

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ЗАКЛАД ВИЩОЇ ОСВІТИ
«ПОДІЛЬСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ УНІВЕРСИТЕТ»

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

ПОЛЮХОВИЧ ВАСИЛЬ ІВАНОВИЧ

УДК: 636.7.09:616.995.4/.7-07-08(043.5)5

ДИСЕРТАЦІЯ
ТРАНСМІСИВНІ ІНВАЗІЇ СОБАК
(діагностика та лікування)

Спеціальність: 211 – «Ветеринарна медицина»

Галузь знань: 21 – «Ветеринарна медицина»

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

(підпис) Василь ПОЛЮХОВИЧ

Науковий керівник: ЛЕВИЦЬКА Вікторія Андріївна, доктор ветеринарних наук, доцент

Кам'янець-Подільський – 2025

АНОТАЦІЯ

Полюхович В.І. **Трансмісивні інвазії собак (діагностика та лікування).**
– Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 211 – Ветеринарна медицина (21 – Ветеринарна медицина). Заклад вищої освіти «Подільський державний університет». Кам'янець-Подільський, 2025 рік.

У дисертації теоретично узагальнено та експериментально вирішено наукову проблему щодо трансмісивних інвазій собак, їх діагностики та лікування на території Вінницької, Хмельницької та Чернівецької областей України.

Встановлено, що середня екстенсивність та інтенсивність зараження трансмісивними збудниками у собак варіювали залежно від регіону. Зокрема, за результатами дослідження зразків крові 1662 собак із Вінницької, Хмельницької та Чернівецької областей, найвища поширеність *Babesia* spp. зафіксована у Вінницькій області (24,5 %), у Хмельницькій – 23,7 %, а в Чернівецькій – 16,5 %. *Dirofilaria* spp. та *Borrelia* spp. найчастіше виявляли у Хмельницькій області – 7,6 % і 9,7 % відповідно. Збудник *Neoehrlichia mikurensis* виявлено виключно у Вінницькій області (0,65 %), тоді як *Anaplasma phagocytophilum* не було зафіксовано в жодному зразку.

З'ясовано особливості перебігу коінвазій у собак. У 3,6 % тварин встановлено коінвазію *Babesia* spp. та *Borrelia* spp., яка супроводжувалася поліорганною недостатністю, що свідчить про ускладнений клінічний перебіг інфекцій.

З'ясовано особливості динаміки ураження залежно від статі, віку та породи собак. Статевий аналіз показав переважання самців серед інвазованих тварин: за дирофіляріозу – 69 %, бабезіозу – 52 %, бореліозу – 58 %. Найвразливішою віковою групою були собаки віком від 3 до 7 років. Породний аналіз виявив вищу схильність до трансмісивних інвазій серед робочих і мисливських порід

(вівчарки, лайки, ретривери) порівняно з декоративними (пуделі, болонки, такси).

Встановлено, що клінічні прояви захворювань значною мірою залежали від виду збудника. Дирофіляріоз проявлявся хронічним кашлем, задишкою, схудненням та швидкою втомлюваністю. Бабезіоз характеризувався лихоманкою, жовтяницею, темною сечею та анемією. У випадках бореліозу спостерігалися млявість, періодична лихоманка, ураження суглобів і кульгавість. Неоерліхіоз, хоч і рідко зустрічався, супроводжувався гарячкою, депресією та лімфаденопатією.

Для молекулярної ідентифікації та генотипування *Dirofilaria repens* досліджено та визначено ефективність ампліфікації трьох видоспецифічних генетичних маркерів: фрагмента гена *COI* (1650 п.о.), *NADH* (516 п.о.) та ділянки *ITS-1* рибосомної ДНК (800 п.о.). Праймери для мітохондріальних генів були сконструйовані на основі повного мітохондріального геному *D. repens* (KX265047), що забезпечило високу специфічність ампліфікації.

Отримано нові дані, які підтверджують видовий статус усіх зразків як *D. repens*, що засвідчує високу специфічність обраних молекулярних маркерів. Секвеновані ПЛР-продукти збережено в базі GenBank. Аналіз нуклеотидних послідовностей виявив 97–100 % ідентичність із ізолятами з Хорватії (KX265049), Італії (KX265048) та Угорщини (KX265091), що підтверджує високу генетичну подібність паразита незалежно від географічного походження та виду-господаря.

Встановлено наявність чотирьох гаплотипів *D. repens* серед проаналізованих зразків, з яких перший гаплотип було ідентифіковано у двох випадках, тоді як решта гаплотипів відрізнялися від нього на один–п'ять нуклеотидів. Аналіз ділянки *ITS-1* (547 п. о.) дозволив виявити два чітко розмежовані гаплотипи – А та В, що відрізнялися тринуклеотидною делецією на позиції 1897 п. о. референсного геному (GenBank AB973229).

Проведено порівняльну оцінку філогенетичних зв'язків між зразками *D. repens* з використанням різних еволюційних моделей. Побудоване за методом

максимальної правдоподібності дерево для першого фрагмента гена *COI* за 3-параметричною моделлю Тамури мало логарифмічну правдоподібність $-764,03$. Аналіз другого фрагмента *COI* за моделлю Тамура-Нея дав значення $-878,31$, а дерево для гена *NADH* ($-649,18$).

З'ясовано особливості генетичної структури популяції *D. repens*, що вказують на низький рівень гаплотипної різноманітності та високу стабільність геному паразита в різних географічних умовах. Ці результати підкреслюють ефективність застосованих молекулярно-генетичних підходів для точного виявлення та порівняння ізолятів *D. repens*.

Встановлено, що ДНК *Babesia canis* виявлено у 357 із 1662 досліджених собак (21,5 %), з яких 82 % мали виражену клінічну симптоматику, тоді як 3,8 % залишалися безсимптомними носіями. Дослідження охоплювало тварин із Хмельницької, Вінницької та Чернівецької областей, що свідчить про значну поширеність бабезіозу в регіонах дослідження ($p < 0,001$).

З'ясовано особливості динаміки вікового розподілу інвазованих собак, серед яких переважали тварини віком 4–8 років (67 %), у межах загального вікового діапазону від 2 до 10 років. Це свідчить про підвищений ризик зараження у дорослих активних собак.

Клінічні прояви бабезіозу включали лихоманку (вище 40 °C), апатію, гематурію, іктеричність слизових оболонок, гепатоспленомегалію, тахікардію та тахіпноє, тоді як безсимптомні носії становили епізоотологічну загрозу, зумовлюючи необхідність раннього молекулярного скринінгу.

Секвенування 19 ампліконів ДНК підтвердило 99,4–100 % ідентичність із відомими ізолятами *B. canis*, зокрема зразками, отриманими від собак і червоних лисиць (GenBank: MN134074, MN173223, MN704759). Це вказує на циркуляцію споріднених генотипів серед різних видів-господарів.

Отримано нові дані щодо генетичної структури *B. canis*, зокрема, виявлено наявність паралогів 18S рДНК з подвійними піками в критичних позиціях (609–610 п. о.), що свідчить про генетичну неоднорідність популяцій паразита. У двох

зразках виявлено генотип А, у восьми — генотип В, тоді як решта демонстрували змішані профілі.

Проведено філогенетичний аналіз із використанням MEGA X, який показав близькість ізолюваних зразків до ізолятів із Вінницької та Хмельницької областей, а також генетичну віддаленість від ізоляту, отриманого з території Чорнобильської зони, що свідчить про регіональні особливості циркуляції збудника.

Проведено порівняльну оцінку серологічного та мікроскопічного дослідження на дирофіляріоз у 192 собак різного віку (1–14 років), статі та порід з Хмельницької та Вінницької областей. Антиген *D. immitis* було виявлено у 7,3 % собак за допомогою стандартного імунохроматографічного тесту, тоді як після термічної обробки зразків крові цей показник зріс до 25,5 %, що свідчить про покращення чутливості методу за умов попередньої денатурації білків.

Досліджено та визначено наявність мікрофілярій у 21,7 % собак методом Кнотта, серед яких *D. immitis* виявлено у 9 тварин, *D. repens* — у 14, а коінвазію обома видами — у 5 собак. Усі зразки з позитивними результатами мікроскопії були підтверджені методом ПЛР, що засвідчує надійність молекулярної верифікації при встановленні виду збудника.

Отримано нові дані щодо ефективності комплексного підходу до діагностики дирофіляріозу, який включає поєднання імунохроматографічного аналізу, мікроскопії та ПЛР. Результати демонструють важливість використання декількох методів водночас для виявлення як клінічно виражених, так і латентних форм інвазії, зокрема за наявності коінвазій.

З'ясовано особливості клінічного перебігу дирофіляріозу залежно від виду збудника: інвазія *D. immitis* супроводжувалася кашлем, задишкою та ознаками серцевої недостатності, тоді як *D. repens* викликала шкірні ураження, свербіж і збільшення периферичних лімфатичних вузлів. Коінвазовані тварини демонстрували поєднання кардіореспіраторної та дерматологічної симптоматики.

Досліджено та визначено морфометричні характеристики мікрофілярій і їх кількісний вміст у крові. Мікроскопічний аналіз показав, що кількість мікрофілярій варіювала в межах 120–2400 ос./мл для *D. immitis* та 10–870 ос./мл для *D. repens*. Середня довжина мікрофілярій *D. immitis* становила $310,2 \pm 6,9$ мкм, ширина — $5,10 \pm 1,68$ мкм, тоді як для *D. repens* ці показники дорівнювали $360,12 \pm 2,82$ мкм та $7,85 \pm 1,23$ мкм відповідно.

Отримано нові дані, які підтверджують високу ефективність попередньої термічної обробки зразків крові для підвищення чутливості серологічної діагностики та виявлення прихованих випадків інвазії, що залишаються недоступними при стандартному тестуванні.

Проведено порівняльну оцінку гематологічних змін у 248 собак. *D. repens* було виявлено у 32 тварин (12,9 %), що свідчить про значне поширення інвазії в Хмельницькій та Вінницькій областях. У цих тварин зафіксовано зниження рівнів лімфоцитів, еритроцитів, гематокриту ($p < 0,001$) і тромбоцитів ($p < 0,01$), що вказує на розвиток анемії та порушення системи коагуляції. Підвищення рівнів лужної фосфатази та креатиніну ($p < 0,01$) свідчило про ураження функції печінки та нирок.

З'ясовано особливості змін крові у собак, інвазованих *D. immitis* (19 випадків), серед яких відмічено анемію (63,2 %), лейкоцитоз (47,4 %), еозинофілію (31,6 %), базофілію (36,8 %) та зниження рівня гемоглобіну (52,6 %). Біохімічний профіль показав підвищення активності аспартатамінотрансферази (15,8 %), аланінамінотрансферази (26,3 %), загального білка (42,1 %) і сечовини (21 %), що є свідченням ураження печінки, нирок і м'язової тканини при хронічному перебігу інвазії.

Встановлено, що лімфопенія мала місце у 73,7 % собак, інвазованих *D. immitis*, що відображає негативний вплив паразитарної інвазії на імунну систему. У 31,6 % тварин зафіксовано регенерацію еритроцитів як компенсаторну реакцію на анемію. Тромбоцитопенія виявлена у 26,3 % випадків і, ймовірно, пов'язана з підвищеним використанням тромбоцитів у процесах коагуляції. Отримані

результати підкреслюють необхідність урахування гематологічних і біохімічних змін під час діагностики та лікування собак з дирофіляріозом.

З'ясовано особливості рентгенологічних змін у собак з дирофіляріозом, спричиненим *D. immitis*, відповідно до стадії захворювання. Виявлено чіткий зв'язок між важкістю інвазії та вираженістю уражень у легеневій та серцево-судинній системах. Основними ознаками були розширення, звивистість і структурні зміни легневих артерій, дилатація судин, що характерно для проліферативного ендартеріїту, а також ущільнення паренхіми легень, інтерстиціальні зміни й утворення, схожі на новоутворення.

Встановлено, що на ранніх стадіях захворювання спостерігалось лише помірне розширення легневих артерій, тоді як у середніх та тяжких випадках відзначали значне погіршення судинного малюнка, дилатацію правого шлуночка і розвиток легеневої гіпертензії. Найбільш виражені зміни виявлено в ділянці правої легеневої артерії, діаметр якої перевищував ширину ребра в 3–6 разів.

Отримано нові дані щодо рентгенологічної картини прогресуючого дирофіляріозу, яка включала збільшення серцевого силуету, наявність плеврального випоту, розширення правої легеневої артерії, а також утворення, схожі на пухлинні маси. Накопичення плевральної рідини в тяжких випадках ускладнювало інтерпретацію знімків. Це підтверджує високу діагностичну цінність рентгенографії для оцінки стадії інвазії та вибору лікувальної тактики.

Проведено порівняльну оцінку видової структури та щільності популяцій комарів – потенційних переносників дирофіляріозу у Вінницькій та Хмельницькій областях протягом 2022–2023 років. Загалом було зібрано 3750 особин, серед яких переважали *Aedes* spp. (45,1 %), *Culex* spp. (37,5 %) і *Anopheles* spp. (17,4 %). У міських районах щільність популяцій комарів була у 4,5 раза вищою, ніж у приміських зонах.

Досліджено та визначено просторову структуру розподілу комарів у різних типах середовищ. Найбільшу кількість особин виявлено у Вінниці (1506 екземплярів) та в с. Мукша Китайгородська (1364 екземпляри), що пов'язано з наявністю штучних водойм. У міських умовах *Aedes* spp. становили 31,4 % від

усієї кількості комарів і концентрувалися біля декоративних ставків та каналізаційних люків. *Culex* spp. (30,3 %) були найпоширенішими у міських парках і навколо озер, а *Anopheles* spp. (14,8 %) переважно зустрічалися поблизу природних водойм. У приміських районах чисельність усіх трьох родів була значно нижчою через відсутність сприятливих умов для розмноження.

З'ясовано особливості сезонної динаміки чисельності комарів, яка характеризувалася піковою активністю у літній період (червень–серпень), на який припадало 62 % усієї зібраної популяції. У весняно-осінній період (травень–жовтень) активність знижувалася до 15 %, що пов'язано зі зменшенням температури повітря та вологості.

Проведено порівняльну оцінку впливу середовищних чинників на поширення комарів, згідно з якою наявність відкритих або штучних водойм, вологість, температура, а також ефект «теплових островів» у містах зумовлювали підвищення чисельності комах на 20 % порівняно з приміськими територіями. Крім того, присутність домашніх тварин забезпечувала додаткові джерела живлення для комарів, сприяючи їх локальному накопиченню. Отримані результати є важливими для планування заходів епізоотологічного нагляду і контролю.

Молекулярно-генетичне дослідження зараженості комарів *D. repens* та *D. immitis* проводилося на основі аналізу 3750 особин, які були об'єднані у 75 проб по 50 комарів одного виду з одного місця відлову. У 6 пробах (8 %) виявлено ДНК *Dirofilaria* spp., з яких усі були позитивними на *D. repens*, а 4 проби (5,3 %) також містили ДНК *D. immitis*.

Отримано нові дані, які підтверджують 98–100 % гомологію секвенованих ПЛР-продуктів з референтними послідовностями *D. repens*, а також 96–99 % гомологію з послідовностями *D. immitis*. Позитивні проби належали до комарів родів *Aedes* spp. та *Culex* spp., що підтверджує їхню роль як потенційних переносників дирофіліаріозу в межах України. Це вказує на наявність регіональних природних резервуарів інвазії та підвищений ризик її поширення в досліджених областях.

Встановлено доцільність подальшого епізоотологічного моніторингу й контролю популяцій комарів, які виступають біологічними переносниками, з метою зниження ризику передачі дирофілярій серед тварин і людей.

Проведено порівняльну оцінку ефективності та безпечності терапевтичних схем лікування за дирофіляріозу у собак на основі дослідження 12 тварин, розподілених на контрольну та дослідну групи по 6 особин кожна. З'ясовано, що в контрольній групі застосовували стандартну схему з дворазовим введенням меларсоміну (2,5 мг/кг на 60-й та 90-й дні), тоді як у дослідній групі використовували розширену схему з трьома ін'єкціями (60-й, 90-й та 91-й дні), а також супутню терапію доксицикліном, глюкокортикоїдами та засобами для профілактики тромбоемболічних ускладнень. Це дозволило знизити ризик ускладнень та покращити клінічні результати у собак із тяжким перебігом інвазії.

З'ясовано гематологічні зміни у собак з дирофіляріозом, які включали анемію (66,7 %), підвищення рівня лейкоцитів (41,7 %), еозинофілію (33,3 %), базофілію (25 %) та знижений рівень гемоглобіну (58,3 %). Біохімічний аналіз крові показав підвищення активності аспартатамінотрансферази (16,7 %), аланінамінотрансферази (25 %), загального білка (41,7 %) та сечовини (16,7 %), що свідчить про порушення функції печінки, нирок і м'язової тканини на тлі хронічної інвазії.

Проведено порівняльну оцінку побічних реакцій у контрольній та дослідній групах під час лікування. У дослідній групі побічні ефекти обмежувалися помірною діареєю (33,3 %) та періодичною анорексією (16,7 %), які зникали без медикаментозного втручання. У контрольній групі негативні реакції були вираженішими: у 67 % собак відзначали блювоту, діарею та анорексію. Місцеві реакції у вигляді набряку та болючості в місці ін'єкції спостерігалися у 4 собак у контрольній групі та у 2 собак у дослідній, де вони мали легший перебіг.

Отримано нові дані щодо безпечності застосування моксидектину: анафілактичних реакцій у жодній із груп не зафіксовано, хоча у двох собак дослідної групи відзначалися розлади травлення, усунені шляхом зниження дози

доксидикліну. Для профілактики тромбоемболії та зменшення побічних ефектів у дослідній групі додатково застосовували клопидогрель (Атерокард, АТ Київський вітамінний завод), фамотидин (Квамател, Гедеон Ріхтер) або омепразол (Омепразол-Тева, Тева Фарма) і пробіотики, що дозволило зменшити частоту ускладнень.

Аналіз ефективності лікування через чотири місяці показав відсутність мікрофілярій у всіх собак дослідної групи (метод Кнотта), тоді як у контрольній групі один собака залишався позитивним, що потребувало повторного курсу терапії. Через дев'ять місяців антигенний тест був негативним у всіх тварин, однак у контрольній групі частіше спостерігалися клінічні ускладнення й залишкові побічні ефекти.

Встановлено, що розширена схема лікування з триразовим введенням меларсоміну в комбінації з доксицикліном, глюкокортикоїдами та супутньою терапією була ефективнішою та безпечнішою порівняно зі стандартною. Рекомендовано впроваджувати комплексний підхід до лікування дирофіляріозу у собак для зменшення ризику ускладнень та підвищення успішності терапії.

Ключові слова: собаки, паразити, нематоди, гельмінти, трансмісивні хвороби, дирофіляріоз, бабезіоз, *Dirofilaria immitis*, *Dirofilaria repens*, діагностика, молекулярно-генетичні дослідження, ПЛР, гематологічні зміни, лікування, ксеномоніторинг, комарі, етіологія, лікування, епізоотичний моніторинг.

ABSTRACT

Poliukhovych V.I. Vector-borne diseases in dogs (diagnosis and treatment).
– Qualifying scientific work copyright.

Dissertation for the degree of Doctor of Philosophy in the specialty 211 – Veterinary Medicine (21 – Veterinary Medicine). Higher educational institution Podillia State University. Kamianets-Podilskyi, 2025.

The examination of blood samples from 1,662 dogs in the Vinnytsia, Khmelnytskyi, and Chernivtsi regions revealed the presence of four major causative

agents of transmissible invasions: *Dirofilaria spp.*, *Babesia spp.*, *Borrelia spp.*, and *Neoehrlichia micurensis*. The highest prevalence of *Babesia spp.* was recorded in the Vinnytsia region (24.5 %), while in the Khmelnytskyi and Chernivtsi regions, it was 23.7 % and 16.5 %, respectively. *Dirofilaria spp.* was most commonly diagnosed in the Khmelnytskyi region (7.6 %), whereas *Borrelia spp.* was more prevalent in the same region (9.7 %). Cases of *Neoehrlichia micurensis* were detected only in the Vinnytsia region (0.6 %), while *Anaplasma phagocytophilum* was not found in any of the examined samples, indicating a low prevalence of this pathogen in the selected regions.

The gender analysis revealed that infected male dogs predominated: specifically, they accounted for 69 % of *Dirofilaria spp.* cases, 52 % of *Babesia spp.*, and 58 % of *Borrelia spp.* infections. Age analysis showed that the most vulnerable group was dogs aged 3 to 7 years, which may be due to prolonged exposure to risk factors such as living in endemic areas and contact with infection vectors. Breed analysis indicated a higher susceptibility to transmissible invasions among working and hunting dog breeds (shepherds, Laikas, retrievers), whereas decorative breeds (poodles, Bolognese, dachshunds) were less prone to infection.

Clinical symptoms varied depending on the pathogen. *Dirofilariasis* was characterized by chronic cough, dyspnea, weight loss, and fatigue. *Babesiosis* presented with fever, jaundice, dark urine, and anemia. *Borreliosis* manifested as lethargy, periodic fever, joint damage, and lameness. Although rarely diagnosed, *neoehrlichiosis* caused fever, depression, and lymph node enlargement. A co-infection of *Babesia spp.* and *Borrelia spp.* (3.6 %) was registered, accompanied by multi-organ failure.

Infected dogs were predominantly aged 4–8 years and of medium to large size, indicating a correlation between infection susceptibility and age or immunological status. For molecular identification and genotyping of *Dirofilaria repens*, three species-specific genetic markers were used: COI (1650 bp), NADH (516 bp), and ITS-1 (800 bp). The primers for mitochondrial markers were developed based on the complete mitochondrial genome of *D. repens* (KX265047).

