

Evaluation of the effectiveness of antigen testing in the diagnosis of canine dirofilariasis

V. Levytska  | V. Poliukhovych

Article info

Correspondence Author

V. Levytska

E-mail:

levytska28@gmail.com

Higher Education Institution
Podillia State University,
Shevchenko Str., 12,
Kamianets-Podilskyi, 32316,
Ukraine

Citation: Levytska, V., & Poliukhovych, V. (2024). Evaluation of the effectiveness of antigen testing in the diagnosis of canine dirofilariasis. *Scientific Progress & Innovations*, 27 (4), 171–175. doi: 10.31210/spi2024.27.04.29

Dirofilariasis is a dangerous parasitic disease, the spread of which among dogs worldwide and in Ukraine is increasing, necessitating effective diagnostic methods for timely detection and treatment. Accurate diagnosis is critical to preventing severe complications, particularly cardiovascular pathologies caused by *Dirofilaria immitis*. In our study, we used a method involving preheating of blood samples prior to antigen testing with immunochromatographic tests, which significantly enhanced detection sensitivity. The aim of the study was to assess the effectiveness of the proposed approach in combination with well-known methods for immunochromatographic detection of antigens from nematodes *D. immitis* extracted from dogs. The research was conducted between 2022 and 2023, analyzing 192 serum samples from dogs aged 1 to 14 years. To detect *D. immitis* antigens, the commercial Heartworm Ag (Vet Expert) test system was used. Before testing, samples underwent thermal treatment: they were heated to 100°C for 5 minutes in a thermal block, causing protein coagulation. After centrifugation, the supernatant was tested according to the manufacturer's instructions. This technique increased the likelihood of detecting antigens even at low concentrations of parasitic proteins. Additionally, a modified Knott's method was employed to identify microfilariae in the blood, including staining with methylene blue, and the species composition was confirmed using PCR. Morphometric characteristics of filariae were assessed using microscopy. When testing blood serum, 14 (7.3 %) samples tested positive for *D. Immitis* antigen using the standard method, while this rate increased to 49 (25.5 %) after preheating. The Knott's method identified microfilariae in 23 (21.7 %) animals: 7 cases were *D. immitis*, 11 were *D. repens*, and 5 dogs exhibited coinfection with both species. The number of microfilariae in the blood varied depending on the species: 120–2400 microfilariae/mL for *D. Immitis* and 10–870 microfilariae/mL for *D. repens*. The average length and width of *D. Immitis* microfilariae were 310.2±6.9 µm and 5.10±1.68 µm, respectively, while for *D. repens*, these measures were 360.12±2.82 µm and 7.85±1.23 µm. The obtained results highlight the necessity of preheating of serum samples to enhance the sensitivity of antigen testing for *D. immitis*. This approach also facilitates the identification of coinfections with *D. repens*. The proposed method is an important complement to standard diagnostic procedures and can minimize the occurrence of false-negative results.

Keywords: dirofilariasis, antigen, immunochromatographic tests, diagnosis, dogs, vector-borne diseases

Оцінка ефективності досліджень на антиген у діагностиці дирофіляріозу собак

В. А. Левицька | В. І. Полухович

Заклад вищої освіти
«Подільський державний
університет»,
м. Кам'янець-Подільський,
Україна

