L. (2018). *Trichinella spiralis* excretory-secretory products induce tolerogenic properties in human dendritic cells via toll-like receptors 2 and 4. *Frontiers in Immunology*, 9(JAN), 315518. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2018.00011/BIBTEX>
 97. Cella, M., Döhning, C., Samaridis, J., Dessing, M., Brockhaus, M., Lanzavecchia, A., & Colonna, M. (1997). A novel inhibitory receptor (ILT3) expressed on monocytes, macrophages, and dendritic cells involved in antigen processing. *The Journal of Experimental Medicine*, 185(10), 1743–1752.
<https://doi.org/10.1084/JEM.185.10.1743>
 98. Kowal, K., Silver, R., Sławińska, E., Bielecki, M., Chyczewski, L., & Kowal-Bielecka, O. (2011). CD163 and its role in inflammation. *Folia Histochemica et Cytobiologica*, 49(3), 365–374. <https://doi.org/10.5603/FHC.2011.0052>
 99. Ferreira, D. W., Ulecia-Morón, C., Alvarado-Vázquez, P. A., Cunnane, K., Moracho-Vilriales, C., Grosick, R. L., Cunha, T. M., & Romero-Sandoval, E. A. (2020). CD163 overexpression using a macrophage-directed gene therapy approach improves wound healing in ex vivo and in vivo human skin models. *Immunobiology*, 225(1), 151862. <https://doi.org/10.1016/J.IMBIO.2019.10.011>
 100. Bayat, M., Sarojini, H., & Chien, S. (2023). The role of cluster of differentiation 163-positive macrophages in wound healing: a preliminary study and a systematic review. *Archives of Dermatological Research*, 315(3), 359–370.
<https://doi.org/10.1007/S00403-022-02407-2/FIGURES/3>

101. Mosser, D. M. (2003). The many faces of macrophage activation. *Journal of Leukocyte Biology*, 73(2), 209–212. <https://doi.org/10.1189/JLB.0602325>
102. Comi, M., Avancini, D., Santoni de Sio, F., Villa, M., Uyeda, M. J., Floris, M., Tomasoni, D., Bulfone, A., Roncarolo, M. G., & Gregori, S. (2020). Coexpression of CD163 and CD141 identifies human circulating IL-10-producing dendritic cells (DC-10). *Cellular & Molecular Immunology*, 17(1), 95–107. <https://doi.org/10.1038/S41423-019-0218-0>
103. Williams, L., Jarai, G., Smith, A., & Finan, P. (2002). IL-10 expression profiling in human monocytes. *Journal of Leukocyte Biology*, 72(4), 800–809. <https://doi.org/10.1189/jlb.72.4.800>
104. Philippidis, P., Mason, J. C., Evans, B. J., Nadra, I., Taylor, K. M., Haskard, D. O., & Landis, R. C. (2004). Hemoglobin scavenger receptor CD163 mediates interleukin-10 release and heme oxygenase-1 synthesis: antiinflammatory monocyte-macrophage responses in vitro, in resolving skin blisters in vivo, and after cardiopulmonary bypass surgery. *Circulation Research*, 94(1), 119–126. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000109414.78907.F9>
105. Domogalla, M. P., Rostan, P. V., Raker, V. K., & Steinbrink, K. (2017). Tolerance through Education: How Tolerogenic Dendritic Cells Shape Immunity. *Frontiers in Immunology*, 8(DEC). <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2017.01764>
106. Chen, S., Liu, L., Zhang, W., Sun, L., Wang, F., Zhao, Y., Liu, S., Zhao, L., & Xu, Y. (2020). Suppressed dendritic cell functions by cystatin C lead to compromised immunity in vivo. *Cellular Immunology*, 349. <https://doi.org/10.1016/J.CELLIMM.2020.104049>
107. Coombs, G. H., & Mottram, J. C. (1997). Parasite proteinases and amino acid metabolism: possibilities for chemotherapeutic exploitation. *Parasitology*, 114 Suppl(SUPPL. 1). <https://doi.org/10.1017/s003118209700111x>
108. Guiliano, D. B., Hong, X., McKerrow, J. H., Blaxter, M. L., Oksov, Y., Liu, J., Ghedin, E., & Lustigman, S. (2004). A gene family of cathepsin L-like proteases of filarial nematodes are associated with larval molting and cuticle and eggshell

- remodeling. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 136(2), 227–242.
<https://doi.org/10.1016/J.MOLBIOPARA.2004.03.015>
109. Kraemer, L., McKay, D. M., Russo, R. C., & Fujiwara, R. T. (2022). Chemokines and chemokine receptors: Insights from human disease and experimental models of helminthiasis. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 66, 38–52.
<https://doi.org/10.1016/J.CYTOGFR.2022.05.002>
 110. Zawistowska-Deniziak, A., Lambooi, J. M., Kalinowska, A., Patente, T. A., Łapiński, M., van der Zande, H. J. P., Basalaj, K., de Korne, C. M., Chayé, M. A. M., Gasan, T. A., Norbury, L. J., Giera, M., Zaldumbide, A., Smits, H. H., & Guigas, B. (2022). Fasciola hepatica Fatty Acid Binding Protein 1 Modulates T cell Polarization by Promoting Dendritic Cell Thrombospondin-1 Secretion Without Affecting Metabolic Homeostasis in Obese Mice. *Frontiers in Immunology*, 13. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2022.884663>
 111. Wangala, B., Gantin, R. G., Voßberg, P. S., Vovor, A., Poutouli, W. P., Komlan, K., Banla, M., Köhler, C., & Soboslay, P. T. (2019). Inflammatory and regulatory CCL and CXCL chemokine and cytokine cellular responses in patients with patent *Mansonella perstans* filariasis. *Clinical and Experimental Immunology*, 196(1), 111–122. <https://doi.org/10.1111/CEI.13251>
 112. Matsushita, T. (2019). Regulatory and effector B cells: Friends or foes? *Journal of Dermatological Science*, 93(1), 2–7.
<https://doi.org/10.1016/J.JDERMSCI.2018.11.008>
 113. Schneider, P. (2005). The role of APRIL and BAFF in lymphocyte activation. *Current Opinion in Immunology*, 17(3), 282–289.
<https://doi.org/10.1016/J.COI.2005.04.005>
 114. Litinskiy, M. B., Nardelli, B., Hilbert, D. M., He, B., Schaffer, A., Casali, P., & Cerutti, A. (2002). DCs induce CD40-independent immunoglobulin class switching through BlyS and APRIL. *Nature Immunology*, 3(9), 822–829.
<https://doi.org/10.1038/NI829>

115. Lamparska-Przybysz, M., Wieczorek, M., Majorek, M., & Guzenda, P. (2006). Role of Wnt/ β -catenin pathway in molecular mechanism of tumorigenesis. *Contemporary Oncology/Współczesna Onkologia*, 10(10), 497–501.
116. Chae, W. J., & Bothwell, A. L. M. (2019). Dickkopf1: An immunomodulatory ligand and Wnt antagonist in pathological inflammation. *Differentiation; Research in Biological Diversity*, 108, 33–39. <https://doi.org/10.1016/J.DIFF.2019.05.003>
117. Ljungberg, J. K., Kling, J. C., Tran, T. T., & Blumenthal, A. (2019). Functions of the WNT Signaling Network in Shaping Host Responses to Infection. *Frontiers in Immunology*, 10. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2019.02521>
118. Chae, W. J., Ehrlich, A. K., Chan, P. Y., Teixeira, A. M., Henegariu, O., Hao, L., Shin, J. H., Park, J. H., Tang, W. H., Kim, S. T., Maher, S. E., Goldsmith-Pestana, K., Shan, P., Hwa, J., Lee, P. J., Krause, D. S., Rothlin, C. V., McMahon-Pratt, D., & Bothwell, A. L. M. (2016). The Wnt Antagonist Dickkopf-1 Promotes Pathological Type 2 Cell-Mediated Inflammation. *Immunity*, 44(2), 246–258. <https://doi.org/10.1016/J.IMMUNI.2016.01.008>
119. Volpini, X., Ambrosio, L. F., Fozzatti, L., Insfran, C., Stempin, C. C., Cervi, L., & Motran, C. C. (2018). Trypanosoma cruzi Exploits Wnt Signaling Pathway to Promote Its Intracellular Replication in Macrophages. *Frontiers in Immunology*, 9(APR). <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2018.00859>
120. Zhao, F., Xiao, C., Evans, K. S., Theivanthiran, T., DeVito, N., Holtzhausen, A., Liu, J., Liu, X., Boczkowski, D., Nair, S., Locasale, J. W., & Hanks, B. A. (2018). Paracrine Wnt5a- β -Catenin Signaling Triggers a Metabolic Program that Drives Dendritic Cell Tolerization. *Immunity*, 48(1), 147-160.e7. <https://doi.org/10.1016/J.IMMUNI.2017.12.004>
121. <https://www.unrefugees.org/emergencies/ukraine/>.
122. <https://www.four-paws.org/campaigns-topics/topics/help-for-stray-animals/stray-animal-care-in-ukraine>.
123. Pękacz, M., Basałaj, K., Kalinowska, A., Klockiewicz, M., Stopka, D., Bąska, P., Długosz, E., Karabowicz, J., Młocicki, D., Wiśniewski, M., & Zawistowska-Deniziak, A. (2022). Selection of new diagnostic markers for *Dirofilaria repens*

- infections with the use of phage display technology. *Scientific Reports* 2022 12:1, 12(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-06116-8>
124. Helps, C., Reeves, N., Egan, K., Howard, P., & Harbour, D. (2003). Detection of *Chlamydomytila felis* and Feline Herpesvirus by Multiplex Real-Time PCR Analysis. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(6), 2734. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.6.2734-2736.2003>
 125. Pękacz, M., Basałaj, K., Miterpáková, M., Rusiecki, Z., Stopka, D., Graczyk, D., & Zawistowska-Deniziak, A. (2024). An unexpected case of a dog from Poland co-infected with *Dirofilaria repens* and *Dirofilaria Immitis*. *BMC Veterinary Research*, 20(1). <https://doi.org/10.1186/S12917-024-03921-3>
 126. Paliy, A. P., Sumakova, N. V., Pavlichenko, O. V., Palii, A. P., Reshetylo, O. I., Kovalenko, L. M., Grebenik, N. P., & Bula, L. V. (2022). Monitoring of Animal *Dirofilariosis* Incidence in Kharkiv Region of Ukraine. *Zoodiversity*, 56(2), 153–164. <https://doi.org/10.15407/ZOO2022.02.153>
 127. Kryvoruchenko, D. O., Prykhodko, Y. O., Mazannyi, O. V., & Byrka, V. I. (2019). Diagnostics of dog *dirofilariosis* and epizootic situation in Kharkov region of Ukraine. *Ветеринарія, Технології Тваринництва Та Природокористування*, 4, 95–102. <https://doi.org/10.31890/VTTP.2019.04.19>
 128. Liulin, P. V., Prykhodko, Y. O., Mazannyi, O. V., Fedorova, H. V., Nikiforova, O. V., & Kryvoruchenko, D. O. (2021). Occurrence of *Dirofilaria immitis* (Nematoda, Onchocercidae) in Red Foxes (*Vulpes vulpes*) from the Suburbs of Kharkiv (Ukraine). *Zoodiversity*, 55(5), 425–430. <https://doi.org/10.15407/ZOO2021.05.425>
 129. Nikiforova, O., & Reshetylo, O. (2019, May 20). Dynamics of Dog *Dirofilariosis* in the North-Eastern Region of Ukraine. *BTRP Ukraine Science Writing Mentorship Program. Fourth Annual BTRP Ukraine Regional One Health Research Symposium*.
 130. Dakhno, Ju. I., & Soroka, N. M. (2013). Mosquitoes as intermediate hosts of *dirofilarias* in Sumy and Poltava regions of Ukraine. *Zoodiversity*, 47(2), 183–186.

131. Prokopenko, V., T. Romanyshyna, Feschenko, D., & Zgozinska, O. (2016). Features of development infectious process dogs dirofilariasis. *Theoretical and Applied Veterinary Medicine*, 4(4), 70–74. <https://bulletin-biosafety.com/index.php/journal/article/view/52>
132. Hamel, D., Silaghi, C., Zapadynska, S., Kudrin, A., & Pfister, K. (2013). Vector-borne pathogens in ticks and EDTA-blood samples collected from client-owned dogs, Kiev, Ukraine. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 4(1–2), 152–155. <https://doi.org/10.1016/J.TTBDIS.2012.08.005>
133. Soloviova, L. N. (2017). *Distribution and treatment of dirofilariosis of dogs in the town of Bila Tserkva*. 46(5), 20–96.
134. Espinosa, N., Rosero, A., Villegas, C. L., Garcia, I. C., Gaviria-Cantin, T., Nieto, A. P., Ferro, B. E., & Nieto Ramirez, L. M. (2022). First Report of *Acanthocheilonema reconditum* Outbreak in Canines with Clinical Signs of Anemia from Southwestern Colombia. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, 11(12). <https://doi.org/10.3390/PATHOGENS11121434>
135. Pacifico, L., Ferrari, N., Romeo, C., Buono, F., Varuzza, P., Sgroi, G., Neola, B., Buch, J., Beall, M., Breitschwerdt, E. B., Chandrashekar, R., Veneziano, V., & Piantedosi, D. (2021). Haematological and biochemical abnormalities in hunting dogs infected with *Acanthocheilonema reconditum*, associated risk factors, and a European overview. *Parasitology Research*, 120(6), 2109–2124. <https://doi.org/10.1007/S00436-021-07179-8>
136. Hoseini, M., Jalousian, F., Hoseini, S. H., & Sadeghian, A. G. (2020). A cross sectional study on *Dirofilaria immitis* and *Acanthocheilonema reconditum* in sheepdogs in a western region in Iran. *Veterinary Research Forum: An International Quarterly Journal*, 11(2), 185–190. <https://doi.org/10.30466/VRF.2018.78930.2046>
137. Jovanović, N. M., Despotović, D., Stepanović, P., Rajković, M., & Ilić, T. (2023). Clinical-parasitological and epidemiological review of the nematode *Acanthocheilonema reconditum*. *Veterinarski Glasnik*, 77(1), 1–15. <https://doi.org/10.2298/VETGL220307008J>

138. Huynh, T., Thean, J., & Maini, R. (2001). *Dipetalonema reconditum* in the human eye. *The British Journal of Ophthalmology*, 85(11), 1391–1392. <https://doi.org/10.1136/BJO.85.11.1384I>
139. Wesołowska, A. (2022). Sex-the most underappreciated variable in research: insights from helminth-infected hosts. *Veterinary Research*, 53(1), 94. <https://doi.org/10.1186/S13567-022-01103-3>
140. Cringoli, G., Rinaldi, L., Veneziano, V., & Capelli, G. (2001). A prevalence survey and risk analysis of filariosis in dogs from the Mt. Vesuvius area of southern Italy. *Veterinary Parasitology*, 102(3), 243–252. [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(01\)00529-5](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(01)00529-5)
141. Ciuca, L., Caruso, V., Illiano, S., Bosco, A., Maurelli, M. P., & Rinaldi, L. (2023). Emerging risk of *Dirofilaria* spp. infection in shelter dogs in southern Italy. *Frontiers in Veterinary Science*, 10. <https://doi.org/10.3389/FVETS.2023.1112036>
142. Sabūnas, V., Radzijeuskaja, J., Sakalauskas, P., Petkevičius, S., Karvelienė, B., Žiliukienė, J., Lipatova, I., & Paulauskas, A. (2019). *Dirofilaria repens* in dogs and humans in Lithuania. *Parasites & Vectors*, 12(1). <https://doi.org/10.1186/S13071-019-3406-Y>
143. Mazurkevich, A., Vasylyk, N., Avramenko, T., Velichko, S., Tarello, W., & Varodi, E. (2004). Adult *Dirofilaria repens* nematodes in a cat from Kiev, Ukraine. *The Veterinary Record*, 155(20), 638–639. <https://doi.org/10.1136/VR.155.20.638>
144. Wongkamchai, S., Nochote, H., Foongladda, S., Dekumyoy, P., Thammapalo, S., Boitano, J. J., & Choochote, W. (2014). A high resolution melting real time PCR for mapping of filaria infection in domestic cats living in brugian filariosis-endemic areas. *Veterinary Parasitology*, 201(1–2), 120–127. <https://doi.org/10.1016/J.VETPAR.2013.12.011>
145. Pennisi, M. G., Tasker, S., Hartmann, K., Belák, S., Addie, D., Boucraut-Baralon, C., Egberink, H., Frymus, T., Hofmann-Lehmann, R., Hosie, M., Lloret, A., Marsilio, F., Thiry, E., Truyen, U., & Möstl, K. (2020). *Dirofilarioses* in cats: European guidelines from the ABCD on prevention and management. *Journal of*

Feline Medicine and Surgery, 22(5), 442–451.
<https://doi.org/10.1177/1098612X20917601>

146. Oi, M., Sato, Y., Nakagaki, K., & Nogami, S. (2015). Detection of *Dirofilaria immitis* DNA in host serum by nested PCR. *Parasitology Research*, 114(10), 3645–3648. <https://doi.org/10.1007/S00436-015-4591-Z>



OPEN

Molecular insights and antibody response to Dr20/22 in dogs naturally infected with *Dirofilaria repens*

Mateusz Pękacz¹, Katarzyna Basałaj², Daniel Młocicki³, Maciej Kamaszewski⁴, Elena Carretón⁵, Rodrigo Morchón⁶, Marcin Wiśniewski^{1,8} & Anna Zawistowska-Deniziak^{7,8}✉

Subcutaneous dirofilariasis, caused by the parasitic nematode *Dirofilaria repens*, is a growing concern in Europe, affecting both dogs and humans. This study focused on *D. repens* Dr20/22, a protein encoded by an *alt* (abundant larval transcript) gene family. While well-documented in L3 larvae of other filariae species, this gene family had not been explored in dirofilariasis. The research involved cloning Dr20/22 cDNA, molecular characterization, and evaluating its potential application in the diagnosis of dirofilariasis. Although Real-Time analysis revealed mRNA expression in both adult worms and microfilariae, the native protein remained undetected in lysates from both developmental stages. This suggests the protein's specificity for L3 larvae and may be related to a process called SLTS (spliced leader trans-splicing), contributing to stage-specific gene expression. The specificity of the antigen for invasive larvae positions it as a promising early marker for dirofilariasis. However, ELISA tests using sera from infected and uninfected dogs indicated limited diagnostic utility. While further research is required, our findings contribute to a deeper understanding of the molecular and immunological aspects of host-parasite interactions and could offer insights into the parasite's strategies for evading the immune system.

Subcutaneous dirofilariasis is a vector-borne disease caused by a parasitic nematode *Dirofilaria repens*. Owing to climate changes and anthropogenic activities, dirofilariasis has expanded its distribution across nearly all European countries¹. Consequently, it has emerged as one of the most rapidly spreading parasitoses in the Old World. While the primary hosts of the disease are carnivores, notably dogs, it exhibits considerable zoonotic potential, thereby constituting a significant concern in both medical and veterinary fields. However, due to the predominantly asymptomatic or mildly symptomatic nature of *D. repens* infections², this zoonosis has often been overlooked, particularly when compared to other filariasis such as pulmonary dirofilariasis or lymphatic filariasis. As a result, research efforts aimed at mitigating invasions, such as early infection detection or development of potential vaccines, have been substantially impeded, given the limited understanding of the parasite's biology and the molecular interactions it established with the hosts.

Throughout the protracted co-evolution between hosts and parasites, helminths have evolved diverse strategies to evade host immune responses at various stages of their life cycle^{3–6}. Notably, the filariae L3 larvae adeptly evade and down-modulate the host's immune system within the cutaneous tissues, playing a pivotal role in both the parasite's establishment and the development of host immunity⁷. These immunomodulatory properties are primarily attributed to the surface and secreted antigens displayed by the larvae. As the initial molecules that engage the definitive host's immune system, these antigens hold promise as potential early markers of infection.

¹Division of Parasitology, Department of Preclinical Sciences, Institute of Veterinary Medicine, Warsaw University of Life Sciences-SGGW, 02-786 Warsaw, Poland. ²Museum and Institute of Zoology, Polish Academy of Sciences, 00-818 Warsaw, Poland. ³Department of General Biology and Parasitology, Medical University of Warsaw, 02-004 Warsaw, Poland. ⁴Department of Ichthyology and Biotechnology in Aquaculture, Institute of Animal Sciences, Warsaw University of Life Sciences-SGGW, 02-786 Warsaw, Poland. ⁵Internal Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, University of Las Palmas de Gran Canaria, Campus Arucas, Arucas, 35413 Las Palmas, Spain. ⁶Zoonotic Diseases and One Health Group, Faculty of Pharmacy, University of Salamanca, Campus Miguel Unamuno, 37007 Salamanca, Spain. ⁷Department of Immunology, Institute of Functional Biology and Ecology, Faculty of Biology, University of Warsaw, 02-095 Warsaw, Poland. ⁸These authors contributed equally: Marcin Wiśniewski and Anna Zawistowska-Deniziak. ✉email: a.zawistowska-deniziak@uw.edu.pl

Moreover, the presence of antibodies against L3 larvae is hypothesized to suppress larval development and correlate with resistance to new infections^{8,9}. However, despite the critical roles, the specific molecules underlying immune modulation in *D. repens* remain elusive. Thus, an in-depth investigation into stage-specific antigens, along with their molecular and immunological characterization, may offer novel insights into the development of prospective vaccines or diagnostic tools.

In light of this, the present study focused on a singular L3-specific *D. repens* 20/22 kDa protein (GenBank: QHR84804.1) known as Dr20/22, which was produced in recombinant form. Dr20/22 is encoded by a gene belonging to the *alt* (abundant larval transcript) family, a group well documented in numerous filarial nematodes including *Brugia malayi*^{10,11}, *Onchocerca volvulus*¹², *Acanthocheilonema viteae*¹³, *Wuchereria bancrofti*¹⁴ and *Dirofilaria immitis*^{15,16}. The ALTs being abundantly expressed in invasive larvae and mammals are devoid of known homologues. Given this, the proteins represent highly attractive vaccine candidates for filarial infections. While the precise biological function of these antigens remains obscure, extensive research has been conducted to explore their prophylactic potential, particularly in human lymphatic filariasis caused by *B. malayi* and *W. bancrofti*^{11,14,17–24}. Intriguingly, however, no investigations have yet delved into this antigen in the context of subcutaneous dirofilariasis. Thus, the *D. repens* homologue of ALT might hold central importance in the invasion process, and its comprehensive molecular and immunological characterization could represent a critical milestone in advancing our understanding of the intricate host-parasite interactions.

This study entailed the cloning of cDNA encoding the *D. repens* homologue of ALT (Dr20/22), followed by its meticulous molecular characterization. Subsequently, the recombinant antigen was evaluated for its potential application as an early diagnostic marker for subcutaneous dirofilariasis and used to discern antibody responses in dogs naturally infected with *D. repens* in comparison to non-infected individuals.

Results

Cloning and characterization of cDNA and gDNA of the Dr20/22 gene in *D. repens*

The cDNA cloning of the *dr20/22* gene yielded a 417 bp product. The complete coding sequence of the *D. repens alt* gene homologue in its adult stage was submitted to GenBank under accession number MN706526.1. No *D. repens*-specific SL sequence was found in either the adult stage or the microfilariae stage cDNA. Additionally, the gDNA cloning of almost the entire gene (from the start codon to the stop codon) resulted in a 1048 bp product (Supplementary Fig. 1).

Comparative analysis of nucleotide and amino acid sequences of ALT cDNAs from related filariae reveals phylogenetic relationships and structural characteristics of Dr20/22 protein

Comparison of nucleotide sequences of ALT cDNAs from related filariae using Blast showed 82.12% identity to *D. immitis* (U29459.1), 76.19% to *Loa loa* (XM_003148107), 60.92% to *O. volvulus* (U29576.1), 78.52% to *A. viteae* (U47545.2), 77.29% to *W. bancrofti* (AF285860.1), and 72.98% to *B. malayi* (U84723.1). A comparison of cDNA and gDNA encoding Dr20/22 revealed that the gene consists of 4 exons (1–78 bp; 296–422 bp; 665–755 bp; 928–1048 bp) and 3 introns (Supplementary Fig. 1).

Comparison of amino acid sequences showed 75.69% (MCP9263779.1) and 72.85% (AAC47031.1) identity to *D. immitis*, 55.48% to *A. viteae* (AAB03902.2), 46.81% to *O. volvulus* (AAA84910.1), 64.10% to *L. loa* (XP_003148155.1), 56.62% to *W. bancrofti* (EJW81953.1), and 53.68% to *B. malayi* (AAB41884.1).

Analysis of the putative amino acid sequence revealed the presence of a 21 amino acid signal peptide, followed by a protein with a theoretical molecular mass of 13.82 kDa and pI 4.93. NetOGlyc and NetNGlyc biotools determined six potential O-glycosylation sites (in positions 27, 29, 33, 36, 53, 60) and no N-glycosylation sites. NetPhos revealed 18 potential sites of phosphorylation: serine (23, 27, 29, 33, 36, 67, 97, 107, 118, 125, 128), threonine (53, 60), tyrosine (37, 41, 58, 81, 126). InterProScan identified a Chromadorea ALT domain (IPR008451) in position 62–135 characteristic of a vast family of filariae. The Phyre² program constructed the most probable 3D structure based on bee-venom phospholipase A2 from *Apis mellifera* (PMID: 2274788). However, only 28% of the protein could be modeled, and the confidence level of this model was estimated at just 3.8%.

Real-time PCR analysis of *D. repens alt* gene expression

Gene expression analysis showed 3.32 times higher expression levels of the *D. repens alt* gene in the adult stage than in microfilariae (Fig. 1).

Expression and characterization of Dr20/22 recombinant protein

SDS-PAGE and Western blot analyses displayed the purified protein as a double band within the 20–22 kDa range (Fig. 2). Glycoprotein staining did not indicate the presence of any glycan residues (Fig. 3). Interestingly, when the gel was overloaded with the protein, smaller fragments of the protein were detected, implying a propensity of the protein to undergo collapse. This observation was further confirmed in subsequent Western blot analyses using frozen protein.