PCR product sequencing confirmed the species identity of all samples as *D. repens*, demonstrating the high specificity of the selected markers. The obtained nucleotide sequences were deposited in the GenBank database. The study confirmed that all tested markers provide accurate identification of *D. repens*, highlighting their reliability for diagnostic purposes.

The genetic polymorphism analysis of *D. repens* based on mitochondrial DNA (COI, NADH) and ribosomal DNA (ITS-1) identified four haplotypes among five analyzed samples. Haplotype DR1 was detected in two samples, while the remaining haplotypes differed by 1 to 5 nucleotides. The ITS-1 sequence analysis (547 bp) identified two distinct haplotypes (A and B), differing by a trinucleotide deletion at position 1897 bp of the reference genome (GenBank AB973229).

Evolutionary analysis of the first COI gene fragment was conducted using the maximum likelihood method based on the Tamura 3-parameter model, resulting in a phylogenetic tree with the highest log-likelihood value (−764.03). The second COI gene fragment was analyzed using the Tamura-Nei model, producing a tree with a log-likelihood of −878.31. A similar approach was applied to the NADH gene fragment, yielding a tree with high log-likelihood (−649.18).

For sequence analysis and phylogenetic visualization, MEGA X and DnaSP software were used. The initial tree was built using Neighbor-Join and BioNJ algorithms based on pairwise distances calculated according to the Tamura and Tamura-Nei models.

The results indicate a low level of haplotype diversity among *D. repens* samples and suggest a high degree of genomic stability across different geographic regions.

Molecular-genetic analysis of *Babesia canis* identified parasite DNA in 357 of 1662 tested dogs (21.5 %), with 82 % showing clinical symptoms and 3.8 % being asymptomatic carriers. The affected dogs were primarily from Khmelnytskyi and Chernivtsi regions, confirming a significant prevalence of babesiosis in these areas ($p < 0.001$). Dogs aged 4–8 years accounted for the highest infection rate (67 %).

Clinical signs of babesiosis included fever (up to 40°C), lethargy, hemoglobinuria, jaundice of mucous membranes, hepatomegaly, splenomegaly, tachycardia, and tachypnea. Sequencing of 19 DNA amplicons confirmed 99.4–100 % identity with known *B. canis* isolates from dogs and red foxes (GenBank: MN134074, MN173223, MN704759).

The serological and microscopic examination of 192 dogs revealed *D. immitis* antigen in 7.3 % of samples using a standard test, increasing to 25.5 % after thermal processing. The Knott's test detected microfilariae in 21.7 % of dogs: *D. immitis* in 9 cases, *D. repens* in 14, and co-infection in 5 dogs, confirmed by PCR.

The clinical signs of dirofilariasis varied depending on the causative agent: *Dirofilaria immitis* infection manifested with symptoms such as coughing, dyspnea, and signs of heart failure, while *Dirofilaria repens* infection was associated with skin lesions, pruritus, and lymph node enlargement. Coinfected dogs exhibited a combination of cardiorespiratory and dermatological symptoms.

Microscopic examination revealed that the microfilariae concentration in blood ranged from 120 to 2400 mf/ml for *D. immitis* and from 10 to 870 mf/ml for *D. repens*. The average length and width of *D. immitis* microfilariae were $310.2 \pm 6.9 \mu\text{m}$ and $5.10 \pm 1.68 \mu\text{m}$, respectively, while for *D. repens*, they measured $360.12 \pm 2.82 \mu\text{m}$ and $7.85 \pm 1.23 \mu\text{m}$.

The findings highlight the high efficiency of thermal treatment of blood samples in increasing the sensitivity of serological diagnostics and detecting hidden cases of infection.

Hematological analysis of 248 dogs revealed *D. repens* infection in 32 animals (12.9 %), indicating a significant prevalence in the Khmelnytskyi and Vinnytsia regions. Dogs infected with *D. repens* showed significant changes in hematological parameters, including a decrease in lymphocytes, erythrocytes, hematocrit ($p < 0.001$), and platelets ($p < 0.01$), indicating anemia and coagulation disorders. Elevated levels of alkaline phosphatase and creatinine ($p < 0.01$) suggested potential kidney and liver dysfunction.

Dogs infected with *D. immitis* (19 cases) showed marked hematological abnormalities, including anemia (63.2 %), leukocytosis (47.4 %), eosinophilia (31.6 %), basophilia (36.8 %), and reduced hemoglobin levels (52.6 %). Biochemical analysis indicated elevated levels of aspartate aminotransferase (15.8 %), alanine aminotransferase (26.3 %), total protein (42.1 %), and urea (21 %), reflecting liver, kidney, and muscle damage associated with chronic infection.

Lymphopenia was recorded in 73.7 % of dogs, confirming the immunosuppressive effects of the infection. Erythrocyte regeneration was observed in 31.6 % of animals, indicating a compensatory response to anemia. Thrombocytopenia was detected in 26.3 % of dogs, likely due to increased platelet consumption in coagulation processes. These results underline the significant impact of dirofilariasis on the hematological and biochemical status of infected dogs, which must be considered in diagnostics and treatment planning.

Radiological examination of dogs infected with *D. immitis* revealed a clear correlation between disease severity and radiographic changes in the pulmonary and cardiovascular systems. Key diagnostic indicators included enlargement, tortuosity, and structural changes of the pulmonary arteries, along with vessel dilation indicative of proliferative endarteritis. Pulmonary parenchymal lesions were characterized by interstitial changes, tissue consolidation, and possible neoplastic-like formations resulting from inflammatory responses to parasitic invasion.

Early-stage infections were associated with mild pulmonary artery dilation, whereas moderate and severe cases exhibited pronounced vascular blurring, right ventricular enlargement, and the development of pulmonary hypertension. The most severe changes were observed in the right pulmonary artery, with diameters exceeding rib width by 3 to 6 times.

Additionally, cardiac silhouette enlargement, pleural effusion, and alterations in the right pulmonary artery were observed as typical signs of progressive dirofilariasis. In severe cases, mass-like formations and pleural effusion were noted, complicating diagnosis. The obtained results confirm the high diagnostic value of

radiography in assessing the stage of dirofilariasis and planning further treatment strategies for infected dogs.

During 2022–2023, mosquito collection was conducted in Vinnytsia and Khmelnytskyi regions to study species diversity, abundance, and spatial distribution of dirofilariasis vectors. A total of 3,750 mosquitoes were collected, with *Aedes spp.* (45.1 %), *Culex spp.* (37.5 %), and *Anopheles spp.* (17.4 %) being the predominant species. Analysis indicated significantly higher mosquito density in urban areas compared to suburban regions—4.5 times higher. The highest number of mosquitoes was recorded in Vinnytsia (1,506 specimens) and the village of Muksha Kitaygorodska (1,364 specimens), which was attributed to the presence of artificial water bodies conducive to mosquito breeding.

In urban areas, *Aedes spp.* accounted for 31.4 % of the total mosquito population and were predominantly found near decorative ponds and sewer drains. *Culex spp.* (30.3 %) were commonly found in urban parks and near lakes, while *Anopheles spp.* (14.8 %) were more frequently encountered near natural water bodies. In suburban areas, their population density was significantly lower due to the limited availability of suitable breeding habitats.

Seasonal population dynamics revealed peak mosquito activity during the summer months (June–August), accounting for 62 % of the total collected specimens. Activity decreased to 15 % during the spring and autumn months (May–October), associated with lower temperatures and reduced humidity.

Environmental factors, including the availability of water bodies, temperature, and humidity, significantly influenced mosquito distribution and activity. In urban areas, the "heat island effect" contributed to a 20 % increase in mosquito populations compared to suburban zones, with the presence of domestic animals providing additional blood sources.

Molecular screening of mosquitoes for *D. repens* and *D. immitis* involved analyzing 3,750 specimens divided into 75 samples, each containing 50 mosquitoes of the same species from a single location. Six samples (8 %) tested positive

for *Dirofilaria spp.*, all confirmed to contain *D. repens*, while 4 samples (5.3 %) also contained *D. immitis* DNA.

Direct sequencing of PCR products confirmed 98–100 % homology with reference sequences of *D. repens* and 96–99 % with *D. immitis*. Positive samples were obtained from *Aedes spp.* and *Culex spp.*, confirming their role as potential vectors of dirofilariasis in Ukraine. These findings suggest the existence of regional natural reservoirs of dirofilariasis and the potential risk of its spread through mosquito populations.

The study on the effectiveness and safety of therapeutic protocols for canine dirofilariasis included 12 dogs, divided into control and experimental groups of 6 animals each. The dogs' ages ranged from 2 to 12 years, with body weights varying from 8 to 75 kg. The control group underwent the standard treatment regimen, which involved two injections of melarsomine at a dose of 2.5 mg/kg on days 60 and 90. The experimental group received an extended treatment regimen, consisting of three melarsomine injections (on days 60, 90, and 91), along with adjunctive therapy using doxycycline, glucocorticoids, and prophylactic measures to prevent complications.

Hematological changes observed during the study included anemia (66.7 % of dogs), increased leukocyte counts (41.7 %), peripheral eosinophilia (33.3 %), basophilia (25 %), and decreased hemoglobin levels (58.3 %). Biochemical analysis revealed elevated levels of aspartate aminotransferase (16.7 %), alanine aminotransferase (25 %), total protein (41.7 %), and urea (16.7 %), indicating liver, muscle, and kidney dysfunction due to chronic infestation.

During treatment, adverse effects in the experimental group were observed in the form of mild diarrhea (33.3 %) and periodic anorexia (16.7 %), which resolved without additional intervention. In the control group, adverse reactions were more pronounced: 67 % of dogs experienced vomiting, diarrhea, and anorexia, necessitating dosage adjustments. Local reactions, such as swelling and pain at the injection site, were observed in 4 dogs in the control group, compared to 2 dogs in the experimental group, where the reactions were less severe.

No anaphylactic reactions were recorded in either group during moxidectin therapy; however, two dogs in the experimental group experienced digestive disturbances, which were successfully managed by reducing the doxycycline dose. To prevent thromboembolism and reduce the risk of side effects, additional treatments such as atherocard, famotidine (kwamatel), or omeprazole, and probiotics were administered in the experimental group, significantly reducing complications.

The treatment outcomes assessed after four months revealed the absence of microfilariae in all dogs in the experimental group, as confirmed by the Knott's test, whereas one dog in the control group remained positive and required additional therapy. After nine months, antigen tests were negative in all dogs; however, the control group exhibited more frequent clinical complications and adverse effects, indicating the lower efficacy and safety of the standard treatment approach.

The obtained results confirm that the extended treatment protocol, involving three doses of melarsomine combined with doxycycline, glucocorticoids, and prophylactic agents, is more effective and safer compared to the standard therapy. A comprehensive approach is recommended to minimize complications and improve the success of dirofilariasis treatment in dogs.

Keywords: dogs, parasites, nematodes, helminths, vector-borne diseases, dirofilariasis, babesiosis, *Dirofilaria immitis*, *Dirofilaria repens*, diagnostics, molecular-genetic studies, PCR, hematological changes, treatment, xenomonitoring, mosquitoes, etiology, therapy, epizootic monitoring.

СПИСОК ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Статті у закордонних виданнях, проіндексованих у базах даних Web of Science Core Collection та/або Scopus:

1. 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 *D. repens* in sled dog kennels from the Baltic countries. *Scientific reports*, 11(1), 1068. (Здобувач виконав систематизацію епізоотичних та епідеміологічних даних, провів молекулярні дослідження, математичну, статистичну обробку даних, узагальнення результатів, підготував матеріали до друку).
2. Bajer, A., Kowalec, M., Levytska, V. A., Mierzejewska, E. J., Alsarraf, M., **Poliukhovych, V.**, Rodo, A., Wężyk, D., & Dwużnik-Szarek, D. (2022). Tick-Borne Pathogens, *Babesia* spp. and *Borrelia burgdorferi* s.l., in Sled and Companion Dogs from Central and North-Eastern Europe. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, 11(5), 499. (Здобувач провів збір матеріалу для досліджень, молекулярно-генетичні дослідження, аналіз та узагальнення даних, підготував матеріали до друку).

Статті у наукових фахових виданнях України:

3. **Полюхович В. І.** (2024). Ксеномоніторингові дослідження комарів за дирофіляріозу. *Вісник Сумського національного аграрного університету. Серія: Ветеринарна медицина*, (1(64), 53-57. (Дисертант провів польові дослідження зі збору комарів, ідентифікував їхню родову та видову приналежність, визначив та порівняв індекси заселення різних біотопів, проаналізував та підготував матеріали до друку)
4. Левицька В. А., **Полюхович В. І.** (2024). Оцінка ефективності досліджень на антиген у діагностиці дирофіляріозу собак. *Scientific Progress &*

Innovations, 27(4), 171–175. (Дисертант провів порівняння серологічних методів дослідження у діагностиці захворювання, проаналізував дані і підготував матеріали до друку)

5. Левицька В. А., **Полюхович В. І.** (2024). Оцінка ефективності та безпечності терапевтичних схем лікування за дирофіляріозу у собак. *НВ ЛНУ ветеринарної медицини та біотехнологій. Серія: Ветеринарні науки*, 26(116), 101-108. (Здобувач проаналізував особливості прояву захворювання у собак, приймав участь у встановленні діагнозу і лікуванні, науково обґрунтував результати, підготував матеріали до друку).

Матеріали і тези наукових конференцій та інші наукові видання, які додатково відображають наукові результати дисертації:

6. Левицька В., Альсараф М., Мушинський А., **Полюхович В.**, Байєр А. Моніторинг і контроль дирофіляріозу собак в Україні. *Міжнародний симпозіум зі зменшення біологічної загрози (IBTRS)*, 29 травня – 2 червня 2021 року, Київ, 2021. (Дисертант виконав науково-теоретичний аналіз сучасних підходів до моніторингу та контролю дирофіляріозу собак в Україні, підготував матеріали до друку).
7. **Полюхович В.І.**, Левицька В.А. Діагностика і лікування дирофіляріозу собак. *Матеріали VIII Міжнародної наукової конференції студентської та учнівської молоді «Стан та перспективи виробництва, переробки і використання продукції тваринництва»*, 23 листопада 2021 року, Кам'янець-Подільський, 2021. (Здобувач приймав участь у проведенні досліджень з діагностики та лікування дирофіляріозу собак, підготував матеріали до друку).
8. **Полюхович В.І.**, Левицька В.А. Ксеномоніторинг комарів як інструмент для виявлення *Dirofilaria spp* в Україні. *Збірник матеріалів Міжнародної науково-практичної конференції «Зміна клімату та її наслідки для*

тваринництва і ветеринарної медицини: наукові підходи та інноваційні рішення», 10-11 жовтня 2024 року, Одеса: ІКОСГ НААН, 2024. (Здобувач виконав ксеномоніторингові дослідження комарів, проаналізував та узагальнив отримані результати, підготував матеріали до друку).

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СКОРОЧЕНЬ.....	23
ВСТУП.....	24
РОЗДІЛ 1	
ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	31
1.1 Біологічна характеристика збудників трансмісивних інвазій собак	31
1.2 Епізоотична ситуація щодо дирофіляріозу собак.....	36
1.3 Патогенез та цикл розвитку збудників.....	40
1.4 Лабораторна діагностика за трансмісивних інвазій собак	44
1.5 Лікувальні заходи за трансмісивних інвазій собак	54
Висновок до Розділу 1.....	56
РОЗДІЛ 2	
ЗАГАЛЬНА МЕТОДИКА ТА ОСНОВНІ МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ.	58
РОЗДІЛ 3	
РЕЗУЛЬТАТИ ВЛАСНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	72
3.1 Молекулярний скринінг собак на трансмісивні інвазії.....	71
3.1.1 Молекулярно-генетична ідентифікація <i>Dirofilaria repens</i>	74
3.1.2 Генетичний поліморфізм та гаплотипи мтДНК (COI, NADH) та рДНК (ITS-1) <i>Dirofilaria repens</i>	76
3.1.3 Молекулярно-генетичний аналіз збудника бабезіозу.....	88
3.2 Результати серологічного та мікроскопічного дослідження на дирофіляріоз у собак.....	95
3.3 Гематологічні дослідження собак інвазованих <i>Dirofilaria repens</i> і <i>Dirofilaria immitis</i>	97
3.4 Рентгенологічні дослідження собак за ураження <i>Dirofilaria immitis</i>	100
3.5 Ксеномоніторингові дослідження комарів за дирофіляріозу.....	106
3.6 Оцінка ефективності та безпечності терапевтичних схем лікування за дирофіляріозу у собак.....	115

РОЗДІЛ 4

АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	124
ВИСНОВКИ.....	149
ПРОПОЗИЦІЇ ВИРОБНИЦТВУ.....	152
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	153
ДОДАТКИ.....	177

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СКОРОЧЕНЬ

АлАТ – аланінамінотрансфераза

АсАТ – аспартатамінотрансфераза

Г/л – гіга на літр (10^9 /літр)

ДНК – дезоксирибонуклеїнова кислота

ЕІ – екстенсивність інвазії

ІХА – імунохроматографічний аналіз

мг/кг – міліграм на кілограм

Мг/л – міліграм на літр

Мкм – мікромметр

Мкмоль/л – мікромоль на літр

Ммоль/л – мілімоль на літр

Од/л – одиниця на літр

П.о. – пар основ нуклеотидів

ПЛР – полімеразна ланцюгова реакція

Т/л – тера на літр (10^{12} /літр)

ELISA – імуноферментний аналіз

ВСТУП

Обґрунтування вибору теми дослідження. Векторні (трансмисивні) захворювання, які передаються членистоногими переносниками, становлять серйозну загрозу як для ветеринарної медицини, так і для охорони здоров'я людини [1–3]. Ці хвороби поширюються через кліщів та комарів, які не лише є переносниками інвазійних та паразитарних агентів, а й активно впливають на епізоотологічні процеси. Інвазії, викликані цими переносниками, можуть проявлятися у собак у різних клінічних формах – від безсимптомних до важких станів, що потребують термінового лікування. Зоонозний потенціал таких захворювань є ще однією важливою проблемою, оскільки деякі з них можуть передаватися від тварин до людини, створюючи додаткові виклики для громадського здоров'я [4–6]. Поширеність і рівень захворюваності залежать від регіональних особливостей, включно з екологічними, соціальними та біологічними факторами, такими як кліматичні умови, поширення переносників, а також поведінка людей і тварин.

Трансмисивні хвороби тварин, такі як дирофіляріоз, бабезіоз, анаплазмоз, ерліхіоз та бореліоз, стають серйозною проблемою в сучасній ветеринарній медицині і мають значний вплив на здоров'я тварин, людей та економіку. Їхнє поширення пов'язане з глобалізацією, кліматичними змінами та розширенням ареалів переносників, зокрема комарів і кліщів [7,8]. Ці хвороби вражають як домашніх, так і диких тварин, а деякі з них є зоонозами, що робить їх особливо актуальними в контексті підходу «Єдине здоров'я». Загалом, зміни клімату та урбанізація сприяють зростанню популяції переносників, що впливає на поширення цих хвороб. У країнах Східної Європи, таких як Україна, ветеринарні лікарі все частіше стикаються зі збільшенням кількості випадків даних захворювань [9]. Для ефективного контролю цих хвороб важливими є рання діагностика, зокрема за допомогою ПЛР, серологічних тестів та профілактичні заходи. Таким

чином, ці захворювання потребують спільних зусиль ветеринарних лікарів, епізоотологів та вчених, щоб мінімізувати їх вплив на здоров'я тварин і людей, що є важливим у контексті підходу «Єдине здоров'я» [10,11].

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами, грантами. Дисертаційна робота є частиною науково-дослідних робіт кафедри інфекційних та інвазійних хвороб факультету ветеринарної медицини і технологій у тваринництві ЗВО «Подільський державний університет», зокрема робота виконувалась в межах науково-дослідних тем: «Епізоотологічний моніторинг, удосконалення діагностики, лікування та профілактики інфекційних та інвазійних хвороб тварин, у тому числі зоонозів в західному регіоні України», № держреєстрації 0121U113965.

Дослідження за темою дисертаційної роботи здійснювали також за підтримки відділу епідеміології паразитарних хвороб, Інституту біології розвитку та біомедичних наук, Біологічного факультету Варшавського університету.

Мета та завдання дослідження. *Метою роботи* було дослідити поширення трансмісивних хвороб, а саме дирофіляріозу та бабезіозу собак в західному регіоні України, визначити молекулярно-генетичні особливості збудників та розробити науково обґрунтовані методи діагностики і лікування.

Для досягнення мети необхідно було вирішити такі *задачі*:

- встановити поширення та видовий склад збудників трансмісивних інвазій у собак у Вінницькій, Хмельницькій та Чернівецькій областях.
- визначити особливості молекулярно-генетичної ідентифікації *Dirofilaria spp.*;
- охарактеризувати генетичну варіативність збудників *D. repens*;
- з'ясувати особливості коінвазування *Babesia spp.* у собак;
- удосконалити спосіб серологічного та мікроскопічного дослідження на дирофіляріоз у собак;

- проаналізувати гематологічні показники собак, інвазованих *D. repens* і *D. immitis*;
- визначити особливості рентгенологічних змін у собак за ураження *D. immitis*;
- провести апробацію ксеномоніторингових досліджень комарів та визначити їх ефективність;
- з'ясувати ефективність та безпечність терапевтичних схем лікування дирофіляріозу у собак.