Дирофіляріоз є небезпечним паразитарним захворюванням, поширення якого серед собак у світі та в Україні зростає, що вимагає ефективних методів діагностики для своєчасного виявлення та лікування. Правильна діагностика має вирішальне значення для запобігання важким ускладненням, зокрема серцево-судинним патологіям, спричиненим *Dirofilaria immitis*. У нашій роботі було використано метод термічної обробки зразків крові перед дослідженням на антиген з допомогою імунохроматографічних тестів, що дозволило суттєво підвищити чутливість виявлення. Метою роботи було оцінити ефективність запропонованого підходу в поєднанні із загальновідомими методиками для імунохроматографічного дослідження антигенів нематод *D. immitis* і *D. repens*, виділених із організму собак. Дослідження виконували у 2022–2023 роках, було проаналізовано 192 зразки сироватки крові собак віком від 1 до 14 років. Для виявлення антигену *D. Immitis* використовували комерційну тест-систему Heartworm Ag (Vet Expert). Перед тестуванням зразки піддавали термічній обробці: їх нагрівали до 100°C протягом 5 хвилин у термоблоці, що викликало коагуляцію білків. Після центрифугування надосадкову рідину тестували згідно з інструкціями виробника. Ця методика підвищувала ймовірність виявлення антигенів, навіть за низької концентрації паразитарних білків. Додатково використовували модифікований метод Кнотта для ідентифікації мікрофілярій у крові, включаючи фарбування метиленовим синім, та підтверджували видовий склад за допомогою ПЛР. Морфометричні характеристики філярій оцінювали за допомогою мікроскопії. При тестуванні сироватки крові 14 (7,3 %) зразків показали позитивний результат на антиген *D. immitis* за стандартною методикою, тоді як після термообробки цей показник зріс до 49 (25,5 %). Метод Кнотта виявив мікрофілярій у 23 (21,7 %) тварин: у 7 випадках це були *D. immitis*, у 11 – *D. repens*, а 5 собак мали коінвазію обох видів. Кількість мікрофілярій у крові варіювала залежно від виду: 120–2400 ос./мл для *D. immitis* і 10–870 ос./мл для *D. repens*. Середня довжина та ширина мікрофілярій *D. Immitis* становила 310,2±6,9 мкм і 5,10±1,68 мкм, тоді як для *D. repens* ці показники склали 360,12±2,82 мкм і 7,85±1,23 мкм відповідно. Отримані результати свідчать про необхідність термічної обробки зразків сироватки крові для підвищення чутливості тестування на антиген *D. immitis*. Такий підхід також дозволяє ідентифікувати коінвазію із *D. repens*. Запропонований метод є важливим доповненням до стандартних діагностичних процедур і може мінімізувати кількість хибнонегативних результатів.

Ключові слова. Дирофіляріоз, антиген, імунохроматографічні тести, діагностика, собаки, трансмісивні захворювання.

Бібліографічний опис для цитування: Левицька В. А., Полухович В. І. Оцінка ефективності досліджень на антиген у діагностиці дирофіляріозу собак. *Scientific Progress & Innovations*. 2024. № 27 (4). С. 171–175.

Вступ

Дирофіляріоз – це паразитарне захворювання, спричинене різними видами *Dirofilaria*, яке набуває все більшого поширення серед собак у Європі та Україні. Хвороба передається через укуси комарів і вражає як тварин, так і людину. Останні дослідження підкреслюють зростаючу захворюваність на дирофіляріоз у різних країнах та регіонах. Так, у північно-східній Європі, особливо в країнах Балтії, поширеність *Dirofilaria repens* склала 13,9 % серед собак, при цьому у Литві було задокументовано найвищий відсоток – 38 % [1]. У Словаччині дослідження повідомляють про високу поширеність *Dirofilaria immitis* серед племінних господарств – уражено 64 % собак, що свідчить про потенційне недооцінювання захворювання в центральній Європі [2].

В Україні у Харківській області дослідження виявило поширеність дирофіляріозу серед собак у 21,4 %, з вищим рівнем зараження у безпородних собак (42,3 %) порівняно з породистими (15,1 %), а у Полтаві – 29,7 % [3, 4]. За іншими даними, поширеність *D. repens* в західному регіоні склала 2,4 % серед домашніх собак, що свідчить про регіональні відмінності в поширеності інвазії [5]. Випадки захворювання людей в Україні, спричинені *D. repens*, також широко задокументовані [6]. Зростаюча поширеність дирофіляріозу в Європі та Україні підкреслює необхідність посиленого нагляду та заходів контролю. Крім того, наявність дирофілярії як у собак, так і у людей підкреслює зоонозний потенціал захворювання, що вимагає підходу One Health для вирішення цієї проблеми громадського здоров'я.