PLA₂ assay has shown no activity of the rDr20/22

As PLA₂ activity was not detected, we conducted tests to explore the protein stability and the potential impact of freezing on antigen activity. Both fresh protein (used immediately after purification) and protein subjected to a freeze–thaw cycle were examined. The rationale behind this testing approach was to ensure that if the protein did possess PLA₂ activity, it could be assessed for any potential loss or changes in activity resulting from the freezing process.

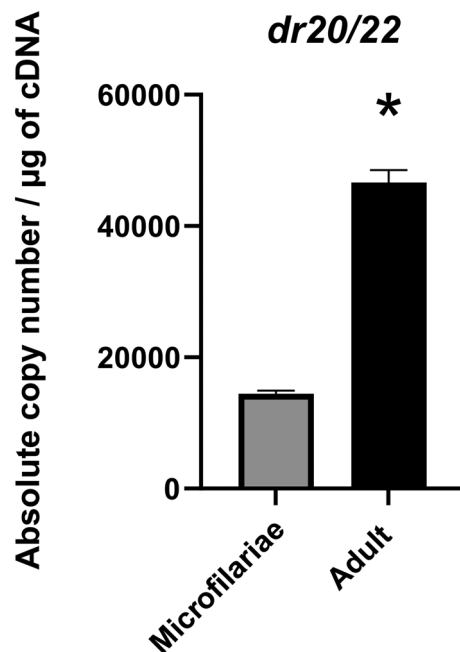


Figure 1. Analysis of the expression levels of *dr20/22* in microfilariae and the adult stage of *D. repens*. The result shows the number of gene copies per μg of cDNA. The bars show mean $\pm$ SEM. The statistically significant differences between examined groups are marked with asterisks: * $p < 0.05$.

Lack of Dr20/22 detection in *D. repens* lysates from adult and microfilariae stages

The Western blot analysis confirmed the presence of antibodies targeting the recombinant Dr20/22 epitopes in the anti-Dr20/22 serum, while no specific antibodies were detected in the serum of non-immunized mice. It was previously mentioned that the freeze–thaw cycle resulted in the observation of smaller protein fragments (Fig. 4).

Native Dr20/22 was not detected in any of the tested *D. repens* lysates, including adult female worm, E/S fraction (data not shown), and microfilariae (data not shown). Some unintended bands were detected in each condition (1b, 2b, 3b) as a result of the non-specific binding of anti-mouse IgG with residual dog IgG present in the worm lysate (Fig. 4). However, specific localization of the protein in cross-sections of the adult female worm (Fig. 5) was not achieved. The anti-Dr20/22 serum showed a strong immunolabeling almost throughout the entire histological section, while a weak immunolabeling was also observed with the serum from non-immunized mice, suggesting the possibility of cross-reactions (Fig. 6).

Recognition of rDr20/22 by antibodies in sera from naturally infected dogs with *D. repens*

Western blot analysis revealed the presence of specific IgG antibodies against rDr20/22 in sera from dogs infected with *D. repens*, while no such antibodies were detected in dogs infected with *D. immitis* (Fig. 7).

ELISA with rDr20/22 reveals IgG response in both infected and negative groups

ELISA, utilizing adult somatic antigen (DrSA) facilitated the classification of dogs without active microfilaremia into amicrofilaremic (Mf–; $N = 297$) and uninfected (Neg; $N = 379$). Interestingly, within the microfilaremic group, several low responders were identified, showing antibody levels comparable to those in non-infected dogs (Fig. 8). This step was critical in further examination of the diagnostic potential of rDr20/22. All sera utilized in the experiment were from leftover blood samples obtained from both pet dogs and shelter dogs. Due to the lack of complete medical histories, we were unaware of any past infections with *Dirofilaria* or other parasites, as well as their current clinical status. By comparing the results to DrSA, we could more accurately assess the usefulness of the individual antigen.

Subsequently, we explored the IgM class in the dogs based on this classification, yet found no significant differences between the infected and non-infected groups (Fig. 9). As a result, we decided to exclude the IgM class from further investigations.

When tested the same panel of sera, rDr20/22 demonstrated elevated IgG levels in both infected groups; however, a notable proportion of uninfected dogs also exhibited heightened antibody levels.

Moreover, cross-reactivity in IgG was observed between dogs infected with *D. repens* and *D. immitis*, using crude antigens from adult worms of both species (DrSA/DiSA), as well as rDr20/22 (Fig. 10).

Discussion

In the present study, we successfully cloned cDNA and gDNA encoding the *D. repens* homologue of ALT, which we named Dr20/22. The predicted molecular weight was significantly lower than the actual size observed on the gel, similar to its orthologs in other filariae (15.1–15.8 kDa)^{12,13}. The observed double band on the gel may

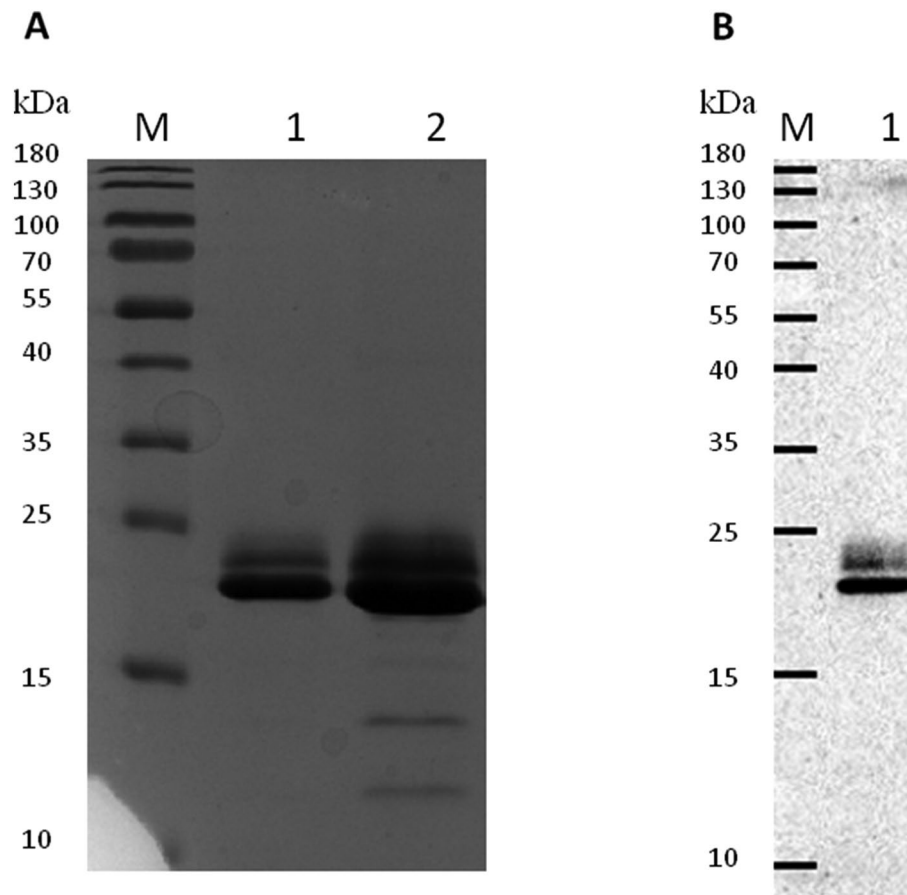


Figure 2. SDS PAGE (A) and Western blot (B) analysis of purified rDr20/22. The Western blot analysis employed the Anti-polyHistidine-Peroxidase antibody. The cropped gel and blot are used in the figure. Lane M—molecular weight marker (PageRuler Prestained Protein Ladder, 10 to 180 kDa, Thermo Scientific); lane 1A—5 μ g of the rDr20/22; lane 2A—15 μ g of the rDr20/22; lane 1B—0.25 μ g of the rDr20/22. Original gel and blot are presented in Supplementary Fig. 3.

result from posttranslational modifications, such as glycosylation and phosphorylation. A double band was also observed for *Brugia* ALT obtained in *Pichia pastoris* due to the glycosylation process¹⁷. Despite the presence of potential O-glycosylation sites, glycan residues were not confirmed by PAS staining in our study. Computational analyses predicted 18 phosphorylation sites for Dr20/22, with phosphorylation events potentially adding almost 1.5 kDa²⁵, which may explain the upper band. Genomic cloning revealed that the *dr20/22* gene consists of 4 exons and 3 introns (Supplementary Fig. 1), consistent with data from research on *B. malayi alt* genes²⁶. In most species, there are at least two transcription variants (*alt-1* and *alt-2*). Each variant has been identified as high stage-specific protein and is among the most abundant proteins in L3 larvae of several filariae species^{10–16}.

In our study, we demonstrated that the expression level of *dr20/22* mRNAs was approximately three times higher in the adult stage compared to microfilariae. However, surprisingly, we did not detect native protein in any of the tested *D. repens* lysates (female adult worm, adult worm E/S, microfilariae), indicating potential specificity of the antigen for L3 larvae. In case of *B. malayi alt-1* expression is terminated abruptly just after injection into the mammalian host tissues, but *alt-2* expression is less rigorously controlled, and trace levels of the transcripts were observed in all life cycle stages. At the protein level, both variants of *B. malayi* ALTs are L3 specific, similar to its orthologs in *D. immitis* (Di20/22)^{11,15,16}. The antigens are stockpiled in the glandular esophagus in the form of inclusion bodies during larval growth in the mosquito and are later secreted via pseudocoelom and cuticle upon entry into the definitive host tissues, triggered by an increase in temperature^{11,12}.

Furthermore, in immunohistochemistry, we observed a strong immunolabeling across almost the entire female cross-section, suggesting that the obtained anti-Dr20/22 serum may react non-specifically with other *D. repens* antigens, similar to what has been reported in the case of *O. volvulus*^{12,27}. Although we were unable to directly compare the Dr20/22 expression level to L3 larvae due to the unavailability of L3 samples, our findings, in combination with available literature, lead us to propose that Dr20/22, like its orthologues, is specific to the infective larvae stage.

There are several potential explanations for why we were not able to detect the antigen in the studied stages. Firstly, it is possible that the expression level was too low to be detected using the described techniques. However, we reject this possibility, as in our previous study, we successfully identified Dre33 in microfilariae lysate, which

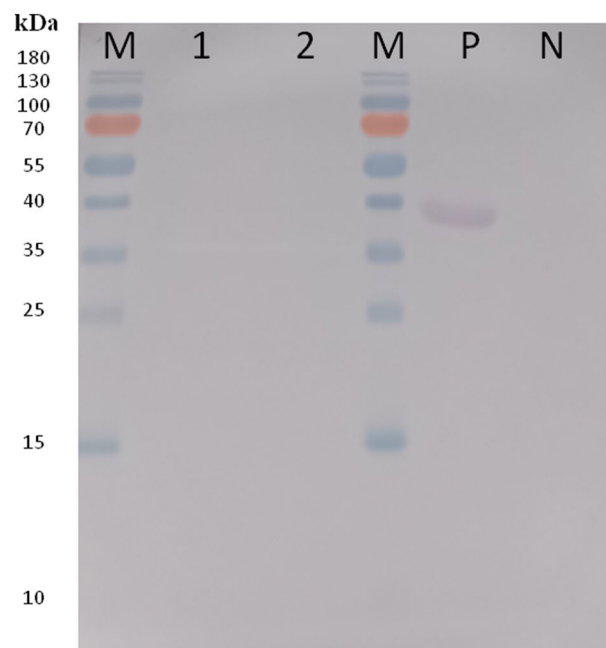


Figure 3. Staining of glycosylated proteins. The cropped blot is used in the figure. Lane M—weight marker (PageRuler Prestained Protein Ladder, 10 to 180 kDa, Thermo Scientific); lane 1—5 μ g of the rDr20/22; lane 2—10 μ g of the rDr20/22; P—positive control (horseradish peroxidase); N—negative control (soybean trypsin inhibitor). Both positive and negative controls were provided by the manufacturer. Original blot is presented in Supplementary Fig. 3.

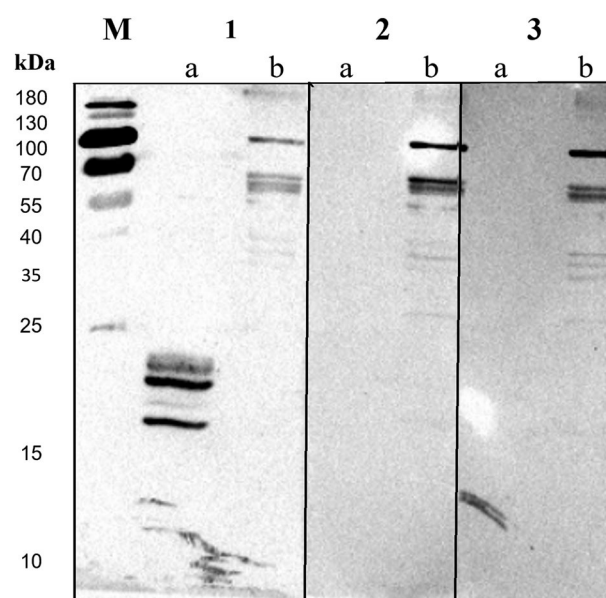


Figure 4. Western blot analysis of the specificity of anti-Dr20/22 antibodies to recombinant Dr20/22 (a) and native protein (b) in adult *D. repens* homogenate using mouse anti-Dr20/22 serum (1), and sera from non-immunized mice (2 and 3). The cropped blot is used in the figure. The nitrocellulose membrane was cut after an electrotransfer of the polyacrylamide gel. Lane M—molecular weight marker (PageRuler Prestained Protein Ladder, 10 to 180 kDa, Thermo Scientific). Original blot is presented in Supplementary Fig. 3.

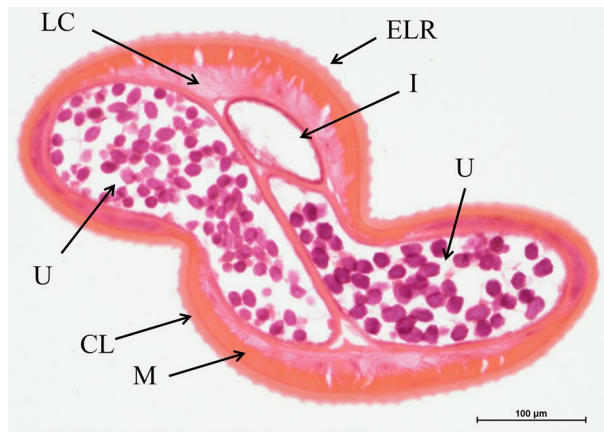


Figure 5. Morphological details of a *D. repens* female transverse section stained with H&E. *ELR* external longitudinal ridges, *CL* cuticular layer, *LC* lateral chord, *M* longitudinal muscles, *I* intestine, *U* uterus containing microfilariae.

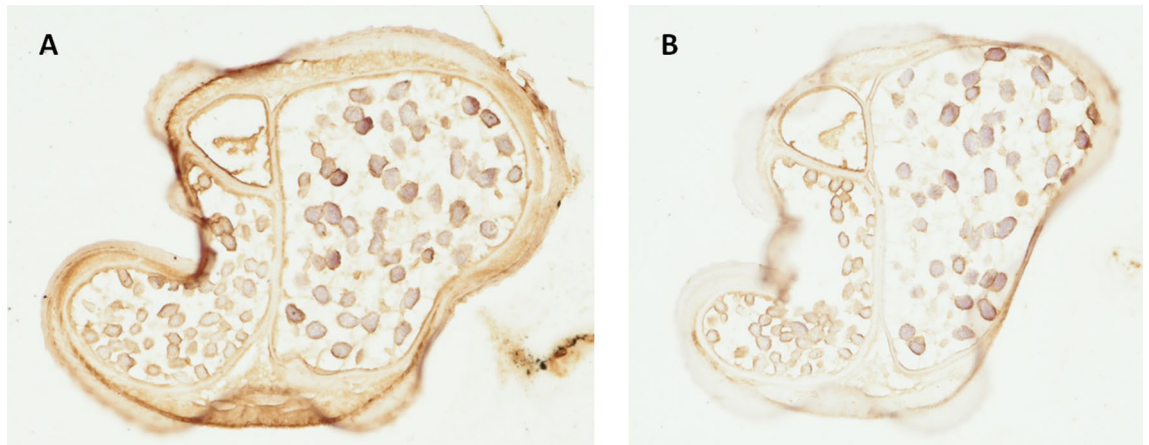


Figure 6. Immunohistochemistry staining of a *D. repens* female transverse sections with anti-Dr20/22 serum (A) and non-immunized mouse serum (B).

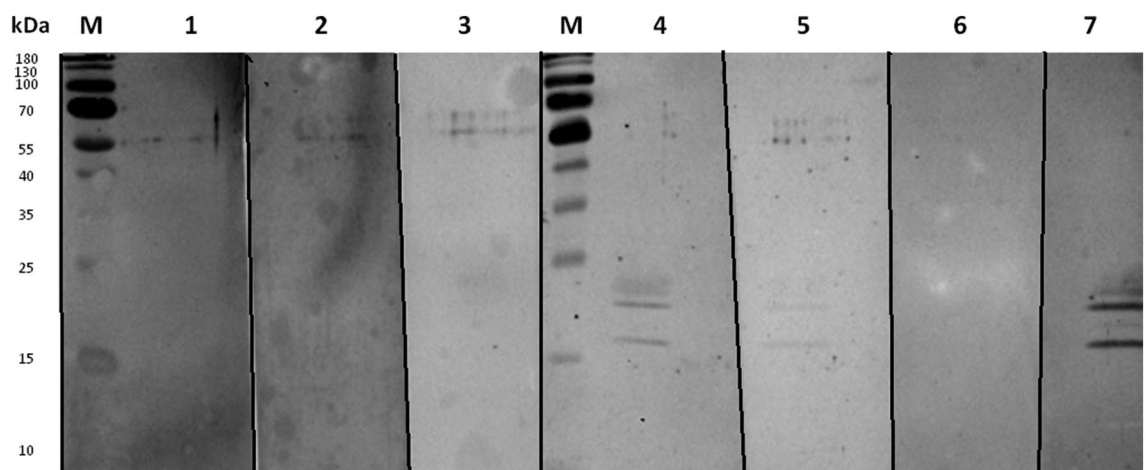


Figure 7. Western blot analysis of the presence of IgG specific to rDr20/22 in sera from dogs infected with *D. immitis* (1–3), *D. repens* (4, 5, 7) and negative dog (6). The cropped blot is used in the figure. The nitrocellulose membrane was cut after an electrotransfer of the polyacrylamide gel. Lane M—molecular weight marker (PageRuler Prestained Protein Ladder, 10 to 180 kDa, Thermo Scientific). Original blots are presented in Supplementary Fig. 3.

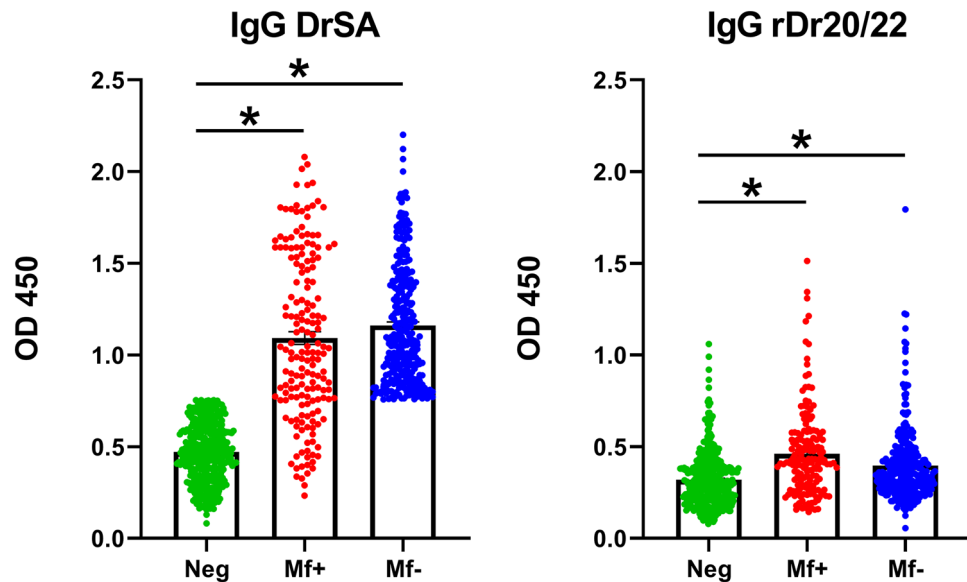


Figure 8. Diagnostic efficiency of rDr20/22 was assessed based on sera from dogs classified using *D. repens* somatic antigen (DrSA) ELISA: microfilaremic (Mf+; N = 174), amicrofilaremic (Mf-; N = 297) and negative (Neg; N = 379). The IgG response to rDr20/22 was demonstrated in both infected (Mf+, Mf-) and uninfected dogs. The statistically significant differences between examined groups are marked with an asterisk: * $p < 0.05$.

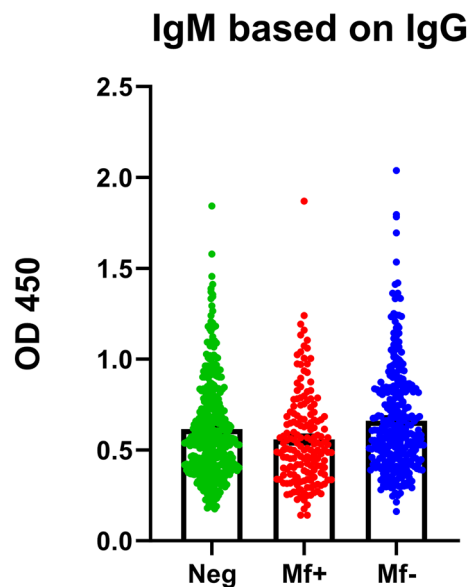


Figure 9. *D. repens* somatic antigen (DrSA) ELISA did not show statistically significant differences in IgM level between infected and non-infected groups. The IgM response to crude antigen from adult worms (DrSA) was evaluated in groups of dogs classified based on IgG level: microfilaremic (red; N = 174); amicrofilaremic (blue; N = 297), negative (green; N = 379).

presented a similar mRNA expression level to Dr20/22²⁸. The second, more plausible scenario involves molecular mechanisms responsible for the regulation of gene expression during larvae development. This phenomenon has been observed in research on *A. viteae* ES-62 antigen, where despite mRNA being expressed across the worm's life cycle, the protein is only secreted by L4 and adult worms and has never been detected in the filarial stages. The authors considered the possibility of different mRNA stability, but they ruled it out as the 3' UTRs were found to be identical in all stages²⁹. Additionally, various regulatory elements, both constructed and unconstructed (linear), play a leading role in translation and are located in the 5' UTR³⁰.

One such regulatory element is the spliced leader (SL) sequence, a short RNA containing a hypermodified 5'-cap structure that is transcribed from a different genomic location and transferred to the 5' end of designated

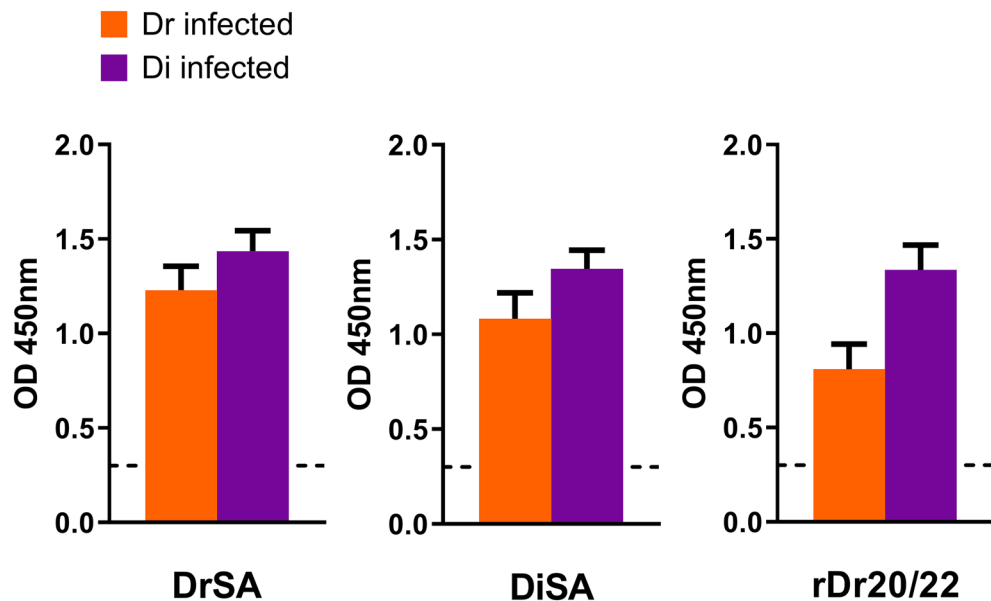


Figure 10. ELISA with crude antigen from adult worms of both species (DrSA/DiSA), as well as rDr20/22, showed cross-reactivity of IgG from dogs infected with either *D. repens* (red; N = 9) or *D. immitis* (blue; N = 9). The dashed line indicates uninfected (negative) dogs (N = 3–5).

mRNAs in a process known as spliced leader trans-splicing (SLTS)³¹. SLTS was first described in 1982 in African trypanosomes in mRNAs encoding variant surface glycoproteins³². It has since been observed in several other phyla, including cestodes, trematodes, and nematodes^{33–35}. In nematodes like *Ascaris lumbricoides* and *Caenorhabditis elegans*, the overall frequency of trans-spliced mRNAs ranges from 50% to even 90% depending on the source^{36–39}. The exact mechanism of SLTS remains puzzling, but several distinct functions have been proposed, including providing a 5'-cap structure for protein-coding RNAs, resolving polycistronic into individual capped, monocistronic mRNAs, enhancing mRNA translational efficiency through the hypermodified cap structure and/or leader sequence, and trimming and sanitizing 5' UTRs of the pre-mRNAs³¹.