Об'єкт дослідження – біологічні, молекулярно-генетичні та клінічні особливості дирофіляріозу і бабезіозу собак, з урахуванням поширення, генетичного поліморфізму збудників, діагностичних методів та ефективності лікування.

Предмет дослідження – поширення та видовий склад збудників трансмісивних інвазій у собак; молекулярно-генетична діагностика дирофіляріозу і бабезіозу собак; імунохроматографічні методи дослідження на дирофіляріоз; комарі родів *Aedes* spp., *Culex* spp., *Anopheles* spp., ефективність терапевтичних схем лікування.

Методи дослідження: паразитологічні (мікроскопічні), епізоотологічні (визначення екстенсивності інвазії), клінічні (збір анамнезу, клінічний огляд), гематологічні (морфологічні, біохімічні), молекулярно-генетичні (полімеразна ланцюгова реакція, секвенування, молекулярно-філогенетичний аналіз), серологічні (ІХА), методи популяційної генетики, статистичні.

Наукова новизна отриманих результатів. Отримано нові дані щодо поширення та видового складу збудників трансмісивних інвазій серед собак у Вінницькій, Хмельницькій та Чернівецькій областях України.

Уперше проведено комплексне дослідження поширення збудників трансмісивних інвазій серед собак у Вінницькій, Хмельницькій та

Чернівецькій областях, що дозволило встановити рівень інвазованості *Dirofilaria* spp. (6,4 %), *Babesia* spp. (21,5 %), *Borrelia* spp. (6,7 %) та *Neoehrlichia micurensis* (0,2 %). Найвищий рівень інвазованості спостерігався у Хмельницькому (41,1 %), тоді як у Вінниці та Чернівцях ці показники склали – 36,5 % та 27,4 % відповідно. Встановлено, що *Anaplasma phagocytophilum* не було виявлено в жодному із зразків, що свідчить про низьку поширеність цього збудника в досліджуваних регіонах. Проаналізовано випадки коінвазій *Babesia* spp. та *Borrelia* spp., що трапляються у 3,6 % досліджених собак і супроводжуються важкими клінічними проявами. Результати молекулярного аналізу *Babesia canis* засвідчили значну генетичну різноманітність збудника. Ідентифіковано два основних генотипи (А і В) із рівнем ідентичності 99,4–100 % із відомими європейськими ізолятами (GenBank MN134074, MN173223, MN704759). У 42,1 % зразків виявлено подвійні піки у послідовностях, що свідчить про можливу наявність змішаних генотипів паразита в організмах собак.

Уперше проведено комплексне дослідження поширеності та діагностики *D. immitis* і *D. repens* серед собак у Вінницькій та Хмельницькій областях із використанням серологічних, мікроскопічних і молекулярно-генетичних методів.

Уперше здійснено молекулярно-генетичну характеристику збудника *D. repens*, що дозволило ідентифікувати чотири унікальні гаплотипи мітохондріальної ДНК (COI, NADH) та два гаплотипи ITS-1 рДНК (GenBank ON540883-87, ON540060-64, ON572064, ON572107, ON572053, ON572106, ON572049). Встановлено, що рівень генетичної варіабельності популяцій *D. repens* є низьким – відмінності між гаплотипами становили 1–5 нуклеотидів. Нуклеотидні послідовності виявили високу ідентичність (97–100 %) із європейськими ізолятами.

Удосконалено методи діагностики дирофіляріозу на основі серологічного та молекулярного аналізу, що забезпечило високу специфічність і точність виявлення збудника. Встановлено, що при застосуванні експрес-тесту на антиген *D. immitis* чутливість діагностики значно підвищується після термічної обробки зразків. Уперше проведено порівняльний аналіз ефективності методу Кнотта та ПЛР для виявлення мікрофілярій у крові собак.

Вперше проведено ксеномоніторинг комарів для оцінки їхньої ролі як переносників *Dirofilaria* spp. у досліджуваних регіонах та визначено ефективність цього підходу для епізоотологічного нагляду.

Встановлено, що інвазовані собаки мали суттєві зміни у гематологічних та біохімічних показниках: рівень лімфоцитів знижувався в 2,3 рази ($p < 0,001$), еритроцитів – на 32 % ($p < 0,001$), а тромбоцитів – на 18 % ($p < 0,01$), що вказує на розвиток анемії та коагуляційних порушень.

Уперше проведено порівняльний аналіз гематологічних змін у собак, інвазованих *D. repens* та *D. immitis*. Встановлено, що анемія діагностувалася у 63,2 % собак із *D. immitis*, а лімфопенія – у 73,7 %. У собак із *D. repens* відзначено підвищення рівня лужної фосфатази ($p < 0,01$) та креатиніну ($p < 0,01$), що вказує на можливі ураження печінки та нирок.

Уперше проаналізовано рентгенологічні зміни у собак із дирофіляріозом, виявлено розширення та звивистість легеневих артерій у 78,9 % випадків, а у 36,8 % собак – виражену дилатацію серця. Встановлено чітку кореляцію між тяжкістю уражень та стадією хвороби, що є важливим для діагностики та планування терапії.

Уперше оцінено ефективність двох схем лікування дирофіляріозу у собак. Дослідні тварини, яким застосовували комплексну терапію (меларсомін, преднізолон, моксидектин), повністю позбулися мікрофілярій у 100 % випадків через 4 місяці, тоді як у контрольній групі інвазія зберігалася у 16,7 % собак.

Практичне значення отриманих результатів. Особливості, виявлені щодо поширення, діагностики та лікування дирофіляріозу серед собак, можуть бути використані на виробництві для розробки, планування та організації науково обґрунтованих діагностичних та лікувально-профілактичних заходів у ветеринарних клініках і підприємствах України.

Запропоновано генетичні маркери для проведення молекулярно-генетичних досліджень на дирофіляріоз і бабезіоз. Вдосконалено і запропоновано метод підготовки зразків крові для ІХА за дирофіляріозу. Розробка та впровадження удосконалених методів діагностики дирофіляріозу, включаючи серологічний та молекулярний аналіз, підвищують точність та специфічність виявлення збудників.

Вдосконалено схему лікування за дирофіляріозу.

Результати експериментальних досліджень використовуються у науково-дослідній роботі та в освітньому процесі вищих навчальних закладів за спеціальністю «Ветеринарна медицина», а також у ветеринарних клініках України.

Особистий внесок здобувача. Здобувач самостійно провів аналіз наукової літератури, сформулював плани наукових досліджень, розробив програми і календарні графіки, методи та схеми проведення дослідів. Брав безпосередню участь у проведенні експериментів, зокрема проводив відбір зразків крові, ізоляцію ДНК, молекулярно-генетичні дослідження (ПЛР, ІХА), клінічні дослідження, випробував препарати у виробничих умовах та визначив їх ефективність. Провів статистичну обробку й узагальнення одержаних результатів, сформулював висновки та пропозиції виробництву.

Ряд виробничих та лабораторних експериментів здобувач провів спільно з науковим консультантом та науковими співробітниками, які є співавторами окремих публікацій, що включені до списку робіт, виконаних за темою дисертації. Молекулярно-генетичні дослідження провів за консультації доктора біологічних наук, професора А. Байєр (Інститут

біології розвитку та біомедичних наук Варшавського університету, Польща).

Апробація результатів дисертації. Основні результати дисертаційної роботи доповідалися, обговорювалися та отримали позитивну оцінку на наукових конференціях професорсько-викладацького складу, наукових співробітників та аспірантів факультету ветеринарної медицини ЗВО «Подільський державний університет»; на Міжнародному симпозіумі зі зменшення біологічної загрози (*IBTRS*) (м. Київ, 29 травня–2 червня 2021 року); VIII Міжнародній науковій конференції студентської та учнівської молоді «Стан та перспективи виробництва, переробки і використання продукції тваринництва» (м. Кам'янець-Подільський, 23 листопада 2021 року); Міжнародній науково-практичній конференції «Зміна клімату та її наслідки для тваринництва і ветеринарної медицини: наукові підходи та інноваційні рішення» (м. Одеса, 10-11 жовтня 2024 року).

Публікації. Основний зміст дисертаційної роботи викладено у 8 наукових працях, з них 2 статті в журналах, що індексуються у міжнародних наукометричних баз даних Scopus (Q1) та Web of Science, 3 статті у наукових фахових виданнях України (категорія «Б») та 3 тези доповідей на наукових конференціях.

Структура та обсяг дисертації. Робота складається із анотації, вступу, огляду літератури, матеріалів та методів виконання роботи, результатів власних досліджень, аналізу та узагальнення результатів досліджень, висновків, пропозицій виробництву, списку використаних джерел і додатків. Дисертацію викладено на 188 сторінках комп'ютерного тексту, ілюстровано 16 рисунками та 14 таблицями. Список використаних джерел містить 196 найменування, у тому числі 188 – латиницею.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Біологічна характеристика збудників трансмісивних інвазій собак

D. immitis – це нематода, яка є збудником паразитарної інвазії, що передається через комарів. Паразити мають білуватий колір, самка досягає розмірів 25–31 см у довжину і 1–1,3 мм у ширину, а самець – 12–20 см і 0,7–0,9 мм відповідно. Хоча типовим господарем вважається собака свійський (*Canis familiaris*), однак збудник також був зареєстрований у кількох диких видів псових: вовків (*Canis lupus*), червоних вовків (*Canis rufus*), динго (*Canis lupus dingo*), койотів (*Canis latrans*), шакалів (*Canis aureus*), єнотовидних собак (*Nyctereutes procyonoides*), дхолів (*Cuon alpinus*), червоних лисиць (*Vulpes vulpes*) та сірих лисиць (*Urocyon cinereoargenteus*) [12]. Крім того, інвазія також була зареєстрована у котячих (*Felis catus*, *Felis concolor*, *Leopardus pardalis*, *Neofelis nebulosa*, *Uncia uncia*, *Panthera tigris*, *Panthera leo*), куницевих (*Mustela putorius*), рисьових (*Gulo gulo*), єнотів (*Procyon lotor*), ведмедів (*Ursus arctos*), панд (*Ailuropoda melanoleuca*), червоних панд (*Ailurus fulgens*), бобрів (*Castor spp.*), ондатр (*Ondatra zibethicus*), коаті (*Nasua nasua*), кролів (*Leoporus spp.*), коней (*Equus caballus*), тюленів (*Phocidae*), морських левів (*Otariidae*), приматів та людей [13]. Зазвичай люди є нетиповими (тупіковими) господарями для *D. immitis*, що є збудником легеневого дирофіляріозу людини [14].

Дорослі гельмінти *D. immitis* паразитують в легневих артеріях та правому відділі серця, спричиняючи важкий стан, відомий як «серцевий гельмінтоз» у собак. Життєвий цикл включає п'ять личинкових стадій, які розвиваються за участю проміжного господаря – комара, який також є переносником. Дорослі самки відкладають мікрофілярії в кров дефінітивного господаря. Проміжними господарями є комарі

родини *Culicidae*, які інвазуються під час кровосмоктання від господаря з мікрофіляріємією [15]. Личинки *Dirofilaria* передаються кількома родами комарів, зокрема *Culex*, *Aedes*, *Anopheles*. Однак основними природними переносниками філярій у Європі є *Aedes vexans*, *Culex pipiens* та *Aedes albopictus* [16].

Цикл розвитку дирофіляріозу є надзвичайно складним, оскільки *Dirofilaria spp.* паразитують на широкому спектрі видів хребетних і мають багато переносників [14], кожен із яких має свій рівень адаптації. Інвазійні личинки третьої стадії передаються дефінітивному господарю під час того, як комар смокче кров, і відкладаються у шкіру господаря через прокол, зроблений стилетами у ротовому апараті комара [17]. Через три дні після інвазування собаки більшість личинок знаходяться в підшкірних тканинах поблизу місця проникнення. До 21-го дня більшість з них мігрують до черевної порожнини собаки, а до 41-го дня їх можна виявити як у черевній, так і в грудній порожнині. Гельмінти досягають серця вже на 70-й день, а до 90-120 дня всі вони локалізуються у серці. Встановлено, що личинки третьої і четвертої стадії пересуваються між м'язами та зрештою через яремну або інші вени проникають до серця [18]. Линька від третьої до четвертої стадії починається вже на 3-й день і триває до 9-12 дня [19]. Личинки четвертої стадії линяють до фінальної стадії на 50-70-й день; перші гельмінти, які досягають серця на 70-85-й день, мають довжину 2-4 см. Після досягнення серця самки дирофілярій збільшуються у довжину майже в десять разів. Вони стають статевозрілими приблизно на 120-й день після інвазування. У собак розвивається патентна інвазія (тобто мікрофілярії циркулюють у крові) вже на 6-й місяць, але зазвичай на 7-9-й місяць після інвазування [20].

Коли дирофілярії вперше досягають серця та легенів, тиск венозної крові проштовхує їх у дрібні легеневі артерії [21]. У міру їх зростання та збільшення у розмірах вони поступово мігрують у напрямку до великих

артерій, доки не досягнуть повної зрілості. Кінцева локалізація дорослих гельмінтів значною мірою залежить від паразитарного навантаження. У собаки з низьким навантаженням (приблизно 10 особин) дирофілярії зазвичай розташовуються в дольових артеріях і головній легеневій артерії. При збільшенні навантаження гельмінти також локалізуються у правому шлуночку. У собак з понад 40 особинами більш імовірно розвивається синдром верхньої порожнистої вени, за якого більшість дирофілярій мігрує у правий шлуночок, праве передсердя та каудальну порожнисту вену, що призводить до порушення функції клапанів та кровообігу [22].

D. repens – це ниткоподібна нематода, яка паразитує у підшкірній жировій клітковині та інших тканинах кінцевого господаря, яким є собаки, коти, а також інші м'ясоїдні. Дорослі самці досягають довжини 4–5 см, а самки — 10–30 см. Личинки (мікрофілярії) мають довжину приблизно 200–300 мкм. Патогенез *D. repens* пов'язаний із впливом як дорослих гельмінтів, так і їхніх личинок (мікрофілярій) на організм господаря. Інвазія починається із укусу зараженого комара, який є проміжним господарем і переносником збудника. У момент укусу личинки третьої стадії потрапляють у шкіру кінцевого господаря разом зі слиною комара [23,24].

Личинки третьої стадії активно мігрують у підшкірних тканинах, де через 1–2 тижні линяють у личинки четвертої стадії, а згодом, через 2–3 місяці, перетворюються на статевозрілих нематод. Дорослі особини локалізуються у підшкірній клітковині, утворюючи вузли та гранульоми, спричиняючи запальну реакцію, що супроводжується свербіжем, болем та локальною гіперемією. У деяких випадках дорослі гельмінти можуть мігрувати до інших тканин, зокрема м'язів, очей або внутрішніх органів, що призводить до ускладнень [25].

Самки гельмінтів після запліднення починають виділяти мікрофілярії, які циркулюють у периферичній крові господаря. Цей етап є критичним для передачі інвазії, оскільки мікрофілярії є інвазійними для

проміжного хазяїна – комара. Під час кровосмоктання комар поглинає мікрофілярії, які у шлунку комахи проникають через стінку кишечника та мігрують у м'язи. Там вони розвиваються, послідовно линяючи до личинки третьої стадії, що триває 10–14 днів, залежно від температури навколишнього середовища [23,26].

Кішки також сприйнятливі до інвазії *D. immitis*, проте не є компетентними господарями. Личинки *D. immitis* можуть досягнути стану статевозрілої особини в організмі котів, але вони рідко здатні до розмноження і не спричиняють стану мікрофіларемії, достатньої для зараження комарів [27]. Незважаючи на низьке паразитарне навантаження, у інвазованих котів можуть розвинутих респіраторні захворювання, спричинені дирофіляріями, що спричиняється міграцією личинок через легені [28]. Дана міграція в організмі котів також може призвести до раптової загибелі [27]. Як і у собак, інвазія у котів є летальною.

Дослідженнями встановлено, що більше 70 видів комарів, які належать до родів *Culex*, *Aedes*, *Anopheles*, *Mansonia*, *Coquillettidia*, *Psorophora* і *Culiseta* можуть відігравати роль у передачі дирофіляріозу [29]. Деякі види комарів (*Culex*, *Aedes*, *Ochlerotatus*, *Anopheles*, *Coquillettidia*, *Armigeres*, *Mansonia* та *Psorophora*) були визнані як компетентні вектори [30]. В Україні зареєстровано 62 види комарів, віднесених до 7 родів [31]. Проте здатність різних видів комарів до передачі збудника може відрізнятися в залежності від географічних умов та інших факторів. Крім того інвазія *D. repens* і *D. immitis* може мати сезонний характер в різних районах. У помірній зоні передача обмежується найтеплішими місяцями року, коли активність комарів досягає свого піку.

Попередні дослідження за молекулярного ксеномоніторингу виявили наявність трьох філяріоїдних нематод (*D. immitis*, *D. repens* і *Setaria tundra*) серед кількох видів комарів у Європі, які переважно належать до родів *Aedes*, *Anopheles*, *Coquillettidia*, *Culex*, *Culiseta* та *Ochlerotatus* [16,29,32–

38]. *D. repens* є домінуючим видом філярій в Європі, однак випадки ураження *D. immitis*, також регулярно спостерігаються, особливо як автохтонні інвазії серед собак [39,40].

Життєвий цикл *D. immitis* порівняно довгий (зазвичай 7-9 місяців) у порівнянні з більшістю паразитичних нематод. Сприйнятливий комар інвазується, коли смокче кров від господаря з мікрофіліріємією. Мікрофілярії (270-365 мкм завдовжки та 6-8 мкм завширшки) залишаються в середній частині шлунка комара близько 24 годин, після чого мігрують у великі клітини мальпігієвих трубочок. Личинки ростуть і збільшуються у розмірах. До п'ятого дня може сформуватися кишечник, що складається з стравоходу, кишечника та прямої кишки. На 6-7-й день личинки залишають клітини мальпігієвих трубочок і потрапляють у їх просвіт. Личинки линяють до другої стадії через 8-10 днів після інвазії, а потім до третьої стадії ще через 2-3 дні. Через 1-2 дні личинки третьої стадії проривають дистальні кінці трубочок і мігрують через порожнину тіла до голови та ротових частин, де стають інвазійними (довжина 1100-1300 мкм) [14,41]. Час, необхідний для розвитку мікрофілярій до інвазійної третьої стадії, залежить від температури. При температурі 27°C та відносній вологості 80 % розвиток займає близько 10-14 днів [15,20].

Контроль за присутністю дирофіляріозу на певній території можна здійснювати через ксеномоніторинг, що полягає у виявленні паразитів серед кровосисних комах [42]. До переваг даного методу в епізоотологічних дослідженнях можна віднести простоту збору матеріалу, нешкідливість для хребетних господарів і здатність ідентифікувати компетентних векторів [16,43]. Однак встановлено, що у популяції комарів личинки філярій можна виявити як у компетентних, так і в некомпетентних векторах [44]. Щоб встановити компетентні види переносників, можна досліджувати ділянки тіла комара, де паразит досягає інвазійної стадії [16]. Дослідження методом ПЛР є найбільш точними і придатними для ветеринарної діагностики та

диференціації близькоспоріднених видів, і широко використовуються для ксеномоніторингу комарів на філярії [29,33,45].

Поширення дирофіляріозу з ендемічних регіонів на нові території на пряму залежить від присутності тварин-носіїв мікрофілярій, компетентних переносників, а також сприятливих екологічних факторів для розвитку личинкових стадій до інвазійних [42,46].

1.2 Епізоотична ситуація щодо дирофіляріозу собак

Дирофіляріоз в даний час реєструють в більшості країн Європи. *D. repens* вважається ендемічним паразитом у багатьох країнах Центральної Європи, включаючи Польщу, Україну, Німеччину, Австрію, Угорщину, Нідерланди, а також вважається одним із найбільш швидко поширюваних паразитарних збудників у Європі [32,47–53].

Численні країни світу на всіх континентах вважаються ендемічними також щодо збудника *D. immitis*, включаючи Іспанію, Грецію, Угорщину, Румунію, Італію, Туніс, Саудівську Аравію, США, Мексику та Бразилію [50,51,54–59].

У зв'язку із кліматичними змінами, захворювання активно розповсюджується з ендемічних південноєвропейських регіонів на схід та захід континенту включаючи країни, такі як Україна, Польща, Чехія, Австрія, Угорщина та Словаччина [55]. На сьогодні дирофіляріоз у людей розглядається як емерджентне захворювання в деяких регіонах [14]. Випадки захворювання людей в Україні, спричинені *D. repens*, також широко задокументовані [49]. Зростаюча поширеність дирофіляріозу в Європі та Україні підкреслює необхідність посиленого нагляду та заходів контролю. Крім того, виявлення дирофілярій як у собак, так і у людей підкреслює зоонозний потенціал захворювання, що вимагає підходу «Єдине здоров'я» для вирішення цієї проблеми громадського здоров'я.

Близькість України до країн, ендемічних щодо дирофіляріозу, зумовлює епізоотологічну взаємозалежність у регіоні. З часом частота виявлення *D. immitis* у регіонах, де раніше домінувала нематода *D. repens*, суттєво зросла [7, 8]. У Словаччині «серцевий гельмінтоз» виявляють як у вигляді моноінвазії, так і в коінвазії з *D. repens*, що становить 45 % усіх випадків дирофіляріозу. У період із 2017 по 2021 роки змішані інвазії цих двох видів становили 22,5 % усіх зареєстрованих випадків дирофіляріозу серед собак в ендемічних регіонах країни [8]. У 2022 році в цьому ж регіоні вперше підтверджено автохтонний випадок серцевого дирофіляріозу у людини [9]. У сусідній Чехії, натомість, наразі реєструють лише завезені випадки [10].