Імунохроматографічні дослідження є важливим інструментом для швидкої діагностики дирофіляріозу собак, зумовленого інвазією *D. immitis*. Ці методи базуються на виявленні антигенів або антитіл до паразитів у зразках крові тварин за допомогою специфічних моноклональних антитіл, іммобілізованих на мембрані тест-системи. Метод є зручним, швидким і практичним у використанні, дозволяючи отримати результати вже через 5–15 хвилин без потреби в складному обладнанні чи спеціальних умовах, що робить його незамінним у клінічній ветеринарній практиці та польових умовах [7, 8]. Дослідження показали, що імунохроматографічні тести (ІХТ), такі як Speed Diro™, мають чутливість та специфічність до 100 % у собак з більш ніж однією дорослою самкою паразита [7].

Однак, незважаючи на високу специфічність, особливо до антигенів *D. immitis*, ІХТ мають певні обмеження. Вони не здатні виявляти ранні стадії інвазії, оскільки антигени паразита визначаються лише після досягнення зрілості дорослими самками паразита, що відбувається через 6–7 місяців після зараження. Крім того, можливі хибнонегативні результати за умов низького рівня антигенів, наявності тільки самців дирофілярій або утворення імунних комплексів антиген-антитіло, що блокують реакцію [9, 10]. Також дослідження на *D. repens* є обмеженими, оскільки більшість ІХТ розроблені для діагностики *D. immitis* [10].

Попри ці недоліки, ІХТ залишаються ефективним первинним методом скринінгу дирофіляріозу, особливо в ендемічних регіонах. Для підтвердження результатів доцільно використовувати додаткові методи, такі як мікроскопія – виявлення мікрофілярій у мазках крові за допомогою методу Кнотта та фарбування кислото фосфатазою або молекулярну діагностику (PCR), що дозволяє уточнити видову приналежність паразитів [11, 12]. Біохімічний аналіз крові може виявити зміни, що вказують на інвазію, такі як підвищення рівня загального білка, глюкози, альбуміну, білірубину, креатиніну, сечовини та калію [3]. Для точного виявлення та видової диференціації інвазій *Dirofilaria* sp. у собак рекомендується комплексний діагностичний підхід, що поєднує декілька методів [13].

Комбінація різних діагностичних підходів є важливою для точного виявлення інвазії, оцінки її інтенсивності та вибору ефективних терапевтичних стратегій. Імунохроматографічні методи діагностики дирофіляріозу собак мають ряд переваг, включаючи швидкі результати та простоту використання [14]. Таким чином, застосування імунохроматографічних тестів у поєднанні з іншими методами діагностики сприяє більш повному розумінню епізоотологічної ситуації щодо дирофіляріозу собак, полегшує раннє виявлення та своєчасне лікування цього небезпечного для здоров'я тварин та людей захворювання.

Мета дослідження

Метою роботи було оцінити ефективність запропонованого методу та загальновідомих підходів до імунохроматографічних досліджень на антигени нематод *D. immitis* і *D. repens*, виділених із організму собак.

Матеріали і методи

Дослідження виконували протягом 2022–2023 років у лабораторії кафедри інфекційних та інвазійних хвороб факультету ветеринарної медицини Закладу вищої освіти Подільський державний університет. Всього було досліджено 192 зразки сироватки від собак (віком від 1 до 14 років; 88 самців і 104 самки) відібраних у клініці «Фауна-Сервіс» (м. Кам'янець-Подільський, Хмельницька область) та «Ветхаус» (м. Вінниця). Зразки крові від собак відбирали з периферійних вен, таких як яремна або стегнова вена. Місце введення голки очищували та обробляли спиртом для зниження ризику контамінації. Для забору крові використовували стерильні шприци та голки або вакуумні системи (Vacutainer). Для отримання сироватки зразки збирали у пробірки без антикоагулянта, що дозволяло крові згортатися, після чого сироватку відділяли центрифугуванням. Зразки сироватки зберігали при – 20°C до подальшого дослідження.