In most research on filarial ALTs, the antigens were cloned using an L3-derived RNA template and primers specific for the spliced leader (SL) sequence^{10,12,13}. However, in the present study, we did not detect the SL in *dr20/22* (*D. repens* homologue of *alt*) in any of the examined stages. Given the fact that we previously identified the same SL sequence (specific for all nematodes) in adult worm mRNA encoding the ES62 antigen, known to be an adult stage-specific antigen, we considered whether the SLTS in *D. repens* may be differently regulated throughout the parasite's life cycle. Several studies suggest that leader sequence-containing transcripts may be stage-specific or developmentally regulated, which might account for differential protein levels and protein repertoires in different stages^{40–43}. As the parasite's development is usually related to changes in the host/habitat, the involvement of environmental and physiological factors in controlling translation via SLTS cannot be excluded. For example, it has been shown that heat shock can inhibit the SLTS process in selected genes of trypanosomes⁴⁴. In the study on the marine chordate *Oikopleura dioica*, it was observed that some of the SLs contain a TOP-like motif that may enable nutrient-dependent translation control of the trans-spliced mRNAs in response to changes in physiological and environmental conditions^{45,46}. Similar trans-spliced TOP mRNAs have also been presented in *C. elegans*, suggesting that this phenomenon may occur in other species as well⁴⁵.

Despite the enigmatic nature of the precise mechanism of SLTS, it has been demonstrated that the process impacts translation efficiency^{47–49}. For instance, a study on *A. lumbricoides* showed that the SL sequence and its hypermethylated cap enhance translational efficiency, especially at the initiation of protein synthesis³⁸. Furthermore, Lall et al.⁵⁰ suggested that both structures may impact translation initiation of the trans-spliced transcripts due to trimming of primary transcripts that are non-optimal for translation. Interestingly, in the study on trypanosomes, the authors suggested that omitting SLTS/polyadenylation sites during polycistronic RNA processing may lead to the generation of RNAs in a “translational latency state”, which can be stored for further processing into a mature transcript when required by the cell⁵¹.

To summarize, based on our findings and available data, we propose that *D. repens dr20/22* gene expression may be developmentally controlled by the SLTS. We hypothesize that in vertebrate-specific stages (mf, adult), the gene is transcribed into non-functional mRNAs, which contain problematic elements in the 5' UTR that prevent efficient translation. However, after the mosquito ingests microfilariae and the molting process starts, environmental or physiological changes promote SLTS events that sanitize *alt*'s 5' UTR and add a modified cap structure, resulting in effective translation. After injection of L3 into the definitive host tissues, the temperature seems to signal abrupt secretion of the antigen and SLTS inhibition at once, leading to the presence of only “latent” transcripts in the adult stage. For a better understanding of the gene expression pattern and detailed mechanism, further study should be conducted using *D. repens* L3 larvae.

Although ALT proteins were identified over 20 years ago, their biological activity and processes in which they are involved are still unknown. Some studies have reported a weak similarity to phospholipase A2 enzymes (PLA₂), which may be implicated in membrane homeostasis, remodeling, migration through host tissues, or signal transduction^{13,15}. In the present study, we excluded this hypothetical activity of Dr20/22 using a commercially available phospholipase A2 assay kit.

The second part of the study examined the diagnostic potential of the antigen. Despite its unknown biological function, the prophylactic potential of the antigen has been widely investigated, especially in human lymphatic filariasis caused by *B. malayi* and *W. bancrofti*^{11,14,17,18,20}. Given the apparent specificity of Dr20/22 for invasive larvae, similar to other ALT homologues, and fact that Western blot successfully detected rDr20/22-specific antibodies only in sera from dogs infected with *D. repens*, we opted to evaluate the antigen's diagnostic potential. We hypothesized that it may facilitate early diagnosis of dirofilariasis within a short period after infection. ELISA with Dr20/22 revealed the presence of specific IgG in both infected (Mf+, Mf-) and non-infected (negative) groups, similar to the findings in other filarial ALTs^{11,12,14,17,18}. Our findings subsequently unveiled a degree of cross-reactivity of the antigen with sera from both *D. repens* and *D. immitis*, thereby challenging its specificity and, by extension, its diagnostic value. A high genetic similarity between both species could explain the observed cross-reactions in both ELISA experiments with crude extracts and rDr20/22. Dr20/22 shares approximately 70% of sequence identity with its counterpart in *D. immitis* (Supplementary Fig. 2).

Interestingly, some research indicates that resistance to filarial diseases might be facilitated by antibodies that target ALT proteins^{16,52}. Studies have demonstrated a significant reduction in the sera's capacity from individuals living in endemic areas (referred to as endemic normals EN) to contribute to the elimination of *B. malayi* L3 larvae in ADCC assay when ALT-specific antibodies are removed⁵². This underscores the potential role of ALT-specific antibodies in mediating resistance to filarial infections. Given that ALT proteins are abundantly expressed in invasive larvae and lack mammalian homologues, they emerge as particularly promising candidates for vaccine development against filarial diseases. Depending on the study and adopted vaccine strategy (single molecule vs. cocktail of molecules), the protection efficacy ranges from 30 to 96% and 70% to 80% using only *alt* DNA and *alt* DNA mixed with other constructs, respectively^{21–24}. In the case of protein-based vaccines, the mean reduction of the alive larval burden reached 69% to 76% when using *B. malayi* ALTs^{11,21–23}, and 49.82% to 62.26% based on *W. bancrofti* recombinant ALT or ALT mutants (e.g. protein without acidic domain or signal peptide)¹⁴. These antigens provided better protection than any other previously tested filarial protein and reached efficacy that rivals vaccination with radiation-attenuated larvae⁵³.

In conclusion, our study provides valuable insights into the expression pattern and potential specificity of Dr20/22 in *D. repens*. It also highlights the role of SLTS in gene expression regulation during the parasite's life cycle. However, further research with L3 larvae is needed for a better understanding of the gene expression pattern and its mechanisms. Additionally, the biological activity and processes involving ALT proteins remain unknown, and more studies are required to explore their potential role in vaccination and immunity against filarial infections.

Materials and methods

Dr20/22 cloning and recombinant protein production

Total RNA was extracted from adult *D. repens* worms and microfilariae using the Total RNA Mini Kit (A&A Biotechnology), following the manufacturer's protocol. The adult worms were manually homogenized in phenol solution, while the microfilariae were isolated from blood using 5 µm filters (Whatman), suspended in phenol solution, and homogenized in TissueLyser LT (QIAGEN, Hilden, NRW, Germany). Each RNA sample (1 µg) was subjected to DNase treatment and cDNA synthesis using the RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific) as per the manufacturer's instructions, with the PTX primer (5' GAA CTA GTC TCG AGT TTTT TTTT TTTT TTTT TTTT 3') replacing oligo (dT)₁₈. The adult worm cDNA mixture was used as a template in PCR with PTX and gene-specific ForDr20/22 (5' ATG AAC AAA CTT YTM ATA RTY YTY GGC 3') primers to amplify the sequence encoding the *D. repens* homologue of the ALT (Dr20/22). The gene-specific primer was designed based on homologous genes from closely related filariae species (GenBank: U29459.1, U47545.2, AF285860.1). The PCR reaction was performed under the following conditions: 3 min at 95 °C, 35 cycles of 95 °C for 30 s, 53 °C for 45 s, and 72 °C for 30 s, with a final extension step of 10 min at 72 °C. The full-length cDNA was ligated into the pGEM T-Easy vector (Promega) and sequenced using Sanger's method to confirm the specificity of the product. Additionally, PCR was performed with ForDrSL (5' GTT TTA ATT ACC CAA GTT TGA GG 3') and gene-specific RevDr20/22cds (5' ATC ATA TGA GCA CTG CCA GTC 3') primers to test if the mature adult and microfilariae mRNAs are enriched with the spliced leader (SL) sequence specific for *D. repens*, as detected in a previous study (GenBank: MT071086.1). The reaction conditions were the same as described above.

Subsequently, cDNA encoding the mature protein (without the signal peptide) was amplified using gene-specific primers incorporating restriction enzyme sites and subcloned into the pPICZα A vector (Invitrogen) using *EcoRI* and *XbaI* enzymes and T4 ligase (Thermo Fisher Scientific). The resulting construct (10 µg) was linearized with *SacI* enzyme and used for electrotransformation of the *P. pastoris* X33 strain. Transfected cells were spread on YPDS plates with increasing concentrations of zeocin (100, 500, 1000 µg/ml) to select multi-copy recombinants. A single colony positive in PCR with 5AOX1 (5' GAC TGG TTC CAA TTG ACA AGC 3') and 3AOX1 (5' GCA AAT GGC ATT CTG ACA TCC 3') primers was used for expression in BMMY medium containing 0.5% methanol at 29.8 °C for 72 h. All yeast transformation, culture, transformant analysis, and protein expression procedures were performed according to the EasySelect Pichia Expression Kit (Invitrogen) protocols.

The protein was purified under native conditions using the Protino Ni-NTA Agarose for His-tag protein purification Kit (MACHEREY-NAGEL) with the gravity flow method, following the manufacturer's protocol.

Eluted fractions were concentrated and dialyzed against PBS using Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Units with a 3 kDa MWCO (Merck Millipore). Endotoxins were removed using High Capacity Endotoxin Removal Spin Columns (Pierce), and the purified rDr20/22 protein was filtered through 0.22 µm syringe filters (Millex, Merck Millipore). The protein concentration was determined using the BCA Protein Kit Assay (Pierce). The presence of purified Dr20/22 was confirmed by SDS-PAGE and Western blotting using the Anti-polyHistidine Peroxidase antibody (Merck Millipore). The occurrence of potential glycosylation sites was assessed using the Glycoprotein Staining Kit (Pierce).

Cloning of Dr20/22 gDNA

Adult *D. repens* worms were manually homogenized in Tris buffer, and genomic DNA (gDNA) was isolated using the Genomic Mini Kit (A&A Biotechnology) following the manufacturer's protocol. The isolated gDNA was utilized as a template in PCR with primers designed to target the start (ForDr20/22cds 5' ATG AAC AAA CTT TTC ATA GTT CTT GGC 3') and stop (RevDr20/22cds 5' ATC ATA TGA GCA CTG CCA GTC 3') codons of the coding sequence. This PCR amplification aimed to capture the full-length gene, including both exons and introns. The reaction conditions involved an initial denaturation at 95 °C for 3 min, followed by 35 cycles of denaturation at 95 °C for 30 s, annealing at 52 °C for 45 s, and extension at 72 °C for 2 min, with a final extension step of 10 min at 72 °C. The amplified product was then cloned into the pGEM T-Easy Vector (Promega) and subjected to Sanger sequencing. The obtained sequence data were subsequently used for the prediction of the gene structure, including the determination of the number of exons and introns.

Analysis of gene expression level

Gene expression levels were assessed using Real-Time PCR. Total RNA isolation, DNase treatment, and cDNA synthesis were performed following the previously described methods. PCR reactions were conducted in triplicates, employing a two-step fast cycle protocol with PowerUp SYBR Green Master Mix from Applied Biosystems. The melt curve step was carried out in a QuantStudio 6 Real-Time PCR system (Applied Biosystems). The PCR process involved UDG (Uracil-DNA Glycosylase) activation for 2 min at 50 °C, followed by initial denaturation for 2 min at 95 °C. Subsequently, 40 amplification cycles were executed, comprising 3 s at 95 °C and 30 s at 60 °C. The reaction mixture included 10 ng of cDNA from each life cycle stage (adult *D. repens* worm and microfilariae), 5 µl of PowerUp SYBR Green Master Mix (2X), forward (ForDr20/22RT 5' CAG CGA CGA AAG TTA TGC AGA AGA C 3') and reverse (RevDr20/22RT 5' AAT ATG CAC CAC GAT TGC GGT TCA C 3') primers at a final concentration of 0.6 µM, and sterile water to reach a final volume of 10 µl. The absolute copy number of the *dr20/22* gene was determined based on a standard curve ranging from one billion to ten copies per reaction, utilizing the data collected during the anneal/extension step.

Statistically significant differences between different life cycle stages were analyzed using the Student's *t*-test.

Bioinformatics analysis and structural prediction of *D. repens* Dr20/22 protein

Comparison of the nucleotide sequences of *alt* from closely related filariae in the GenBank database was performed using the Basic Local Alignment Search Tool (Blast) available at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>. The amino acid sequence was obtained using the Translate tool available at <http://web.expasy.org/translate/>. Nucleotide and amino acid alignments, incorporating the novel *D. repens* Dr20/22 sequence and homologous sequences from related filariae, were constructed using Multalin accessible at <http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>. The theoretical molecular weight and isoelectric point were estimated using the Compute pI/Mw tool (https://web.expasy.org/compute_pi/). The signal peptide was determined using the SignalP 5.0 server available at <https://services.healthtech.dtu.dk/services/SignalP-5.0/>. For the determination of N-glycosylation, O-glycosylation, and phosphorylation sites, NetOGlyc, NetNGlyc, and NetPhos, respectively, were employed and accessed at <https://www.cbs.dtu.dk/services>. The identification of characteristic domains was carried out using the InterProScan Sequence Search available at <https://www.ebi.ac.uk/interpro/>. Lastly, the probable three-dimensional structure of *D. repens* Dr20/22 was obtained and visualized using Phyre², accessible at <http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/>.

Dirofilaria E/S collection and tissue lysates preparation

Briefly, to collect *D. repens* excretory/secretory (E/S) products, several live worms obtained during surgical procedures were washed in PBS and then incubated in RPMI 1640 supplemented with penicillin (100 U/ml) and streptomycin (100 µg/ml) at 37 °C for 16 h. Fresh medium was replaced every 2 h, and the collected medium was stored at −70 °C until further analyses. Subsequently, the collected medium was centrifuged (8000×g, 10 min, 4 °C), concentrated, and dialyzed against cold sterile PBS using an Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Unit with a 3 kDa MWCO (Merck Millipore). The resulting product was then passed through a 0.22 µm filter.

For adult worm (*D. repens* and *D. immitis*) and microfilariae lysates, the procedures described in our previous studies were followed^{28,54}. Protein concentration in the lysates was determined by BCA assay (Pierce).

Preparation of mouse anti-Dr20/22 serum and western blotting analysis of *D. repens* proteins

Antiserum against recombinant Dr20/22 was generated through subcutaneous immunization of a BALB/c mouse with 100 µg of the recombinant protein, followed by three booster doses of 75, 50, and 25 µg on days 14, 28, and 42, respectively. Each dose was mixed with Imject Alum Adjuvant (Thermo Fisher Scientific) in a 1:3 ratio. On day 49, the mouse was euthanized, and blood was collected in tubes, incubated for 2 h at 37 °C, followed by overnight incubation at 4 °C. The next day, the blood was centrifuged for 10 min at 500×g, and the serum was stored at −70 °C until further analyses. All experiments were conducted following relevant guidelines and regulations, and ethical approval was obtained from the 2nd Local Ethics Committee for Animal Experimentation,

Warsaw University of Life Sciences-SGGW, Poland (approval number: WAW2/82/2019). The manuscript reporting adheres to the recommendations in the ARRIVE guidelines⁵⁵.

To determine the presence of antibodies recognizing recombinant Dr20/22 epitopes in the mouse serum and to detect native protein in adult worm lysate, excretory/secretory (ES) products, and microfilariae lysate, Western blot analysis was performed. 0.25 µg of the recombinant protein and 10 µg of each lysate were separated on a 15% polyacrylamide gel during SDS-PAGE and subsequently transferred to a nitrocellulose membrane. The membrane was blocked for 2 h at room temperature using SuperBlock T20 (Thermo Fisher Scientific) and then incubated overnight at 4 °C with mouse anti-Dr20/22 serum or serum from non-immunized mice, both diluted 1:1000 in the blocking buffer. The following day, the membrane was thoroughly washed with PBS containing 0.05% Tween-20 (0.05% PBS-T) and then incubated for 1 h at room temperature with Anti-Mouse IgG HRP-conjugated antibodies (R&D Systems), diluted 1:1000 in the blocking buffer. After washing with 0.05% PBS-T (3 × 10 min), the membrane was visualized by chemiluminescence using SuperSignal West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate (Thermo Fisher Scientific) in a ChemiDoc MP Imaging System (Bio-Rad).

Immunohistochemical detection of Dr20/22 protein in adult female *D. repens* worm

Detection of the Dr20/22 protein in adult female *D. repens* worms was carried out using immunohistochemistry staining. The worms were fixed in 4% buffered formalin, embedded in paraffin, and cross-sectioned to a thickness of 5 µm using a Leica RM2025 microtome (Leica Microsystems, Germany). The obtained histological sections were initially subjected to topographic staining using the hematoxylin–eosin (H/E) standard protocol to assess the morphology of the adult nematode.

For the immunohistochemistry staining, the histological slides were deparaffinized in xylene, rehydrated through a gradient of ethanol (from absolute alcohol to 70%), and then subjected to antigen retrieval by incubation for 5 min at 82 °C in 10 mM citric acid (pH 6). Endogenous peroxidase was blocked using 5% hydrogen peroxide, and to reduce non-specific antibody binding, the slides were blocked with Protein Blocker (Novocastra Peroxidase Detection System, Leica) and 5% skim milk, each step lasting 30 min at 37 °C. Subsequently, the slides were incubated with polyclonal anti-Dr20/22 mouse serum, diluted 1:100 in PBS, overnight at 4 °C. The following day, incubation with secondary antibodies and visualization were performed according to the manufacturer's protocol (Novocastra Peroxidase Detection System, Leica). After each step, the slides were rinsed in Tris buffer (pH 8.0, Merck Millipore). Finally, the slides were counterstained with Harris hematoxylin solution, differentiated with 1% acid alcohol, dehydrated, rinsed in xylene, and mounted in DPX Mountant for histology (Merck Millipore). For the negative control test, sera from non-immunized mice were used.

Immunological analysis of Dr20/22 antibodies in dogs infected with *D. repens* or *D. immitis*

Western blot analysis was performed to determine the presence of antibodies specific for rDr20/22 in sera from dogs infected with *D. repens* or *D. immitis*. The membrane was incubated with sera from infected or healthy (uninfected) dogs, diluted 1:400 in the blocking buffer, overnight at 4 °C. Subsequently, secondary anti-dog IgG-HRP antibodies (Abcam) were incubated for 1 h at room temperature in a 1:25,000 dilution. The remaining procedure steps, including protein separation on the gel, washing, and visualization, were conducted as described in section “Preparation of mouse anti-Dr20/22 serum and western blotting analysis of *D. repens* proteins”.

Overview of study design and diagnostic evaluation

The aim of our study was to compare the diagnostic efficiency of rDr20/22 to DrSA ELISA. We analyzed sera from 850 dogs, comprising 174 with active microfilaremia and 676 individuals without active microfilaremia—negative in PCR or Knott's test. Considering the possibility of occult/amicrofilaremic infections, we categorized the dogs using DrSA ELISA into three groups: microfilaremic (Mf+), amicrofilaremic (Mf−), and negative (Neg), based on the calculated cut-off value, which was determined as the mean OD plus 3 standard deviations (SD) from 35 dogs known to be negative in Knott, qPCR, and ELISA, as detailed in our previous study⁵⁴. Additionally, we examined the IgM response among each group and the IgG response against rDr20/22 using the same panel of sera.

Recognizing the high genetic similarity between *D. repens* and *D. immitis*, we conducted separate experiments to explore the potential occurrence of cross-reactions between both species. This investigation included the use of ELISA with extracts of adult worms (DrSA/DiSA) as well as rDr20/22. For these experiments, we utilized smaller groups of dogs, consisting of those infected with *D. repens* (N = 9), *D. immitis* (N = 9), and negative (N = 3–5).

Comparative diagnostic evaluation of rDr20/22 ELISA and crude adult worm antigens in canine dirofilariasis

The Nunc MaxiSorp C-shaped Plates (Thermo Fisher) were coated with 2.5 µg/ml of DrSA/DiSA in 0.1 M sodium carbonate buffer (pH 9.5) and incubated overnight at 4 °C. Subsequently, the plates were blocked with 0.1 M NaHCO₃ (pH 8.6) and 0.5% BSA for 1.5 h at room temperature. Plasma samples, collected during previous studies⁵⁴, were analyzed in a dilution of 1:1600 in the blocking buffer for 1.5 h at room temperature. The anti-dog peroxidase-conjugated IgG and IgM (Abcam) were diluted to 1:50,000 in 0.1 M NaHCO₃ (pH 8.6) and 0.5% BSA and then incubated for 1 h at room temperature. After each step, the plates were washed three times with PBS containing 0.05% Tween-20. TMB substrate solution was added to the wells, developed at room temperature, and the reaction was stopped after 30 min with 2 M H₂SO₄. Optical densities were measured at 450 nm using a microplate reader (Synergy HT, BioTek).

The ELISA with rDr20/22 was conducted similarly, all procedures were performed as described above, with the exception of the dogs' sera, which were used in a dilution of 1:400.

Evaluating the phospholipase A2 (PLA₂) activity of rDr20/22

The potential phospholipase A2 (PLA₂) activity of rDr20/22 was evaluated using the EnzChek Phospholipase A2 Assay Kit (Invitrogen). Fresh or frozen (stored at -80°C) protein was utilized in two-fold dilutions ranging from 100 μg per reaction to 0.2 μg per reaction. Additionally, the ability of rDr20/22 to inhibit PLA₂ activity was investigated. Each well was supplemented with 1.25 U/ml of PLA₂, which was pre-incubated for 20 min with serial dilutions of rDr20/22 (ranging from 100 to 0.2 μg per reaction) before the substrate-liposome mix was added. All reactions were conducted in a 96-Well Black Polystyrene Microplate (Costar) following the manufacturer's protocol.

The fluorescence was measured with excitation at $\sim 485/20$ nm and fluorescence emission at $\sim 528/20$ nm using a microplate reader (Synergy HT, BioTek). The PLA₂ activity was determined based on a standard curve ranging from 5 to 0.2 U/ml.

Statistical analysis

All data are presented as mean $\pm$ standard error of the mean (SEM). Statistical analysis was performed using GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) with unpaired *t*-test for gene expression analysis and Kruskal–Wallis test for data produced in ELISA. Differences between groups were considered statistically significant at $p < 0.05$.

Data availability

Sequence data that support the findings of this study have been deposited in the GenBank repository with the accession number MN706526.1. Other data is provided within the manuscript or supplementary information files.

Received: 20 November 2023; Accepted: 29 May 2024

Published online: 05 June 2024

References

1. Fuehrer, H. P. *et al.* *Dirofilaria* spp. and *Angiostrongylus vasorum*: Current risk of spreading in central and northern Europe. *Pathogens* **10**, 1268. <https://doi.org/10.3390/pathogens10101268> (2021).
2. Genchi, C. & Kramer, L. Subcutaneous dirofilariasis (*Dirofilaria repens*): An infection spreading throughout the old world. *Parasites Vectors* <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2434-8> (2017).
3. Başka, P. *et al.* *Fasciola hepatica*—The pilot study of *in vitro* assessing immune response against native and recombinant antigens of the fluke. *Acta Parasitol.* **58**, 453–462 (2013).
4. Baska, P. & Norbury, L. J. The role of the intestinal epithelium in the ‘weep and sweep’ response during gastro-intestinal helminth infections. *Animals* **12**, 175 (2022).
5. Zakeri, A., Hansen, E. P., Andersen, S. D., Williams, A. R. & Nejsum, P. Immunomodulation by helminths: Intracellular pathways and extracellular vesicles. *Front. Immunol.* **9**, 2349 (2018).
6. Wiedemann, M. & Voehringer, D. Immunomodulation and immune escape strategies of gastrointestinal helminths and schistosomes. *Front. Immunol.* **11**, 572865 (2020).
7. Bhoj, P., Togre, N., Khatri, V. & Goswami, K. Harnessing immune evasion strategy of lymphatic filariae: A therapeutic approach against inflammatory and infective pathology. *Vaccines* **10**, 1235 (2022).
8. Devaney, E. & Osborne, J. The third-stage larva (L3) of *Brugia*: Its role in immune modulation and protective immunity. *Microbes Infect.* **2**, 1363–1371 (2000).
9. Kwarteng, A. & Ahuno, S. T. Immunity in filarial infections: Lessons from animal models and human studies. *Scand. J. Immunol.* **85**, 251–257 (2017).
10. Gregory, W. F., Blaxter, M. L. & Maizels, R. M. Differentially expressed, abundant trans-spliced cDNAs from larval *Brugia malayi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **87**, 85–95 (1997).
11. Gregory, W. F., Atmadja, A. K., Allen, J. E. & Maizels, R. M. The abundant larval transcript-1 and -2 genes of *Brugia malayi* encode stage-specific candidate vaccine antigens for filariasis. *Infect. Immun.* **68**, 4174–4179 (2000).
12. Wu, Y. *et al.* The Secreted Larval Acidic Proteins (SLAPs) of *Onchocerca* spp. are encoded by orthologues of the alt gene family of *Brugia malayi* and have host protective potential. *Mol. Biochem. Parasitol.* **134**, 213–224 (2004).
13. Pogonka, T., Oberländer, U., Marti, T. & Lucius, R. *Acanthocheilonema viteae*: Characterization of a molt-associated excretory/secretory 18-kDa protein. *Exp. Parasitol.* **93**, 73–81 (1999).
14. Aparnaa, R. *et al.* *Wuchereria bancrofti* 20/22 a homologue of abundant larval transcript L3 stage filarial antigen: Molecular and immunological characterization. *Parasite Immunol.* **36**, 475–484 (2014).
15. Frank, G. R., Tripp, C. A. & Grieve, R. B. Molecular cloning of a developmentally regulated protein isolated from excretory-secretory products of larval *Dirofilaria immitis*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **75**, 231–240 (1996).
16. Frank, G. R. & Grieve, R. B. Purification and characterization of three larval excretory-secretory proteins of *Dirofilaria immitis*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **75**, 221–229 (1996).
17. Paul, R., Saha, G., Selvaraja, V. & Kaliraj, P. Cloning, expression and characterization of *Brugia malayi* abundant larval protein transcript-2 (BmALT-2) expressed in *Pichia pastoris*. *Prep. Biochem. Biotechnol.* **31**, 403–410 (2016).
18. Madhumathi, J. *et al.* Crucial epitopes of *Wuchereria bancrofti* abundant larval transcript recognized in natural infection. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **29**, 1481–1486 (2010).
19. Yasin, N. *et al.* Design, expression, and evaluation of novel multiepitope chimeric antigen of *Wuchereria bancrofti* for the diagnosis of lymphatic filariasis—A structure-based strategy. *Int. Immunopharmacol.* **83**, 106431 (2020).
20. Prado, I. C., Mendes, V. G., Souza, A. L. A., Dutra, R. F. & De-Simone, S. G. Electrochemical immunosensor for differential diagnosis of *Wuchereria bancrofti* using a synthetic peptide. *Biosens. Bioelectron.* **113**, 9–15 (2018).
21. Ramachandran, S. *et al.* The larval specific lymphatic filarial ALT-2: Induction of protection using protein or DNA vaccination. *Microbiol. Immunol.* **48**, 945–955 (2004).
22. Thirugnanam, S. *et al.* *Brugia malayi*: Comparison of protective immune responses induced by Bm-alt-2 DNA, recombinant BmALT-2 protein and prime-boost vaccine regimens in a jird model. *Exp. Parasitol.* **116**, 483–491 (2007).
23. Vanam, U. *et al.* Evaluation of immunoprophylactic efficacy of *Brugia malayi* transglutaminase (BmTGA) in single and multiple antigen vaccination with BmALT-2 and BmTPX for human lymphatic filariasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **80**, 319–324 (2009).
24. Anand, S. B., Kodumudi, K. N., Reddy, M. V. & Kaliraj, P. A combination of two *Brugia malayi* filarial vaccine candidate antigens (BmALT-2 and BmVAH) enhances immune responses and protection in jirds. *J. Helminthol.* **85**, 442–452 (2011).