У Німеччині протягом останніх років зафіксовано значну кількість інвазій *D. immitis* серед завезених або подорожуючих собак. У декількох регіонах країни також виявлено ДНК *D. immitis* у комарів, здатних передавати збудника [11]. На основі цих даних Німеччина класифікується як преендемічна зона [5]. На східному кордоні Польщі, у Литві, зафіксовано один завезений випадок кардіопульмонального дирофіляріозу у собаки [12], а в Білорусі ДНК *D. immitis* виявлена серед комарів-переносників [13].

Дані про поширеність дирофіляріозу серед собак в Україні обмежені, проте між 1997 і 2012 роками зареєстровано 1465 випадків інвазій *D. repens* у людей [14]. В іншому дослідженні серед 102 випадків кілька були ідентифіковані як *D. immitis* [15]. Виходячи з цих даних, Україна вважається ендемічною щодо обох видів дирофілярій [16].

У Польщі основною формою дирофіляріозу є підшкірний, спричинений *D. repens*. Перший випадок інвазії у людини був зафіксований у 2007 році [17, 18]. Перший автохтонний випадок у людини зареєстрований у 2010 році, після чого спостерігалось зростання кількості таких випадків [19–23]. У собак перший випадок інвазії *D. repens* виявлено у 2009 році, і відтоді поширеність постійно зростає [24, 25]. У 2014 році

загальна поширеність у 16 провінціях Польщі становила майже 16 % [26], а в 2016 році в одному лише Мазовецькому краї інвазованими виявилися 38,3 % собак [27]. У дослідженні 2017–2019 років поширеність у країні становила 12 % [3]. Інвазії *D. immitis* у собак уперше зафіксовані в Гдині у 2012 році на основі SNAP-тесту (IDEXX), і цей випадок вважається автохтонним [28]. Ще один автохтонний випадок зареєстровано у Сілезії в 2014 році [29].

Дирофіляріоз 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 *D. repens* склала 13,9 % серед собак, при цьому у Литві було задокументовано найвищий відсоток – 38 % [60]. У Словаччині дослідження повідомляють про високу поширеність *D. immitis* серед племінних господарств – уражено 64 % собак, що свідчить про потенційне недооцінювання захворювання в центральній Європі [61].

Серед собак в Україні дирофіляріоз також широко поширений, зокрема у Харківській та Сумській областях, де рівень інвазії сягає 37,03 % і 57,6 % відповідно [62,63]. Часто інвазія протікає субклінічно, що ускладнює діагностику й сприяє підтриманню життєвого циклу паразита [25].

У Харківській області дослідження виявило 21,4 % собак уражених дирофіляріозом, з вищим рівнем зараження у безпородних собак (42,3 %) порівняно з породистими (15,1 %), а у Полтаві – 29,7 % [64,65]. За іншими даними, поширеність *D. repens* в західному регіоні склала 2,4 % серед домашніх собак, що свідчить про регіональні відмінності в поширеності інвазії [66].

Передача *D. immitis* залежить від багатьох факторів, а саме: достатньої кількості інвазованих собак з мікрофіляріємією, наявності компетентних видів комарів та сприятливих кліматичних умов, які

дозволяють екзогенну інкубацію паразитів у комарах-переносниках [67]. Прогностичні моделі, що базуються на накопиченні градусо-днів, використовуються для прогнозування поширення та сезонної динаміки інвазії *D. immitis* у різних регіонах світу [23,55]. Ця модель базується на даних про порогову температуру 14°C, нижче якої розвиток *Dirofilaria* у комарах не відбувається. Крім того, для досягнення інвазійної стадії личинкам необхідно накопичити 130 градусо-днів, а максимальна тривалість життя комара складає 30 днів [68].

Завдяки цим моделям було оцінено кількість щорічних генерацій *Dirofilaria*, а також тривалість періодів ризику інвазування у кількох регіонах Європи [23,55]. Загалом тривалість сезону передачі інвазії критично залежить від накопичення достатньої кількості тепла для інкубації личинок до інвазійної стадії у комарах [68]. У Північній півкулі пік передачі інвазії припадає, як правило, на липень і серпень. Хоча рівень передачі знижується в зимові місяці, ризик ніколи не досягає нуля через наявність мікросередовищ у міських районах.

За даними деяких авторів, ранні прогнози свідчили про можливість інтродукції дирофіляріозу до центральної та північної Європи [39,51,69]. Фактично, зміна клімату подовжує щорічні періоди активності комарів та скорочує стадії розвитку личинок, що призводить до зростання рівня передачі інвазії у багатьох регіонах.

Крім того, важливо враховувати інтродукцію нових видів компетентних комарів, таких як *Aedes albopictus* (азійський тигровий комар), який є високоадаптивним видом. Цей вид походить з Південно-Східної Азії та західної частини Тихоокеанського регіону, проте вже поширився в Африці, Америці та Європі, пристосувавшись до холодніших кліматичних умов [70]. Інші приклади інвазивних видів, які адаптувались у Європі – *Aedes koreicus* і *Aedes japonicus*, які підвищують ризик

поширення *D. immitis* як в ендемічних, так і в неендемічних регіонах [71,72].

1.3 Патогенез та цикл розвитку збудників

Інвазія у собак може мати хронічний перебіг. Тривале перебування дорослих паразитів у підшкірних тканинах спричиняє розвиток фіброзу, утворення вузлів та алергічних реакцій. Продукти життєдіяльності паразита викликають імунопатологічні реакції, які можуть проявлятися у вигляді дерматиту, локального набряку або системної еозинофілії. При значній інвазії спостерігається пригнічення імунної системи, анемія, а також зниження загальної резистентності організму [25,27,73,74].

Патогенез *D. repens* охоплює комплекс механічних, токсико-алергічних та імунопатологічних змін, що впливають на організм господаря. Знання циклу розвитку паразита є важливим для розуміння механізмів його передачі, а також розробки діагностичних і профілактичних заходів.

Дорослі особини *D. immitis* паразитують головним чином у легеневій артерії, спричиняючи механічне ушкодження ендотелію судин. Це запускає локальну запальну реакцію, яка призводить до проліферації інтими, фіброзу та тромбоутворення. Ураження судин викликає підвищення тиску у легеневій артерії (легенева гіпертензія), що, у свою чергу, призводить до перевантаження правого шлуночка серця та розвитку серцевої недостатності [23,75].

Продукти життєдіяльності та розпаду дорослих нематод є сильними антигенами, які викликають системні токсико-алергічні реакції. У хронічних випадках це може проявлятися у вигляді еозинофілії, васкуліту та гіперімунного ураження легенів (легеневий тромбоемболізм). Додатково, змертвілі дорослі гельмінти можуть спричиняти механічну закупорку артерій, що викликає гострі ускладнення.

Самки дорослих гельмінтів виділяють мікрофілярії у кровообіг дефінітивного хазяїна, які циркулюють у периферичній крові. Під час укусу комара вони потрапляють у організм комах, де проникають через стінку кишечника та мігрують до мальпігієвих судин. У м'язах комара мікрофілярії линяють та розвиваються у личинок третьої стадії протягом 10–14 днів, залежно від температури. Зрілі личинки третьої стадії мігрують до хоботка комара і стають інвазійними для нового хазяїна [73].

Клінічні прояви дирофіляріозу варіюються залежно від ступеня інвазії. У собак із незначною кількістю паразитів симптоми можуть бути відсутніми, тоді як значна інвазія призводить до кашлю, задишки, слабкості, асцити, втрати ваги та навіть раптової смерті. У котів інвазія може супроводжуватися розвитком «легеневого артеріального дирофіляріозу», що часто має гострий перебіг.

Таким чином, патогенез *D. immitis* характеризується складними механічними, імунопатологічними та токсичними ефектами, які значно впливають на організм хазяїна. Розуміння циклу розвитку та механізмів патогенезу є ключовим для ефективної діагностики, лікування та профілактики дирофіляріозу.

Ураження *D. immitis* характеризується гострими та хронічними запальними ураженнями легень та інших органів, що спричинені наявністю дорослих гельмінтів та циркулюючих мікрофілярій. Патофізіологічна відповідь на інвазію головним чином зумовлена присутністю дорослих нематод *D. immitis* у легневих артеріях. Первинні ураження при цьому захворюванні виникають у легневих артеріях та легеневій паренхімі й переважно пов'язані з внутрішньосудинними паразитами, що викликають легеневу гіпертензію, яка за відсутності лікування неминуче прогресує до застійної серцевої недостатності.

Інші синдроми, такі як синдром порожнистої вени, пов'язані з порушенням кровотоку через локалізацію гельмінтів у правому передсерді

на рівні тристулкового клапана, що викликає масивний гемоліз і гемоглобінурію [22]. Мікрофілярії відіграють менш значну роль у патогенезі, однак можуть спричинити клінічно пневмоніт і гломерулонефрит. У деяких собак розвивається гіперчутливість до мікрофілярій, що призводить до їх зникнення з крові. Рідкісні випадки аберантної міграції призводять до потрапляння паразитів в атипові місця, такі як передня камера ока або системні артерії [76].

Основні ураження виникають у легневих артеріях при контакті паразитів з інтимою судин. Початкові ураження обмежуються дрібними периферійними гілками, де зупиняються молоді гельмінти. З ростом паразитів ураження поширюються на проксимальні сегменти, викликаючи проліферацію інтими і звуження просвіту судин, що веде до обструкції кровотоку та легеневої гіпертензії [77,78]. У великих судинах розвивається потовщення і зміни інтими, але просвіт рідко звужується, натомість великі артерії дилатують при прогресуванні гіпертензії.

Пошкодження ендотелію відбувається одразу після проникнення паразитів у судини. У місцях ураження скупчуються макрофаги, гранулоцити та тромбоцити, що активують проліферацію гладких м'язових волокон судинної стінки. Під впливом тромбоцитарних факторів росту починається проліферація інтими [78,79]. Окрім цього, у собак з дирофіляріозом зафіксовано підвищення рівня ендотеліну-1, що спричиняє вазоконстрикцію та судинне ремоделювання [80].

Зменшення судинної мережі через облітеративний ендартеріт у дрібних судинах призводить до підвищеного навантаження на правий шлуночок, що проявляється гіпертрофією. З часом, при важкому дирофіляріозі, розвивається правошлуночкова недостатність з асцитом, гепатомегалією та кахексією. У таких випадках можуть траплятися епізоди втрати свідомості при різкому збільшенні серцевого викиду.

У собак із хронічною інвазією спостерігається зменшення позаклітинного колагенового матриксу у міокарді, що спричиняє дилатацію шлуночків і погіршує систолічну та діастолічну функції серця [81].

Таким чином, дирофіляріоз у собак є не лише причиною механічної обструкції кровотоку, але й важким судинним захворюванням, що вимагає раннього діагностування та лікування для запобігання легеневій гіпертензії та застійній серцевій недостатності.

D. immitis, збудник серцевого дирофіляріозу собак, співіснує з внутрішньоклітинними бактеріями-симбіонтами *Wolbachia pipientis*, які відіграють критичну роль у біології та репродукції філярій [82]. Ці грамнегативні бактерії можуть впливати на патогенез інвазії та імунну відповідь організму-господаря.

Wolbachia виявляють на всіх стадіях життєвого циклу *D. immitis*, переважно в гіподермальних клітинах та репродуктивних органах самок, що підтверджує їх материнську передачу [83]. Важливе значення симбіозу доведено тим, що елімінація *Wolbachia* антибіотиками призводить до стерильності самок та загибелі дорослих паразитів [41]. Пік росту *Wolbachia* спостерігається на четвертій стадії личинки у перший місяць після зараження, що свідчить про їхню роль у пригніченні імунної відповіді господаря [84,85].

Побічні реакції на терапію дирофіляріозу (івермектин, діетилкарбамазин) асоціюються із вивільненням *Wolbachia* або її ДНК у кровотік, що викликає підвищення рівнів прозапальних цитокінів [83]. Антибіотикотерапія, спрямована на бактерії *Wolbachia*, демонструє протизапальний ефект та може застосовуватись разом із терапією проти дорослих філярій.

1.4 Лабораторна діагностика за трансмісивних інвазій собак

Діагностика дирофіляріозу спричиненого *D. immitis*, базується на використанні різноманітних методів, які відрізняються за принципом дії, чутливістю, специфічністю та практичним застосуванням. Методи діагностики включають мікроскопічні, молекулярні та імунологічні підходи, кожен з яких має свої переваги й обмеження. Вибір відповідного методу суттєво впливає на точність виявлення паразита та оцінку поширеності інвазії, особливо в регіонах з різним рівнем ендемічності.

Клінічна картина дирофіляріозу у собак зазвичай має хронічний перебіг. Більшість інвазованих собак місяцями або роками не проявляють симптомів, що залежить від кількості паразитів, індивідуальної реактивності та фізичної активності, оскільки пошкодження артерій значно сильніше у собак з інтенсивними навантаженнями [86]. Симптоми розвиваються поступово: спочатку з'являється хронічний кашель, який може прогресувати до задишки, слабкості та втрати свідомості після фізичного навантаження чи збудження.

Інвазовані собаки також демонструють непереносимість фізичних навантажень або раптову втрату свідомості. Під час клінічного огляду можна виявити втрату ваги, шум на тристулковому клапані через недостатність, серцевий ритм галопу та розщеплення другого тону [87]. При правошлуночковій недостатності спостерігаються набухання яремних вен, гепатоспленомегалія та асцит.

Клінічні ознаки ураження легень включають кашель, задишку, вологі хрипи, приглушені звуки в легенях і ціаноз. У разі тромбоемболії стан погіршується: з'являються лихоманка та гемоптизис. Раптова смерть рідкісна, але можлива через кардіореспіраторну недостатність або важку тромбоемболію [88]. Присутність дорослих особин дирофілярій у легеневій артерії спричиняє легеневу гіпертензію, масивний гемоліз та

гемоглобінурію, що є ознакою синдрому порожнистої вени, фатального без хірургічного втручання [88,89].

Інвазія *D. immitis* може також призводити до ниркової дисфункції та гломерулонефриту, спричинених імунними комплексами, що формуються на антигени дорослих і личинкових стадій паразита [90,91]. У собак може розвиватися екзематозний дерматит (вторинний до уражень нирок) та еозинофільна пневмонія внаслідок реакції на антигени мікрофілярій. Можливі ураження інших органів при ектопічній локалізації паразита: очей, головного мозку, печінки та черевної порожнини.

Лабораторна діагностика

Діагностика дирофіляріозу включає декілька методів, але необхідно враховувати наступні особливості: ідентифікацію виду мікрофілярій за морфологічними ознаками; у собак з відсутністю мікрофілярій при клінічній підозрі слід використовувати додаткові дослідження; для оцінки кардіопульмональних уражень необхідні рентгенографія та ехокардіографія для візуалізації дорослих гельмінтів [23].

Мікроскопічні методи, такі як ларвоскопія, передбачають дослідження крові для виявлення мікрофілярій. Цей метод має чутливість 81,36 % та специфічність 97,13 %, що робить його надійним інструментом для діагностики в польових умовах. Модифікований метод Кнотта, що використовується для концентрації мікрофілярій, демонструє чутливість 85,71 % та специфічність 91,66 % і є економічним варіантом для лабораторій із базовим оснащенням. Водночас мікроскопічні методи мають обмеження у виявленні так званих окультних інвазій, коли мікрофілярії у крові відсутні [59,92,93].

Мазок свіжої крові

На предметне скло наносять краплю венозної крові, накривають покривним склом і досліджують під малим збільшенням мікроскопа. Мікрофілярії виявляють через рух еритроцитів. Метод є швидким та

дешевим, проте має низьку чутливість і високу ймовірність помилково-негативних результатів, а також не дозволяє визначити вид паразита [23].

Модифікований метод Кнотта є найпоширенішим методом для виявлення мікрофілярій. Це швидкий, простий і недорогий метод. Для виконання дослідження 1 мл крові з ЕДТА змішують з 9 мл 2 %-го формаліну та центрифугують протягом 5 хв при 500 об/хв. Після видалення надосаду до осаду додають краплю метиленового синього і досліджують під світловим мікроскопом [88,94].

Оскільки мікрофілярії можуть належати до різних видів філярій собак: *D. immitis*, *D. repens*, *Acanthocheilonema dracunculoides* та *A. reconditum* [95], для точного діагнозу та вибору лікування необхідний морфометричний аналіз. Magnis et al. (2013) визначили морфометричні особливості для ідентифікації мікрофілярій у крові собак [94] (таб. 1.1)

Таблиця 1.1

Морфометричні особливості видів мікрофілярій, що паразитують у крові собак

Вид	Довжина (мкм)	Ширина (мкм)	Передній кінець	Задній кінець
<i>D. immitis</i>	302	6	Конічний	Прямий
<i>D. repens</i>	369	9	Конічний	Зігнутий
<i>A. dracunculoides</i>	259	5	Округлий	Прямий
<i>A. reconditum</i>	265	5	Тупий	Зачеплений

Через однакові розміри мікрофілярій *A. dracunculoides* та *A. reconditum* необхідні додаткові біохімічні або молекулярні методи діагностики для точної диференціації видів [94].

Фільтраційний метод

1 мл венозної крові (з антикоагулянтом ЕДТА або гепарином) змішують з 10 мл лізуючого розчину, після чого суміш пропускають через

фільтр Millipore. Фільтр забарвлюють і досліджують під мікроскопом. Метод є швидким і чутливим, але потребує високих витрат [23].

Гістохімічне фарбування

1 мл венозної крові (з ЕДТА) змішують з 10 мл деіонізованої води, центрифугують при 1500 об/хв протягом 15 хв. Після видалення надосаду осад фіксують в абсолютному ацетоні, висушують та обробляють субстратом кислої фосфатази. У результаті *D. immitis* і *D. repens* демонструють різні патерни активності кислої фосфатази (виділяються червоні плями) [96].

Імунохроматографічні методи

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 [97,98]. 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 [97].

Однак, незважаючи на високу специфічність, особливо до антигенів *D. immitis*, ІХТ мають певні обмеження. Вони не здатні виявляти ранні стадії інвазії, оскільки антигени паразита можливо виявити лише після досягнення зрілості дорослими самками паразита, 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

[99,100]. Також дослідження на *D. repens* є обмеженими, оскільки більшість ІХТ розроблені для діагностики *D. immitis* [100].

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 кислою фосфатазою або молекулярну, що дозволяє уточнити видову приналежність паразитів [101,102]. Біохімічний аналіз крові може виявити зміни, що вказують на інвазію, такі як підвищення рівня загального білка, глюкози, альбуміну, білірубіну, креатиніну, сечовини та калію [64]. Для точного виявлення та видової диференціації інвазій *Dirofilaria* spp. у собак рекомендується комплексний діагностичний підхід, що поєднує декілька методів [103].

Імунологічні методи, такі як імуносорбентний аналіз, пов'язаний із ферментами (ІФА), дозволяють виявляти антигени *D. immitis* у крові. Використання модифікованого підходу із дисоціацією імунних комплексів підвищує ефективність виявлення антигену, збільшуючи частку виявлення з 56,5 % до 79,6 %. Загальні показники чутливості ІФА становлять 84,0 %, а специфічності — 86,4 %.

Імунологічний метод ELISA та імунохроматографічні тести для виявлення антигенів дорослих самок *D. immitis* є чутливими, специфічними, швидкими та простими у виконанні. Вони виявляють антигени в сироватці, плазмі або крові собак і кішок [23]. Позитивний результат можливий при наявності хоча б однієї дорослої самки, але самців паразитів виявити неможливо.

Антигени в організмі собак можливо виявити через 5-6,5 місяців після зараження. Тести також використовують для оцінки ефективності терапії: собак тестують на 5-й та 9-й місяць після лікування.

У кішок антигени виявляють на 5,5-8-й місяць після зараження, але у разі унісекс-інвазії самцями або незрілими формами дирофілярій антигенні тести не надійні [15].

Кількість антигену в крові (визначена напівкількісними ELISA-дослідженнями) має прямий, але неточний зв'язок із кількістю дорослих самок. Щоб уникнути прогалин у хіміопрофілактиці, собакам, які отримують ін'єкційні препарати тривалої дії, рекомендовано проводити дослідження раз на 2-3 роки [23,104].

Ці методи є золотим стандартом діагностики дирофіляріозу у собак і кішок, але вони досить дороговартісні та не придатні для виявлення інших філярій, таких як *D. repens* [57].

Молекулярна діагностика

Інші діагностичні методи включають ампліфікацію ДНК мікрофілярій за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) [33,105,106]. ПЛР є чутливим та точним інструментом для диференціювання мікрофілярій дирофілярій від інших нематод.

Молекулярні методи забезпечують високу точність завдяки виявленню ДНК паразита. Чутливість ПЛР становить 90,57 %, а специфічність — 93,33 %. Важливою перевагою є здатність диференціювати види *D. immitis* та *D. repens*, що має вирішальне значення для визначення правильної терапії та прогнозування захворювання. Ще одним ефективним підходом є виявлення поверхневого білку Wolbachia, який орієнтований на виявлення ДНК симбіотичних бактерій, що присутні у паразитах *Dirofilaria*. Цей метод забезпечує додаткову точність у ранній діагностиці, особливо в складних випадках.