Дослідження на антиген проводили за допомогою комерційно доступної тест-системи Heartworm Ag (Vet Expert) згідно з інструкціями виробника. Крім того, додатково усі зразки досліджували за вдосконаленою методикою – перед тестуванням

проводили теплову обробку зразків сироватки крові згідно з описаною методикою [15]. Приблизно 1–1,5 мл сироватки поміщали в епендорф і нагрівали до 100°C протягом 5 хвилин у термоблоці. Нагрівання викликало утворення коагуляту, який потім центрифугували при 16000 × g протягом 5 хвилин. Після центрифугування надосаову рідину знову досліджували за допомогою того ж самого комерційного тесту Heartworm Ag (Vet Expert) відповідно до інструкцій виробника.

Дослідження крові також проводили за модифікованим методом Кнотта, за загальновідомою методикою [16]. Додатково відібрали зразки крові у пробірки з антикоагулянтом EDTA для гематологічного аналізу. До 1 мл цільної крові додавали 9 мл 2 % формаліну та перемішували, що призводило до лізису клітин. Потім зразок центрифугували при 1200 × g, і осад фарбували 1 % метиленовим синім. Виявлені мікрофілярії були ідентифіковано на основі морфологічних та морфометричних ознак та підраховано в 20 мкл крові (ос./мл крові). Видова ідентифікація мікрофілярій була підтверджена за допомогою ПЛР. Морфометричні дослідження проводили за допомогою світлової мікроскопії (мікроскоп Leica DM-2500, фотокамера Leica DFC 450c).

Результати та їх обговорення

У дослідженні взяли участь 192 собаки різних вікових груп (від 1 до 14 років), різної статі та порід, включаючи як породистих тварин, так і безпородних з Хмельницької та Вінницької областей. Серед досліджених тварин було 88 самців (45,8 %) і 104 самки (54,2 %). Усі тварини були клінічно обстежені перед забором крові для лабораторних досліджень.

Клінічні ознаки дирофіляріозу у заражених собак різнилися, залежно від виду збудника і ступеня

ураження. Серед поширених симптомів у собак з виявленими мікрофіляріями *D. immitis* відзначали: кашель, задишку, слабкість, швидку втомлюваність після фізичних навантажень, а також ознаки серцевої недостатності, такі як асцит та збільшення печінки. У деяких тварин спостерігали також тахікардію та порушення серцевого ритму.

У собак, інвазованих *D. repens*, клінічні прояви включали шкірні ураження, такі як вузлики під шкірою, свербіж, еритемау та випадіння шерсті в уражених ділянках. Часто тварини демонстрували підвищену нервозність через постійний свербіж. Також спостерігали збільшення лімфатичних вузлів та прояви загальної інтоксикації організму.

Цікаво, що деякі з тварин, які мали коінвазію обох видів філярій (*D. immitis* і *D. repens*), демонстрували змішані клінічні ознаки, які включали як кардіореспіраторні симптоми, так і шкірні ураження. У цих собак захворювання часто протікало у важчій формі з ознаками як серцево-судинної недостатності, так і вираженими шкірними проблемами.

У результаті дослідження сироватки крові від 192 собак на наявність антигену *D. immitis* було виявлено 14 (7,3 %) позитивних зразків за стандартною методикою і 49 (25,5 %) позитивних зразків після термічної обробки. Дослідження крові за допомогою методу Кнотта виявило, що 23 (21,7 %) тварини мали мікрофілярії. Зокрема, 7 собак були позитивними на *D. immitis*, 11 на *D. repens*, і 5 собак були коінвазовані обома видами філярій, що було підтверджено ПЛР (табл. 1).

Кількість мікрофілярій у крові варіювала від 120 до 2400 ос./мл для *D. immitis* та від 10 до 870 мікрофілярій/мл для *D. repens*. Середня довжина та ширина мікрофілярій *D. immitis* складала 310,2±6,9 мкм і 5,10±1,68 мкм відповідно, а для *D. repens* ці показники становили 360,12±2,82 мкм і 7,85±1,23 мкм.