25. Yu, L.-R. & Veenstra, T. D. Characterization of phosphorylated proteins using mass spectrometry. *Curr. Protein Pept. Sci.* **22**, 148 (2021).
26. Gomez-Escobar, N. *et al.* Abundant larval transcript-1 and -2 genes from *Brugia malayi*: Diversity of genomic environments but conservation of 5' promoter sequences functional in *Caenorhabditis elegans*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **125**, 59–71 (2002).
27. Joseph, G. T., Huima, T. & Lustigman, S. Characterization of an *Onchocerca volvulus* L3-specific larval antigen, Ov-ALT-1. *Mol. Biochem. Parasitol.* **96**, 177–183 (1998).
28. Zawistowska-Deniziak, A. *et al.* Immunoproteomic analysis of *Dirofilaria repens* microfilariae and adult parasite stages. *Pathogens* **10**, 1–18 (2021).
29. Stepek, G., Houston, K. M., Goodridge, H. S., Devaney, E. & Harnett, W. Stage-specific and species-specific differences in the production of the mRNA and protein for the filarial nematode secreted product, ES-62. *Parasitology* **128**, 91–98 (2004).
30. Leppek, K., Das, R. & Barna, M. Functional 5' UTR mRNA structures in eukaryotic translation regulation and how to find them. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **19**, 158–174 (2018).
31. Hastings, K. E. M. SL trans-splicing: Easy come or easy go? *Trends Genet.* **21**, 240–247 (2005).
32. van der Ploeg, L. H. T. *et al.* RNA splicing is required to make the messenger RNA for a variant surface antigen in trypanosomes. *Nucleic Acids Res.* **10**, 3591 (1982).
33. Brehm, K., Jensen, K. & Frosch, M. mRNA trans-splicing in the human parasitic cestode *Echinococcus multilocularis*. *J. Biol. Chem.* **275**, 38311–38318 (2000).
34. Brehm, K., Hubert, K., Sciotto, E., Garate, T. & Frosch, M. Characterization of a spliced leader gene and of trans-spliced mRNAs from *Taenia solium*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **122**, 105–110 (2002).
35. Davis, R. E. *et al.* RNA trans-splicing in *Fasciola hepatica*. Identification of a spliced leader (SL) RNA and SL sequences on mRNAs. *J. Biol. Chem.* **269**, 20026–20030 (1994).
36. Nilsen, T. W. Trans-splicing of nematode premessenger RNA. *Annu. Rev. Microbiol.* **47**, 413–440 (1993).
37. Nilsen, T. W. Trans-splicing: An update. *Mol. Biochem. Parasitol.* **73**, 1–6 (1995).
38. Maroney, P. A., Denker, J. A., Darzynkiewicz, E., Laneve, R. & Nilsen, T. W. Most mRNAs in the nematode *Ascaris lumbricoides* are trans-spliced: A role for spliced leader addition in translational efficiency. *RNA* **1**, 714 (1995).
39. Blaxter, M. & Liu, L. Nematode spliced leaders—Ubiquity, evolution and utility. *Int. J. Parasitol.* **26**, 1025–1033 (1996).
40. Bitar, M., Boroni, M., Macedo, A. M., Machado, C. R. & Franco, G. R. The spliced leader trans-splicing mechanism in different organisms: Molecular details and possible biological roles. *Front. Genet.* **4**, 199 (2013).
41. Zeng, W., Alarcon, C. M. & Donelson, J. E. Many transcribed regions of the *Onchocerca volvulus* genome contain the spliced leader sequence of *Caenorhabditis elegans*. *Mol. Cell. Biol.* **10**, 2765–2773 (1990).
42. Nilsson, D. *et al.* Spliced leader trapping reveals widespread alternative splicing patterns in the highly dynamic transcriptome of *Trypanosoma brucei*. *PLoS Pathog.* **6**, 21–22 (2010).
43. Parsons, M., Nelson, R. G., Watkins, K. P. & Agabian, N. Trypanosome mRNAs share a common 5' spliced leader sequence. *Cell* **38**, 309–316 (1984).
44. Muhich, M. L. & Boothroyd, J. C. Synthesis of trypanosome hsp70 mRNA is resistant to disruption of trans-splicing by heat shock. *J. Biol. Chem.* **264**, 7107–7110 (1989).
45. Danks, G. B. *et al.* Trans-splicing and operons in metazoans: Translational control in maternally regulated development and recovery from growth arrest. *Mol. Biol. Evol.* **32**, 585–599 (2015).
46. Meyuhas, O. Synthesis of the translational apparatus is regulated at the translational level. *Eur. J. Biochem.* **267**, 6321–6330 (2000).
47. Wallace, A. *et al.* The nematode eukaryotic translation initiation factor 4E/G complex works with a trans-spliced leader stem-loop to enable efficient translation of trimethylguanosine-capped RNAs. *Mol. Cell. Biol.* **30**, 1958–1970 (2010).
48. Yang, Y. F. *et al.* Trans-splicing enhances translational efficiency in *C. elegans*. *Genome Res.* **27**, 1525–1535 (2017).
49. Bernard, F., Dargère, D., Rechavi, O. & Dupuy, D. Quantitative analysis of *C. elegans* transcripts by Nanopore direct-cDNA sequencing reveals terminal hairpins in non trans-spliced mRNAs. *Nat. Commun.* **14**, 1229 (2023).
50. Lall, S. *et al.* Contribution of trans-splicing, 5'-leader length, cap-poly(A) synergism, and initiation factors to nematode translation in an *Ascaris suum* embryo cell-free system. *J. Biol. Chem.* **279**, 45573–45585 (2004).
51. Jäger, A. V., De Gaudenzi, J. G., Cassola, A., D'Orso, I. & Frasch, A. C. mRNA maturation by two-step trans-splicing/polyadenylation processing in trypanosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**, 2035–2042 (2007).
52. Dakshinamoorthy, G., Samykutty, A. K., Munirathinam, G., Reddy, M. V. & Kalyanasundaram, R. Multivalent fusion protein vaccine for lymphatic filariasis. *Vaccine* **31**, 1616–1622 (2013).
53. Yates, J. A. & Higashi, G. I. *Brugia malayi*: Vaccination of jirds with 60cobalt-attenuated infective stage larvae protects against homologous challenge. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **34**, 1132–1137 (1985).
54. Pękacz, M. *et al.* Selection of new diagnostic markers for *Dirofilaria repens* infections with the use of phage display technology. *Sci. Rep.* **12**, 2288 (2022).
55. Kilkenny, C., Browne, W. J., Cuthi, I., Emerson, M. & Altman, D. G. Improving bioscience research reporting: The ARRIVE guidelines for reporting animal research. *Vet. Clin. Pathol.* **41**, 27–31 (2012).

Author contributions

Conceptualization, M.P., M.W. and A.Z.-D.; methodology, M.P., M.W., and A.Z.-D.; validation, M.P., K.B., M.K.; formal analysis, M.P., K.B.; investigation, M.P., K.B., M.K.; resources, M.P., E.C. and RM.; data curation, M.P.; writing—original draft preparation, M.P.; writing—review and editing, M.P., D.M., M.W. and A.Z.-D.; visualization, M.P. and A.Z.-D.; supervision, M.W. and A.Z.-D.; project administration, A.Z.-D.; All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding

This research was funded by National Centre for Research and Development, grant number 0106/L-9/2017. The publication was (co)financed by the Science Development Fund of the Warsaw University of Life Sciences – SGGW.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Additional information

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1038/s41598-024-63523-9>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to A.Z.-D.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2024, corrected publication 2024

Warszawa, 29.11.2024 r.

Mgr inż. Mateusz Pękacz
Zakład Parazytologii i Chorób Inwazyjnych
Katedra Nauk Przedklinicznych
Instytut Medycyny Weterynaryjnej
Szkola Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie
ul. Ciszewskiego 8, 02-787 Warszawa
mateusz_pekacz@sggw.edu.pl

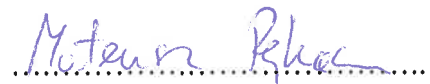
Rada Dyscypliny Weterynaria
Szkoły Głównej Gospodarstwa
Wiejskiego w Warszawie

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

Pękacz, M., Basalaj, K., Młocicki, D., Kamaszewski, M., Carretón, E., Morchón, R., Wiśniewski, M., & Zawistowska-Deniziak, A. (2024). Molecular insights and antibody response to Dr20/22 in dogs naturally infected with *Dirofilaria repens*. Scientific reports, 14(1), 12979. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-63523-93>

mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na zaplanowaniu i wykonaniu eksperymentów, analizie uzyskanych wyników, przygotowaniu i edycji manuskryptu.



Podpis

Warszawa, 29.11.2024 r.

Dr inż. Katarzyna Basałaj
Muzeum i Instytut Zoologii
Polska Akademia Nauk
ul. Twarda 51/55, 00-818 Warszawa
kbasalaj@miiz.waw.pl

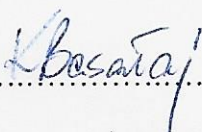
**Rada Dyscypliny Weterynaria
Szkoły Głównej Gospodarstwa
Wiejskiego w Warszawie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

Pękacz, M., Basałaj, K., Młocicki, D., Kamaszewski, M., Carretón, E., Morchón, R., Wiśniewski, M., & Zawistowska-Deniziak, A. (2024). Molecular insights and antibody response to Dr20/22 in dogs naturally infected with *Dirofilaria repens*. Scientific reports, 14(1), 12979. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-63523-9>

mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na krytycznej analizie wyników.


.....
Podpis

Warszawa, 29.11.2024 r.

Prof. dr hab. Daniel Młocicki
Katedra Biologii Ogólnej i Parazytologii
Wydział Lekarski
Warszawski Uniwersytet Medyczny
ul. Chałubińskiego 5, 02-004 Warszawa
daniel.mlocicki@wum.edu.pl

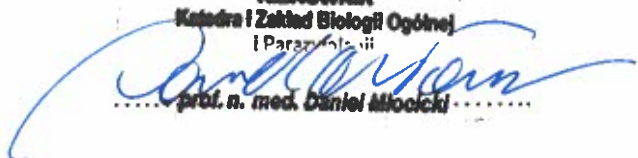
**Rada Dyscypliny Weterynaria
Szkoły Głównej Gospodarstwa
Wiejskiego w Warszawie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

Pękacz, M., Basałaj, K., Młocicki, D., Kamaszewski, M., Carretón, E., Morchón, R., Wiśniewski, M., & Zawistowska-Deniziak, A. (2024). Molecular insights and antibody response to Dr20/22 in dogs naturally infected with *Dirofilaria repens*. Scientific reports, 14(1), 12979. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-63523-9>

mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na krytycznej ocenie przeprowadzonej analizy wyników, recenzji oraz edycji manuskryptu.

KIEROWNIK
Katedra i Zakład Biologii Ogólnej
i Parazytologii

..... prof. n. med. Daniel Młocicki

Podpis

Warszawa, 29.11.2024 r.

Ks. dr hab. inż. Marcin Wiśniewski, prof. SGGW
Zakład Parazytologii i Chorób Inwazyjnych
Katedra Nauk Przedklinicznych
Instytut Medycyny Weterynaryjnej
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie
ul. Ciszewskiego 8, 02-787 Warszawa
marcin_wisniewski@sggw.edu.pl

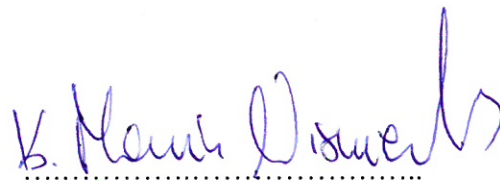
**Rada Dyscypliny Weterynaria
Szkoły Głównej Gospodarstwa
Wiejskiego w Warszawie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

Pękacz, M., Basałaj, K., Młocicki, D., Kamaszewski, M., Carretón, E., Morchón, R.,
Wiśniewski, M., & Zawistowska-Deniziak, A. (2024). Molecular insights and antibody
response to Dr20/22 in dogs naturally infected with *Dirofilaria repens*. Scientific reports,
14(1), 12979. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-63523-9>

mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na krytycznej ocenie przeprowadzonej
analizy wyników, recenzji oraz edycji manuskryptu.



Podpis

Warszawa, 29.11.2024 r.

Dr hab. inż. Anna Zawistowska-Deniziak
Zakład Immunologii
Instytut Zoologii Doświadczalnej
Wydział Biologii
Uniwersytet Warszawski
ul. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa
a.zawistowska-deniziak@uw.edu.pl

**Rada Dyscypliny Weterynaria
Szkoły Głównej Gospodarstwa
Wiejskiego w Warszawie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

Pękacz, M., Basałaj, K., Młocicki, D., Kamaszewski, M., Carretón, E., Morchón, R., Wiśniewski, M., & Zawistowska-Deniziak, A. (2024). Molecular insights and antibody response to Dr20/22 in dogs naturally infected with *Dirofilaria repens*. Scientific reports, 14(1), 12979. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-63523-9>

mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na krytycznej ocenie przeprowadzonej analizy wyników, recenzji oraz edycji manuskryptu.

Zawistowska-Deniziak Anne

Podpis



OPEN

Selection of new diagnostic markers for *Dirofilaria repens* infections with the use of phage display technology

Mateusz Pękacz^{1,2}, Katarzyna Basałaj¹, Alicja Kalinowska¹, Maciej Klockiewicz², Diana Stopka³, Piotr Bąska⁴, Ewa Długosz², Justyna Karabowicz², Daniel Młocicki^{1,5}, Marcin Wiśniewski² & Anna Zawistowska-Deniziak¹✉

Dirofilaria repens is a parasitic nematode causing vector-borne disease (dirofilariasis), considered an emerging problem in veterinary and human medicine. Although main hosts are carnivores, particularly dogs, *D. repens* shows high zoonotic potential. The disease spreads uncontrollably, affecting new areas. Since there is no vaccine against dirofilariasis, the only way to limit disease transmission is an early diagnosis. Currently, diagnosis depends on the detection of microfilariae in the host bloodstream using modified Knott's test or multiplex PCR. However, the efficacy of tests relying on microfilariae detection is limited by microfilariae periodic occurrence. Therefore, a new reliable diagnostic test is required. Our study aimed to select new diagnostic markers for dirofilariasis with potential application in diagnostics. We focused on single epitopes to ensure high specificity of diagnosis and avoid cross-reactivity with the other parasite infections common in dogs. Using phage display technology and 12-mer peptides library, we selected epitopes highly reactive with IgG from sera of infected dogs. Additionally, our study presents the possibility of detecting *D. repens* specific cell-free DNA in dogs with no microfilaria but high IgG and IgM antibody levels against parasite somatic antigen.

Dirofilaria repens is a causative agent of subcutaneous dirofilariasis – a widespread mosquito-borne zoonosis. Infections occur prevalently in Europe, Southeastern Asia and occasionally in Africa. In recent years, disease spread primarily through Central and Eastern Europe countries: Poland, Slovakia or Ukraine¹. According to the newest data, dirofilariasis reaches Northern Europe and Baltic countries, mainly Lithuania and Latvia. Autochthonous cases were also reported in Estonia and Finland¹, while the first imported case was described in Denmark². The spread of the disease depends on climate changes due to the introduction of more mosquitoes species able to transmit filariae. Also, human activity like travelling with pets increases the risk of transmission to new regions and contributes to the emergence of new endemic areas¹.

Although main hosts are carnivores, especially dogs, parasites show high zoonotic potential. Human infections are described more frequently all over Europe³ and in rare non-endemic locations like Tanzania and other African countries⁴. Human infections were initially considered incomplete in the parasite life cycle; however, several patients with active microfilaremia were reported^{5–9}. In the twenty-first century, over 70% of described human dirofilariasis cases were caused by *D. repens*, and 42.95% of recovered worms were mature, mainly females, and 26.42% contained microfilariae in the uterus³. These reports suggest that humans should also be considered as a potential reservoir of subcutaneous dirofilariasis.

Since no vaccine is available against *D. repens* infections, the only way to limit disease transmission is an early diagnosis. Currently, diagnosis depends on the detection of microfilariae in the host bloodstream using modified Knott's test or multiplex PCR^{10,11}. Histochemical staining of acid phosphatase may complement Knott's method, enabling microfilariae differentiation^{12,13}. However, available methods are ineffective in prepatent or

¹Witold Stefański Institute of Parasitology, Polish Academy of Sciences, Warsaw, Poland. ²Division of Parasitology, Department of Preclinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Warsaw University of Life Sciences-SGGW, Warsaw, Poland. ³Division of Pathology, Department of Pathology and Veterinary Diagnostics, Faculty of Veterinary Medicine, Warsaw University of Life Sciences-SGGW, Warsaw, Poland. ⁴Division of Pharmacology and Toxicology, Department of Preclinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Warsaw University of Life Sciences-SGGW, Warsaw, Poland. ⁵Department of General Biology and Parasitology, Medical University of Warsaw, Warsaw, Poland. ✉email: anna.zawistowska@twarda.pan.pl

Dogs	<i>s16</i>	<i>drpa</i>	<i>cox1</i>	OD IgG	OD IgM
1	–	–	+	1.13	0.62
2	–	+	+	1.51	0.85
3	–	+	–	0.90	0.63
4	+	+	+	0.84	0.89
5	+	+	+	1.54	0.47
6	+	–	+	0.60	0.35
7	+	–	+	0.98	0.24
8	+	+	–	0.97	0.62
9	–	–	+	1.27	0.41
10	+	+	+	1.13	0.54
11	+	+	+	0.83	0.45
12	–	+	–	1.47	0.97
13	–	+	+	0.80	0.32
14	+	–	+	1.36	0.90
15	+	–	N/A	1.35	0.52
16	–	+	–	0.57	0.59
17	+	+	N/A	1.08	0.64
18	+	+	N/A	1.49	1.38
19	+	+	+	1.04	0.32

Table 1. Amplification pattern of targeted *D. repens* specific cfDNA fragments and OD values obtained in DrSA ELISA in microfilaremic (italic) and amicrofilaremic (bold) dogs. “+” detected; “–” not detected; “N/A” not analyzed.

occult (amicrofilaremic) infections and need specialized personnel and equipment, making them less widely accessible. The disease control is even more challenging as, in most cases, the infections are asymptomatic^{14,15} and may remain undiagnosed for years, being parasite reservoirs. Diagnosis of closely related *Dirofilaria immitis* is much easier since several diagnostic tests are available on the market¹⁶ and based on serological techniques detecting molecules secreted by parasites. However, knowledge about their specificity is inconsistent. Numerous researchers report cross-reactions with other dogs parasites despite indicated high specificity, e.g. *Angiostrongylus vasorum*, *Spirocerca lupi*, *Taenia taeniaeformis*, *Toxocara canis*, *Toxocara cati*, *Dipylidium caninum* and *D. repens*^{17–20}; whereas some indicate their high specificity²¹. Furthermore, worm burden and sex of the parasites impact test sensitivity^{22–24}, making it ineffective in prepatent and occult infections.

Our study aimed to select new diagnostic markers for subcutaneous dirofilariasis with potential application in the diagnostic test. We focused on single epitopes to provide high specificity of diagnosis and avoid cross-reactivity with other parasite infections common in dogs. Using phage display technology and 12-mer peptides library, we selected epitopes highly reactive with IgG and IgM antibodies from sera of infected dogs. Additionally, our study presents the possibility of detecting *D. repens* specific cell-free DNA in dogs with no microfilaria but high IgG and IgM antibody levels against parasite somatic antigen.

Results

Diagnostic examination. The first step in dogs classification was Knott's test. Based on this method, dogs were initially distinguished as positive or negative. Then, sera from both positive and negative dogs were used in DrSA ELISA to evaluate IgG and IgM antibody response. Interestingly, despite the lack of microfilariae in the bloodstream, several dogs considered as non-infected showed high levels of IgG or IgM, which indicated false-negative results. We developed a new molecular detection method based on cell-free DNA presence detected by Real-Time PCR to confirm ELISA results. As cfDNA is known to degrade, we targeted three *Dirofilaria* genes (*16S rRNA*, *cox1* and *drpa*). Our approach enabled us to verify dogs negative in Knott's test but with high OD in DrSA ELISA as positive but amicrofilaremic.

Interestingly, one dog was positive in the molecular test, although IgG and IgM levels were low. Targeted DNA fragments were amplified randomly and differed among examined individuals (Table 1). Fragments of internal control genes (*line1*, *gapdh*) were amplified in all analysed dogs sera samples (data not shown). The primers specificity was confirmed by reactions with genomic DNA isolated from common canine parasites (Table S1).

Finally, based on summarized results (Knott's test, DrSA ELISA, Real-Time PCR), dogs were classified into three groups:

1. Microfilaremic (MF +)—dogs with microfilariae detected in the bloodstream using Knott's test.
2. Amicrofilaremic (MF– DNA +)—dogs with no clear presence of microfilariae in the bloodstream but positive in Real-Time PCR analysis.
3. Non-infected (MF– DNA –)—dogs negative in both tests.

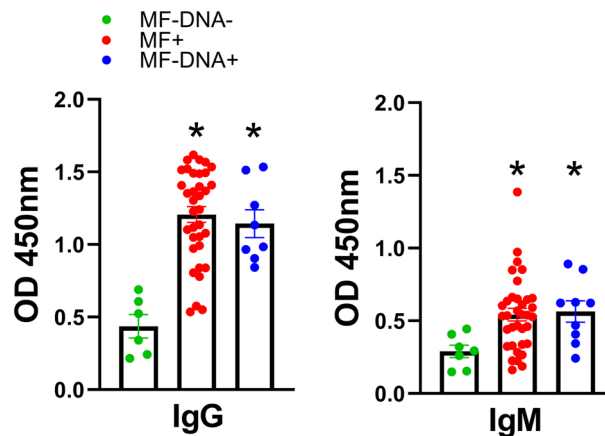


Figure 1. *D. repens* somatic antigen (DrSA) ELISA enables to detect infections in microfilaremic and amicrofilaremic dogs. The IgG and IgM levels were analyzed in dogs sera against DrSA. Plates were coated with 2.5 µg/ml of DrSA in carbonate buffer. The blocking step was performed with PBS containing 5% skimmed milk. Dog sera and secondary anti-dog IgG/IgM-HRP antibodies were used in 1:1,600 and 1:50,000 dilution, respectively. The statistically significant differences between examined groups are marked with an asterisk: * $p < 0.05$.

***D. repens* somatic antigen (DrSA) ELISA enables to detect infection in microfilaremic and amicrofilaremic dogs.** To analyze the IgG and IgM levels in dogs sera, we performed ELISA with adult somatic antigen (DrSA). Microfilaremic (MF+) and amicrofilaremic dogs (MF– DNA +) sera showed significantly higher IgG and IgM levels when compared to non-infected dogs (Fig. 1). However, in both positive groups (microfilaremic, amicrofilaremic), we identified several low responders with antibody levels comparable to non-infected dogs. Interestingly, there was no correlation between antibodies level and intensity of infection (number of microfilariae per ml of blood) (Figure S1 and S2).

Screening of phage display peptide library enabled selection of 12 clones specific for both *D. repens* IgG and IgM antibodies. Phage display technology was used to select new potential diagnostic markers for subcutaneous dirofilariasis. Briefly, technology is based on modified bacteriophages displaying short 12-mer peptides fused with coat protein. Biopanning of phage display peptide library was performed using IgG and IgM from dogs naturally infected with *D. repens* as a target. We added prescreening steps to reject non-specific clones and avoid cross-reactions with antibodies against other parasites molecules. First prescreening step was performed using sera from dogs free from *D. repens* infection, followed by sera from dogs infected with *T. leonina*, *U. stenocephala* and mice infected with *T. canis* (Fig. 2).

Our approach enabled us to select 12-mer peptides specific for *D. repens* IgG and IgM antibodies. After four rounds of biopanning with IgG and three rounds with IgM, 96 and 48 clones, respectively, were picked from individual plaques, and DNA sequences were analyzed. After rejecting TUPs (Target Unrelated Peptides), the most abundant clones were selected: 6 clones potentially specific for IgG (C23, C25, LH10, HL5, Y16, HH12) and 6 clones potentially specific for IgM (M1, M2, M3, M5, M11, M13). Two peptides specific for IgG, C23 and LH10, appeared in 47/96 (~49%) and 26/96 (~27%) of screened clones, respectively. Selected clones were then tested in phage ELISA with sera from dogs infected with *D. repens*. The OD values of IgM clones were lower than IgG and were not considered in the experiments that followed (Fig. 3), while the three most reactive IgG clones (C23, HL5 and LH10) were further analyzed.