Розроблено дуплексну ПЛР у реальному часі для виявлення та диференціювання інвазій, спричинених *D. immitis* та *D. repens* у собак і серед переносників – комарів. Також описано мультиплексну ПЛР для одночасного виявлення різних видів філярій [33]. Для ампліфікації частини

гена малої субодиниці рибосомної ДНК мітохондрії (12S рДНК) використовуються специфічні праймери (12SF/12SRdeg/12SF2B/12SR2) для мультиплексної ПЛР. Ампліфікація консервативної ділянки становить 500 п. о. (12SF/12SRdeg) для зразків філярій, що паразитують у собак, а для одночасної ампліфікації *D. immitis* та *D. repens* специфічні фрагменти становлять 204 п. о. (12SF2B/12SRdeg) та 327 п. о. (12SF/12SR2) відповідно [107].

Інші діагностичні процедури

Методи радіографії, ехокардіографії та електрокардіографії є важливими діагностичними інструментами, що можуть надати інформацію про клінічний стан тварини та ступінь кардіопульмональних змін спричинених дирофіляріозом. Патогномонічними радіографічними ознаками є збільшені, звивисті, усічені периферичні гілки легеневих артерій, що постачають кров до окремих частин легеневих долей (особливо в діафрагмальних частках), що супроводжуються ураженням паренхіми легень, кардіомегалією правого серця на пізніх стадіях і плевральним випотом, що виникає внаслідок застійної недостатності правого серця [27].

Ехокардіографія дозволяє візуалізувати гельмінтів, які виглядають як дві паралельні гіперехогенні лінії в основній легеневій артерії, інтерлобарних гілках, правому передсерді та шлуночку [108]. Окрім цього, метод дає змогу оцінити анатомію серця та його функціональну здатність та може надати підтвердження синдрому порожнистої вени, коли дирофілярії локалізуються у тристулковому клапані. Однак ехокардіографія не є ефективним методом для діагностики у собак з низьким рівнем інвазії, оскільки гельмінти часто локалізуються у периферичних гілках легеневих артерій, що виходить за межі ехокардіографічного поля огляду.

Електрокардіографія може виявити зміни в електричній осі та ритмі (відхилення осі вправо та фібриляцію передсердь) у собак на термінальних стадіях, які мають виражене збільшення правого передсердя [88].

Діагноз на дирофіляріоз можна встановити за розміром і морфологією мікрофілярій, однак ці ознаки можуть бути складними для інтерпретації, особливо при низькій паразитемії або змішаних інвазіях. Крім того, модифікований метод Кнотта та ацидофосфатазного фарбування ефективні лише тоді, коли у собак, інвазованих дирофіляріями спостерігається мікрофіляремія. Це трапляється лише у 2/3 випадків, оскільки 30-40 % інвазованих собак залишаються або стають амікрофіляремічними, незважаючи на наявність дорослих особин [109]. Крім того, реактиви для гістохімічного фарбування кислою фосфатазою мають обмежений термін придатності та вимагають свіжих зразків для отримання достовірних результатів [110].

Діагностика, що базується виключно на виявленні циркулюючих антигенів, може давати хибнонегативні результати при низькому паразитарному навантаженні. У деяких собак антиген-антитілові комплекси можуть захоплювати антигени, перешкоджаючи імунологічному виявленню. Оскільки циркулюючі антигени можна виявити лише за паразитування дорослих стадій нематод *D. immitis*, антиген-тестування слід проводити не раніше ніж через 7 місяців після зараження.

Комбінація серологічних методів з методом Кнотта або гістохімічного фарбування забезпечує точне виявлення дирофіляріозу. Позитивний результат дослідження на мікрофілярії разом із позитивним тестом на антигени підтверджує інвазію *D. immitis*. Позитивний тест на антигени без мікрофілярій вказує на амікрофіляремічну або приховану інвазію *D. immitis*, яка може бути спричинена передпатентним періодом, унісексуальною інвазією самками нематод, стерильністю дорослих особин

під дією препаратів або імунно-опосередкованим знищенням мікрофілярій [23].

Позитивне дослідження на мікрофілярії з негативним тестом на антигени може свідчити про інвазію, спричинену іншим видом нематод, що може бути підтверджено методом Кнотта або молекулярними методами. Якщо це мікрофілярії *D. immitis*, це може бути наслідком утворення комплексів антиген-антитіло, що перешкоджають виявленню антигенів [111], низької кількості самок гельмінтів або наявності мікрофілярій після природної чи фармакологічно індукованої загибелі дорослих особин [87].

Загалом діагностичні методи повинні застосовуватись разом (виявлення мікрофілярій та антигенів) і тлумачитись разом з результатами клінічного обстеження (радіографія та ехокардіографія) для отримання надійного діагнозу. Щорічне обстеження собак важливе не лише для забезпечення ефективної профілактики, а й для раннього лікування з мінімальними патологічними наслідками при наявності інвазії [104].

Незважаючи на високу ефективність сучасних методів, вони мають певні обмеження. Молекулярні підходи, такі як ПЛР, потребують дорогого обладнання та обізнаного персоналу, що може бути недоступно в умовах із обмеженими ресурсами. Імунологічні тести, наприклад, ІФА, можуть давати хибнонегативні результати через присутність імунних комплексів, що вимагає застосування додаткових методів, таких як дисоціація імунного комплексу.

Таким чином, діагностика *D. immitis* є складним процесом, який залежить від доступності технологій та умов клінічної практики. Для підвищення точності діагностики рекомендовано поєднання кількох методів, що дозволяє врахувати їхні сильні сторони та компенсувати обмеження. Подальші дослідження мають бути спрямовані на вдосконалення діагностичних підходів, зокрема розробку доступніших і точніших молекулярних та імунологічних методів досліджень.

Діагностика Dirofilaria repens

Діагностика інвазії спричиненої *D. repens* базується на використанні різних методів, кожен з яких має свої переваги та недоліки. Найбільш ефективними методами діагностики ПЛР, мікроскопічне дослідження та інші методи молекулярної біології. Ці підходи забезпечують високу точність, специфічність і практичність, які є вирішальними для ефективного виявлення та лікування.

ПЛР є високочутливим і специфічним методом, що дозволяє ідентифікувати як зрілих, так і незрілих паразитів, мікрофілярій у крові, а також личинок, що розвиваються у переносниках – комарах [33]. Метод ґрунтується на використанні специфічних праймерів для ампліфікації ДНК-маркерів, що значно підвищує точність виявлення *D. repens* у різних хазяїв. Дослідження показали 100 % відповідність результатів ПЛР і мікроскопії навіть у випадках низької паразитемії, що підкреслює надійність цього підходу.

Мікроскопічне дослідження залишається традиційним методом діагностики, особливо при виявленні мікрофілярій у зразках крові. Воно часто використовується у поєднанні з ПЛР для підтвердження присутності паразита, зокрема у випадках складної морфологічної ідентифікації [112]. Проте мікроскопія поступається молекулярним методам у специфічності, особливо при необхідності розрізнення різних видів дирофілярій.

Методи молекулярної біології, такі як використання специфічних праймерів та схем ампліфікації, мають вирішальне значення для точної ідентифікації *D. repens*. Вони особливо корисні у випадках, коли морфологічна ідентифікація утруднена, наприклад, при виявленні підшкірних вузлів або очних цист. Впровадження цих методів у клінічну практику забезпечує надійну альтернативу традиційним підходам до діагностики.

У регіонах, де реєструють як *D. repens*, так і *D. immitis*, ПЛР показала себе більш надійною, ніж тести на антиген, через високу специфічність і відсутність перехресної реактивності [113]. Завдяки високій чутливості та специфічності ПЛР стає пріоритетним методом для епізоотогічних досліджень і рутинної діагностики, особливо у регіонах із супутніми інфекціями [114].

Незважаючи на це, методи ПЛР та молекулярної біології мають певні обмеження, зокрема високу вартість і потребу у спеціалізованому обладнанні, що може ускладнювати їх застосування в умовах обмежених ресурсів. Мікроскопічне дослідження, хоча й менш специфічне, залишається важливим інструментом, особливо у клініках із недостатнім технічним забезпеченням. Вибір методу діагностики залежить від доступних ресурсів, поширеності коінвазій і клінічної ситуації пацієнта, що потребує комплексного підходу для ефективного виявлення та лікування *D. repens*.

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 [115]. 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.

1.5 Лікувальні заходи за трансмісивних інвазій собак

Дирофіляріоз, викликаний *Dirofilaria* spp., залишається серйозною загрозою для здоров'я людей і тварин в Україні. Поширення інвазії серед людей, зокрема спричиненої *D. repens*, стрімко зростає, охоплюючи всю

територію країни, з високою захворюваністю в регіонах на півдні та сході, особливо в Херсонській області [49]. Інвазії найчастіше проявляються у вигляді підшкірних уражень, зокрема на обличчі та навколо очей.

На поширеність інвазії впливають кліматичні зміни, активні міграції та наявність комарів-переносників (*Aedes*, *Culex*) [25,63]. Відсутність систематичної діагностики і нагляду, а також низька обізнаність населення додатково ускладнюють боротьбу з хворобою, потребуючи тісної співпраці між ветеринарними та медичними фахівцями [25]. В Україні розроблено національну систему нагляду за дирофіляріозом, однак для зниження інвазії необхідні подальші дослідження та підвищення обізнаності серед фахівців і громадськості [49].

Ефективні методи лікування дирофіляріозу спричиненого *D. immitis*, який може спричинити серйозні серцево-легеневі ураження, є критично важливими. Стратегії лікування для собак включають різноманітні схеми терапії, кожна з яких відрізняється за ефективністю та витратами. Основним засобом є меларсоміну дигідрохлорид, рекомендований для усунення дорослих форм паразита, який вводять тричі ін'єкційно та поєднують з макроциклічними лактонами і тетрациклінами для зниження кількості мікрофілярій. Проте, через ризик ускладнень, профілактика залишається кращою стратегією [116]. Дослідження показали, що поєднання доксицикліну з моксидектиновими препаратами може зменшити паразитарне навантаження та поліпшити клінічні результати, досягаючи антиген-негативного статусу у значної частини собак після терапії [56]. Макроциклічні лактони, такі як івермектин, моксидектин і селамектин, застосовуються як для мікрофілярицидної дії, так і для профілактики. Івермектин, введений підшкірно кожні два тижні, ефективно зменшує клінічні ознаки інвазії [73]. Моксидектин у різних формах суттєво знижує кількість мікрофілярій, що було підтверджено рентгенографічно і лабораторно [56]. Щомісячне профілактичне лікування, що передбачає

комбінацію мілбеміциноксим-празиквантел та динотефуран-перметрин-пірипроксифен, забезпечує ефективну профілактику нових інвазій, особливо в районах високого ризику, пропонуючи комплексний захист від *Dirofilaria* spp. [117]. Висока вартість імпортованих препаратів, таких як меларсомін, може обмежувати лікування в деяких регіонах, стимулюючи пошук доступніших альтернатив [64]. Профілактичне використання макроциклічних лактонів виявляється економічно вигіднішим порівняно з лікуванням встановлених інвазій, оскільки допомагає уникнути складної та дороговартісної терапії дорослих форм паразита [116]. Загалом, вибір терапії залежить від важкості інвазії, супутніх захворювань та фінансових можливостей. Профілактичне використання макроциклічних лактонів рекомендується як стратегія для уникнення ускладнень, тоді як комбінована терапія з доксицикліном і моксидектином є перспективною альтернативою, що може знизити залежність від дорогих імпортованих препаратів.

Висновок до Розділу 1

Трансмісивні хвороби займають важливе місце серед інфекційних та інвазійних захворювань тварин і людини, оскільки вони передаються через кровосисних членистоногих, які виконують роль механічних або біологічних переносників. До таких захворювань належать різноманітні протозойні, бактеріальні та гельмінтозні інвазії, що несуть значне навантаження на ветеринарну медицину. Основними збудниками трансмісивних хвороб є найпростіші (*Babesia* spp.), бактерії (*Borrelia* spp., *Rickettsia* spp., *Anaplasma* spp., *Ehrlichia* spp.) та гельмінти, серед яких особливе місце займають філярії, зокрема *Dirofilaria* spp.

Дирофіляріоз є серйозним трансмісивним гельмінтозом собак, котів та людини, збудниками якого є *D. immitis* і *D. repens*. Основними переносниками виступають комарі родів *Culex*, *Aedes* та *Anopheles*, які заражають тварин при кровосанні. *D. immitis* викликає серцево-легеневий

дирофіляріоз, що супроводжується важкими кардіореспіраторними порушеннями, тоді як *D. repens* вражає переважно підшкірну клітковину та сполучні тканини. Захворювання поширене у багатьох регіонах світу, включаючи Україну, і має зростаюче значення у зв'язку зі змінами кліматичних умов, що сприяють розширенню ареалу переносників.

Діагностика дирофіляріозу включає різні методи: мікроскопічні, серологічні та молекулярно-генетичні, серед яких ПЛР має високу специфічність та чутливість. Лікування та профілактика базуються на застосуванні макроциклічних лактонів, хірургічних методів та заходів боротьби з комарами. З огляду на зростаючу загрозу дирофіляріозу та інших трансмісивних хвороб, необхідне подальше дослідження механізмів їх поширення, покращення діагностики та розробка ефективних стратегій профілактики у ветеринарній та медичній практиці.

РОЗДІЛ 2

ЗАГАЛЬНА МЕТОДИКА ТА ОСНОВНІ МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Експериментальну частину дисертаційної роботи виконували упродовж 2019–2023 років у лабораторії кафедри інфекційних та інвазійних хвороб факультету ветеринарної медицини Закладу вищої освіти «Подільський державний університет» (м. Кам'янець-Подільський), на базі ветеринарного центру Ветхаус (м. Вінниця), постановку полімеразної ланцюгової реакції та аналіз гаплотипів здійснювали спільно з Інститутом біології розвитку та біомедичних наук Варшавського університету (Польща).

Матеріал для аналізу було отримано від собак, які проходили діагностичне обстеження та лікування на базі філій кафедри інфекційних та інвазійних хвороб. Проведені дослідження повністю відповідали етичним нормам, визначеним Законом України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (№ 3447-IV). Усі експериментальні процедури виконувалися відповідно до «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», затверджених Національним конгресом з біоетики (Київ, 2001) [118]. Проект дослідження та процедура відбору зразків були схвалені комісією з питань біоетики факультету ветеринарної медицини та технологій у тваринництві ЗВО «Подільський державний університет». Окрім цього, робота з тваринами та процес забору матеріалу проводилися у відповідності до положень Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для експериментальних і наукових досліджень (Страсбург, 1986) [119].

Дослідження виконували у чотири етапи. Схема проведених досліджень наведена на рис. 2.1.



Рис. 2.1 Схема проведення досліджень

Валідацію отриманих результатів дослідження здійснювали у ветеринарних клініках міст Кам'янець-Подільський, Хмельницький,

Чернівці та Вінниця. Обстеженню підлягали собаки різних порід і вікових категорій, які надходили до клінік з різних причин. Вік тварин, включених у дослідження, варіювався від 6 тижнів до 15 років.

На першому етапі досліджень було визначено рівень поширеності та видовий склад збудників трансмісивних інвазій у собак у Вінницькій, Хмельницькій та Чернівецькій областях.

Екстенсивність інвазії (EI, %) визначали як відсоток інвазованих особин від загальної кількості досліджених.

Інтенсивність інвазії (II) визначали шляхом підрахунку кількості паразитів у пробах за допомогою мікроскопії та копрологічних досліджень. Для підрахунку паразитарного навантаження використовували методи прямого підрахунку у мазках.

Також проведено молекулярно-генетичну ідентифікацію *Dirofilaria* spp., оцінено генетичну варіативність *D. repens* і досліджено особливості коінвазії *Babesia* spp. та *Borrelia burgdorferi* у собак.

Зразки крові від собак для досліджень були зібрані протягом 2019-2020 років. Усього було зібрано 1662 зразки крові, які відбирали у флакони з антикоагулянтом (ЕДТА), що забезпечує стабільність зразків для подальших лабораторних аналізів. Зразки були отримані у ветеринарних клініках, зокрема у Вінницькій, Хмельницькій і Чернівецькій областях. Вибір даних клінік обумовлений тим, що вони охоплювали різноманітні групи собак: домашніх, які регулярно відвідували ветеринарну клініку; бездомних тварин, що були доставлені для медичного огляду або лікування; та службових собак, які проходили планові ветеринарні огляди.

Для відбору зразків застосовували метод венепункції, використовуючи вену передньої кінцівки або яремну вену. Процедура відбору крові включала підготовку тварини шляхом фіксації в положенні сидючи або лежачи для мінімізації стресу. Місце венепункції попередньо обробляли антисептичним розчином – 70 % етанолом, щоб уникнути

контамінації зразка і інвазії. Відбір крові проводили за допомогою одноразової стерильної голки та шприца або вакутейнерної системи. Від кожної тварини відбирали 3-5 мл крові, що було достатньо для проведення молекулярно-генетичних та гематологічних досліджень. Відразу після відбору кров переносили у флакони з ЕДТА, щоб запобігти її коагуляції. Зібрані зразки транспортували до лабораторії у спеціальних контейнерах з охолодженням (температура 4-8°C) для забезпечення збереження клітинних елементів та ДНК. В лабораторії зразки зберігали при температурі -20°C до моменту проведення аналізів. Усі процедури відбору крові виконувалися відповідно до міжнародних стандартів етики поводження з лабораторними та ветеринарними тваринами, з мінімізацією болю та стресу для собак.

Молекулярне виявлення D. repens. Геномну ДНК екстрагували із 1662 зразків крові відібраних від собак, за допомогою набору DNAeasy Blood & Tissue (Qiagen, США) і зберігали при температурі -20 °C.

Молекулярне виявлення *D. repens* проводили шляхом ампліфікації та секвенування трьох видоспецифічних маркерів. Комбінація специфічних для *D. repens* праймерів (12SF і 12SR2), екстрагованих із мультиплексної ПЛР, розробленої Gioia та ін. [107], була використана для ампліфікації ділянки гена мітохондріальної 12S рРНК (327 п.о.) *D. repens*.

Два набори видоспецифічних праймерів були розроблені на основі опублікованого мітохондріального геному *D. repens* (KX265047) [60,120]. Фрагмент близько 800 п.о. гена субдиниці цитохром-с-оксидази I (COI) був ампліфікований з використанням праймерів ctc2F (5'-GTGAATGTGTTTTGTTTTGAC-3') і ctc2R (5'-CCTTACTAATAACCTTTCAATGAA-3'). Фрагмент гена субдиниці I дегідрогенази (NAD1) довжиною близько 516 п.о. був ампліфікований за допомогою праймерів nadF (5'-TTGTAGTATGGTAGAGGTAAGG-3') і nadR (5'-TGAACACAAGAACGAATACC-3') (табл. 2.1).

Для дослідження зразків з використанням 12S рДНК реакції ПЛР проводили в об'ємі 20 мкл, включаючи 1 × ПЛР буфер Dream Taq Green, полімеразу Dream Taq 1U (Thermo Fisher Scientific, США), 0,33 мМ dNTPs, 1 мкл кожного праймера та 2 мкл екстрагованого зразка ДНК.

Таблиця 2.1

Генетичні маркери використані для ПЛР на дирофіляріоз

Ген	Пар основ	Праймер
12S рРНК	327	12SF 5'-GTTCCAGAATAATCGGCTA-3' 12SR2 5' -AAAAGCAACACAAATAA(CA)A- 3'
цитохром-С- оксидаза I (COI)	800	ctc2F 5'-GTGAATGTGTTTTGTTTTTGAC-3' ctc2R 5'-CCTTACTAATAACCTTTCAATGAA-3'
субодиниця I дегідрогенази (NAD1)	516	nadF 5'-TTGTAGTATGGTAGAGGTAAGG-3' nadR 5'-TGAACACAAGAACGAATACC-3'

Для отримання якісних продуктів ПЛР для секвенування (фрагменти генів COI та NAD1) використовували полімеразу Promega GoTaq G2 Hot Start (Promega, США). Позитивним контролем була ДНК *D. repens*, отримана в попередньому дослідженні [121]. Негативні контролю проводили з дистильованою водою, що не містить нуклеази, за відсутності матричної ДНК.

Для ампліфікації 12S рДНК реакції ПЛР проводили в таких циклічних умовах: первинна денатурація при 94 °С протягом 3 хв, потім 40 циклів

денатурації при 94 °C протягом 45 с, відпал при 58 °C протягом 45 с і елонгація при 72 °C протягом 45 с, потім кінцева елонгація при 72 °C протягом 7 хв і стадія витримки при 4 °C. Для ампліфікації фрагментів генів COI та NAD1 використовували такі умови: первинна денатурація при 95 °C протягом 5 хв, потім 40 циклів денатурації при 95 °C протягом 45 с, відпал при 61 °C протягом 1 хв та елонгація при 72 °C протягом 1 хв, з подальшою остаточною елонгацією при 72 °C протягом 7 хв і етапом витримки при 4 °C.

Амплікони візуалізували за допомогою барвника Midori Green (Nippon Genetics Europe GmbH, Німеччина) після електрофорезу в 1,5 % агарозних гелях. Вибрані амплікони були очищені та секвеновані в обох напрямках приватною компанією (Польща). Вирівнювання послідовностей ДНК проводили за допомогою MEGA і Codon Code Aligner. Отримані нуклеотидні послідовності порівнювали з послідовностями, депонованими в GenBank NCBI.

Молекулярне генотипування D. repens. Генотипування *D. repens* проводили шляхом ампліфікації та секвенування трьох видоспецифічних маркерів. Праймери для мітохондріальних маркерів були розроблені на основі повного мітохондріального геному *D. repens* KX265047 [60,120]. Два набори праймерів використовували для ампліфікації фрагмента гена COI розміром 1650 п.о. (табл. 2.2). Другий маркер, фрагмент гена NADH довжиною 516 п.о., був ампліфікований за допомогою праймерів Nad1F і Nad1R. Третій геномний маркер, фрагмент ділянки ITS-1 рибосомної ДНК (AF217800) довжиною 800 п.о. був ампліфікований за допомогою праймерів Diro 18S-F3 і Diro 5.8S-R [122].