Таблиця 1

Результати досліджень сироватки крові собак на наявність *D. Immitis* і *D. repens* різними методами

Метод дослідження	Специфіка дослідження і результат	Кількість позитивних зразків	Відсоток позитивних зразків (%)
Експрес-тест	Виявлено антиген <i>D. immitis</i> (стандартний метод)	14	7,3
Heartworm Ag	Виявлено антиген <i>D. immitis</i> (після термічної обробки)	49	25,5
Метод Кнотта	Виявлено мікрофілярії	23	21,7
	Мікрофілярії <i>D. immitis</i>	7	4,7
	Мікрофілярії <i>D. repens</i>	11	7,3
	Коінвазія <i>D. immitis</i> та <i>D. repens</i>	5	2,6

З семи собак, у яких було виявлено мікрофілярії *D. immitis*, три мали позитивний результат на антиген як до, так і після термічної обробки зразків. Ще три собаки, які спочатку були антиген-негативними, стали позитивними після термічної обробки. Серед п'яти коінвазованих тварин три були антиген-позитивними до та після обробки, а дві – стали позитивними лише після термообробки.

Ці дані підтверджують можливість помилково негативних результатів на антиген при первинному тестуванні собак, спонтанно інвазованих *D. immitis*. Отримані результати підкреслюють важливість використання термічної обробки зразків для

підвищення чутливості дослідження на *D. immitis* і виявлення можливих коінвазій із *D. repens*.

Наші результати підтверджують попередні висновки, що свідчать про можливість отримання хибнонегативних результатів при тестуванні на антигени у собак, інвазованих *D. immitis*. Такі тварини після термічної обробки зразків виявлялися позитивними, що узгоджується з даними інших досліджень [17–19]. Крім того, наші висновки підтверджуються виявленням мікрофілярій у собак з подальшою ідентифікацією виду методом ПЛР. Наприклад, у роботі Ionica та співавт. (2015) було виявлено, що 9 (24,3 %) зразків, які спершу давали

негативний результат на антиген, згодом підтвердили наявність *D. immitis* за допомогою ПЛР [20]. Такі результати, ймовірно, пояснюються низькою кількістю дорослих гельмінтів у організмі тварини або ж затримкою у виробленні антигену. Ці висновки є надзвичайно важливими, оскільки значна частина епідеміологічних досліджень базується на антигенних тестах, які можуть недооцінювати справжню поширеність інвазії.

Слід зазначити, що дослідження на дирофіляріоз за допомогою ПЛР продемонструвало обмеження традиційних антигенних тестів у виявленні всіх інвазованих собак. У рамках нашого дослідження загальна поширеність інвазії *D. immitis* склала 25,5 % після термічної обробки зразків, тоді як без обробки цей показник становив лише 7,3 %. Це підкреслює необхідність удосконалення діагностичних методів та впровадження більш чутливих підходів, що дозволить покращити діагностику, лікування і контроль поширення цього захворювання.

Цікава тенденція, підтверджена останніми дослідженнями, стосується собак із коінвазією *D. immitis* і *D. repens*. Було встановлено, що у тварин, які отримують регулярні ін'єкції макроциклічних лактонів і доксицикліну, можуть спостерігатися хибнонегативні результати при тестуванні на антигени дирофіляріозу. Це свідчить про те, що стандартні тест-системи на антиген мають обмеження щодо діагностики собак, які проходять терапію для поступового знищення паразитів [19]. Важливо враховувати терапевтичні підходи під час проведення діагностики, оскільки нагрівання зразків може руйнувати комплекс антиген-антитіло, що впливає на результати тестування. Таким чином, результати нашого дослідження підкреслюють важливість комплексного підходу до діагностики та лікування дирофіляріозу, що є ключовим для забезпечення здоров'я собак та ефективного контролю захворювання.