LH10 clone revealed the highest diagnostic potential among examined clones. Phage ELISA confirmed the diagnostic potential of C23, HL5 and LH10 clones with sera from *D. repens* microfilaremic, amicrofilaremic and non-infected dogs. Significantly higher levels of IgG from positive (MF+) dogs were observed for LH10 clone compared to non-infected (MF– DNA–) dogs. There were no statistically significant differences for clones C23 and HL5, despite increased IgG levels in the microfilaremic group. Additionally, neither of the peptides showed a significant difference between amicrofilaremic (MF– DNA+) and non-infected (MF– DNA–) dogs. Moreover, similarly to DrSA ELISA results, several individuals had IgG levels comparable to non-infected dogs (Fig. 4).

LH10, C23 and HL5 clones are more reactive with microfilariae extract specific IgG. The specificity of C23, HL5 and LH10 clones was confirmed in phage ELISA with sera from rats immunized with extracts from *D. repens* adult worm and microfilariae and lysis buffer as a control. Higher OD values were observed for all of the selected clones in microfilariae extract immunized rats (Fig. 5).

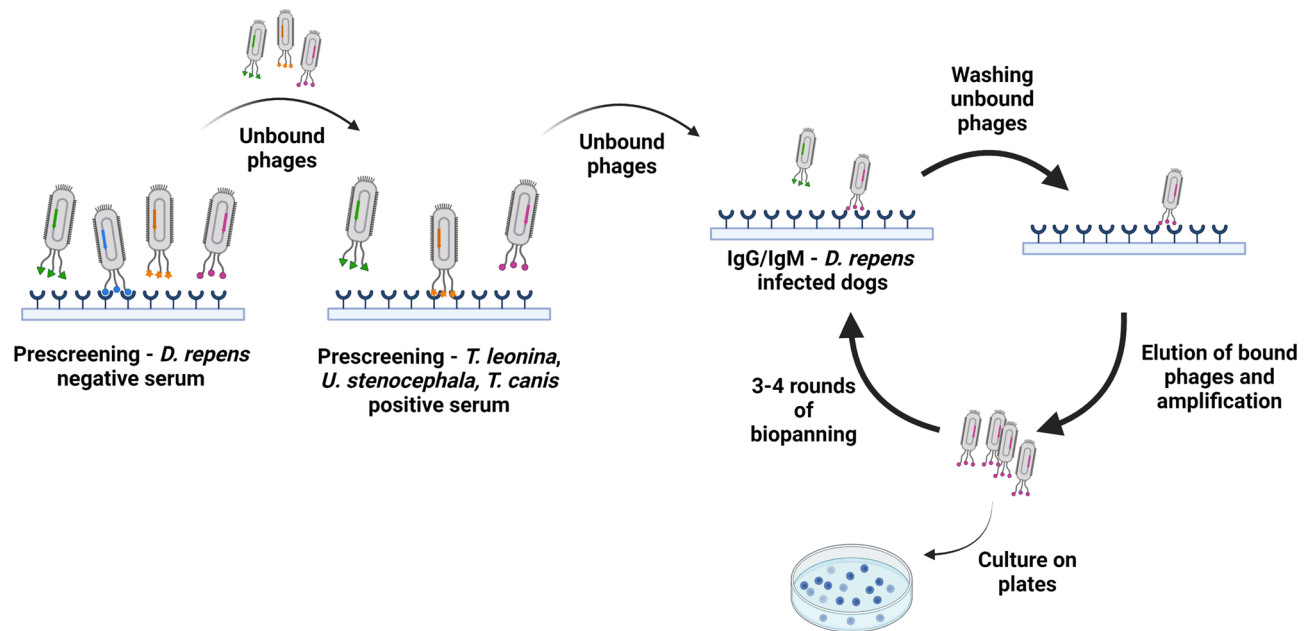


Figure 2. Screening of phage display peptide library enabled selection of 12 clones specific for both *Dirofilaria repens* IgG and IgM antibodies. Before actual biopanning, screening steps with sera from *D. repens* non-infected dogs, dogs infected with *T. leonina* and *U. stenocephala* and mice infected with *T. canis* were performed. After 3–4 rounds of actual biopanning with *D. repens* positive dogs sera 6 clones specific for IgG and 6 specific for IgM were selected. Figure created with BioRender.com.

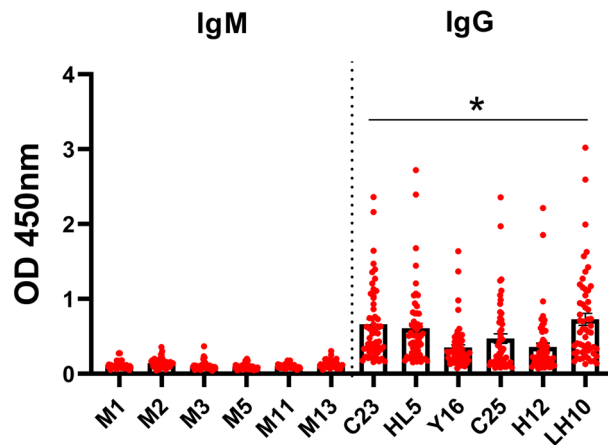


Figure 3. Clones specific for IgG showed higher reactivity with sera from dogs infected with *D. repens* than IgM-specific clones. To perform phage ELISA plates were coated with 1.46×10^{11} pfu/well of selected clones in TBS. The blocking step was performed with 0.1 M NaHCO₃, 0.5% BSA and washed three times. Dogs sera were used in 1:800 dilution in blocking buffer, and secondary anti-dog IgG/IgM-HRP antibodies were diluted 1:50,000 in blocking buffer. The statistically significant differences between examined groups are marked with an asterisk: * $p < 0.05$.

“Wild type” vs. LH10 ELISA showed presence of IgG specific for LH10 peptide in sera from dogs infected with *D. repens*. Based on the results obtained so far, the LH10 was identified as the most reactive and promising peptide. To exclude potential non-specific reaction of tested sera with native phage proteins, we designed phage ELISA with LH10 phage clone versus “wild” M13 phage (a clone with no library insert sequence). The OD values of IgG observed for LH10 clone were significantly higher than those observed for “wild” phage, suggesting the occurrence of antibodies specific for displayed peptides (Fig. 6).

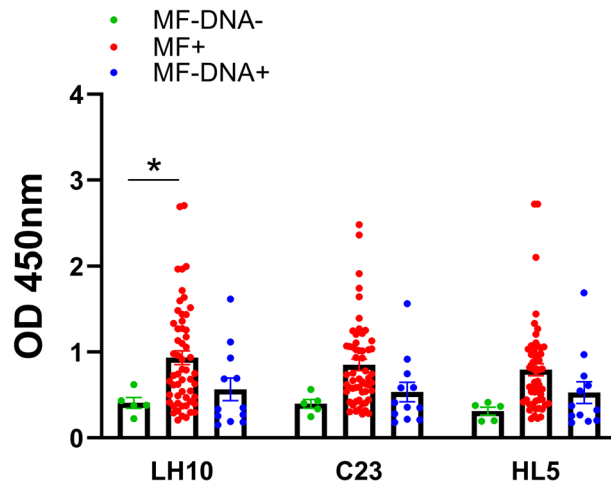


Figure 4. Phage ELISA showed that LH10 clone has the highest diagnostic potential among examined clones. The IgG responses to selected clones was evaluated in microfilaremic (MF+), amicrofilaremic (MF– DNA+) and negative (MF– DNA–) groups of dogs. Plates were coated with 1.46×10^{11} pfu/well of LH10/C23/HL5 clones in TBS. Plates were blocked with 0.1 M NaHCO₃, 0.5% BSA and washed three times. Dogs sera were used in 1:800 dilution in blocking buffer. After six washes, secondary anti-dog IgG-HRP antibodies were used in a dilution of 1:50,000 in blocking buffer. The statistically significant differences between examined groups are marked with an asterisk: * $p < 0.05$.

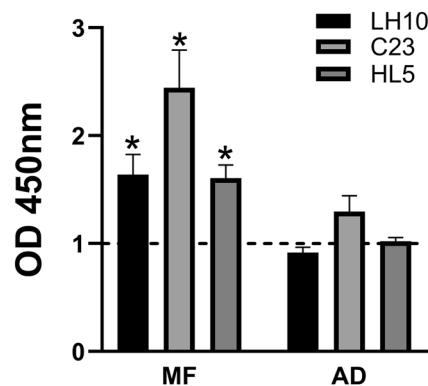


Figure 5. LH10, C23 and HL5 clones are more reactive with microfilariae extract specific IgG. IgG responses to selected clones were analyzed with the use of sera from rats immunized with *D. repens* adult worm (AD) and microfilariae (MF) extracts. Results are expressed as fold change IgG responses compared to control rat's serum (dashed line). Plates were coated with 1.46×10^{11} pfu/well of LH10/C23/HL5 clones in TBS. Blocking step was performed in 0.1 M NaHCO₃, 0.5% BSA and plates were washed three times. Rats sera were used in 1:800 dilution in blocking buffer. After six washes, secondary anti-rat IgG-HRP antibodies were used in a dilution of 1:5,000 in blocking buffer. The bars show mean $\pm$ SEM. The statistically significant differences between examined groups are marked with an asterisk: * $p < 0.05$.

Discussion

Subcutaneous dirofilariasis is an emerging problem of human and veterinary medicine. Since there is no vaccine and current diagnostic methods are insufficient, zoonosis spread uncontrollably over the world. Developing a new reliable diagnostic tool, which could be applied not only by specialists but also by practitioners in every point of care like veterinary clinics, shelters could help control infections.

We selected epitopes highly reactive with IgG from the serum of dogs infected with *D. repens*. In addition, we demonstrated the possibility of detecting specific cell-free DNA in dogs with no microfilariae presence but with high IgG and IgM antibody levels against DrSA. First, using the DrSA ELISA test, we demonstrated that both IgG and IgM antibodies might be successfully used to diagnose both microfilaremic and amicrofilaremic/occult *D. repens* infections. This method allowed us to consider few individuals with no microfilariae in the bloodstream as a positive for *D. repens*, following additional confirmation by molecular approach. Such cases might indicate occult or prepatent infections.

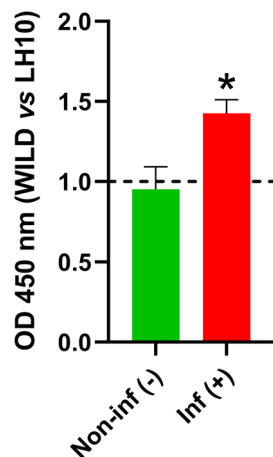


Figure 6. “Wild type” vs. LH10 ELISA showed the presence of IgG specific for LH10 peptide in sera from dogs infected with *Dirofilaria repens*. Levels of LH10-specific IgG in *D. repens* infected (red) and non-infected (green) dogs sera were compared to “wild type” M13 bacteriophage (dashed line). Plates were coated with 1.46×10^{11} pfu/well of LH10/“wild type” clones in TBS. The blocking step was performed in 0.1 M NaHCO₃, 0.5% BSA and plates were washed three times. Dogs sera were used in 1:800 dilution in blocking buffer. After six washes, secondary anti-dog IgG-HRP antibodies were used in a dilution of 1:50,000 in blocking buffer. The bars show mean $\pm$ SEM. The statistically significant differences between examined groups are marked with an asterisk: * $p < 0.05$.

Dirofilaria somatic antigens ELISA were successfully used in several previous studies^{25–28}, and we showed it might be applied to diagnose cases without presence of microfilariae in the blood. The length of prepatent period varies depending on the study. Petry et al.²⁹ reported that in experimentally infected dogs, prepatency lasts 169 to even 256 days post infection (dpi). In contrast, the others report patency beginning at 220–281 dpi, confirmed by molecular method and at 245–288 dpi established by Knott’s test²⁸. Thus, in the first 5–9 months of infection, both described methods (Knott’s and PCR tests) are ineffective. The use of serodiagnostics might be a better choice as antibody response starts in prepatent period and IgG levels constantly increase with the infection progress^{26,28}.

In DrSA ELISA we identified several microfilaremic dogs with IgG and IgM antibody levels comparable to non-infected dogs. Interestingly, there was no correlation between the intensity of infection (number of microfilariae in the bloodstream) and levels of IgG and IgM. The explanation for low antibody titer is unclear, but we can hypothesize that it might be associated with the stage of infection and general medical condition of the host. In heartworm infections, stronger IgG response was showed in microfilaremic dogs than in amicrofilaremic³⁰, however no evident correlation between antibody levels and number of microfilariae or adult worms was observed³¹. Simón et al.³⁰ suggest relationship between IgG levels and host’s clinical status. A recent study shows that *D. repens* infection leads to anemia and a state of chronic stress response that likely affects antibodies’ production³². It has also been reported that high microfilaremia develops in dogs with immunodeficiency-related conditions³³. On the contrary, in dogs infected with *Brugia pahangi*, the IgG levels specific for adult worm extract were highest in amicrofilaremic dogs³⁴. Similar trend was observed in human bancroftian filariasis, antibodies specific for sheath molecules were present in amicrofilaremic patients, with no response detected in patients with active microfilaremia³⁵. The same significant inverse association was observed in Brugianosis³⁶ and bovine filariae *Setaria digitata*³⁷.

Our study aimed to select highly specific and immunoreactive markers of *D. repens* infections. To minimize the possibility of cross-reactions with antibodies against other parasite molecules, we focused on the short peptides using phage display technology. We screened the peptides library to select 12-mer epitopes reactive with *D. repens* IgG and IgM. Among all examined clones, LH10 had the highest diagnostic potential in the phage ELISA test. Evaluation of the “wild type” phage ELISA confirmed specificity to IgG antibodies present in infected dogs and analyses with rat sera indicated higher peptide reactivity with IgG against microfilariae extract. Results from phage ELISA shown a similar pattern to those from DrSA ELISA. Interestingly, several dogs still had low OD values for IgG levels comparable to non-infected dogs, which might be a limitation of the developed marker. However, further experiments with synthetic peptides will reduce the non-specific interaction of IgG with phage coat proteins which might increase the intensity of the signal.

Phage display is a high-throughput molecular screening technique used in multiple applications: epitope mapping^{38,39}, searching for new ligands to target proteins⁴⁰ or selection of antimicrobial/viral peptides^{41,42}. Researchers recently successfully applied this technology in the parasitology field to select diagnostic markers, vaccine candidates, drug targets and to study general host-parasite interactions^{43–46}.

The most challenging problem associated with serological diagnostic is cross-reactivity. Consequently, our limitation was the exclusion of the possible concomitant diseases or coinfections with other parasites. To reduce the risk of cross-reactivity, we performed additional prescreening steps with sera from dogs infected with *T. leonina* and *U. stenocephala* and mice experimentally infected with *T. canis*. Cross-reactions between molecules of the *Dirofilaria* genus were widely described in commercially available diagnostic tests and non-commercial

ELISA tests. We plan to evaluate the cross-reactivity of selected peptides with the serum of *D. immitis* infected dogs in future studies.

In the present study, we identified specific *D. repens* cell-free DNA in sera samples from dogs naturally infected with *D. repens* and individuals with no microfilariae in the bloodstream. Analysis of 3 different genes revealed random amplification of targeted DNA fragments in both microfilaremic and amicrofilaremic individuals. Our results suggest that the pattern of released cell-free DNA may differ for each examined individual. The suggestion of random pattern release was previously reported by Ji et al.⁴⁷ after sequencing of total plasma cfDNA from pooled 23 patients infected with *Echinococcus* spp. Parasite derived DNA was applied before in molecular detection of *Plasmodium*, *Leishmania*, *Schistosoma*, *Taenia* and *Wuchereria*^{48–52}.

Cell-free DNA occurs in many body fluids like serum/plasma, urine or saliva, but might degrade quickly⁵³. The knowledge about the source and kinetics of cfDNA remains puzzling. The mean half-time of circulating fetal DNA in maternal blood was established at 16.3 min (62) but may last several hours⁵⁴. In the rabbit model of *S. japonicum*, depend on the monosexual or mixed sexual infections model, cfDNA was detectable in animals serum 3 and 7 weeks post infection, respectively. Nucleic acids release from inactive eggs lasted for more than 16 weeks⁵⁵. Two mechanisms for release of cfDNA are possible: 1) passive—cfDNA derived from collapsed parasites tissues or cellular necrosis/apoptosis; 2) active—cfDNA is released directly from parasite or in excretory-secretory products⁵⁶. According to Oi et al.⁵⁷, in *D. immitis* infections cfDNA is derived mainly from microfilariae, whereas adult worms may be minor contributors. In research on *Brugia malayi*, cell-free DNA was detected in serum from jirds infected with *B. malayi* 56 days post infection⁵⁸, which indicate that L3/L4 larvae may be considered as a main source of cfDNA during prepatent period. Despite some limitations caused by the physiological kinetics of cfDNA our technique may be regarded as a significant complement for serological diagnosis of subcutaneous dirofilariasis.

The present study demonstrated that DrSA ELISA might be an alternative diagnostic method for subcutaneous dirofilariasis infections. However, it requires constant access to *D. repens* parasites making it impossible to commercialize. We successfully implemented phage display technology to select new diagnostic markers. Our approach enabled us to search highly immunoreactive peptides with IgG from *D. repens* infected dogs. We consider LH10 peptide as a new diagnostic marker for subcutaneous dirofilariasis. However, further studies on synthetic peptides and a larger group of animals are required. Additionally, our study presents the possibility of detecting *D. repens* specific cell-free DNA in dogs with no microfilaria but high IgG and IgM antibody levels against parasite somatic antigen.

Materials and methods

Blood sample collection. All blood samples were collected in EDTA tubes from domestic and shelter dogs. One ml of blood was used in Knott's test, and remains were used to obtain plasma by centrifuging (15 min, 800 × g, 4 °C). Plasma samples were filtered through 0.22 µm syringe filters (Millex) to dispose of microfilariae and stored at –70 °C until further analyses. All analyses were performed on the leftovers of blood samples collected during routine checkups or the diagnosis process by veterinarians in veterinary clinics or shelters in accordance with relevant guidelines and regulations.

***D. repens* tissue lysates preparation.** Adult *D. repens* worms were obtained from dogs scrotum during castration operations in veterinary clinics; microfilariae were isolated from blood using 5 µm filters (Whatman) and washed with PBS.

Adult and microfilariae lysates were prepared as we previously described⁵⁹. Adult worms were washed with PBS to remove debris and homogenized manually in lysis buffer (8 M Urea, 40 mM Tris, 4% CHAPS). Approximately 160,000 microfilariae were suspended in lysis buffer and homogenized in TissueLyser (Qiagen, Hilden, NRW, Germany). Prepared homogenates were centrifuged for 15 min at 10,000 × g. The protein concentration in the supernatants was determined using BCA Protein Assay Kit (Pierce). The extract obtained from the adult parasite was termed *D. repens* Somatic Antigen (DrSA) and applied in the ELISA test with dog sera.

Rat immunization and blood collection. Three-month-old male Wistar rats were immunized with an extract from *Dirofilaria repens* adult worms and microfilariae. Rats were subcutaneously administered with 100 µg of extract, followed by three doses of the booster: 75, 50 and 25 µg given on days 14, 28 and 42, respectively. Additionally, one rat was immunized with lysis buffer as a control group. Each of the doses was mixed in a 1:3 ratio with Imject™ Alum Adjuvant (Thermo Fisher Scientific). On day 49, rats were euthanized, and blood was collected in tubes with a clot activator. Blood tubes were centrifuged (15 min, 800 × g, 4 °C), and serum samples were stored at –70 °C until further analyses. All experiments were performed in accordance with relevant guidelines and regulations. Ethical approval for this study was obtained from the 2nd Local Ethics Committee for Animal Experimentation, Warsaw University of Life Sciences-SGGW, Poland (approval number: WAW2/080/2019). The reporting in the manuscript follows the recommendations in the ARRIVE guidelines⁶⁰.

Dogs classification. All blood samples were tested with the use of Knott's test, DrSA ELISA and/or molecular method—Real-Time PCR. Based on summarized results, dogs were classified as microfilaremic, amicrofilaremic and negative.

Modified Knott's test. One ml of blood was mixed with 9 ml of 2% formalin and centrifuged 10 min at 500 × g. The supernatant was discarded, and the pellet was stained with 1% methylene blue. One drop was placed on a microscope slide, covered with slip glass and observed under a light microscope. In positive samples number of microfilariae was counted and expressed in mf/ml.

Molecular detection. Real-Time PCR was used to detect *D. repens* cell-free DNA (cfDNA) in plasma samples. cfDNA was isolated from 1 ml of filtered plasma using QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit (Qiagen). Primers targeted at *D. repens drpa* (For_drpa 5' CGG AGG AAA TCA GAA TGA AAG TCG AAG 3'; Rev_drpa 5' CGT GCA TTC ATT GCC GCA TAG ATT TTA C 3'), *16S rRNA* (For_s16 5' GTG TGC TGC GCT ACA TCG ATG TT 3'; Rev_s16 5' ATA AAC CGC TCT GTC TCA CGA CG 3') and *cox1* (For_cox1 5' GTA GGT ATT GGT TCT TTG TGT GGT GCT A 3'; Rev_cox1 5' GTA ACA GCA GTA GAA CGC ATA TTC GTA 3') genes were designed and used in qPCR reactions with isolated DNA as a template. Additionally, two pairs of primers specific for dogs *line1* (For_LINE1 5' C AAA TGC AAT GAA ACG CCG GG ACA 3'; Rev_LINE1 5' TCT TTC GTT GGA CAC CGA GG CTC 3')⁶¹ and *gapdh* (For_GAPDH 5' CAT GTT CCA GTA TGA TTC TAC CCA CG 3'; Rev_GAPDH 5' GGA GAT GGG ATT TCC ATT GAT GAC AAG 3')⁶² genes were used as a positive internal control. Reactions were performed according to a two-step procedure, including the dissociation curve step (Luminaris Color HiGreen qPCR Master Mix, high rox; Thermo Fisher Scientific) in a QuantStudio6 Real-Time PCR system (Applied Biosystems) according to manufacturer's protocol. After incubation for 2 min at 50 °C (Uracil-DNA Glycosylase pre-treatment) and 10 min denaturation step at 95 °C, 40 cycles of two-step amplification (15 s at 95 °C, 60 s at 60 °C) were performed. Data were collected during the annealing/extension step. The reaction volume of 10 µl contained 5 µl of 2× Master Mix, 10 ng of isolated DNA and both forward and reverse primers in final concentration of 0.3 µM.

In addition, to confirm the specificity of primers targeted at *D. repens* DNA, the qPCR with 5 ng of genomic DNA isolated from common canine parasites (*Toxocara canis*, *Uncinaria stenocephala*, *Dipylidium caninum*, *Taenia krebbi*, *Mesocestoides litteratus*) was performed. Reactions conditions were as described above.

***D. repens* somatic antigen ELISA.** 96-well half-area microplates (Corning) were coated with 2.5 µg/ml of DrSA in 0.1 M sodium carbonate buffer (pH 9.5) and incubated overnight at 4 °C. The plates were blocked with PBS containing 5% skimmed milk for 1.5 h at RT. All plasma samples were analyzed in dilution 1:1,600 in PBS, 1.5 h at RT. Anti-dog peroxidase-conjugated IgG and IgM (abcam, Table S2) were diluted 1:50,000 in PBS and incubated 1 h at RT. After every step, plates were washed three times with PBS containing 0.05% Tween-20. TMB substrate solution was added to the wells, developed at RT and stopped after 30 min with 2 M H₂SO₄. Optical densities were measured at 450 nm in a microplate reader (Synergy HT, BioTek).

Biopanning with dog sera. Before each round of panning, five prescreening steps were undertaken. Ph.D.[™]-12 Phage Display Peptide Library (New England Biolabs) was first added to an empty well (1 h, RT) to eliminate polystyrene surface-binding peptides (PSBPs). Unbound phages were then transferred to subsequent wells for 1 h, RT: precoated with streptavidin (Pierce); coated with pooled sera from mice (diluted 1:100) infected with *Toxocara canis*⁶³; coated with pooled dog sera (diluted 1:100) free from *Dirofilaria immitis* infection and lastly, coated with 1:100 diluted serum from a dog infected with *Uncinaria stenocephala* and *Toxascaris leonina* (serum received from the Small Animal Hospital, Warsaw University of Life Sciences-SGGW). Unbound phages were collected from the last prescreening well and used for the actual biopanning.

The actual biopanning was conducted in a 96-well plate precoated with streptavidin (Pierce). Firstly, wells were washed 3 times with TBS, 0.5% Tween-20 (TBST) and coated overnight at 4 °C with 10 µg/ml biotin-SP anti-dog Fc IgG (Jackson ImmunoResearch) in 0.1 M NaHCO₃. After 6 washes with TBST, wells were coated overnight at 4 °C with pooled sera in 1:100 dilution from dogs termed “low responders”. “Low responders” were microfilaremic dogs which sera, similarly to non-infected dogs had OD ≤ 0.7 in DrSA ELISA test).

After 6 washes with TBST, wells were blocked with 0.1 M NaHCO₃, 3% BSA at 4 °C for two hours, followed by incubation with prescreened phages (overnight, 4 °C). After 10 washes with TBST, bound phages were eluted with 100 µl 0.2 M glycine-HCl pH 2.2 (15 min, RT with gentle agitation) and neutralized with 15 µl of 1 M Tris-HCl pH 9.1.

Amplification of phages for the next round was performed in *Escherichia coli* strain ER2738 (1:100 dilution of overnight culture with tetracycline) for 4.5 h, at 37 °C with shaking (250 rpm). The precipitation of phages from the supernatants was carried out overnight at 4 °C in the new tube in 1/6 volume of 20% PEG/2.5 M NaCl. After spinning the next day, the phage pellet was suspended in 1 ml of TBS and centrifuged again to pellet residual cells. The supernatant was transferred to a new tube, and the PEG/NaCl precipitation was repeated on ice for 30 min. After the last spin, the pellet was resuspended in 50 µl TBS and phage concentration was measured by titration and spectrophotometrically with the use of the following equation:

$$pfu/ml = \frac{(A_{269} - A_{320}) \times 6 \times 10^{16}}{7222}$$

The amplified eluate was used in the next round of panning after prescreening steps. In the second round, instead of overnight incubation at 4 °C, 2 × 10¹¹ of phages were incubated on a plate for 1 h at RT and in the third and fourth round for 30 min. For rounds 1 and 3, blocking buffer with BSA was used (0.1 M NaHCO₃, 3% BSA), and for rounds 2 and 4, 0.1 M NaHCO₃, 3% non-fat dry milk was used.