Реакції ПЛР проводили в об'ємі 25 мкл, включаючи: 16,7 мкл стерильної води, 2 мкл 5х концентрованого буфера Go Taq Green, 1 мкл кожного праймера, 2 мкл 25 мМ MgCl₂, 0,2 мкл 10 мМ dNTP, 0,1 мкл полімерази Go Taq Hot Start (Promega, США) і 2 мкл матричної ДНК.

Негативні контролю проводили з дистильованою водою, що не містить нуклеази, за відсутності матричної ДНК.

Амплікони візуалізували за допомогою фарби Midori Green (Nippon Genetics Europe GmbH, Німеччина) після електрофорезу в 1,5 % агарозних гелях. Амплікони очищали та секвенували в обох напрямках за допомогою методу секвенування за Сангером (Польща).

Таблиця 2.2

Праймери для генотипування *D. repens*

Назва праймера	Послідовність праймера (5'→3')	Ген	Довжина (пар основ)	Температура відпалу
Drep2F	GATTTATTTTGTATTTAATATGAA	COI	849	56 °C
Ctc1R	TATCAGTCAAAAACAAAACACATT	COI	849	56 °C
Ctc2F	GTGAATGTGTTTTGTTTTTGAC	COI	801	61 °C
Ctc2R	CCTTACTAATAACCTTTCATGAA	COI	801	61 °C
Nad1F	TTGTAGTATGGTAGAGGTAAGG	NADH	516	61 °C
Nad1R	TGAACACAAGAACGAATACC	NADH	516	61 °C
Diro18S-F3	AATTCCTAGTAAGTGTGAGTCATC	ITS-1	800	65 °C
Diro5.8S-R	TAGCTGCGTTCTTCATCGAT	ITS-1	800	65 °C

Усі нуклеотидні послідовності були вирівняні та відредаговані для формування консенсусної послідовності за допомогою CodonCode Aligner.

Нуклеотидні послідовності з обох маркерів мітохондріальної ДНК (COI: 1165 п. о., NADH: 355 п. о.) були об'єднані, а остаточна послідовність мітохондріальної ДНК довжиною 1520 п. о. вирівняна за допомогою ClustalW.

Послідовності ITS-1 (547 п. о.) були вирівняні окремо за допомогою програми MEGA і використовувалися для розрахунку кількості гаплотипів у кінцевій конструкції мітохондріальної ДНК та у фрагменті гена ITS-1.

Аналіз медіанної охоплюючої мережі для послідовностей мітохондріальної ДНК та ядерного маркера ITS-1 проводили за допомогою PopART [123], використовуючи лише послідовності, отримані в цьому дослідженні.

Філогенетичні дерева були обчислені з використанням максимальної правдоподібності для усіх фрагментів маркерів мітохондріальної ДНК COI та NADH. Еволюційна модель (модель Тамура-Нея) була обрана на основі моделі, перевіреної Mega X [124]. Ідентичні консенсусні послідовності, отримані в дослідженні, були об'єднані для аналізу та супроводжувалися еталонними послідовностями, отриманими з бази даних GenBank. Відповідні ділянки повного генома мітохондріальної ДНК *D. immitis* (AJ537512) використовували як зовнішню групу для дерев.

Молекулярне виявлення Babesia spp. і Borrelia burgdorferi sensu lato. Геномну ДНК екстрагували із зразків крові, відібраних з ЕДТА, за допомогою набору DNAeasy Blood & Tissue (Qiagen, Німеччина) і зберігали при температурі -20°C .

Молекулярне виявлення *Babesia* spp. проводили шляхом ампліфікації фрагмента 550 п. о. 18S рДНК, як описано іншими авторами [125,126]. Для молекулярного скринінгу спірохет (*Borrelia burgdorferi* s. l.) були використані родоспецифічні праймери: 132f/905r і 220f/824r для ампліфікації фрагментів гена flaB (774 і 605 п. о.) відповідно [127] у протоколі вкладеної ПЛР з використанням модифікованих умов реакції [128]. Позитивний (секвеновані ізоляти *Babesia microti* або *Borrelia burgdorferi* s. l.) і негативний (стерильна вода) контролю були включені в кожен набір ПЛР. Амплікони візуалізували за допомогою барвника Midori Green (Nippon Genetics Europe GmbH, Німеччина) після електрофорезу в 1,5 % агарозних гелях. Для ідентифікації видів збудників відібрані амплікони були очищені та секвеновані в обох напрямках приватною компанією (Польща). Вирівнювання послідовностей ДНК було проведено за допомогою MEGA X і CodonCode Aligner. Отримані консенсусні

послідовності порівнювали з послідовностями, депонованими в GenBank NCBI.

Для статистичної оцінки відмінностей у поширеності збудників (% інвазованих) ми застосували методи максимальної ймовірності на основі логарифмічного лінійного аналізу таблиць непередбачуваності в IBM SPSS Statistics, як детально описано в попередніх роботах [129]. Для кожного рівня аналізу, починаючи з найскладнішої моделі, що включає всі можливі основні ефекти та взаємодії, ті комбінації, які не несли суттєвих відмінностей ($p > 0,05$) у варіації даних, були усунені поетапно, починаючи з взаємодій найвищого рівня (процедура зворотного відбору). Потім була отримана мінімально достатня модель, для якої відношення ймовірності хі-квадрат не було значущим, що вказувало на те, що модель була достатньою для пояснення даних [130].

Філогенетичний аналіз проводили за допомогою методу максимальної правдоподібності та 3-параметричної моделі Тамури. Еволюційну модель було обрано відповідно до даних після впровадження тесту моделі в MEGA X. Дискретний гамма-розподіл використовувався для моделювання еволюційних відмінностей швидкості між сайтами (5 категорій (+G, параметр = 0,2939)). *Borrelia miyamotoi* була обрана як зовнішня група.

Вибрані послідовності *B. canis*, які були ідентифіковані в зразках з України, депоновані в базі даних GenBank під номерами доступу: OM362458-OM362460.

На другому етапі досліджень аналізували та вдосконалювали методи лабораторної діагностики за дирофіляріоз у собак. Для цього було здійснено вдосконалення методики серологічної та мікроскопічної діагностики дирофіляріозу у собак з метою підвищення точності виявлення збудника та покращення ефективності діагностичних процедур.

Дослідження сироватки крові собак на D. immitis і D. repens. Всього було досліджено 194 зразки сироватки від собак (віком від 1 до 14 років; 96 самців і 98 самок) 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 вакутайнер. 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.

Тестування на антиген проводили за допомогою комерційно доступної тест-системи Heartworm Ag VetExpert згідно з інструкціями виробника. Перед цим проводили теплову обробку зразків сироватки крові згідно з методикою описаною Drake та ін. (2015) [57]. Приблизно 1-1,5 мл сироватки поміщали в пробірку і нагрівали до 104°C протягом 10 хвилин у термоблоці. Нагрівання викликало утворення коагуляту, який потім центрифугували при 16000 об./хв. протягом 5 хвилин. Після центрифугування надосадкову рідину знову тестували за допомогою того ж самого комерційного тесту Heartworm Ag, Vet Expert відповідно до інструкцій виробника.

Метод Кнотта

Дослідження крові також проводили за методом Кнотта з модифікаціями [94,133]. Додатково 108 зразків крові відібрали у пробірки з антикоагулянтом ЕДТА 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 об./хв., 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) [94]. Видова ідентифікація мікрофілярій була підтверджена за допомогою ПЛР. Морфометричні дослідження проводили за допомогою світлової мікроскопії (мікроскоп Leica DM-2500, фотокамера Leica DFC 450c).

Молекулярні дослідження були проведені на зразках крові, позитивних за методом Кнотта. Геномну ДНК виділяли з кожного позитивного на мікрофілярії зразка за допомогою комерційного набору DNeasy Blood and Tissue (Qiagen, Німеччина), дотримуючись інструкцій виробника. Для кращої ампліфікації ділянки малої субодиниці рибосомної РНК мітохондрій (12S рДНК) використовували еквімолярну комбінацію загальних і специфічних праймерів (12SF, 12SRdeg, 12SF2B, 12SR2). Мультиплексну ПЛР виконували відповідно до методики, описаної в Gioia et al. (2010). ПЛР продукти були візуалізовані в 1 % агарозному гелі забарвленому бромистим етидієм (BIO-RAD, Іспанія). Продукт ампліфікації консервативної області становив 500 п. о. (12SF/12SRdeg) для зразків крові від собак з виявленими філяріями, а для одночасного виявлення *D. immitis* і *D. repens* специфічного фрагмента був 204 п. о. (12SF2B/12SRdeg) і 327 п. о. (12SF/12SR2) відповідно. Об'єм кожної реакції ПЛР становив 20 мкл, із вмістом 1 мкл ДНК для кожного зразка. Використані умови термоциклеру: 95°C протягом 10 хв; 40 циклів при 92°C протягом 30 с, 49°C протягом 45 с, 72°C протягом 1 хв і остаточний етап елонгації при 72°C протягом 10 хв.

На **третьому етапі** досліджень проводили гематологічні та біохімічні дослідження крові собак із дирофіляріозом з метою оцінки фізіологічного стану тварин та виявлення патологічних змін, зумовлених інвазією. Забір крові здійснювали у стерильних умовах із медіальної вени передпліччя. Загальний аналіз крові проводили за допомогою гематологічного аналізатора (Sysmex XT-2000iV, Японія), визначаючи такі показники: еозинофіли (EOS), базофіли (BAS), нейтрофіли (%) (NEU %),

лімфоцити (%) (LYM %), моноцити (%) (MONO %), еозинофіли (%) (EOS %), базофіли (%) (BAS %), еритроцити (RBC), гемоглобін (HGB), гематокрит (HCT), середній об'єм еритроцита (MCV), середній вміст гемоглобіну в еритроциті (MCH), середня концентрація гемоглобіну в еритроциті (MCHC), розподіл еритроцитів за об'ємом (RDW %), тромбоцити (PLT), середній об'єм тромбоцитів (MPV). Лейкоцитарну формулу визначали мікроскопічно на мазках, забарвлених за Романовським-Гімзою.

Для біохімічного аналізу використовували автоматичний аналізатор (Olympus AU480, Японія). Отримані дані використовували для оцінки функціонального стану печінки, нирок та обміну речовин у собак із підтвердженим дирофіляріозом.

На *четвертому етапі* проводили рентгенологічні дослідження для виявлення кардіопульмональних змін, характерних за дирофіляріозу. Знімки виконували у бічній та вентродорсальній проекціях (Mindray DigiEye 280, Mindray Bio-Medical Electronics, Китаї).

На *п'ятому етапі* досліджень проводили апробацію ксеномоніторингових досліджень комарів та з'ясовували їх ураженість збудниками дирофіляріозу собак. Комарів для досліджень збирали протягом 2022-2023 років на території Вінницької і Хмельницької областей протягом вечірніх годин. Комарів збирали 2-3 рази на місяць з травня по жовтень за загально прийнятими методами. Комарів морфологічно ідентифікували за визначниками [131].

Для проведення молекулярних досліджень і виділення ДНК комарів було розділено на 75 проб, що склалися із 50 особин одного виду, зібраних в одному місці. ДНК для молекулярного аналізу екстрагували з цілих комарів шляхом гомогенізації всього пулу за допомогою ступки для подрібнення в 500 мкл фосфатно-сольового розчину. Екстраговану ДНК

виділяли за допомогою комерційного набору DNeasy® Blood and Tissue Kit (QIAGEN, Німеччина), як зазначено в інструкціях виробника.

Полімеразно-ланцюгову реакцію обох видів дирофілярій проводили з використанням праймерів послідовностей субодиниці гена цитохромоксидази (COI), специфічної для *D. immitis* DiIm COI-F1 (5'- AGT GTA GAG GGT CAG CCT GAG TTA-3') та DiIm COI -R1 (5'-ACA GGC ACT GAC AAT ACC AAT-3') і DiRe COI-F1 (5'-AGT GTT GAT GGT CAA CCT GAA TTA- 3') і DiRe COI-R1 (5'-GCC AAA ACA GGA ACA GAT AAA ACT-3') для *D. repens* [132]. Усі зразки досліджували окремо на *D. repens* та *D. immitis*. ПЛР проводили в таких циклічних умовах: первинна денатурація при 95 °C протягом 5 хв, потім 40 циклів денатурації при 95 °C протягом 45 с, відпал при 61 °C протягом 1 хв та елонгація при 72 °C протягом 1 хв, з подальшою остаточною елонгацією при 72 °C протягом 7 хв і етапом витримки при 4 °C.

Амплікони візуалізували за допомогою барвника Midori Green (Nippon Genetics Europe GmbH, Німеччина) після електрофорезу в 1 % агарозних гелях. Вибрані амплікони були очищені та секвеновані в обох напрямках. Вирівнювання послідовностей ДНК проводили за допомогою програми Geneious Prime.

На шостому етапі досліджень з'ясовували ефективність використаних різних схем лікування за дирофіляріозу. У дослідженні ефективності лікування було використано 13 собак – 7 самок та 6 самців. Їх вік був у діапазоні від 2 до 12 років, а вага становила від 8 до 75 кг. Собак лікували в клініці дрібних тварин «Ветхаус» м. Вінниця у період з 2019 року до 2023 року. Для виявлення циркулюючих у крові мікрофілярій було застосовано модифікований метод Кнотта [23]. Антигени у крові собак до *D. immitis* визначали за допомогою тест-системи Heartworm Ag VetExpert. У випадках мікрофіляремії для ідентифікації інвазій *D. immitis* та *D. repens* використовували ПЛР дослідження, як опубліковано раніше [50,107].

Було зібрано епізоотологічні дані, клінічний анамнез та проведено лабораторні дослідження, які включали аналіз крові, рентгенографію та ехокардіографію грудної клітки (М-режим, двовимірна та доплерівська ехокардіографія).

Отримані цифрові дані були проаналізовані за допомогою статистичного програмного забезпечення MS Excel 2007. Визначено середнє арифметичне (M) та стандартну похибку середнього (m). Для оцінки статистичної значущості різниці (p) між середніми значеннями двох варіаційних рядів використовувався t-критерій Стьюдента. Різниця вважалася статистично значущою при рівні ймовірності $p \leq 0,05$.

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

3.1 Молекулярний скринінг собак на трансмісивні інвазії

За результатами дослідження зразків крові 1662 собак із Вінницької, Хмельницької та Чернівецької областей було виявлено чотири збудники трансмісивних інвазій. У таблиці представлені результати досліджень щодо поширеності паразитарних інвазій серед тварин у трьох областях України: Вінницькій, Хмельницькій та Чернівецькій (табл. 3.1). Аналіз охоплював чотири основні збудники: *Dirofilaria* spp., *Babesia* spp., *Borrelia* spp. та *Neoehrlichia micurensis*. У Вінницькій області найбільш поширеним був бабезіоз, який виявлено у 149 голів (24,47 %), тоді як дирофіляріоз відзначено у 42 тварин (6,9 %), бореліоз у 31 тварини (5,09 %), а неоерліхіоз – у 4 тварин (0,65 %).

Таблиця 3.1

Розподіл інвазованих собак за результатами ПЛР дослідження на трансмісивні інвазії

Збудник	Вінницька область гол. інв./ЕІ	Хмельницька область гол. інв./ЕІ	Чернівецька область гол. інв./ЕІ
<i>Dirofilaria</i> spp.	42/6,9 %	36/7,63 %	28/4,82 %
<i>Babesia</i> spp.	149/24,47 %	112/23,73 %	96/16,52 %
<i>Borrelia</i> spp.	31/5,09 %	46/9,74 %	35/6,02 %
<i>Neoehrlichia micurensis</i>	4/0,65 %	-	-
Всього	609	472	581

У Хмельницькій області кількість випадків бабезіозу становила 112 (23,73 %), бореліозу – 46 (9,74 %), дирофіляріозу – 36 (7,63 %), тоді як випадки неоерліхіозу не виявлено. У Чернівецькій області *Babesia* spp. виявлено у 96 тварин (16,52 %), *Borrelia* spp. у 35 (6,02 %), *Dirofilaria* spp. у 28 (4,82 %), а випадків *Neoehrlichia micurensis* також не виявлено. Загальна кількість обстежених тварин у Вінницькій області становила 609, у Хмельницькій – 472, а в Чернівецькій – 581. *Anaplasma phagocytophilum* не було виявлено у жодному із зразків, що вказує на низьку поширеність цього збудника у вибраних регіонах.

Статевий аналіз обстежених тварин свідчить про те, що серед інвазованих тварин спостерігалось переважання самців. Зокрема, за дирофіляріозу уражені самці становили близько 69 %, тоді як самки – 31 %. За бабезіозу співвідношення було приблизно рівномірним – 52 % на 48 %. За бореліозу характерним була більша кількість випадків серед самців – 58 %, а самок – 42 %. Вік тварин, у яких виявляли паразитарні захворювання, переважно становив від 3 до 7 років, що може свідчити про тривале перебування під впливом факторів ризику, таких як проживання в ендемічних районах і контакти з переносниками інвазій.

Аналіз порід показав, що до групи ризику щодо трансмісивних інвазій переважно потрапляли собаки порід, схильних до активного способу життя і ті, які проводили час на природі (вівчарки, лайки, ретривери), тоді як у декоративних порід (пуделі, болонки, такси) захворювання зустрічалось рідше, що може бути пов'язано з умовами утримання.

Щодо симптомів, то за дирофіляріозу спостерігалися такі ознаки, як хронічний кашель, задишка, втрата маси тіла та підвищена стомлюваність. Бабезіоз супроводжувався лихоманкою, жовтяницею, темною сечею та анемією. Бореліоз проявлявся кульгавістю, млявістю, періодичною лихоманкою та ураженням суглобів. Неоерліхіоз, хоча і рідко

діагностований, мав ознаки, подібні до бабезіозу, зокрема гарячку, депресію та збільшення лімфатичних вузлів.

Таким чином, отримані результати свідчать про значну поширеність паразитарних інвазій серед тварин досліджених областей, що вимагає впровадження профілактичних заходів, зокрема регулярної діагностики та проведення інсектицидних обробок для запобігання зараженню.

3.1.1 Молекулярно-генетична ідентифікація *Dirofilaria repens*

За результатами молекулярного скринінгу крові собак на виявлення *Dirofilaria spp.* з використанням трьох видоспецифічних генетичних маркерів було отримано амплікони очікуваної довжини, що підтверджує наявність збудника у досліджуваних зразках (рис. 3.1).

Для ампліфікації фрагмента гена COI довжиною 1650 пар основ (п.о.) використовували два набори праймерів.

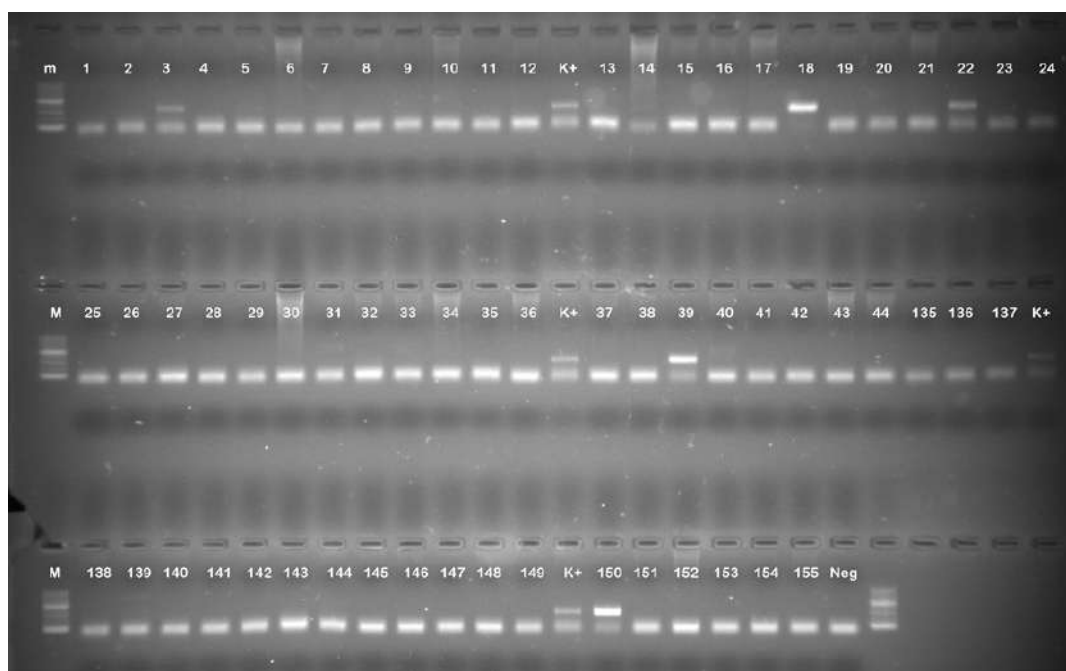


Рис. 3.1 Гель-електрофорез продуктів ПЛР на *Dirofilaria spp.*

Другим маркером слугував фрагмент гена NADH довжиною 516 п.о.. Третім маркером був фрагмент внутрішньої транскрибованої спейсингової ділянки ITS-1 рибосомної ДНК (AF217800) довжиною 800 п.о..