Особливий інтерес становлять дані про можливу перехресну реактивність антигенних тестів на *D. immitis* у випадках одночасної інвазії *D. repens*. Так, у одному дослідженні було встановлено, що дев'ять зразків, які показували позитивний результат на антиген *D. immitis*, також виявилися позитивними на *D. repens* при дослідженні методом ПЛР [20]. Це може свідчити як про супутню інвазію з латентною формою *D. immitis*, так і про можливий вплив мікрофілярій *D. repens* на пригнічення *D. immitis*. У нашому дослідженні більшість собак, у яких за методом Кнотта було підтверджено інвазію *D. repens*, демонстрували позитивний результат як до, так і після термічної обробки зразків. Ці дані важко пояснити однозначно, що свідчить про потребу у додаткових дослідженнях. Одна з можливих причин полягає у тому, що використана тест-система на антиген має поліклональне покриття антитіл, що може впливати на специфічність тесту. Крім того, спорідненість антигенів різних видів філярій може сприяти розпізнаванню антигенів *D. repens* тестами, розробленими для *D. immitis*.

У роботі Панчева та ін. (2009) було зазначено, що перехресна реакція між *D. repens* і *D. immitis* була виключена, що підтверджує специфічність цих видів

у діагностичному аспекті [21]. Це підкреслює важливість точної ідентифікації паразитів у клінічній практиці. Крім того, у літературі описано потенційну перехресну реакцію тестів із такими паразитами, як *Angiostrongylus vasorum* та *Spirocerca lupi*, що вказує на необхідність подальших досліджень специфічності тестів [22, 23]. Попередні дослідження антигенних тестів продемонстрували, що сироватка від собак, інвазованих іншими гельмінтами, зазвичай не викликала перехресних реакцій з антигеном *D. immitis*, за винятком випадків, пов'язаних із *Dipetalonema reconditum* [24]. Водночас Brunner et al. (1988) не виявили перехресних реакцій між кишковими паразитами та *D. reconditum*, що свідчить про унікальність антигенних профілів різних видів паразитів [25]. У рамках проведеного нами дослідження собаки були ретельно обстежені на присутність в організмі інших паразитів. Копрологічне дослідження виявило присутність кількох видів кишкових паразитів, таких як *Toxocara canis*, *Uncinaria stenocephala*, *Trichuris vulpis* та *Ancylostoma caninum*. Згідно з опублікованою літературою, перехресні реакції відсутні між цими кишковими паразитами та *D. immitis*.

Ще одним важливим аспектом є те, що *D. repens* може викликати утворення імунних комплексів, подібно до *D. immitis*. При термічній обробці такі комплекси можуть руйнуватися, звільняючи антигени, які взаємодіють із тестовими системами, що використовувалися. Також можливими є коінвазії *D. immitis* та *D. repens*, що потребує подальшого вивчення взаємодії між цими паразитами та їх впливу на організм собак.

Особливу увагу слід звернути на дослідження рівня сироваткового білка та співвідношення альбумінів і глобулінів у собак із сероконверсією після термічної обробки. Це допоможе визначити, чи утворення імунних комплексів пов'язане з гіперглобулінемією. Згідно з дослідженням Little та ін. (2014), у собак із гіпергаммаглобулінемією, інвазованих іншими паразитами, сироватка здатна блокувати виявлення антигену *D. immitis* за допомогою тестів [17]. Нагрівання сироватки усуває це блокування, що дозволяє виявляти антигени. Таким чином, собаки, які стають позитивними на антиген *D. immitis* після термічної обробки, можуть бути носіями коінвазій з іншими паразитами. Якщо супутні інвазії, викликані збудниками, які спричиняють гіпергаммаглобулінемію (наприклад, *Leishmania infantum*, *Ehrlichia canis*, *Babesia* sp.), впливають на результати тестів, це може суттєво змінити уявлення про поширеність *D. immitis* у регіонах, де ці збудники поширені. Це підкреслює необхідність глибшого аналізу та адаптації діагностичних підходів для отримання точних даних.

Висновки

Результати досліджень демонструють, що традиційні антигенні імунохроматографічні тести мають деякі особливості у виявленні інвазій *D. immitis* та *D. repens*, особливо у випадках супутніх інвазій або гіпергаммаглобулінемії. Термічна обробка

зразків покращує чутливість тестів, розкриваючи приховану наявність антигенів, що може бути зумовлено руйнуванням імунних комплексів. Перехресна реактивність між видами філярій та іншими паразитами підкреслює необхідність розробки більш специфічних і чутливих діагностичних методів. Це дозволить підвищити точність діагностики, зменшити кількість хибнонегативних результатів та сприятиме ефективнішому контролю дирофіляриозу у собак.