For the fourth and last round of biopanning, pooled dog sera in 1:100 dilution defined as “high responders” were used. “High responders” were microfilaremic dogs which sera had OD ≥ 1.4 in DrSA ELISA test. In rounds 1–3 “low responders” sera were used to provide a high sensitivity of selected peptides and their usefulness in diagnosing dogs with low antibodies level against *D. repens* molecules. The use of “high responders” sera in the fourth round of biopanning was to confirm the specificity of screened peptides and select the most reactive ones. After elution of bound phages and neutralization, the phages were plated on LB/IPTG/X-gal plates for titrating and plaques formation.

Approximately 100 blue plaques were picked for amplification and sequencing according to the manufacturer's protocol. SAROTUP software (<http://i.uestc.edu.cn/sarotup3/index.html>) was used for bioinformatic evaluation of obtained sequences to reject TUP (Target Unrelated Peptides) clones.

Additionally, we performed three rounds of biopanning with IgM antibodies from dogs infected with *D. repens* as a target in a separate experiment. As was shown in DrSA ELISA, IgM antibodies were less reactive than IgG (Fig. 1). Therefore, all three rounds of panning were undertaken using pooled sera in 1:100 dilution only from dogs with a high level of IgM antibodies ($OD \geq 0.8$ in DrSA ELISA).

Prescreening, blocking (1 and 3 round: 0.1 M NaHCO_3 , 3% BSA; 2 round: 0.1 M NaHCO_3 , 3% non-fat dry milk) and washing steps, elution and amplification conditions and incubation times were the same as in the IgG screening experiment.

In contrast to previous actual biopanning, 96-well plate precoated with streptavidin (Pierce) was coated with goat anti-dog IgM Fc specific, Biotin conjugated (Agrisera) diluted 1:100 in 0.1 M NaHCO_3 . After three rounds of screening, eluted phages were plated, and 48 plaques were picked for amplification, sequencing and bioinformatic evaluation.

Phage ELISA with dogs sera. According to NEB's protocol, selected phage clones were amplified in *E. coli* strain ER2738 and purified by PEG/NaCl precipitation method described above.

The 96-well half-area microplates (Costar) were coated with 1.46×10^{11} pfu/well in TBS of selected phage clone and incubated O/N at 4 °C with gentle agitation. The next day, plates were blocked with 0.1 M NaHCO_3 , 0.5% BSA for 2 h at 4 °C with gentle agitation and washed 3 times with TBST. The plates were incubated with dog serum samples in 1:800 and 1:1,600 dilutions in blocking buffer for 2 h at RT with gentle agitation. After 6 washes with TBST, the plates were incubated with goat anti-dog IgG/IgM-HRP antibodies (abcam) 1:50,000 in blocking buffer for 1 h at RT with gentle agitation. After 6 washes with TBST, 50 μl of TMB solution was added to the wells and plates were developed for 30 min. Optical densities were measured at 450 nm in a microplate reader (Synergy HT, BioTek).

Additionally, a "wild type" clone was amplified and included in the experiment to determine levels of antibodies that react with native phage molecules. Extra microplates were coated with 1.46×10^{11} pfu/well in TBS of "wild type" clone and incubated with dogs serum samples. All procedures were conducted as was described above. "Wild type" was a clone of M13 bacteriophage selected from peptide library (NEB) which did not display a 12-mer peptide fused to its coat protein.

Phage ELISA with rats sera. To confirm the specificity of clones (C23, HL5, LH10), an ELISA test was performed with sera from rats immunized with extracts from *D. repens* adult worm, microfilariae and lysis buffer as control. All ELISA procedures were performed as was described in Sect. 2.9. Rats sera and secondary goat anti-rat IgG-HRP (Sigma) antibodies were used in 1:800 and 1:5,000 dilutions, respectively. Each sample was tested in triple technical repeats.

Statistical analysis. All data are presented as mean $\pm$ standard error of the mean (SEM). Statistical analysis was performed using GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) with unpaired *t*-test or one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Fisher's post-hoc test. Differences between groups were considered statistically significant at $p < 0.05$. Outliers were identified according to the two-standard deviation method. Spearman's correlation coefficient was performed using R Statistical Software (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria) to analyze associations between number of microfilariae in the bloodstream and IgG/IgM levels.

Data availability

The data presented in this study are available on request from the corresponding author.

Received: 13 November 2021; Accepted: 20 January 2022

Published online: 10 February 2022

References

1. Fuehrer, H. P. et al. *Dirofilaria* spp. and *Angiostrongylus vasorum*: Current risk of spreading in central and northern Europe. *Pathogens* **10**, 1268 (2021).
2. Klintebjerg, K. et al. Periorbital *Dirofilaria repens* imported to Denmark: A human case report. *IDCases* **2**, 25–26 (2015).
3. Simón, F., Diosdado, A., Siles-Lucas, M., Kartashev, V. & González-Miguel, J. Human dirofilariasis in the 21st century: A scoping review of clinical cases reported in the literature. *Transbound. Emerg. Dis.* <https://doi.org/10.1111/tbed.14210> (2021).
4. Raele, D. A. et al. Case report: Molecular detection of *Dirofilaria repens* in an Italian patient after a stay in Tanzania. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **104**, 2042–2045 (2021).
5. Negahban, S. et al. *Dirofilaria repens* diagnosed by the presence of microfilariae in fine needle aspirates: A case report. *Acta Cytol.* **51**, 567–570 (2007).
6. Fedianina, L. V. et al. [Microfilaraemia in human dirofilariasis caused by *Dirofilaria repens* Ralet et Henry, 1911. A case report]. *Med. Parazit. (Mosk.)* **2**, 3–7 (2013).
7. Damle, A. S., Iravane Bajaj, J. A., Khaparkhantkar, M. N., Maher, G. T. & Patil, R. V. Microfilaria in human subcutaneous dirofilariasis: A case report. *J. Clin. Diagn. Res.* **8**, 113–114 (2014).
8. Sulekova, L. F. et al. *Dirofilaria repens* microfilariae from a human node fine-needle aspirate: A case report. *BMC Infect. Dis.* **16**, (2016).
9. Kludkowska, M. et al. *Dirofilaria repens* infection as a cause of intensive peripheral microfiliariemia in a Polish patient: Process description and cases review. *Acta Parasitol.* **63**, 657–663 (2018).
10. Knott, J. A method for making microfilarial surveys on day blood. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **33**, 191–196 (1939).

11. Magnis, J. *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. *Parasites Vectors* **6**, (2013).
12. Balbo, T. & Abate, O. Histochemical differentiation of microfilariae of *Dirofilaria immitis*, *Dirofilaria repens* and *Dipetalonema* sp.. *Parassitologia* **14**, 239–244 (1972).
13. Peribáez, M. A. *et al.* Histochemical differentiation of *Dirofilaria immitis*, *Dirofilaria repens* and *Acanthocheilonema dracunculoides* microfilariae by staining with a commercial kit, Leucognost-SP®. *Vet. Parasitol.* **102**, 173–175 (2001).
14. Mircean, M. *et al.* Clinical and pathological effects of *Dirofilaria repens* and *Dirofilaria immitis* in a dog with a natural co-infection. *Parasitol. Int.* **66**, 331–334 (2017).
15. Genchi, C. & Kramer, L. Subcutaneous dirofilariasis (*Dirofilaria repens*): An infection spreading throughout the old world. *Parasites Vectors* **10**, (2017).
16. Henry, L. G. *et al.* Comparison of six commercial antigen kits for detection of *Dirofilaria immitis* infections in canines with necropsy-confirmed heartworm status. *Vet. Parasitol.* **254**, 178–182 (2018).
17. Schnyder, M. & Deplazes, P. Cross-reactions of sera from dogs infected with *Angiostrongylus vasorum* in commercially available *Dirofilaria immitis* test kits. *Parasites Vectors* **5**, (2012).
18. Aroch, I. *et al.* Serological cross-reactivity of three commercial in-house immunoassays for detection of *Dirofilaria immitis* antigens with *Spirocerca lupi* in dogs with benign esophageal spirocercosis. *Vet. Parasitol.* **211**, 303–305 (2015).
19. Ciucă, L. *et al.* Heat treatment of serum samples from stray dogs naturally exposed to *Dirofilaria immitis* and *Dirofilaria repens* in Romania. *Vet. Parasitol.* **225**, 81–85 (2016).
20. Venco, L., Manzocchi, S., Genchi, M. & Kramer, L. H. Heat treatment and false-positive heartworm antigen testing in ex vivo parasites and dogs naturally infected by *Dirofilaria repens* and *Angiostrongylus vasorum*. *Parasites Vectors* **10**, (2017).
21. Gruntmeir, J. M., Thompson, N. M., Long, M. T., Blagburn, B. L. & Walden, H. D. S. Detection of heartworm antigen without cross-reactivity to helminths and protozoa following heat treatment of canine serum. *Parasites Vectors* **14**, 1–8 (2021).
22. Courtney, C. H. & Zeng, Q. Y. Comparison of heartworm antigen test kit performance in dogs having low heartworm burdens. *Vet. Parasitol.* **96**, 317–322 (2001).
23. Atkins, C. E. Comparison of results of three commercial heartworm antigen test kits in dogs with low heartworm burdens. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **222**, 1221–1223 (2003).
24. Lee, A. C. Y. *et al.* Evaluation of a new in-clinic method for the detection of canine heartworm antigen. *Vet. Parasitol.* **177**, 387–391 (2011).
25. Cancrini, G. *et al.* Canine dirofilariasis in two cities of southeastern Spain. *Vet. Parasitol.* **92**, 81–86 (2000).
26. Joekel, D. E., Maier, S., Huggel, K., Schaper, R. & Deplazes, P. Specific antibody detection in dogs with filarial infections. *Parasitol. Res.* **116**, 81–90 (2017).
27. Ciuca, L. *et al.* Seroepidemiological survey of human exposure to *Dirofilaria* spp. in Romania and Moldova. *Acta Trop.* **187**, 169–174 (2018).
28. Ciuca, L. *et al.* New insights into the biology, diagnosis and immune response to *Dirofilaria repens* in the canine host. *Vet. Parasitol.* **X 4**, (2020).
29. Petry, G. *et al.* 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**, 131–144 (2015).
30. Simón, F. *et al.* Immunopathology of *Dirofilaria immitis* infection. *Vet. Res. Commun.* **31**, 161–171 (2007).
31. Grieve, R. B., Mika-Johnson, M., Jacobson, R. H. & Cypess, R. H. Enzyme-linked immunosorbent assay for measurement of antibody responses to *Dirofilaria immitis* in experimentally infected dogs. *Am. J. Vet. Res.* **42**, 66–69 (1981).
32. Wyszomolek, M. E. *et al.* Hematological and biochemical changes in dogs naturally infected with *Dirofilaria repens*. *Front. Vet. Sci.*, 590 (2020).
33. Wyszomolek, 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.*, 682 (2020).
34. Snowden, K. & Hammerberg, B. Dynamics of immune responses related to clinical status in *Brugia pahangi*-infected dogs. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **37**, 143–151 (1987).
35. Ravindran, B., Satapathy, A. K., Sahoo, P. K. & Babu Geddani, J. J. Protective immunity in human Bancroftian filariasis: Inverse relationship between antibodies to microfilarial sheath and circulating filarial antigens. *Parasite Immunol.* **22**, 633–637 (2000).
36. McGreevy, P. B., Ratiwayanto, S., Tuti, S., McGreevy, M. M. & Dennis, D. T. *Brugia malayi*: Relationship between anti-sheath antibodies and amicrofilaremia in natives living in an endemic area of South Kalimantan, Borneo. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **29**, 553–562 (1980).
37. Mohanty, M. C., Sahoo, P. K., Satapathy, A. K. & Ravindran, B. *Setaria digitata* infections in cattle: Parasite load, microfilaremia status and relationship to immune response. *J. Helminthol.* **74**, 343–347 (2000).
38. Youn, J. H. *et al.* Production and characterization of peptide mimotopes of phenolic glycolipid-I of *Mycobacterium leprae*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **41**, 51–57 (2004).
39. Dietlens, T. *et al.* Unravelling the antigenic landscape of the HIV-1 subtype A envelope of an individual with broad cross-neutralizing antibodies using phage display peptide libraries. *J. Virol. Methods* **169**, 95–102 (2010).
40. Lunder, M., Bratković, T., Kreft, S. & Trukelj, B. Peptide inhibitor of pancreatic lipase selected by phage display using different elution strategies. *J. Lipid Res.* **46**, 1512–1516 (2005).
41. Lavi, T., Siman-Tov, R. & Ankri, S. EhMLBP is an essential constituent of the *Entamoeba histolytica* epigenetic machinery and a potential drug target. *Mol. Microbiol.* **69**, 55–66 (2008).
42. Rajik, M. *et al.* Identification and characterisation of a novel anti-viral peptide against avian influenza virus H9N2. *Virol. J.* **6**, (2009).
43. Norbury, L. J. *et al.* Generation of a single-chain variable fragment phage display antibody library from naïve mice panned against *Fasciola hepatica* antigens. *Exp. Parasitol.* **205**, (2019).
44. Norbury, L. J. *et al.* Construction of a novel phage display antibody library against *Fasciola hepatica*, and generation of a single-chain variable fragment specific for *F. hepatica* cathepsin L1. *Exp. Parasitol.* **198**, 87–94 (2019).
45. van Nieuwenhove, L. *et al.* Identification of mimotopes with diagnostic potential for *Trypanosoma brucei gambiense* variant surface glycoproteins using human antibody fractions. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **6**, (2012).
46. Link, J. S., Alban, S. M., Soccol, C. R., Pereira, G. V. M. & Soccol, V. T. Synthetic peptides as potential antigens for cutaneous leishmaniasis diagnosis. *J. Immunol. Res.* **2017**, (2017).
47. Ji, J. *et al.* Comprehensive characterization of plasma cell-free *Echinococcus* spp. DNA in echinococcosis patients using ultra-high-throughput sequencing. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **14**, 1–20 (2020).
48. Gal, S. *et al.* Detection of *Plasmodium falciparum* DNA in plasma. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **945**, 234–238 (2001).
49. Almeida, C. R. *et al.* *Taenia solium* DNA is present in the cerebrospinal fluid of neurocysticercosis patients and can be used for diagnosis. *Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci.* **256**, 307–310 (2006).
50. Wichmann, D. *et al.* Diagnosing schistosomiasis by detection of cell-free parasite DNA in human plasma. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **3**, (2009).
51. Veland, N. *et al.* Polymerase chain reaction detection of leishmania kDNA from the urine of Peruvian patients with cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **84**, 556–561 (2011).

52. Ximenes, C. *et al.* Detection of *Wuchereria bancrofti* DNA in paired serum and urine samples using polymerase chain reaction-based systems. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **109**, 978–983 (2014).
53. Kustanovich, A., Schwartz, R., Peretz, T. & Grinshpun, A. Life and death of circulating cell-free DNA. *Cancer Biol. Ther.* **20**, 1057–1067 (2019).
54. Yu, S. C. Y. *et al.* High-resolution profiling of fetal DNA clearance from maternal plasma by massively parallel sequencing. *Clin. Chem.* **59**, 1228–1237 (2013).
55. Xu, J. *et al.* The sources and metabolic dynamics of *Schistosoma japonicum* DNA in serum of the host. *Parasitol. Res.* **112**, 129–133 (2013).
56. Weerakoon, K. G. & McManus, D. P. Cell-free DNA as a diagnostic tool for human parasitic infections. *Trends Parasitol.* **32**, 378–391 (2016).
57. Oi, M., Sato, Y., Nakagaki, K. & Nogami, S. Detection of *Dirofilaria immitis* DNA in host serum by nested PCR. *Parasitol. Res.* **114**, 3645–3648 (2015).
58. Albers, A. *et al.* Real-time PCR detection of the HhaI tandem DNA repeat in pre- and post-patent *Brugia malayi* Infections: A study in Indonesian transmigrants. *Parasites Vectors* **7**, (2014).
59. Zawistowska-Deniziak, A. *et al.* Immunoproteomic analysis of *Dirofilaria repens* microfilariae and adult parasite stages. *Pathogens* **10**, 174 (2021).
60. Kilkenny, C., Browne, W. J., Cuthill, I. C., Emerson, M. & Altman, D. G. Improving bioscience research reporting: The arrive Guidelines for Reporting Animal Research. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000412>
61. Beffagna, G. *et al.* Circulating cell-free DNA in dogs with mammary tumors: Short and long fragments and integrity index. *PLoS ONE* **12**, (2017).
62. Devonshire, A. S. *et al.* Towards standardisation of cell-free DNA measurement in plasma: Controls for extraction efficiency, fragment size bias and quantification. *Anal. Bioanal. Chem.* **406**, 6499–6512 (2014).
63. Długosz, E. & Wisniewski, M. *Toxocara canis* glycans influence antigen recognition by mouse IgG1 and IgM antibodies. *Acta Parasitol.* **61**, 191–194 (2016).

Author contributions

Conceptualization, M.P. and A.Z.-D.; methodology, M.P., K.B., P.B. and A.Z.-D.; validation, M.P., K.B. and A.Z.-D.; formal analysis, M.P., K.B., M.K. and D.S.; investigation, M.P., K.B., A.K., M.K., D.S., P.B., J.K., D.M. and E.D.; data curation, M.P.; writing—original draft preparation, M.P. and A.Z.-D.; writing—review and editing, M.P., K.B., A.K., M.K., D.S., P.B., E.D., J.K., D.M., M.W. and A.Z.-D.; visualization, M.P., K.B. and A.Z.-D.; supervision, M.W. and A.Z.-D.; project administration, A.Z.-D.; funding acquisition, A.Z.-D. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding

This research was funded by National Centre for Research and Development, grant number 0106/L-9/2017.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Additional information

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1038/s41598-022-06116-8>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to A.Z.-D.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2022

Warszawa, 29.11.2024 r.

Mgr inż. Mateusz Pękacz
Zakład Parazytologii i Chorób Inwazyjnych
Katedra Nauk Przedklinicznych
Instytut Medycyny Weterynaryjnej
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie
ul. Ciszewskiego 8, 02-787 Warszawa
mateusz_pekacz@sggw.edu.pl

Rada Dyscypliny Weterynaria
Szkoły Główniej Gospodarstwa
Wiejskiego w Warszawie

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

Pękacz, M., Basałaj, K., Kalinowska, A., Klockiewicz, M., Stopka, D., Bąska, P., Długosz, E., Karabowicz, J., Młocicki, D., Wiśniewski, M., & Zawistowska-Deniziak, A. (2022). Selection of new diagnostic markers for *Dirofilaria repens* infections with the use of phage display technology. Scientific reports, 12(1), 2288. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-06116-8>

mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na zaplanowaniu i wykonaniu eksperymentów, analizie uzyskanych wyników, przygotowaniu i edycji manuskryptu.

.....Mateusz Pękacz.....

Podpis

Warszawa, 29.11.2024 r.

Dr inż. Katarzyna Basałaj
Muzeum i Instytut Zoologii
Polska Akademia Nauk
ul. Twarda 51/55, 00-818 Warszawa
kbasalaj@miiz.waw.pl

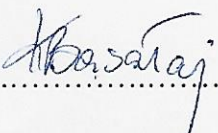
**Rada Dyscypliny Weterynaria
Szkoły Głównej Gospodarstwa
Wiejskiego w Warszawie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

Pękacz, M., Basałaj, K., Kalinowska, A., Klockiewicz, M., Stopka, D., Baska, P., Długosz, E., Karabowicz, J., Młocicki, D., Wiśniewski, M., & Zawistowska-Deniziak, A. (2022). Selection of new diagnostic markers for *Dirofilaria repens* infections with the use of phage display technology. Scientific reports, 12(1), 2288. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-06116-8>

mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na wykonaniu części eksperymentów oraz edycji i recenzji manuskryptu.


.....
Podpis

Warszawa, 29.11.2024 r.

Mgr Justyna Karabowicz
Zakład Parazytologii i Chorób Inwazyjnych
Katedra Nauk Przedklinicznych
Instytut Medycyny Weterynaryjnej
Szkola Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie
ul. Ciszewskiego 8, 02-787 Warszawa
justyna_karabowicz@sggw.edu.pl

**Rada Dyscypliny Weterynaria
Szkoly Głównej Gospodarstwa
Wiejskiego w Warszawie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

Pękacz, M., Basałaj, K., Kalinowska, A., Klockiewicz, M., Stopka, D., Baska, P., Długosz, E., Karabowicz, J., Młocicki, D., Wiśniewski, M., & Zawistowska-Deniziak, A. (2022). Selection of new diagnostic markers for *Dirofilaria repens* infections with the use of phage display technology. Scientific reports, 12(1), 2288. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-06116-8>

mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na pozyskaniu materiału (prób surowic) niezbędnego do przeprowadzenia badań.

.....


Podpis

Warszawa, 29.11.2024 r.

Ks. dr hab. inż. Marcin Wiśniewski, prof. SGGW
Zakład Parazytologii i Chorób Inwazyjnych
Katedra Nauk Przedklinicznych
Instytut Medycyny Weterynaryjnej
Szkola Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie
ul. Ciszewskiego 8, 02-787 Warszawa
marcin_wisniewski@sggw.edu.pl

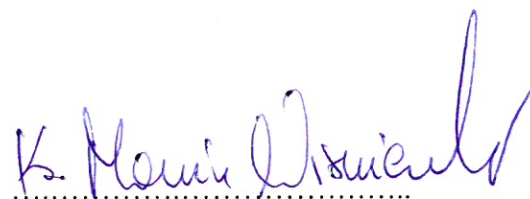
Rada Dyscypliny Weterynaria
Szkoly Głównej Gospodarstwa
Wiejskiego w Warszawie

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

Pękacz, M., Basałaj, K., Kalinowska, A., Klockiewicz, M., Stopka, D., Bąska, P., Długosz, E., Karabowicz, J., Młocicki, D., Wiśniewski, M., & Zawistowska-Deniziak, A. (2022). Selection of new diagnostic markers for *Dirofilaria repens* infections with the use of phage display technology. Scientific reports, 12(1), 2288. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-06116-8>

mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na krytycznej ocenie przeprowadzonej analizy wyników, recenzji oraz edycji manuskryptu.



Podpis

Warszawa, 29.11.2024 r.

Dr hab. inż. Anna Zawistowska-Deniziak
Zakład Immunologii
Instytut Zoologii Doświadczalnej
Wydział Biologii
Uniwersytet Warszawski
ul. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa
a.zawistowska-deniziak@uw.edu.pl

**Rada Dyscypliny Weterynaria
Szkół Główniej Gospodarstwa
Wiejskiego w Warszawie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

Pękacz, M., Basałaj, K., Kalinowska, A., Klockiewicz, M., Stopka, D., Baska, P., Długosz, E., Karabowicz, J., Młocicki, D., Wiśniewski, M., & Zawistowska-Deniziak, A. (2022). Selection of new diagnostic markers for *Dirofilaria repens* infections with the use of phage display technology. Scientific reports, 12(1), 2288. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-06116-8>

mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na opracowaniu koncepcji badań, częściowej analizie wyników, recenzji oraz edycji manuskryptu.

Zawistowska - Deniziak Anne

Podpis

CASE REPORT

Open Access



An unexpected case of a dog from Poland co-infected with *Dirofilaria repens* and *Dirofilaria immitis*

Mateusz Pękacz^{1*}, Katarzyna Basałaj², Martina Miterpáková³, Zbigniew Rusiecki⁴, Diana Stopka⁵, Dominika Graczyk⁴ and Anna Zawistowska-Deniziak⁶

Abstract

Background Dirofilariasis is a vector-borne disease caused by parasitic nematodes of the genus *Dirofilaria* spp., considered an emerging concern in both veterinary and human medicine. Climate changes and human activities, such as pet travel, contribute to the spread of diseases to new non-endemic regions. Poland is dominated by subcutaneous dirofilariasis caused by *D. repens* infections. Cardiopulmonary dirofilariasis, also known as a heartworm disease is much more rare with only single autochthonous cases reported so far. Also, imported infections are observed sporadically in dogs traveling to endemic countries. In this study, we report the first case of a dog in Poland, never having traveled abroad, co-infected with *Dirofilaria repens* and *Dirofilaria immitis*.

Case presentation A 14-year-old mixed breed, an intact male dog with fever, lightly pale mucosal membranes, moderate abdominal pain, and a mild cough was presented in a veterinary clinic in Warsaw, Poland. The examination of the blood sample collected for complete morphology and biochemistry revealed the presence of live microfilariae. Presence of the DNA of both microfilariae species was detected using Real-Time PCR with species-specific primers.

Conclusions Since the remaining diagnostic methods like Knott's test, antigen test or echocardiography did not reveal the presence of *D. immitis*, we discussed the impact of microfilariae periodicity and low worm burden infections on the limited efficiency of these techniques. We strongly recommend using a mixed diagnostic approach for the most sensitive and specific diagnosis since the ideal diagnostic method does not exist, and several factors may contribute to misdiagnosis. Furthermore, we considered factors that contribute to the uncontrolled spread of dirofilariasis such as climate changes, introduction of new species of mosquitoes competent for the transmission of the disease, and wildlife animals as an important reservoir of this parasitosis. Given that Poland shares borders with countries classified as endemic and pre-endemic for *D. immitis*, such as Slovakia and Ukraine, it is reasonable to anticipate a rise in autochthonous heartworm infections and shifts in the epidemiological pattern of dirofilariasis in the coming years.

Keywords Dirofilariasis, Co-infection, Diagnostics, Real-time PCR

*Correspondence:
Mateusz Pękacz
pekaczmateusz@gmail.com

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s) 2024. **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated in a credit line to the data.