Для підтвердження видоспецифічної ідентифікації *D. repens* з використанням трьох вищезазначених генетичних маркерів було проведено секвенування ПЛР-продуктів для всіх зразків крові від собак. Отримані нуклеотидні послідовності порівняно із записами в базі даних GenBank для підтвердження видової приналежності. У всіх секвенованих зразках була виявлена лише ДНК *D. repens*, що підтверджує високу специфічність обраних маркерів для даного виду.

Отримані послідовності *D. repens* було збережено в базі даних GenBank (табл. 3.2).

Таблиця 3.2

**Секвеновані нуклеотидні послідовності *Dirofilaria repens*,
збережені в базі даних GenBank**

Гаплотип	Ген COI (1-й фрагмент)	Ген COI (2-й фрагмент)	Ген NADH	rRNA гаплотип	Ген ITS-1
1	ON540885	ON540062	ON572064	A	ON554183
1	ON540884	ON540060	ON572107	-	-
2	ON540886	ON540063	ON572053	B	ON554184
3	ON540887	ON540061	ON572106	-	-
4	ON540883	ON540064	ON572049	B	ON554185

При порівнянні послідовностей із відомими послідовностями із Національного центру біотехнологічної інформації (NCBI, США), зразки гена COI продемонстрували найвищий рівень ідентичності (97–100 %) з послідовністю *D. repens*, ізольованою у випадку дирофіляріозу людини в Хорватії (KX265049), а також із зразком, виділеним у випадку шкірного дирофіляріозу у собаки в Італії (KX265048). Крім того, амплікони показали ідентичність у межах 97–100 % з послідовністю *D. repens*, ізольованою з крові собаки в Угорщині (KX265091). Ці результати підкреслюють

надійність використаних маркерів для ідентифікації *D. repens* і демонструють високу генетичну подібність паразитів, виділених із різних географічних регіонів та від різних видів-господарів.

3.1.2 Генетичний поліморфізм та гаплотипи мтДНК (COI, NADH) та рДНК (ITS-1) *Dirofilaria repens*

За результатами досліджень було ідентифіковано чотири гаплотипи у мітохондріальній ДНК серед п'яти проаналізованих зразків. Перший гаплотип був ідентифікований у 2-х зразках. Усі інші гаплотипи відрізнялися від першого гаплотипу поліморфізмом від 1 до 5 нуклеотидів.

Перший гаплотип

1-й фрагмент COI:

>ON540885.1 *D. repens* isolate 39 cytochrome c oxidase subunit I (COX1) gene, partial cds; mitochondrial
 TGTTCGATTCGTTTTGAATTATCTAGTCCTGGTGGTTATTTGTTTTTGGTAGTGGTCAGGTGTATAATTC
 TGTTCCTTACTATGCATGGTGTGTTGATGATTTTTTTATGGTTATACCTATTTTGATTGGTGGTTTTGGT
 AATTGGATGTTGCCTTTGATATTGGGGGCTCCTGAGATGGCGTTTCCTCGTGTTAATGCTTTGTCTTTTT
 GGTTTACTTTTGTGCTTTGTTAATGGTTTATCAATCTTTTTTATTGGTGGTGGACCTGGTAGTAGTTG
 AACTTTTTATCCTCCTTTAAGTGTGATGGTCAACCTGAATTATCTTTGGATAGTATAATTTGGGTTTA
 CATACTGTAGGTATTGGTTCTTTGTTGGGTGCTATTAATTTTATGGTTACTACTCAGAATATGCGTTCTA
 CTGCTGTTACTTTAGATCAGATTAGTATGTTTGTGTTGAACCTCTTATTTGACTTCTTTCTTTTAGTTTT
 ATCTGTTCTGTTTTAGCTGGTTCTTTGTTGTTTTGTTATTAGATCGTAATTTAATACTTCTTTTTAT
 GATA

2-й фрагмент COI

>ON540062.1 *D. repens* isolate 39 cytochrome c oxidase subunit I (COX1) gene, partial cds; mitochondrial
 GGATTGCTGTTTTAGGTAATCTGTTTGAAGTCATCATATGTATACTGCTGGTTAGATATTGATACTCG
 AACTTATTTTAGTGCTGCTACTATGATTATTGCTATTCCTAGAGCTGTTAAGATTTTAAATTGGTTGGGT
 ACTTTTTTGGTTCTAATCAGAAGATTCAACCTCTTTGATGTTGAACCTTATAGTTTTATTTTCTTTTTA
 CTGTTGGTGGTTAAGTGGTATTATTTAAGTTCTGCTAGTTTGGATATTATTTACATGATACTTATTA
 TGTTGTAGCTCATTTTCATTATACTTTGAGTTTAGGTGCTGTTTATGGTATTTTTTGTGGTTTTTGTTTA
 TGGTTACCTTATATATATGGTATTTCTTTTGATGGAATGATGATAATAGCTGTTTTTTTTGTTTTTTG
 TTGGTAAATATAACTTTTTTCCATACATTTTGCTGGTTTACAAGGTATGCCTCGTAAATTTTGGGA
 TTATCCTGATTGTTTTCTGCTTTTCAGATTATTTCTTCTTTGGGTTCTGTTATTACTTTTGTGGTTTT
 ATTTTATTTAATTATTTGCTTATTGATTCTATTTTTTTTTT

NADH:

>ON572064.1 *D. repens* isolate 0039 NADH dehydrogenase subunit I (ND1) gene, partial cds; mitochondrial
 TTTTTTTGTTTTATTTTGGTTTTTTTATTATGATTTTTTTATTTTGCAGTCTATTGCTTTTTTGACTT
 TATTAGAACGTCATTTTTTGGGGGGTCTCAGTGTCTGTTTGGTCCCTAATAAGGTTGGTTATTCTGGTTT
 GTTTCAGGCTCTTTTGATGGTTTGAAGTTGTTAAAAAAGGAACAATTGTTTTTTTTTATTCTAGTTGA
 TTTTCTTTTTTGTATGCCTTTATGTTGTTTTGTTTTAATGGTTTTTTTTTGTATTACTTTGCCTTATT
 TTTTTGTTTTTTGACTTTTGAATATTCTAGTTTGTTTTTGTTTTGCTTAATGGGTGTTTCTGTTATTTT

*rRNA Haplotype**A**ITS-1*

>ON554183.1 *D. repens* isolate U39 small subunit ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 1, partial sequence
 GAAAAGCGGAGACTGCTGTTTTGATACCTTTTCGAGGTGGAGATTCTTTGGTGGAAACCGCTTTAATCGCA
 GTGGCTTGAACCGGGCAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTATCGTGC
 TTCAAAAATAACAAAAAACTTAATAATATATAATGATCAATTTGATGATTAAATATTATTATTATATT
 CATTATTTATTATTATTATTAATAATTCTATTAACATATATATATTTTTCTTTTTCAAATATGCGAGTA
 ATTGAAAAAGAATGAAATAAAAAATGATATTGTTAATAGATGAAAATGAATGATAATAATAATAATAA
 TAATGATATAATTTTTATAAACGGTGATATTCGTTGGTGTCTATACTTTATCAAAGTTATCGCCTTACCG
 TCGATAACAATGACGATAAAGTGATAGCTTAATTGATTTTAATAATGAAATTAATTCATTTTATAAATCA
 ATTAAGTAGACTTAATAAGCATTTTAGCTAGTATGCTACCAACAAAATAAATCTATACACATATGTAAAC
 AAAAAATATATT

Другий гаплотип*1-й фрагмент COI*

>ON540887.1 *D. repens* isolate 106 cytochrome c oxidase subunit I (COX1) gene, partial cds; mitochondrial
 TGTGATTCGTTTTGAATTATCTAGTCCTGGTGGTTATTTGTTTTTGGTAGTGGTCAGGTGTATAATTC
 TGTCTTACTATGCATGGTGTGTTGATGATTTTTTTATGGTTATACCTATTTTGATTGGTGGTTTTGGT
 AATTGGATGTTGCCTTTGATATTGGGGGCTCCTGAGATGGCGTTTCCTCGTGTTAATGCTTTGTCTTTTT
 GGTTTACTTTTGTGCTTTGTTAATGGTTTATCAATCTTTTTTTATTGGTGGTGGACCTGGTAGTAGTTG
 AACTTTTTATCCTCCTTTAAGTGTTGATGGTCAACCTGAATTATCTTTGGATAGTATAATTTGGGTTTA
 CATACTGTAGGTATTGGTTCTTTGTTGGGTGCTATTAATTTTATGGTTACTACTCAGAATATGCGTTCTA
 CTGCTGTTACTTTAGATCAGATTAGTATGTTTGTTGGACTTCTTATTTGACTTCTTTTCTTTAGTTTT
 ATCTGTTCTGTTTTAGCTGGTTCTTTGTTGTTTTGTTATTAGATCGTAATTTTAATACTTCTTTTTAT
 GATA

2-й фрагмент COI

>ON540061.1 *D. repens* isolate 106 cytochrome c oxidase subunit I (COX1) gene, partial cds; mitochondrial
 GGATTGCTGTTTTAGGTACTTCTGTTTGAGGTCATCATATGTATACTGCTGGTTAGATATTGATACTCG
 AACTTATTTTAGTGCTGCTACTATGATTATTGCTATTCCTAGAGCTGTTAAGATTTTAAATTGGTTGGGT
 ACTTTTTTTGGTTCTAATCAGAAGATTCAACCTCTTTGATGTTGAACCTATAGTTTTATTTTCTTTTTA
 CTGTTGGTGGTTAAGTGGTATTATTTTAAAGTTCTGAGTTGGATATTATTTTACATGATACTTATTA
 TGTTGTAGCTCATTTTCATTATACTTTGAGTTTAGGTGCTGTTTATGGTATTTTTTGTGGTTTTTGTTTA
 TGGTTACCTTATATATATGGTATTTCTTTTGATGGAATGATGATAATAGCTGTTTTTTTTTGTTTTTTTG
 TTGGTACTAATAAATTTTCTTATACATTTTGCTGGTTTACAAGGTATGCCTCGTAAATTTTGGA
 TTATCCTGATTGTTTTCTGCTTTTCAGATTATTTCTTCTTTGGGTTCTGTTATTACTTTTGTGGTTTT
 ATTTTATTTAATTATTTGCTTATTGATTCTATTTTTTTTTT

NADH

>ON572106.1 *D. repens* isolate 0106 NADH dehydrogenase subunit I (ND1) gene, partial cds; mitochondrial
 TTTTTTTGTTTTATTTTGGTTTTTTTATTATGATTTTTTTTATTTTGCAGTCTATTGCTTTTTTGA
 TATTAGAACGTCATTTTTTGGGGGGTCTCAGTGTCGATTGGTCCCTAATAAGGTTGGTTATTCTGGTTT
 GTTTCAGGCTCTTTTGATGGTTTGAAGTTGTTAAAAAAGGAACAATTGTTTTTTTTTATTCTAGTTGA
 TTTTCTTTTTTGTATGCCTTTATGTTGTTTTGTTTTAATGGTTTTTTTTGATTTACTTTGCCTTATT
 TTTTGTTTTTTGACTTTTGAGTATTCTAGTTTGTTTTTGTTTTGCTTAATGGGTGTTTCTGTTTATTTT

rRNA Haplotype

-

ITS-1

Третій гаплотип

1-й фрагмент COI

>ON540883.1 *D. repens* isolate U18 cytochrome c oxidase subunit I (COX1) gene, partial cds; mitochondrial
 TGTTCGATTCGTTTTGAATTATCTAGTCCTGGTGGTTATTTGTTTTTTGGTAGTGGTCAGGTGTATAATTC
 TGTTCCTTACTATGCATGGTGTGTTGATGATTTTTTTATGGTTATACCTATTTTGATTGGTGGTTTTGGT
 AATTGGATGTTGCCTTTGATATTGGGGGCTCCTGAGATGGCGTTTCCTCGTGTTAATGCTTTGTCTTTTT
 GGTTTACTTTTGTTGCTTTGTTAATGGTTTATCAATCTTTTTTTGTTGGTGGTGGACCTGGTAGTAGTTG
 AACTTTTTATCCTCCTTTAAGTGTGATGGTCAACCTGAATTATCTTTGGATAGTATAATTTGGGTTTA
 CATACTGTAGGTATTGGTTCTTTGTTGGGTGCTATTAATTTTATGGTTACTACTCAGAATATGCGTTCTA
 CTGCTGTTACTTTAGATCAGATTAGTATGTTTGTGTTGAACCTCTTATTTGACTTCTTTTCTTTTAGTTTT
 ATCTGTTCTGTTTTAGCTGGTTCTTTGTTGTTTTGTTATTAGATCGTAATTTTAATACTTCTTTTTAT
 GATA

2-й фрагмент COI

>ON540064.1 *D. repens* isolate U18 cytochrome c oxidase subunit I (COX1) gene, partial cds; mitochondrial
 GGATTGCTGTTTTAGGTACTTCTGTTTGAGGTCATCATATGTATACTGCTGGTTAGATATTGATACTCG
 AACTTATTTTAGTGCTGCTACTATGATTATTGCTATTCCTAGAGCTGTTAAGATTTTAAATTGGTTGGGT
 ACTTTTTTTGGTTCTAATCAGAAGATTCAACCTCTTTGATGTTGAACCTTATAGTTTTATTTTTCTTTTTA
 CTGTTGGTGGTTAAGTGGTATTATTTAAGTTCTGCTAGTTTGGATATTATTTACATGATACTTATTA
 TGTGTAGCTCATTTCATTATACCTTGAGTTTAGGTGCTGTTTATGGTATTTTTTGTTGGTTTTGTTTA
 TGGTTACCTTATATATATGGTATTTCTTTTGATGGAATGATGATAATAGCTGTTTTTTTTTGTTTTTTG
 TTGGTACTAATAAATTTTTTCTTATACATTTTGCTGGTTTACAAGGTATGCCTCGTAAAAATTTGGA
 TTATCCTGATTGTTTTCTGCTTTTCAAATTATTTCTTCTTTGGGTTCTGTTATTACTTTTGTGGTTTT
 ATTTTATTTAATTATTTGCTTATTGATTCTATTTTTTTTTT

NADH

>ON572049.1 *D. repens* isolate 0U18 NADH dehydrogenase subunit I (ND1) gene, partial cds; mitochondrial
 TTTTTTTGTTTTATTTTGGTTTTTTTATTATGATTTTTTTATTTTGCAGTCTATTGCTTTTTTGACTT
 TATTAGAACGTCATTTTTGGGGGGTCTCAGTGTCGATTGGTCCTAATAAGGTTGGTTATTCTGGTTT
 GTTTCAGGCTCTTTTTGATGGTTTGAAGTTGTTAAAAAAGGAACAATTGTTTTTTTTTATTCTAGTTGA
 TTTTCTTTTTTGTTTATGCCTTTATGTTGTTTTGTTTTAATGGTTTTTTTTTGATTTACTTTGCCTTATT
 TTTTTGTTTTTTGACTTTTGAGTATTCTAGTTTGTTTTTGTTTTGCTTAATGGGTGTTTCTGTTTATTTT

rRNA Haplotype

B

ITS-1

>ON554185.1 *D. repens* isolate U18 small subunit ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 1,
 partial sequence
 GAAAAGCGGAGACTGCTGTTTTGATACCTTTCGAGGTGGAGATTCTTTGGTGGAAACCGCTTTAATCGCA
 GTGGCTTGAACCGGGCAAAAGTCGTAACAAGGTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTATCGTGC
 TTCAAAAAATAACAAAAAACTTAATAATATATAATGATCAATTTGATGATTAAATATTATTATTATATT
 CATTAATTTATTATTATTATTAATAATTCTATTAAACATATATATATTTTTCTTTTTCAAATATGCGAGTA
 ATTGAAAAAGAATGAAATAAAAAATGATATTGTTAATAGATGAAAATGAATGATAATAATAATAATAA
 TAATAATGATATAATTTTTATAAACGGTGATATTCGTTGGTGTCTATACTTTATCAAAGTTATCGCCTTA
 CCGTCGATAACAATGACGATAAAGTGATAGCTTAATTGATTTTAATAATGAAATTAATTCATTTTATAAA
 TSAATTAAGTAGACTTAATAAGCATTTTAGCTAGTATGCTACCAACAAAATAAATCTATACACATATGTA
 AASAAAAATATATT

Четвертий гаплотип

1-й фрагмент COI

>ON540886.1 *D. repens* isolate 22 cytochrome c oxidase subunit I (COX1) gene, partial cds; mitochondrial
 TGTGATTCGTTTTGAATTATCTAGTCCTGGTGGTTATTTGTTTTTGGTAGTGGTCAGGTGTATAATTC
 TGTTCTTACTATGCATGGTGTGTTGATGATTTTTTTATGGTTATACCTATTTTGATTGGTGGTTTTGGT
 AATTGGATGTTGCCTTTGATATTGGGGGCTCCTGAGATGGCGTTTCCTCGTGTTAATGCTTTGTCTTTTT
 GGTTTACTTTTGTGCTTTGTTAATGGTTTATCAATCTTTTTTGTGGTGGTGGACCTGGTAGTAGTTG
 AACTTTTTATCCTCCTTTAAGTGTGATGGTCAACCTGAATTATCTTTGGATAGTATAATTTTGGGTTTA
 CATACTGTAGGTATTGGTTCTTTGTTGGGTGCTATTAATTTTATGGTTACTACTCAGAATATGCGTTCTA
 CTGCTGTTACTTTAGATCAGATTAGTATGTTTGTGTTGAACCTCTTATTTGACTTCTTTTCTTTAGTTTT
 ATCTGTTCTGTTTTAGCTGGTTCTTTGTTGTTTTGTTATTAGATCGTAATTTAATACTTCTTTTTAT
 GATA

2nd Fragment COI

>ON540063.1 *D. repens* isolate 22 cytochrome c oxidase subunit I (COX1) gene, partial cds; mitochondrial
 GGATTGCTGTTTTAGGTACTTCTGTTTGAGGTCATCATATGTATACTGCTGGTTAGATATTGATACTCG
 AACTTATTTTAGTGCTGCTACTATGATTATTGCTATTCTAGAGCTGTTAAGATTTTAAATTGGTTGGGT
 ACTTTTTTGGTTCTAATCAGAAGATTCAACCTCTTTGATGTTGAACCTATAGTTTTATTTTCTTTTTA
 CTGTTGGTGGTTAAGTGGTATTATTTAAGTTCTGCTAGTTGGATATTATTTACATGATACTTATTA
 TGTTGTAGCTCATTTTCATTATACTTTGAGTTTAGGTGCTGTTTATGGTATTTTTTGTGGTTTTGTTTA
 TGGTTACCTTATATATATGGTATTTCTTTTGATGGAATGATGATAAAGCTGTTTTTTTTGTTTTTTG
 TTGGTACTAATAAATTTTTTCTATACATTTTGCTGGTTTACAAGGTATGCCTCGTAAAATTTTGA
 TTATCCTGATTGTTTTCTGCTTTTCAGATTATTCTTCTTTGGGTTCTGTTATTACTTTTGTGGTTTT
 ATTTATTTAATTATTGCTTATTGATTCTATTTTTTTTT

NADH

>ON572053.1 *D. repens* isolate 0022 NADH dehydrogenase subunit I (ND1) gene, partial cds; mitochondrial
 TTTTTTTGTTTTATTTTGGTTTTTTTATTATGATTTTTTTATTTTGCAGTCTATTGCTTTTTTGACTT
 TATTAGAACGTCATTTTTTGGGGGTTCTCAGTGTGCTATTGGTCTAATAAGGTTGGTTATTCTGGTTT
 GTTTCAGGCTCTTTTTGATGGTTTGAAGTTGTTAAAAAGGAACAATTGTTTTTTTTTATTCTAGTTGA
 TTTTCTTTTTTGTTTATGCCTTTATGTTGTTTTGTTTTAATGGTTTTTTTTGATTTACTTTGCCTTATT
 TTTTTGTTTTTTGACTTTTGAGTATTCTAGTTTGTTTTTGTTTTGCTTAATGGGTGTTTCTGTTATTTT

rRNA Haplotype

B

ITS-1

>ON554184.1 *D. repens* isolate U22 small subunit ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 1,
 partial sequence
 GAAAAGCGGAGACTGCTGTTTTGATACCTTTTCGAGGTGGAGATTCTTTGGTGGAACCGCTTTAATCGCA
 GTGGCTTGAACCGGGCAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTATCGTGC
 TTCAAAAATAACAAAAAACTTAATAATATATAATGATCAATTTGATGATTTAATATTATTATTATATT
 CATTTATTTATTTATTTAATAAATCTATTAAACATATATATATTTTTCTTTTTCAAATATGCGAGTA
 ATTGAAAAAGAATGAAATAAAAAATGATATTGTTAATAGATGAAAATGAATGATAATAATAATAATAA
 TAATAATGATATAATTTTTATAAACGGTGATATTCGTTGGTGTCTATACTTTATCAAAGTTATCGCCTTA
 CCGTCGATAACAATGACGATAAAGTGATAGCTTAATTGATTTTAATAATGAAATTAATTCATTTTATAAA
 TSAATTAAGTAGACTTAATAAGCATTTTAGCTAGTATGCTACCAACAAAAATAAATCTATACACATATGTA
 AACAAAAATATATT

Загалом спостерігалась низька генетична варіативність.

Консенсусні послідовності з обох маркерів мтДНК (COI: 1165 п.о.,
 NADH: 355 п.о.) були об'єднані, а остаточна послідовність мтДНК
 довжиною 1520 п.о. порівняна за допомогою ClustalW.