Конфлікт інтересів

Автори стверджують про відсутність конфлікту інтересів щодо їхнього викладу та результатів досліджень.

References

1. Alsarraf, M., Levytska, V., Mierzejewska, E. J., Poliukhovych, V., Rodo, A., Alsarraf, M., Kavalevich, D., Dwuznik-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), 1068. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-80208-1>
2. Miterpáková, M., Antolová, D., Rampalová, J., Undesser, M., Krajčovič, T., & Vichová, B. (2022). *Dirofilaria immitis* pulmonary dirofilariasis, Slovakia. *Emerging Infectious Diseases*, 28 (2), 482–485. <https://doi.org/10.3201/eid2802.211963>
3. Kryvoruchenko, D. (2022). Biochemical indicators of serum of dogs with dirofilariasis. *Scientific Progress & Innovations*, 1, 164–170. <https://doi.org/10.31210/visnyk2022.01.21>
4. Kruchynenko, O. (2022). Distribution and diagnostics of dog dirofilariasis in the city of Poltava. *Scientific Progress & Innovations*, 3, 130–136. <https://doi.org/10.31210/visnyk2022.03.17>
5. Mushynskiy, A., Karchevska, T., Kernychnyi, S., Savchuk, L., & Betlinska, T. (2024). Parasitic diseases of dogs in the urban population. *Scientific Progress & Innovations*, 27 (3), 100–104. <https://doi.org/10.31210/spi2024.27.03.16>
6. Salamatin, R., Pavlikovska, T., Sagach, O., Nikolayenko, S., Komyushin, V., Kharchenko, V., Masny, A., Cielecka, D., Konieczna-Salamatin, J., Conn, D., & Golab, E. (2013). Human dirofilariasis due to *Dirofilaria repens* in Ukraine, an emergent zoonosis: epidemiological report of 1465 cases. *Acta Parasitologica*, 58 (4). <https://doi.org/10.2478/s11686-013-0187-x>
7. Genchi, M., Mangia, C., Ferrari, N., & Loukeri, S. (2017). 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>
8. Orozco, P. S. C., Arango, M., & Cardona, W. (2016). Detección de antígenos de *Dirofilaria immitis* en caninos del Área Metropolitana del Valle de Aburrá. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 19 (3), 11. <https://doi.org/10.17533/udea.rccp.324081>
9. Erawan, I. G. M. K., Tjahajati, I., Nurcahyo, W., & Asmara, W. (2016). Excretory-secretory antigens of male and female heart worms (*Dirofilaria immitis*) which potentially as a diagnostic marker. *Jurnal Veteriner*, 16 (4), 463–467.
10. Naghipoor, M., Javadi, S., Tavassoli, M., & Shamsi, S. (2018). Serological study of *Dirofilaria immitis* in urban dogs of Urmia using modified Knott and rapid antigen tests. *Journal of Zoonotic Diseases*, 3 (1), 42–47.
11. Kyslytsia, V., Kladnytska, L., Soroka, N., Velychko, S., Dontsova, O., & Velychko, V. (2020). Diagnostic methods of heartworm disease in dogs and their comparative characteristics. *Bulletin of Sumy National Agrarian University. The Series: Veterinary Medicine*, 3 (50), 44–53. <https://doi.org/10.32845/bsnu.vet.2020.3.7>
12. Yevstafieva, V., Melnychuk, V., Prykhodko, Yu., & Kryvoruchenko, D. (2023). Comparative efficiency of identification methods of *Dirofilaria immitis* nematodes. *Bulletin "Veterinary Biotechnology"*, 42, 15–22. https://doi.org/10.31073/vet_biotech42-02
13. Bamorovat, M., Sharifi, I., Fasihi Harandi, M., Nasibi, S., Sadeghi, B., Khedri, J., & Mohammadi, M. A. (2017). Parasitological, serological and molecular study of *Dirofilaria immitis* in domestic dogs, Southeastern Iran. *Iranian Journal of Parasitology*, 12 (2), 260–266.
14. Khanmohammadi, M., Falak, R., Meamar, A. R., Razmjou, E., Mokhtarian, K., Arshadi, M., Shayanfar, N., & Akhlaghi, L. (2018). Application of *Dirofilaria immitis* immunoreactive proteins in serodiagnosis. *Parasite Immunology*, 41 (1). <https://doi.org/10.1111/pim.12598>