Background

Dirofilariasis is a vector-borne disease caused by parasites from the genus *Dirofilaria* spp. *Dirofilaria repens* is a causative agent of subcutaneous dirofilariasis whereas *D. immitis* causes cardiopulmonary dirofilariasis, also known as heartworm disease [1]. While the primary hosts are carnivores, both parasites exhibit zoonotic potential and can infect humans. The disease is spreading worldwide, gradually expanding into new non-endemic areas year after year. Direct causes of spreading the disease are climate changes, which lead to the introduction of new species of mosquitoes competent for disease transmission. Additionally, increased movement of pets, especially those lacking sufficient protection, contributes to the spread [2].

Both *Dirofilaria* species are widespread in Europe, but their distribution in specific regions differs. *D. repens* infections are prevalent across Europe and endemic in many countries of both Southern and Central Europe. Moreover, the risk of new endemic regions emerges in North Europe and Baltic countries, where infections have occurred more frequently in recent years [3, 4]. Heartworm infections have predominantly been observed in Southern Europe, particularly in the hyper-endemic Mediterranean region. In the rest of Europe, especially in the central part, infections have been reported only occasionally. However, according to Morchón et al. [5], the epidemiological situation is constantly changing. Over the last 10 years, the prevalence of the disease not only increased in previously endemic areas but also spread across new non-endemic regions. Single imported cases or occurrences of infected mosquitoes were reported even in Northern Europe countries like Norway [6] and Denmark [2].

Near Poland, Slovakia is a region that can be considered endemic. Over the years, *D. immitis* infections have become more and more frequent in the regions that up to this time were dominated by *D. repens* [7, 8]. Currently, heartworm disease, both in mono-infection and co-infection with *D. repens*, represents 45% of all dirofilarial infections in Slovakia. Between 2017 and 2021 mixed infections of *D. repens* and *D. immitis* represented 22.5% of all diagnosed cases of canine dirofilariasis in endemic regions of Slovakia [8]. Moreover, in 2022 an autochthonous case of human heartworm infection was confirmed in this area [9]. Interestingly, in the bordering Czech Republic, only imported cases have been identified so far [10]. A significant number of *D. immitis* infections have been detected in Germany in recent years, all of which were associated with imported or traveling dogs. In addition, in some regions of the country *D. immitis* DNA was identified in a pool of mosquitoes competent for transmission of the heartworm disease [11]. Based on these

reports, Germany may be considered a pre-endemic area [5].

Beyond Poland's eastern border, in Lithuania, a single imported case of canine cardiopulmonary dirofilariasis was identified [12] and in Belarus, *D. immitis* DNA was detected in a pool of competent mosquitoes [13]. In the case of Ukraine, data on prevalence in dogs are limited, but 1465 cases of human infections caused by *D. repens* were reported in the years 1997–2012 [14] and in the other study among 102 cases, a few were identified as *D. immitis* [15]. Based on these findings Ukraine is considered endemic for both species [16].

Poland is dominated by subcutaneous dirofilariasis. The first case of *D. repens* infection in Poland was reported in humans in 2007 [17, 18], but the patient traveled to Greece a few years earlier so invasion might have been imported. The first autochthonous infection in humans was reported in 2010 [19], with subsequent cases described in the following years [19–23]. The first case of canine dirofilariasis was described in 2009 [24, 25], and since then the prevalence of infected dogs has been increasing steadily. In 2014, the overall prevalence of infected dogs across all 16 provinces reached almost 16% [26], whereas in 2016 only in the Mazovia district the percentage of infected dogs was 38.3% [27]. In a recent study conducted in 2017–2019, the prevalence in Poland was 12% [3].

The first case of a dog infected with *D. immitis* was described in 2012 in Gdynia [28] based on the SNAP test (IDEXX) detecting adult female antigens and has been suspected to be autochthonous. Despite this, only one additional autochthonous case was described in Silesia in 2014 [29]. Importantly, physicians sporadically observe imported infections in dogs that have traveled to endemic countries (data unpublished, based on personal communication). In light of climate changes and Poland's proximity to countries where *D. immitis* is endemic (Slovakia, Ukraine) and pre-endemic (Germany), we have every reason to expect an increase in autochthonous infections shortly.

Here we report a case of a dog from Poland co-infected with *Dirofilaria repens* and *D. immitis*, that has never traveled abroad. To our best knowledge, this is the first confirmed case of autochthonous *D. immitis* infection in a dog from Poland using molecular methods.

Case presentation

Case report

In autumn 2022, a 14-year-old mixed breed, an intact male dog was brought to a veterinary clinic in Warsaw, Poland, for an evaluation due to general lameness. Clinical signs included: fever (39.5 °C), lightly pale mucosal membranes, moderate abdominal pain, and mild cough. No lymphadenopathy of the peripheral lymph nodes and

no deviations from the standard image in the ultrasound examination of the abdominal cavity were observed. A blood sample was collected to complete morphology and biochemistry tests, and then anti-inflammatory and anti-emetic drugs were implemented. The results are showed in the Table 1.

Because of lowered PLT the CaniV-4 rapid test was performed (One-step Canine Heartworm Antigen and *Ehrlichia canis*; *Borrelia burgdorferi*; *Anaplasma phagocytophilum* Antibody Test, Vetexpert). The test was positive on *Anaplasma* antibodies and antibiotic treatment with doxycycline at a dose of 10 mg/per kilo/day, for 7 days was implemented. After a week of treatment, the dog's health status did not show any noticeable improvement. A follow-up blood sample was obtained for a control morphology blood test and blood smear. While no *Anaplasma* was observed in the smear, live microfilariae were detected in the native blood sample. Molecular analyzes confirmed the presence of microfilariae from both *D. repens* and *D. immitis*, with a higher quantity of *D. repens* indicated Ct (cycle threshold) values obtained through Real-Time PCR. The dog had no lumps in the skin and the control echocardiography showed no visible adult forms of *Dirofilaria spp.* in the heart. The control radiography of the thorax in dorsoventral and lateral projections showed no deviations. Based on information from the owner, the dog has never traveled abroad but it lived in the vicinity of dogs traveling outside Poland's borders.

The dog was treated with a combination of imidacloprid 250 mg and moxidectin 62.5 mg in spot-on drops (Advocate, Bayer) according to the following treatment schedule: four doses of the drug administrated at four-week intervals. Additionally, doxycycline (10 mg/kg/day) was continued for a total of one month due to *Anaplasma sp.* and *Wolbachia*. After 2 months the follow-up blood test showed no microfilariae in the bloodstream and all the blood and biochemistry parameters were in the correct ranges. During the following months, the dog was under constant medical care.

Knott's test

One ml of blood was mixed with 9 ml of 4% formalin and centrifuged for 10 min at $500 \times g$. The supernatant was discarded and the pellet was stained with 1% methylene blue. One drop was deposited on the glass slide and examined under the light microscope at $10\times$ and $40\times$ magnification. The Knott's test revealed the presence of microfilariae, displaying features typical of *D. repens*, including a blunt-end head with a short cephalic space, a distinct pair of nuclei, and a hooked tail. The average length and width of the presented microfilariae were measured at $364,3 \mu\text{m}$ and $6,2 \mu\text{m}$, respectively (Fig. 1). These distinctive characteristics collectively confirm

the identification of the microfilariae as belonging to *D. repens* [30, 31]. No microfilariae of *D. immitis* were detected. However, given the low intensity of microfilaremia (200 mf/ml of whole blood) and the observation of only single microfilariae on the slide, it is possible that they were omitted during the examination. There was no opportunity to repeat the examination of microfilariae as the next blood samples were collected already at a check-up visit one month after the treatment has been implemented.

Molecular detection

300 μl of blood was used for the isolation of genomic DNA using Blood Mini Kit (AA Biotechnology) according to the manufacturer's protocol. The isolated gDNA was used as a template in Real-Time PCR reaction with primers targeted at the *D. repens* 16s rRNA gene described in our previous study [32] and newly designed species-specific primers for *D. immitis* (ForDI 5' ACT GATGTTATTATTCTATGTGTTTGGG 3'; RevDI 5' TTCAAAGAATCCCACTCTAAAAACCTC 3'). The novel primers targeted the small fragment of mtDNA located between *tRNA* and *ND6* genes (starts at 3960 bp and ends at position 4109 bp), were designed based on the reference mitochondrial genomes of *D. immitis* (NC_005305.1) and *D. repens* (NC_029975.1) so that 3' mismatches would discriminate and would not amplify *D. repens* DNA fragments.

Reactions were performed in triplicate according to the two-step fast cycling protocol (PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix, Applied Biosystems™), followed by the melt curve step in a QuantStudio 6 Real-Time PCR system (Applied Biosystems) according to the manufacturer's protocol. After the UDG (Uracil-DNA Glycosylase) activation step (2 min at 50 °C) followed by initial denaturation (2 min, 95 °C), 40 cycles of amplification were performed (3 s at 95 °C, 30 s at 60 °C). The reaction volume was 10 μl and consisted of 5 μl of 2 $\times$ Master mix, 3 μl of the isolated DNA, 1 μl of each primer in a final concentration of 0.6 μM . Data were collected during the annealing/extension step.

The specificity of the amplified products was confirmed based on the melt curve peaks compared to the reference samples and Sanger's sequencing. Reference samples were as follows: gDNA isolated from adult *D. repens* ($N=1$) and *D. immitis* worm ($N=1$); gDNA isolated from the blood of dogs infected with *D. repens* ($N=10$) and *D. immitis* ($N=10$); gDNA isolated from the blood of dogs co-infected with both species ($N=5$). All samples related to *D. immitis* were derived from Slovakia.

The specificity of the designed primers was confirmed in all reference samples. Melt curve analysis revealed peaks specific for *D. immitis* and *D. repens* with $T_m \sim 71$ °C (Fig. 2) and ~ 72 °C, respectively. The novel

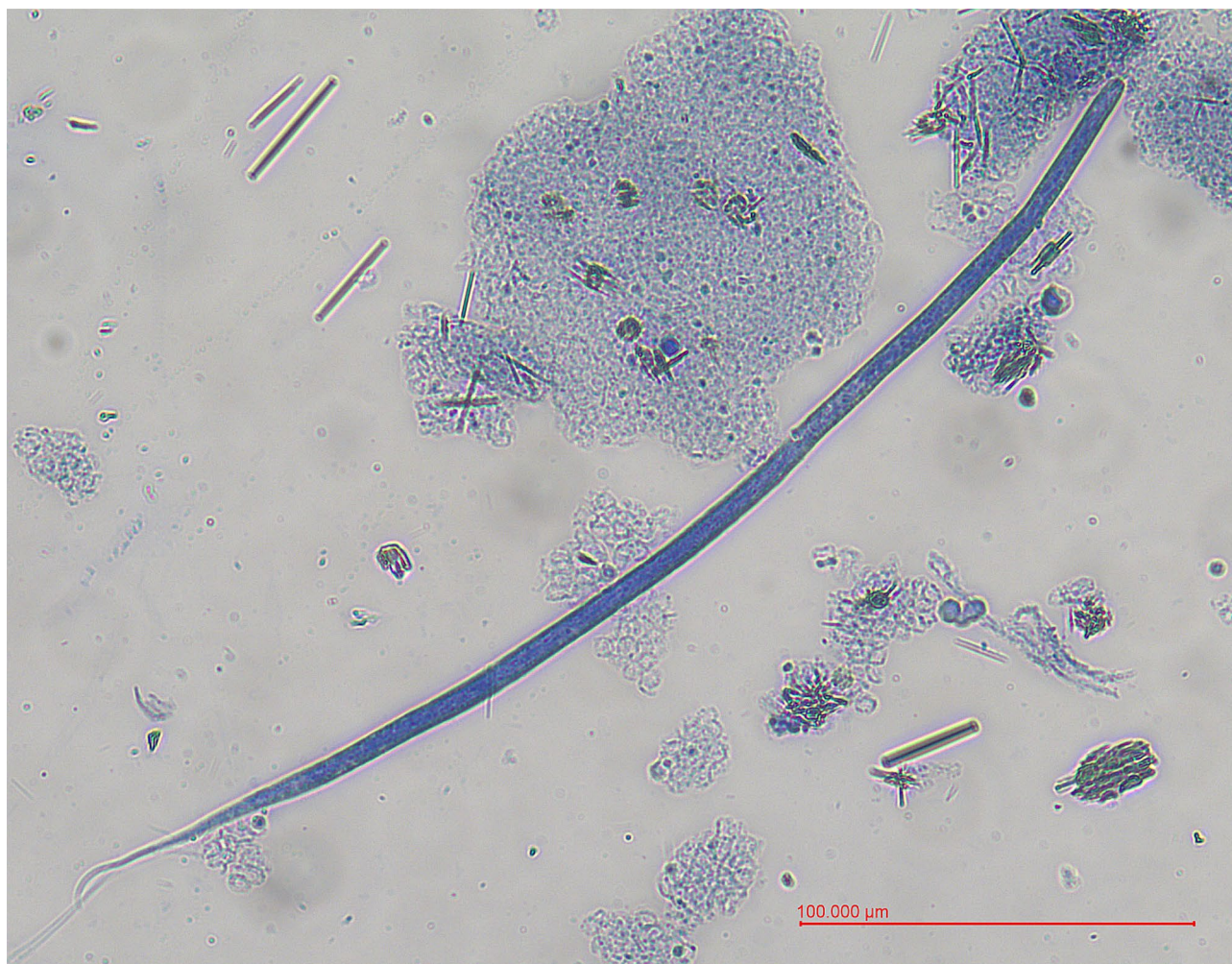


Fig. 1 Microfilaria of *Dirofilaria repens* identified in Knott's test during examination of a dog's blood sample observed under 40x magnification

primers specific for *D. immitis* amplified only *D. immitis* gDNA (microfilariae or adult). No amplification was observed in reactions with *D. repens* gDNA (microfilariae or adult).

Both genes of interest were amplified with the gDNA isolated from the blood of the described dog which indicates co-infection. Tm of melt curves were consistent with reference samples and sequencing of the amplified DNA fragments showed almost 100% similarity to *s16* rDNA and "DI fragment" for *D. repens* and *D. immitis*, respectively. The sequencing of the amplicons was outsourced to Genomed S.A., where each sample was bidirectionally sequenced using the same gene-specific primers employed in our real-time PCR analysis.

Interestingly, the product specific for *D. immitis* presented a much higher Ct value (Ct~35), than the one specific for *D. repens* (Ct~29). That indicates the predominance of *D. repens* in the bloodstream and seems to correspond to the Knott's test result, where *D. immitis* microfilariae have not been even detected. We assume

that the number of *D. immitis* microfilariae was too low to be noticeable in Knott's test. There may be a few explanations for this phenomenon related to the biology of the parasite.

Discussion and conclusions

Mixed infections of both species are not uncommon and have already been reported in several countries [10, 33–35] with a relatively high prevalence. For example, in Romania's 2015 report, mixed infections represented 23.91% of all positive samples [36]. Interestingly, the predominance of microfilariae of one of the species over the other has also been frequently observed, e.g. 7780 mf/ml and 427 mf/ml of *D. immitis* and *D. repens*, respectively [34, 37]. A similar scenario has been observed in naturally co-infected dogs in Slovakia (personal communication, prof. Martina Miterpáková). Genchi et al. [38] observed this phenomenon in experimentally infected dogs and suggested that the interaction of both species may disrupt the progress of each other and pointed out

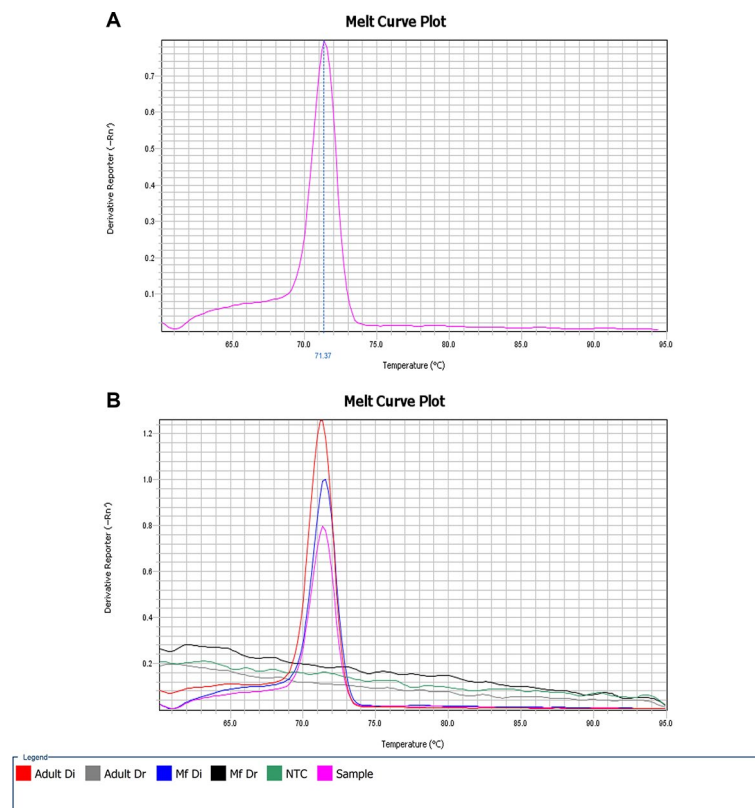


Fig. 2 Melt curve analysis of products amplified using gene-specific primers for *D. immitis*: (A) reveals a distinct peak with a specific melting temperature (T_m) corresponding to the amplicon obtained from the tested sample; (B) demonstrates primer specificity assessed with genomic DNA isolated from adult *D. immitis* (Adult Di) and *D. repens* (Adult Dr) worms, blood from dogs infected with *D. immitis* (Mf Di), and *D. repens* (Mf Dr). NTC implies “no target control”

that it may impact the further distribution of dirofilariasis in different regions. Periodic fluctuations in microfilariae levels, influenced by factors like host behavior and environmental conditions, can impact the effectiveness of standard morphological/molecular examinations. Studies suggest a link between microfilaremia dynamics and host habits, as well as vector activity in specific regions [37]. Seasonal variation in microfilaremia is evident, peaking during summer [39–41]. Although limited, research on mixed infections in dogs reveals a shared circadian rhythm between parasites, with peripheral microfilaremia highest at 1 am and lowest between 5 and 8 am. Intriguingly some cases showed zero microfilariae of one species between 9 and 11 am [37], supporting the assumption that during low-count phases, microfilariae concentrate in lung vessels [42].

These findings appear consistent with our situation, as the blood sample for differentiating the infection collected at 10.30 am corresponds to a period of low peripheral microfilaremia (200 mf/ml), possibly contributing to the absence of *D. immitis* in the Knott’s test. However, we recognize that sampling at a single time point is a limitation and may not definitively conclude the absence of *D. immitis* due to time of day. Regrettably, additional

sampling at varied time points was not feasible in this case.

In addition, a negative result of the antigen test and no sign of adult worms may indicate low worm burden infection [43], which also complies with AHS (American Heartworm Society) [44] and ESDA (European Society of Dirofilariosis and Angiostrongylosis) [45] directives. While echocardiography is crucial for assessing the severity of the infection, it may also be misleading, particularly in lightly infected dogs, where worms could be beyond the field of view. Sporadically, *D. immitis* worms have also been reported in various atypical locations [46, 47]. As described, the patient did not show any specific heartworm symptoms, only occasional coughing and general lameness were observed. The infection should be considered “mild” and “Class 1 with low risk of thromboembolic complications”, according to AHS and ESDA directives, respectively [44, 45].

Here, we report the first case of a naturally co-infected dog with both *D. repens* and *D. immitis* in Poland, marking the third documented case of heartworm infection in the country overall. While the country is not considered pre-endemic, we believe heartworm disease may be

Table 1 Hematological and biochemical parameters of the investigated dog at the time of the initial presentation in the veterinary clinic. Bold font is used to indicate increased or lowered parameters

	Results	Unit	Reference intervals
Morphology			
Leukocytes	11.10	G/l	6.00–12.00
Erythrocytes	5.23	T/l	5.50–8.00
Hemoglobin	7.70	mmol/l	7.45–11.17
Hematocrit	0.37	l/l	0.37–0.55
MCV	71	fl	60–77
MCH	1.47	Fmol	1.18–1.49
MCHC	20.8	mmol/l	19.8–22.3
RDW	14	%	13–19
Platelets	41	G/l	200–580
Manual Blood Smear			
Banded neutrophils	3	%	0–3
Segmented neutrophils	92	%	60–77
Lymphocytes	5	%	12–30
Biochemistry			
AST (aspartate aminotransferase)	54.0	U/l	3.0–45.0
ALT (alanine aminotransferase)	280.0	U/l	5.0–60.0
AP (alkaline phosphatase)	1415.0	U/l	5.0–155.0
Glucose	106.0	mg/dl	70.0–120.0
Creatinine	0.7	mg/dl	0.8–1.7
Urea	18.0	mg/dl	20.0–50.0
Total protein	74.0	g/l	55.0–75.0
Bilirubin	0.4	mg/ml	0.2–0.9
Albumins	38.0	g/l	29.0–43.0
GGT (gamma-glutamyl transferase)	33.0	U/l	5.0–25.0
Calcium	10.0	mg/ml	8.4–11.5
Phosphorus	2.7	mg/ml	2.5–6.3
Magnesium	1.8	mg/ml	1.7–2.9
Total cholesterol	239.0	mg/ml	128.0–360.0
LDH (lactate dehydrogenase)	149.0	U/l	80.0–1683.0
CK (creatin kinase)	78.0	U/l	5.0–467.0
Triglycerides	72.0	mg/dl	18.0–115.0
Sodium	151.8	mmol/l	139.1–156.5
Potassium	4.8	mmol/l	4.1–5.4

underestimated, leading to potential undiagnosed or misdiagnosed cases.

Climate changes introduce vectors competent for transmission and extend the exposure time to infection, allowing more *Dirofilaria* generations in a season. Mosquito larval development, influenced by temperature, shows the fastest progress at 28–30 °C, taking 8–9 days for *D. immitis* and 9–13 for *D. repens*, with a threshold of 14 °C below which *Dirofilaria* will not evolve [48]. This information led to the creation of a seasonal heartworm (HW) transmission model, enabling the prediction of *Dirofilaria* occurrences [49–51]. Recently, suitable

conditions were occasionally observed in Northern European countries such as Sweden, Norway, Finland, and Denmark [2]. Human activities are also crucial for the transmission of the disease to non-endemic regions. Traveling with insufficiently protected and/or not properly examined pets contribute to the appearance of new outbreaks of the disease, that within a short period may lead to the endemization in new areas. According to Fuehrer et al. [2], more than 30% of dogs in Poland are kept outside overnight, placing them at an increased risk of mosquito bites.

Although the awareness of dirofilariasis increased in recent years and epidemiological data is being updated locally, still there are some research areas where the data is limited. One of them is molecular xenomonitoring which recently was improved in many European countries and several protocols have been described [52–54]. In Poland, only two studies have been conducted in this field, [55, 56] and provided estimates of the infection rate (EIR) at 1.57% for *D. repens* in the Central part of Poland. Neither *D. immitis*, nor *D. repens* DNA was detected in vectors collected from Southern West part of Poland. Although examining hundreds or even thousands of mosquitoes for a single infected individual might seem economically questionable, xenomonitoring offers valuable insights into transmission risk and the actual epidemiological status.

Unfortunately, the ongoing neglect of infections in free-living carnivores remains a significant contributing factor to the uncontrolled spread of dirofilariasis. Foxes, jackals, wolves, and raccoon dogs in Europe have been identified with infections from both *Dirofilaria* species. Recent findings in beech martens [57] and European badgers [58] suggest a potentially broader natural host range, prompting discussions on their roles as reservoir hosts. In a recent study, Alsarraf et al. [59] reported that the overall prevalence in Poland reached 3.13%, which corresponds with similar studies conducted in other European countries [60–62]. Interestingly, in neighboring Slovakia, *D. repens* infections were detected in 54.97–57.4% of examined foxes [63, 64]. Moreover, only in the Tatry region (the natural borderline between Poland and Slovakia), the prevalence in foxes reached 24.6% [65]. In light of possible patent infections and the absence of preventive or therapeutic interventions in fox populations, these animals could facilitate access to microfilariae for new mosquito genera, particularly given their nocturnal habits and proximity to human habitats. Foxes' nomadic tendencies and capacity for long-distance travel further amplify the risk of disease spread. Nonetheless, the infrequent occurrence of microfilaremia and the inconsistency in available data mean that the true impact of foxes as reservoirs is still subject to debate.

As Poland is surrounded by at least two endemic (Slovakia, Ukraine) and one pre-endemic (Germany) country, we suppose that subsequent cases of both imported and autochthonous infections will be reported more frequently in the following years. Interestingly, in a recent study, Alsarraf et al. demonstrated that genetic diversity among populations of dogs infected with both *D. repens* and *D. immitis* appears to be linked to their geographical origin [16, 66]. The ongoing cultivation of this field of study could significantly contribute to understanding the origin of infections and monitoring the potential migration between populations.

In summary, following the OneHealth approach, it is essential to rigorously monitor the epidemiological situation not just in dogs but also in humans, wildlife animals, and insects. Our case supports the thesis that a mixed diagnostic approach based on morphological, molecular, and serological techniques provides the most sensitive and specific diagnosis.

Acknowledgements

Not applicable.

Author contributions

MP: Conceptualization, Methodology, Validation, Formal analysis, Investigation, Writing - Original Draft, Writing - Review & Editing. KB: Writing - Review & Editing, Formal analysis. MM: Resources, Writing - Review & Editing. ZR: Resources, Writing - Original Draft. DS: Resources. DG: Resources. AZD: Writing - Review & Editing, Supervision, Project administration, Funding acquisition.

Funding

This research was funded by National Centre for Research and Development, grant number 0106/L-9/2017.

Data availability

Derived data supporting the findings of this study are available from the corresponding author MP on request.

Declarations

Ethics approval and consent to participate

The owners of the dog were informed about the results of *Dirofilaria* testing. Written informed consent was not obtained from the owners because no interventions except routine care were performed. All analyzes were performed on the leftovers of blood samples collected during routine checkups or the diagnosis process by veterinarians in veterinary clinic in accordance with relevant guidelines and regulations.

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Author details

¹Division of Parasitology, Department of Preclinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Warsaw University of Life Sciences-SGGW, Ciszewskiego 8, Warsaw 02-776, Poland

²Museum and Institute of Zoology, Polish Academy of Sciences, Wilcza 64, Warsaw 00-679, Poland

³Institute of Parasitology, Slovak Academy of Sciences, Hlinkova 3, Košice 040 01, Slovakia

⁴Centrum Zdrowia Zwierząt, Brata Alberta 34, Warsaw 05-075, Poland

⁵Division of Pathology, Department of Pathology and Veterinary Diagnostics, Faculty of Veterinary Medicine, Warsaw University of Life Sciences-SGGW, Ciszewskiego 8, Warsaw 02-776, Poland

⁶Department of Immunology, Institute of Functional Biology and Ecology, Faculty of Biology, University of Warsaw, Miecznikowa 1, Warsaw 02-096, Poland

Received: 28 July 2023 / Accepted: 8 February 2024

Published online: 23 February 2024

References

- Genchi C, Kramer LH. The prevalence of *Dirofilaria immitis* and *D. repens* in the Old World. Vol. 280, Veterinary Parasitology. 2020.
- Fuehrer HP, Morelli S, Unterköfler MS, Bajer A, Bakran-Lebl K, Dwuznik-Szarek D et al. *Dirofilaria* spp. and *Angiostrongylus vasorum*: Current risk of spreading in central and northern Europe [Internet]. Vol. 10, Pathogens. Multidisciplinary Digital Publishing Institute; 2021 [cited 2022 Jan 3]. p. 1268. Available from: <https://www.mdpi.com/2076-0817/10/10/1268/html>.
- Alsarraf M, Levytska V, Mierzejewska EJ, Polikhovych V, Rodo A, Alsarraf M et al. Emerging risk of *Dirofilaria* spp. infection in Northeastern Europe: high prevalence of *Dirofilaria repens* in sled dog kennels from the Baltic countries. Sci Rep. 2021;11(1).
- Jensen AL, Krogh AKH, Lundsgaard JFH, Willesen JL, Lyngby JGH, Schrøder AS et al. *Dirofilaria repens* in a dog imported to Denmark: A potential for emerging zoonotic disease. Vet Parasitol Reg Stud reports [Internet]. 2023 Jun 1 [cited 2023 May 25];41. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37208081/>.
- Morchón R, Montoya-Alonso JA, Rodríguez-Escobar I, Carretón E. What Has Happened to Heartworm Disease in Europe in the Last 10 Years? [Internet]. Vol. 11, Pathogens. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI); 2022 [cited 2023 May 18]. Available from: <https://pmc/articles/PMC9503846/>.
- Vatne LI. Heartworm infection caused by *Dirofilaria immitis* in a dog imported to Norway. *Dirofilariasis Aetiology and epidemiology*. Nor Veterinaertidsskrift [Internet]. 2014 [cited 2023 May 18];126(7):60–7. Available from: <http://www.ejcap.org>.
- Miterpáková M, Valentová D, Čabanová V, Berešková L. Heartworm on the rise—new insights into *Dirofilaria immitis* epidemiology. Parasitol Res [Internet]. 2018 Jul 1 [cited 2023 May 18];117(7):2347–50. Available from: <https://link.springer.com/article/https://doi.org/10.1007/s00436-018-5912-9>.
- Miterpáková M, Valentová D. *Dirofilaria immitis* a *Dirofilaria repens* v teritoriálnom boji. Veterinarstvi. 2023;73(3):128–32.
- Miterpáková M, Antolová D, Rampalová J, Undesser M, Krajčovic T, Vichová B. *Dirofilaria immitis* Pulmonary *Dirofilariasis*, Slovakia. Emerg Infect Dis [Internet]. 2022 Feb 1 [cited 2023 May 18];28(2):482–5. Available from: <https://pmc/articles/PMC8798700/>.
- Miterpáková M, Hurníková Z, Valentová D, Borková L. Different epidemiological pattern of canine *dirofilariasis* in two neighboring countries in Central Europe—the Czech Republic and Slovakia. Parasitol Res [Internet]. 2021 Feb 1 [cited 2023 May 23];120(2):547–52. Available from: <https://link.springer.com/article/https://doi.org/10.1007/s00436-020-06995-8>.
- Kronefeld M, Kampen H, Sassnau R, Werner D. Molecular detection of *Dirofilaria immitis*, *Dirofilaria repens* and *Setaria tundra* in mosquitoes from Germany. Parasit Vectors [Internet]. 2014 Jan 16 [cited 2023 May 18];7(1):30. Available from: <https://pmc/articles/PMC3898823/>.
- Sabūnas V, Radzijeuskaja J, Sakalauskas P, Paulauskas A. First Report of Heartworm (*Dirofilaria Immitis*) Infection in an Imported Dog in Lithuania. Helminthologia [Internet]. 2019 [cited 2023 May 18];56(1):57. Available from: <https://pmc/articles/PMC6662024/>.
- Šulešćo T, Volkova T, Yashkova S, Tomazatos A, von Thien H, Lühken R et al. Detection of *Dirofilaria repens* and *Dirofilaria immitis* DNA in mosquitoes from Belarus. Parasitol Res [Internet]. 2016 Sep 1 [cited 2023 May 18];115(9):3535–41. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00436-016-5118-y>.
- Salamatina RV, Pavlikovska TM, Sagach OS, Nikolayenko SM, Korniyushin VV, Kharchenko VO et al. Human *dirofilariasis* due to *Dirofilaria repens* in Ukraine, an emergent zoonosis: Epidemiological report of 1465 cases. Acta Parasitol [Internet]. 2013 Dec 13 [cited 2023 May 18];58(4):592–8. Available from: <https://link.springer.com/article/10.2478/s11686-013-0187-x>.

15. Rossi A, Peix Á, Pavlikovskaya T, Sagach O, Nikolaenko S, Chizh N, et al. Genetic diversity of *Dirofilaria* spp. isolated from subcutaneous and ocular lesions of human patients in Ukraine. *Acta Trop.* 2015;142:1–4.
16. Alsarraf M, Baneth G, Bogucka-Kocka A, Ciuca L, Dwużnik-Szarek D, Fuehrer HP, et al. Haplotypes of *Dirofilaria repens* from Poland and selected countries of Central, North-Eastern Europe and the Middle East: an evaluation on the relation between the genetic diversity and the geographic distribution of the fast-spreading parasite. *Vet Parasitol.* 2023;315:109882.
17. Cielecka D, Szymanska K, Salamatin R, Tomaszewska A. Case report of human infection with *Dirofilaria repens* (Leidy, 1856) (Nematoda: Filarioidea: Onchocercidae) in Warsaw. *Wiadomości Parazytologii* [Internet]. 2007 [cited 2023 May 18];53:165. Available from: <https://yadda.icm.edu.pl/yadda/element/bwmeta1.element.agro-article-af7f102c11bd-445f-87e6-48ab62849bfe/c/165.PDF>.
18. Żarnowska-Prymek H, Cielecka D, Salamatin R. *Dirofilaria* repens, po raz pierwszy opisana u polskich pacjentów. *Przegl Epidemiol.* 2008;62:547–51.
19. Cielecka D, Żarnowska-Prymek H, Masny A, Salamatin R, Wesolowska M, Gołab E. Human dirofilariosis in Poland: the first cases of autochthonous infections with *Dirofilaria repens*. *Ann Agric Environ Med.* 2012;19(3):445–50.
20. Rymgaylo-Jankowska B, Ziaja-Softys M, Flis B, Bogucka-Kocka A, Żarnowski T. Subcutaneous Dirofilariosis of the Eyelid Brought to Poland from the Endemic Territory of Ukraine. *Pathogens* [Internet]. 2023 Feb 1 [cited 2023 May 18];12(2). Available from: <https://pmc/articles/PMC9966818/>.
21. Khudkowska 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(3):657–63.
22. Kołodziej P, Szostakowska B, Jarosz B, Pojasek S, Romak M, Kocki J et al. The First Case of Elbow Bursitis Caused by *Dirofilaria repens* in Humans. *Open Forum Infect Dis* [Internet]. 2019 Apr 1 [cited 2023 May 18];6(4). Available from: <https://pmc/articles/PMC6483126/>.
23. Mazur-Melewska K, Figlerowicz M, Masny A, Cielecka D, Mania A, Trejster E, et al. The first autochthonous infection with *Dirofilaria repens* in a child in Poland. *J Pediatr Infect Dis.* 2013;8(4):187–90.
24. Demiaszkiewicz A, Polańczyk G. Pierwszy przypadek inwazji *Dirofilaria repens* Railliet et Henry, 1911 u psa w Polsce. *Mag Weter* [Internet]. 2010 [cited 2023 May 18];19:254–6. Available from: https://scholar.google.com/scholar?hl=pl&as_sdt=0%2C5&q=Pierwszy+przypadek+inwazji+Dirofilaria+repens+Railliet+et+Henry%2C+1911+u+psa+w+Polsce&btnG=.
25. Demiaszkiewicz AW, Polańczyk G, Pyziel AM, Kuligowska I, Lachowicz J. The first foci of dirofilariosis of dogs evoked by *Dirofilaria repens* Railliet et Henry, 1911 in central Poland. *Wiadomości Parazytologii.* 2009;55(4):367–70.
26. Demiaszkiewicz AW, Polańczyk G, Osińska B, Pyziel AM, Kuligowska I, Lachowicz J et al. The prevalence and distribution of *Dirofilaria repens* in dogs in the Mazovian Province of Central-Eastern Poland. *Ann Agric Environ Med* [Internet]. 2014 Nov 26 [cited 2023 May 18];21(4):701–4. Available from: <https://www.aem.pl/The-prevalence-and-distribution-of-Dirofilaria-repens-in-dogs-in-the-Mazovian-Province-of-Central-Eastern-Poland>.
27. Bajaj A, Rodo A, Mierzejewska EJ, Tokacz 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* [Internet]. 2016 Sep 5 [cited 2023 May 18];12(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27595920/>.
28. Świątalska A, Demiaszkiewicz A. Pierwszy w Polsce rodzimy przypadek inwazji nicieni *Dirofilaria immitis* u psa. *Życie Weter* [Internet]. 2012 [cited 2023 May 18];87:685–6. Available from: <https://www.esccap.pl/datastore/download/PierwszywPolsceRodzimyPrzypadekinwazjiD.immitisupsa.pdf>.
29. Noszczyk-Nowak A, Janus I, Bielewska J, Nowak M, Soltysiak Z. Pierwszy w Polsce potwierdzony pośmiertnie przypadek infestacji *Dirofilaria immitis* u psa. Dowód na Rozprzestrzenianie się Choroby. *Weter w Prakt.* 2014;11(06).
30. Liotta JL, Sandhu GK, Rishniw M, Bowman DD. Differentiation of the Microfilariae of *Dirofilaria immitis* and *Dirofilaria repens* in Stained Blood Films. <https://doi.org/10.1645/12-101> [Internet]. 2013 Jun 1 [cited 2024 Jan 8];99(3):421–5. Available from: <https://bioone.org/journals/journal-of-parasitology/volume-99/issue-3/12-101/Differentiation-of-the-Microfilariae-of-Dirofilaria-immitis-andhttps://doi.org/10.1645/12-101.full>.
31. 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. Vol. 11, Parasites and Vectors. 2018.
32. Pękacz M, Basalaj K, Kalinowska A, Klockiewicz M, Stopka D, Bąska P et al. Selection of new diagnostic markers for *Dirofilaria repens* infections with the use of phage display technology. *Sci Rep* [Internet]. 2022 Dec 1 [cited 2023 May 18];12(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35145147/>.
33. Farkas R, Mag V, Gyurkovszky M, Takács N, Vörös K, Solymosi N. The current situation of canine dirofilariosis in Hungary. *Parasitol Res* [Internet]. 2020 Jan 1 [cited 2023 May 18];119(1):129–35. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31754854/>.
34. 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* [Internet]. 2017 Jun 1 [cited 2021 Aug 25];66(3):331–4. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28232044/>.
35. Sonnberger K, Duscher GG, Fuehrer HP, Leschnik M. Current trends in canine dirofilariosis in Austria-do we face a pre-endemic status? *Parasitol Res* [Internet]. 2020 Mar 1 [cited 2023 May 18];119(3):1001–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32056024/>.
36. Ionică AM, Matei IA, Mircean V, Dumitrache MO, D'Amico G, Györke A et al. Current surveys on the prevalence and distribution of *Dirofilaria* spp. and *Acanthocheilonema reconditum* infections in dogs in Romania. *Parasitol Res* [Internet]. 2015 Feb 21 [cited 2023 May 18];114(3):975–82. Available from: <https://link.springer.com/article/https://doi.org/10.1007/s00436-014-4263-4>.
37. Ionică AM, Matei IA, D'Amico G, Bel LV, Dumitrache MO, Modry D et al. *Dirofilaria immitis* and *D. repens* show circadian co-periodicity in naturally co-infected dogs. *Parasit Vectors* [Internet]. 2017 Feb 28 [cited 2023 May 18];10(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28245837/>.
38. Genchi C, Basano FS, Bandi C, di Sacco B, Venco L, Vezzoni A, et al. Factors influencing the spread of heartworms in Italy. Interaction between *Dirofilaria immitis* and *Dirofilaria repens*. American Heartworm Society. American Heartworm Society; 1995. pp. 65–71.
39. Kume S. Experimental Observations on Seasonal Periodicity of Microfilariae. In: Heartworm Symposium '74. VM Publishing, Inc.; 1975. p. 26–31.
40. Sawyer TK. Seasonal Fluctuations of Microfilariae in Two Dogs Naturally Infected with *Dirofilaria immitis*. In: Heartworm Symposium '74. VM Publishing, Inc.; 1975. p. 23–5.
41. Cancrini G, Coluzzi M, Balbo T, Gallo MG. Seasonal variations in microfilarema and effects of ambient temperature in dogs parasitized by *Dirofilaria repens*. *Parassitologia* [Internet]. 1975 Jan 1 [cited 2023 May 19];17(1–3):75–82. Available from: <https://europepmc.org/article/med/1233403>.
42. Hawking F. Microfilaria infestation as an instance of periodic phenomena seen in host-parasite relationships. *Ann NY Acad Sci* [Internet]. 1962 Oct 1 [cited 2023 May 19];98(4):940–53. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1962.tb30610.x>.
43. Atkins CE. Comparison of results of three commercial heartworm antigen test kits in dogs with low heartworm burdens. *J Am Vet Med Assoc* [Internet]. 2003 May 1 [cited 2021 Aug 25];222(9):1221–3. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12725308/>.
44. AHS. Current canine guidelines for the prevention, diagnosis, and management of heartworm (*Dirofilaria immitis*) infection in dogs. 2020.
45. ESDA. Guidelines for clinical management of canine heartworm disease. 2021.
46. Penezić A, Kuručki M, Bogdanović N, Pantelić I, Bugarski-Stanojević V, Čirović D. Heartworm Disease in Jackals: Unusual Location of *Dirofilaria immitis*. *Acta Parasitol* [Internet]. 2022 Sep 1 [cited 2023 May 19];67(3):1412–5. Available from: <https://link.springer.com/article/https://doi.org/10.1007/s11686-022-00567-9>.
47. Sevimli FK, Kozan E, Bülbül A, Birdane FM, Köse M, Sevimli A. *Dirofilaria immitis* infection in dogs: Unusually located and unusual findings. *Parasitol Res* [Internet]. 2007 Nov 22 [cited 2023 May 19];101(6):1487–94. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00436-007-0665-x>.
48. Genchi C, Rinaldi L, Mortarino M, Genchi M, Cringoli G. Climate and *Dirofilaria* infection in Europe. *Vet Parasitol.* 2009;163(4):286–92.
49. Slocombe JOD, Surgeoner GA, Srivastava B et al. Proceedings of the Heartworm Symposium '89: Charleston, South Carolina, March 17–19, 1989. In: Otto GF, Jackson RF, Knight DH, Campbell WC, Courtney CH, Dillon R, editors. Determination of the heartworm transmission period and its used in diagnosis and control. American Heartworm Society; 1989. p. 19–26.
50. Knight DH, Lok JB. Proceedings of Heartworm Symposium'92, American Heartworm Society, Baravia, IL. In: M.D. Soll, D.H. Knight, editors. Seasonal timing of heartworm chemoprophylaxis in the United States. 1995. p. 37–42.
51. Fortin JF, Slocombe JOD. Temperature requirements for the development of *Dirofilaria immitis* in *Aedes triseriatus* and *Ae. vexans*. *Mosq News* [Internet]. 1981 [cited 2023 May 19];December(4):625–33. Available from: <https://www.biodiversitylibrary.org/part/131550>.

52. Latrofa MS, Montarsi F, Ciocchetta S, Annoscia G, Dantas-Torres F, Ravagnan S et al. Molecular xenomonitoring of *Dirofilaria immitis* and *Dirofilaria repens* in mosquitoes from north-eastern Italy by real-time PCR coupled with melting curve analysis. *Parasit Vectors* [Internet]. 2012 [cited 2023 May 19];5(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22520170/>.
53. Bocková E, Rudolf I, Kočíšová A, Betášová L, Venclíková K, Mendel J et al. *Dirofilaria repens* microfilariæ in *Aedes vexans* mosquitoes in Slovakia. *Parasitol Res* [Internet]. 2013 Oct [cited 2023 May 20];112(10):3465–70. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23846240/>.
54. Silbermayr K, Eigner B, Joachim A, Duscher GG, Seidel B, Allerberger F et al. Autochthonous *Dirofilaria repens* in Austria. *Parasit Vectors* [Internet]. 2014 May 14 [cited 2023 May 20];7(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24885284/>.
55. Masny A, Salamatin R, Rozej-Bielicka W, Golab E. Is molecular xenomonitoring of mosquitoes for *Dirofilaria repens* suitable for dirofilariasis surveillance in endemic regions? *Parasitol Res* [Internet]. 2016 Feb 1 [cited 2023 May 20];115(2):511–25. Available from: <https://link.springer.com/article/https://doi.org/10.1007/s00436-015-4767-6>.
56. Rydzanicz K, Golab E, Rozej-Bielicka W, Masny A. Screening of mosquitoes for filarioid helminths in urban areas in south western Poland-common patterns in European *Setaria tundra* xenomonitoring studies. *Parasitol Res* [Internet]. 2019 Jan 23 [cited 2023 May 20];118(1):127–38. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30535561/>.
57. Miterpáková M, Hurníková Z, Zalešný G, Chovancová B. Molecular evidence for the presence of *Dirofilaria repens* in Beech marten (*Martes foina*) from Slovakia. *Vet Parasitol*. 2013;196(3–4):544–6.
58. Ionică AM, Deak G, Boncea R, Gherman CM, Mihalca AD. The European Badger as a New Host for *Dirofilaria immitis* and an Update on the Distribution of the Heartworm in Wild Carnivores from Romania. *Pathog (Basel, Switzerland)* [Internet]. 2022 Apr 1 [cited 2023 May 20];11(4). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35456095/>.
59. Alsarraf M, Dwużnik-Szarek D, Hildebrand J, Mierzejewska EJ, Kloch A, Kot K et al. Occurrence of *Dirofilaria repens* in wild carnivores in Poland. *Parasitol Res* [Internet]. 2023 May 1 [cited 2023 May 20];122(5):1229. Available from: <https://pmc/articles/PMC10097766/>.
60. Penezić A, Selaković S, Pavlović I, Čirović D. First findings and prevalence of adult heartworms (*Dirofilaria immitis*) in wild carnivores from Serbia. *Parasitol Res* [Internet]. 2014 Sep 1 [cited 2023 May 20];113(9):3281–5. Available from: <https://link.springer.com/article/https://doi.org/10.1007/s00436-014-3991-9>.
61. Ionică AM, Matei IA, D'Amico G, Ababii J, Daskalaki AA, Sándor AD et al. Filarioid infections in wild carnivores: a multispecies survey in Romania. *Parasit Vectors* [Internet]. 2017 Jul 13 [cited 2023 May 20];10(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28705255/>.
62. Tolnai Z, Széll Z, Sproch Á, Szeredi L, Sréter T. *Dirofilaria immitis*: an emerging parasite in dogs, red foxes and golden jackals in Hungary. *Vet Parasitol*. 2014;203(3–4):339–42.
63. Hurníková Z, Miterpáková M, Zalešný G. Epidemiological coherency of vulpine dirofilariasis in environmental conditions of Slovakia. *Helminthol*. 2015;52(1):11–6.
64. Lecová L, Letková V. The prevalence of *Dirofilaria* spp. in domesticated and wild carnivores in Slovakia. *Folia Vet* [Internet]. 2009 [cited 2023 May 20];53(3):160–1. Available from: <https://www.uvlf.sk/document/fovia-veterinaria-volume-53-issue-3.pdf>.
65. Hurníková Z, Miterpáková M, Čabanová V, Chovancová G. Free-living carnivores as an important reservoir of zoonotic parasites in the Tatra Mountains region, Slovakia. *Ann Parasitol*. 2016.
66. Alsarraf M, Carretón E, Ciuca L, Diakou A, Dwużnik-Szarek D, Fuehrer HP et al. Diversity and geographic distribution of haplotypes of *Dirofilaria immitis* across European endemic countries. *Parasit Vectors* [Internet]. 2023 Dec 1 [cited 2024 Jan 8];16(1). Available from: <https://pmc/articles/PMC10498598/>.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Warszawa, 29.11.2024 r.

Mgr inż. Mateusz Pękacz
Zakład Parazytologii i Chorób Inwazyjnych
Katedra Nauk Przedklinicznych
Instytut Medycyny Weterynaryjnej
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie
ul. Ciszewskiego 8, 02-787 Warszawa
mateusz_pekacz@sggw.edu.pl

**Rada Dyscypliny Weterynaria
Szkoły Główniej Gospodarstwa
Wiejskiego w Warszawie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

Pękacz, M., Basałaj, K., Miterpáková, M., Rusiecki, Z., Stopka, D., Graczyk, D., & Zawistowska-Deniziak, A. (2024). An unexpected case of a dog from Poland co-infected with *Dirofilaria repens* and *Dirofilaria immitis*. BMC veterinary research, 20(1), 66. <https://doi.org/10.1186/s12917-024-03921-3>

mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na zaplanowaniu i wykonaniu eksperymentów, analizie uzyskanych wyników, przygotowaniu i edycji manuskryptu.

.....
Mateusz Pękacz

Podpis

Warszawa, 29.11.2024 r.

Dr inż. Katarzyna Basałaj
Muzeum i Instytut Zoologii
Polska Akademia Nauk
ul. Twarda 51/55, 00-818 Warszawa
kbasalaj@miiz.waw.pl

**Rada Dyscypliny Weterynaria
Szkoły Głównej Gospodarstwa
Wiejskiego w Warszawie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

Pękacz, M., Basałaj, K., Miterpáková, M., Rusiecki, Z., Stopka, D., Graczyk, D., & Zawistowska-Deniziak, A. (2024). An unexpected case of a dog from Poland co-infected with *Dirofilaria repens* and *Dirofilaria immitis*. BMC veterinary research, 20(1), 66.
<https://doi.org/10.1186/s12917-024-03921-3>

mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na recenzji oraz edycji manuskryptu.


.....
Podpis

Warszawa, 29.11.2024 r.

Lek. wet. Diana Stopka
Zakład Patologii Zwierząt
Katedra Patologii i Diagnostyki Weterynaryjnej
Instytut Medycyny Weterynaryjnej
Szkola Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie
ul. Nowoursynowska 159c, 02-776 Warszawa
diana_stopka@sggw.edu.pl

**Rada Dyscypliny Weterynaria
Szkoly Głównej Gospodarstwa
Wiejskiego w Warszawie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

Pękacz, M., Basałaj, K., Miterpáková, M., Rusiecki, Z., Stopka, D., Graczyk, D., & Zawistowska-Deniziak, A. (2024). An unexpected case of a dog from Poland co-infected with *Dirofilaria repens* and *Dirofilaria immitis*. BMC veterinary research, 20(1), 66.
<https://doi.org/10.1186/s12917-024-03921-3>

mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na pobraniu materiału niezbędnego do przeprowadzenia badań oraz wykonaniu części eksperymentów.

.....


Podpis

Warszawa, 29.11.2024 r.

Lek. wet. Dominika Graczyk
Centrum Zdrowia Zwierząt,
ul. Brata Alberta 34, 05-075 Warszawa
dominika2725@gmail.com

**Rada Dyscypliny Weterynaria
Szkół Główniej Gospodarstwa
Wiejskiego w Warszawie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

Pękacz, M., Basałaj, K., Miterpáková, M., Rusiecki, Z., Stopka, D., Graczyk, D., & Zawistowska-Deniziak, A. (2024). An unexpected case of a dog from Poland co-infected with *Dirofilaria repens* and *Dirofilaria immitis*. BMC veterinary research, 20(1), 66.
<https://doi.org/10.1186/s12917-024-03921-3>

mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na pobraniu materiału niezbędnego do przeprowadzenia badań.

.....*Dominika Graczyk*.....

Podpis

Warszawa, 29.11.2024 r.

Dr hab. inż. Anna Zawistowska-Deniziak
Zakład Immunologii
Instytut Zoologii Doświadczalnej
Wydział Biologii
Uniwersytet Warszawski
ul. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa
a.zawistowska-deniziak@uw.edu.pl

**Rada Dyscypliny Weterynaria
Szkoły Głównej Gospodarstwa
Wiejskiego w Warszawie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

Pękacz, M., Basałaj, K., Miterpáková, M., Rusiecki, Z., Stopka, D., Graczyk, D., & Zawistowska-Deniziak, A. (2024). An unexpected case of a dog from Poland co-infected with *Dirofilaria repens* and *Dirofilaria immitis*. BMC veterinary research, 20(1), 66.
<https://doi.org/10.1186/s12917-024-03921-3>

mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na recenzji oraz edycji manuskryptu.



Podpis