15. Beall, M. J., Arguello-Marin, A., Drexel, J., Liu, J., Chandrashekar, R., & Alleman, A. R. (2017). Validation of immune complex dissociation methods for use with heartworm antigen tests. *Parasites & Vectors*, 10 (S2). <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2442-8>
16. Watson, A., Testoni, F., & Porges, W. (1973). A comparison of microfilariae isolated from canine blood by the modified Knott test and a filter method. *Australian Veterinary Journal*, 49 (1), 28–30. <https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.1973.tb14673.x>
17. Little, S. E., Munzing, C., Heise, S. R., Allen, K. E., Starkey, L. A., Johnson, E. M., Meinkoth, J., & Reichard, M. V. (2014). Pre-treatment with heat facilitates detection of antigen of *Dirofilaria immitis* in canine samples. *Veterinary Parasitology*, 203 (1–2), 250–252. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.01.007>
18. Velasquez, L., Blagburn, B. L., Duncan-Decoq, R., Johnson, E. M., Allen, K. E., Meinkoth, J., Gruntmeir, J., & Little, S. E. (2014). Increased prevalence of *Dirofilaria immitis* antigen in canine samples after heat treatment. *Veterinary Parasitology*, 206 (1–2), 67–70. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.03.021>
19. Drake, J., Gruntmeir, J., Merritt, H., Allen, L., & Little, S. E. (2015). False negative antigen tests in dogs infected with heartworm and placed on macrocyclic lactone preventives. *Parasites & Vectors*, 8 (1). <https://doi.org/10.1186/s13071-015-0698-4>
20. Ionică, A. M., Matei, I. A., Mircean, V., Dumitrache, M. O., D'Amico, G., Györke, A., Pantchev, N., Annoscia, G., Albrechtová, K., Otranto, D., Modrý, D., & Mihalca, A. D. (2014). Current surveys on the prevalence and distribution of *Dirofilaria* spp. and *Acanthocheilonema reconditum* infections in dogs in Romania. *Parasitology Research*, 114 (3), 975–982. <https://doi.org/10.1007/s00436-014-4263-4>
21. Pantchev, N., Schaper, R., Limousin, S., Norden, N., Weise, M., & Lorentzen, L. (2009). Occurrence of *Dirofilaria immitis* and tick-borne infections caused by *Anaplasma phagocytophilum*, *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Ehrlichia canis* in domestic dogs in France: results of a countrywide serologic survey. *Parasitology Research*, 105 (S1), 101–114. <https://doi.org/10.1007/s00436-009-1501-2>
22. 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>
23. 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 *Spirocerca lupi* in dogs with benign esophageal spirocercosis. *Veterinary Parasitology*, 211 (3–4), 303–305. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.06.010>
24. Gillis, J. M., Smith, R. D., & Todd, K. S., Jr. (1984). Diagnostic criteria for an enzyme-linked immunosorbent assay for occult heartworm disease: standardization of the test system in naturally exposed dogs. *American Journal of Veterinary Research*, 45 (11), 2289–2292.
25. Brunner, C. J., Hendrix, C. M., Blagburn, B. L., & Hanrahan, L. A. (1988). Comparison of serologic tests for detection of antigen in canine heartworm infections. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 192 (10), 1423–1427.

ORCID

- V. Levytska  <https://orcid.org/0000-0003-3100-009X>
V. Poliukhovych  <https://orcid.org/0009-0006-4128-9922>



2024 Levytska V. and Poliukhovych V. This is an open-access article distributed under the Creative Commons Attribution License <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.