DIRREPENS1	TGTTGATTCGTTTTGAATTATCTAGTCCTGGTGGTTATTTGTTTTTGGTAGTGGTCAGG	60
DIRREPENS2	TGTTGATTCGTTTTGAATTATCTAGTCCTGGTGGTTATTTGTTTTTGGTAGTGGTCAGG	60
DIRREPENS3	TGTTGATTCGTTTTGAATTATCTAGTCCTGGTGGTTATTTGTTTTTGGTAGTGGTCAGG	60
DIRREPENS4	TGTTGATTCGTTTTGAATTATCTAGTCCTGGTGGTTATTTGTTTTTGGTAGTGGTCAGG	60

DIRREPENS1	TGTATAATTCTGTTCTTACTATGCATGGTGTGTTGATGATTTTTTTATGGTTATACCTA	120
DIRREPENS2	TGTATAATTCTGTTCTTACTATGCATGGTGTGTTGATGATTTTTTTATGGTTATACCTA	120
DIRREPENS3	TGTATAATTCTGTTCTTACTATGCATGGTGTGTTGATGATTTTTTTATGGTTATACCTA	120
DIRREPENS4	TGTATAATTCTGTTCTTACTATGCATGGTGTGTTGATGATTTTTTTATGGTTATACCTA	120

DIRREPENS1	TTTGTATTGGTGGTTTTGGTAATTGGATGTTGCCTTTGATATTGGGGGCTCCTGAGATGG	180
DIRREPENS2	TTTGTATTGGTGGTTTTGGTAATTGGATGTTGCCTTTGATATTGGGGGCTCCTGAGATGG	180
DIRREPENS3	TTTGTATTGGTGGTTTTGGTAATTGGATGTTGCCTTTGATATTGGGGGCTCCTGAGATGG	180
DIRREPENS4	TTTGTATTGGTGGTTTTGGTAATTGGATGTTGCCTTTGATATTGGGGGCTCCTGAGATGG	180

DIRREPENS1	CGTTTCCTCGTGTTAATGCTTTGTCTTTTTGGTTTACTTTTGTGCTTTGTTAATGGTTT	240
DIRREPENS2	CGTTTCCTCGTGTTAATGCTTTGTCTTTTTGGTTTACTTTTGTGCTTTGTTAATGGTTT	240
DIRREPENS3	CGTTTCCTCGTGTTAATGCTTTGTCTTTTTGGTTTACTTTTGTGCTTTGTTAATGGTTT	240
DIRREPENS4	CGTTTCCTCGTGTTAATGCTTTGTCTTTTTGGTTTACTTTTGTGCTTTGTTAATGGTTT	240

DIRREPENS1	ATCAATCTTTTTTTTATTGGTGGTGGACCTGGTAGTAGTTGAACTTTTATCCTCCTTTAA	300
DIRREPENS2	ATCAATCTTTTTTTTATTGGTGGTGGACCTGGTAGTAGTTGAACTTTTATCCTCCTTTAA	300
DIRREPENS3	ATCAATCTTTTTTTTATTGGTGGTGGACCTGGTAGTAGTTGAACTTTTATCCTCCTTTAA	300
DIRREPENS4	ATCAATCTTTTTTTTATTGGTGGTGGACCTGGTAGTAGTTGAACTTTTATCCTCCTTTAA	300

DIRREPENS1	GTGTTGATGGTCAACCTGAATTATCTTTGGATAGTATAATTTTGGGTTTACATACTGTAG	360
DIRREPENS2	GTGTTGATGGTCAACCTGAATTATCTTTGGATAGTATAATTTTGGGTTTACATACTGTAG	360
DIRREPENS3	GTGTTGATGGTCAACCTGAATTATCTTTGGATAGTATAATTTTGGGTTTACATACTGTAG	360
DIRREPENS4	GTGTTGATGGTCAACCTGAATTATCTTTGGATAGTATAATTTTGGGTTTACATACTGTAG	360

DIRREPENS1	GTATTGGTTCCTTTGTTGGGTGCTATTAATTTTATGGTTACTACTCAGAATATGCGTTCTA	420
DIRREPENS2	GTATTGGTTCCTTTGTTGGGTGCTATTAATTTTATGGTTACTACTCAGAATATGCGTTCTA	420
DIRREPENS3	GTATTGGTTCCTTTGTTGGGTGCTATTAATTTTATGGTTACTACTCAGAATATGCGTTCTA	420
DIRREPENS4	GTATTGGTTCCTTTGTTGGGTGCTATTAATTTTATGGTTACTACTCAGAATATGCGTTCTA	420

DIRREPENS1	CTGCTGTTACTTTAGATCAGATTAGTATGTTTGTGTTACTTCTTATTTGACTTCTTTTC	480
DIRREPENS2	CTGCTGTTACTTTAGATCAGATTAGTATGTTTGTGTTACTTCTTATTTGACTTCTTTTC	480
DIRREPENS3	CTGCTGTTACTTTAGATCAGATTAGTATGTTTGTGTTACTTCTTATTTGACTTCTTTTC	480
DIRREPENS4	CTGCTGTTACTTTAGATCAGATTAGTATGTTTGTGTTACTTCTTATTTGACTTCTTTTC	480

DIRREPENS1	TTTTAGTTTTATCTGTTCCCTGTTTTAGCTGGTTCCTTGTGTTTTTGTATTAGATCGTA	540
DIRREPENS2	TTTTAGTTTTATCTGTTCCCTGTTTTAGCTGGTTCCTTGTGTTTTTGTATTAGATCGTA	540
DIRREPENS3	TTTTAGTTTTATCTGTTCCCTGTTTTAGCTGGTTCCTTGTGTTTTTGTATTAGATCGTA	540
DIRREPENS4	TTTTAGTTTTATCTGTTCCCTGTTTTAGCTGGTTCCTTGTGTTTTTGTATTAGATCGTA	540

DIRREPENS1	ATTTTAATACTTCTTTTTATGATAGGATTGCTGTTTTAGGTACTTCTGTTTGAGGTCATC	600
DIRREPENS2	ATTTTAATACTTCTTTTTATGATAGGATTGCTGTTTTAGGTACTTCTGTTTGAGGTCATC	600
DIRREPENS3	ATTTTAATACTTCTTTTTATGATAGGATTGCTGTTTTAGGTACTTCTGTTTGAGGTCATC	600
DIRREPENS4	ATTTTAATACTTCTTTTTATGATAGGATTGCTGTTTTAGGTACTTCTGTTTGAGGTCATC	600

DIRREPENS1	ATATGTATACTGCTGGTTAGATATTGATACTCGAACTTATTTTAGTGCTGCTACTATGA	660
DIRREPENS2	ATATGTATACTGCTGGTTAGATATTGATACTCGAACTTATTTTAGTGCTGCTACTATGA	660
DIRREPENS3	ATATGTATACTGCTGGTTAGATATTGATACTCGAACTTATTTTAGTGCTGCTACTATGA	660
DIRREPENS4	ATATGTATACTGCTGGTTAGATATTGATACTCGAACTTATTTTAGTGCTGCTACTATGA	660

DIRREPENS1	TTATTGCTATTCCTAGAGCTGTTAAGATTTTTAATTGGTTGGGTACTTTTTTGGTTCTA	720
DIRREPENS2	TTATTGCTATTCCCTAGAGCTGTTAAGATTTTTAATTGGTTGGGTACTTTTTTGGTTCTA	720
DIRREPENS3	TTATTGCTATTCCCTAGAGCTGTTAAGATTTTTAATTGGTTGGGTACTTTTTTGGTTCTA	720
DIRREPENS4	TTATTGCTATTCCCTAGAGCTGTTAAGATTTTTAATTGGTTGGGTACTTTTTTGGTTCTA	720

DIRREPENS1	ATCAGAAGATTC AACCTCTTTGATGTTGAACCTATAGTTTTATTTTCTTTTACTGTTG	780

DIRREPENS2	ATCAGAAAGATTCAACCTCTTTGATGTTGAACCTATAGTTTTATTTTCTTTTACTGTTG	780
DIRREPENS3	ATCAGAAAGATTCAACCTCTTTGATGTTGAACCTATAGTTTTATTTTCTTTTACTGTTG	780
DIRREPENS4	ATCAGAAAGATTCAACCTCTTTGATGTTGAACCTATAGTTTTATTTTCTTTTACTGTTG *****	780
DIRREPENS1	GTGGTTTAAAGTGGTATTATTTTAAAGTTCTGCTAGTTTGGATATTATTTTACATGATACTT	840
DIRREPENS2	GTGGTTTAAAGTGGTATTATTTTAAAGTTCTGCTAGTTTGGATATTATTTTACATGATACTT	840
DIRREPENS3	GTGGTTTAAAGTGGTATTATTTTAAAGTTCTGCTAGTTTGGATATTATTTTACATGATACTT	840
DIRREPENS4	GTGGTTTAAAGTGGTATTATTTTAAAGTTCTGCTAGTTTGGATATTATTTTACATGATACTT *****	840
DIRREPENS1	ATTATGTTGTAGCTCATTTTCATTATACTTTGAGTTTAGGTGCTGTTTATGGTATTTTTT	900
DIRREPENS2	ATTATGTTGTAGCTCATTTTCATTATACTTTGAGTTTAGGTGCTGTTTATGGTATTTTTT	900
DIRREPENS3	ATTATGTTGTAGCTCATTTTCATTATACTTTGAGTTTAGGTGCTGTTTATGGTATTTTTT	900
DIRREPENS4	ATTATGTTGTAGCTCATTTTCATTATACTTTGAGTTTAGGTGCTGTTTATGGTATTTTTT *****	900
DIRREPENS1	GTGGTTTTTGTTTATGGTTACCTTATATATATGGTATTTCTTTTGATGGAATGATGATAA	960
DIRREPENS2	GTGGTTTTTGTTTATGGTTACCTTATATATATGGTATTTCTTTTGATGGAATGATGATAA	960
DIRREPENS3	GTGGTTTTTGTTTATGGTTACCTTATATATATGGTATTTCTTTTGATGGAATGATGATAA	960
DIRREPENS4	GTGGTTTTTGTTTATGGTTACCTTATATATATGGTATTTCTTTTGATGGAATGATGATAA *****	960
DIRREPENS1	TAGCTGTTTTTTTTGTTTTTTTGTGGTACTAATAAAGTTTTCCTATACATTTTG	1020
DIRREPENS2	TAGCTGTTTTTTTTGTTTTTTTGTGGTACTAATAAAGTTTTCCTATACATTTTG	1020
DIRREPENS3	TAGCTGTTTTTTTTGTTTTTTTGTGGTACTAATAAAGTTTTCCTATACATTTTG	1020
DIRREPENS4	TAGCTGTTTTTTTTGTTTTTTTGTGGTACTAATAAAGTTTTCCTATACATTTTG *****	1020
DIRREPENS1	CTGGTTTACAAGGTATGCCTCGTAAAAATTTTGGATTATCCTGATTGTTTTCTGCTTTTC	1080
DIRREPENS2	CTGGTTTACAAGGTATGCCTCGTAAAAATTTTGGATTATCCTGATTGTTTTCTGCTTTTC	1080
DIRREPENS3	CTGGTTTACAAGGTATGCCTCGTAAAAATTTTGGATTATCCTGATTGTTTTCTGCTTTTC	1080
DIRREPENS4	CTGGTTTACAAGGTATGCCTCGTAAAAATTTTGGATTATCCTGATTGTTTTCTGCTTTTC *****	1080
DIRREPENS1	AGATTATTTCTCTTTGGGTTCTGTTATTACTTTTGTGGTTTTATTTTATTTAATTATT	1140
DIRREPENS2	AGATTATTTCTCTTTGGGTTCTGTTATTACTTTTGTGGTTTTATTTTATTTAATTATT	1140
DIRREPENS3	AGATTATTTCTCTTTGGGTTCTGTTATTACTTTTGTGGTTTTATTTTATTTAATTATT	1140
DIRREPENS4	AGATTATTTCTCTTTGGGTTCTGTTATTACTTTTGTGGTTTTATTTTATTTAATTATT *****	1140
DIRREPENS1	TGCTTATTGATTCTATTTTTTTTCTTTTTTGTGTTTATTTTGGTTTTTTTATTATGAT	1200
DIRREPENS2	TGCTTATTGATTCTATTTTTTTTCTTTTTTGTGTTTATTTTGGTTTTTTTATTATGAT	1200
DIRREPENS3	TGCTTATTGATTCTATTTTTTTTCTTTTTTGTGTTTATTTTGGTTTTTTTATTATGAT	1200
DIRREPENS4	TGCTTATTGATTCTATTTTTTTTCTTTTTTGTGTTTATTTTGGTTTTTTTATTATGAT *****	1200
DIRREPENS1	TTTTTTTATTTTGCAGTCTATTGCTTTTTGACTTTATTAGAACGTCATTTTTTGGGGGG	1260
DIRREPENS2	TTTTTTTATTTTGCAGTCTATTGCTTTTTGACTTTATTAGAACGTCATTTTTTGGGGGG	1260
DIRREPENS3	TTTTTTTATTTTGCAGTCTATTGCTTTTTGACTTTATTAGAACGTCATTTTTTGGGGGG	1260
DIRREPENS4	TTTTTTTATTTTGCAGTCTATTGCTTTTTGACTTTATTAGAACGTCATTTTTTGGGGGG *****	1260
DIRREPENS1	TTCTCAGTGTCGATTGGTCCTAATAAGGTTGGTTATTCTGGTTTGTTCAGGCTCTTTT	1320
DIRREPENS2	TTCTCAGTGTCGATTGGTCCTAATAAGGTTGGTTATTCTGGTTTGTTCAGGCTCTTTT	1320
DIRREPENS3	TTCTCAGTGTCGATTGGTCCTAATAAGGTTGGTTATTCTGGTTTGTTCAGGCTCTTTT	1320
DIRREPENS4	TTCTCAGTGTCGATTGGTCCTAATAAGGTTGGTTATTCTGGTTTGTTCAGGCTCTTTT *****	1320
DIRREPENS1	TGATGGTTTGAAGTTGTTAAAAAAGGAACAATTGTTTTTTTTTATTCTAGTTGATTTTC	1380
DIRREPENS2	TGATGGTTTGAAGTTGTTAAAAAAGGAACAATTGTTTTTTTTTATTCTAGTTGATTTTC	1380
DIRREPENS3	TGATGGTTTGAAGTTGTTAAAAAAGGAACAATTGTTTTTTTTTATTCTAGTTGATTTTC	1380
DIRREPENS4	TGATGGTTTGAAGTTGTTAAAAAAGGAACAATTGTTTTTTTTTATTCTAGTTGATTTTC *****	1380
DIRREPENS1	TTTTTTGTTTATGCCTTTATGTTGTTTTGTTTTAATGGTTTTTTTTTGATTTACTTTGCC	1440
DIRREPENS2	TTTTTTGTTTATGCCTTTATGTTGTTTTGTTTTAATGGTTTTTTTTTGATTTACTTTGCC	1440
DIRREPENS3	TTTTTTGTTTATGCCTTTATGTTGTTTTGTTTTAATGGTTTTTTTTTGATTTACTTTGCC	1440
DIRREPENS4	TTTTTTGTTTATGCCTTTATGTTGTTTTGTTTTAATGGTTTTTTTTTGATTTACTTTGCC *****	1440
DIRREPENS1	TTATTTTTTGTTTTTTTGACTTTTGAAGTATTCTAGTTTGTGTTTTGTTTGCTTAATGGG	1500
DIRREPENS2	TTATTTTTTGTTTTTTTGACTTTTGAAGTATTCTAGTTTGTGTTTTGTTTGCTTAATGGG	1500
DIRREPENS3	TTATTTTTTGTTTTTTTGACTTTTGAAGTATTCTAGTTTGTGTTTTGTTTGCTTAATGGG	1500
DIRREPENS4	TTATTTTTTGTTTTTTTGACTTTTGAAGTATTCTAGTTTGTGTTTTGTTTGCTTAATGGG	1500

DIRREPENS1	TGTTTCTGTTTATTTT	1516
DIRREPENS2	TGTTTCTGTTTATTTT	1516
DIRREPENS3	TGTTTCTGTTTATTTT	1516
DIRREPENS4	TGTTTCTGTTTATTTT	1516

Послідовності ITS-1 довжиною 547 п.о. були вирівняні окремо із використанням програмного забезпечення MEGA X. Для аналізу гаплотипної різноманітності та розрахунку кількості гаплотипів у отриманих послідовностях мтДНК і фрагменті гена ITS-1 застосовувалося програмне забезпечення DnaSP.

У результаті аналізу було виявлено наявність лише двох чітко відмінних гаплотипів серед послідовностей ITS-1. Ці два гаплотипи відрізнялися тринуклеотидною делецією, що була зафіксована на позиції 1897 п.о. опублікованого повного генома *D. repens* (номер запису в GenBank AB973229). Гаплотипи було умовно позначено як гаплотип А та гаплотип В. Характерною ознакою гаплотипу В є наявність мотиву «ААТ» як вставки в тій самій позиції, де у гаплотипі А спостерігалася делеція цього тринуклеотидного мотиву.

Таким чином, виявлені відмінності в області ITS-1 рДНК свідчать про існування низького рівня гаплотипної різноманітності серед проаналізованих зразків *D. repens*.

ON554183.1	GAAAAGCGGAGACTGCTGTTTGTATACCTTTCGAGGTGGAGATTCTTTGGTGGAACCGC	60
ON554185.1	GAAAAGCGGAGACTGCTGTTTGTATACCTTTCGAGGTGGAGATTCTTTGGTGGAACCGC	60
ON554184.1	GAAAAGCGGAGACTGCTGTTTGTATACCTTTCGAGGTGGAGATTCTTTGGTGGAACCGC	60

ON554183.1	TTTAATCGCAGTGGCTTGAACCGGGCAAAAGTCGTAACAAGGTTCCGTAGGTGAACCTG	120
ON554185.1	TTTAATCGCAGTGGCTTGAACCGGGCAAAAGTCGTAACAAGGTTCCGTAGGTGAACCTG	120
ON554184.1	TTTAATCGCAGTGGCTTGAACCGGGCAAAAGTCGTAACAAGGTTCCGTAGGTGAACCTG	120

ON554183.1	CGGAAGGATCATTTATCGTGCTTCAAAAATAACAAAAAACTTAATAATATATAATGATCA	180
ON554185.1	CGGAAGGATCATTTATCGTGCTTCAAAAATAACAAAAAACTTAATAATATATAATGATCA	180
ON554184.1	CGGAAGGATCATTTATCGTGCTTCAAAAATAACAAAAAACTTAATAATATATAATGATCA	180

ON554183.1	ATTTGATGATTTAATATTATTATTATATTCATTATTATTATTATTATTAAATTAATCTA	240
ON554185.1	ATTTGATGATTTAATATTATTATTATTATTCATTATTATTATTATTATTAAATTAATCTA	240
ON554184.1	ATTTGATGATTTAATATTATTATTATTATTCATTATTATTATTATTATTAAATTAATCTA	240

ON554183.1	TTAACATATATATATTTTCTTTTCAAAATATGCGAGTAATTGAAAAAGAATGAAATAA	300
ON554185.1	TTAACATATATATATTTTCTTTTCAAAATATGCGAGTAATTGAAAAAGAATGAAATAA	300
ON554184.1	TTAACATATATATATTTTCTTTTCAAAATATGCGAGTAATTGAAAAAGAATGAAATAA	300

ON554183.1	AAATGATATTGTTAATAGATGAAAATGAATGATAATAATAATAAATAATAATATGAT	357	
ON554185.1	AAATGATATTGTTAATAGATGAAAATGAATGATAATAATAATAATAATAATAATGAT	360	
ON554184.1	AAATGATATTGTTAATAGATGAAAATGAATGATAATAATAATAATAATAATAATGAT	360	

ON554183.1	ATAATTTTATAAAACGGTGATATTCGTTGGTGTCTATACTTTATCAAAGTTATCGCCTTA	417	
ON554185.1	ATAATTTTATAAAACGGTGATATTCGTTGGTGTCTATACTTTATCAAAGTTATCGCCTTA	420	
ON554184.1	ATAATTTTATAAAACGGTGATATTCGTTGGTGTCTATACTTTATCAAAGTTATCGCCTTA	420	

ON554183.1	CCGTCGATAACAATGACGATAAAGTGATAGCTTAATTGATTTTAATAATGAAATTAATTC	477	
ON554185.1	CCGTCGATAACAATGACGATAAAGTGATAGCTTAATTGATTTTAATAATGAAATTAATTC	480	
ON554184.1	CCGTCGATAACAATGACGATAAAGTGATAGCTTAATTGATTTTAATAATGAAATTAATTC	480	

ON554183.1	ATTTTATAAATCAATTAAGTAGACTTAATAAGCATTTTAGCTAGTATGCTACCAACAAAA	537	
ON554185.1	ATTTTATAAATCAATTAAGTAGACTTAATAAGCATTTTAGCTAGTATGCTACCAACAAAA	540	
ON554184.1	ATTTTATAAATCAATTAAGTAGACTTAATAAGCATTTTAGCTAGTATGCTACCAACAAAA	540	

ON554183.1	TAAATCTATACACATATGTAACAAAAATATATT	571	
ON554185.1	TAAATCTATACACATATGTAACAAAAATATATT	574	
ON554184.1	TAAATCTATACACATATGTAACAAAAATATATT	574	

Еволюційна історія першого фрагмента гена COI була побудована за допомогою методу максимальної правдоподібності із застосуванням 3-параметричної моделі Тамури. Для цього було побудовано філогенетичне дерево з найвищим значенням логарифмічної правдоподібності (−764,03), що забезпечує надійне відтворення еволюційних зв'язків між послідовностями. Відсоткове значення дерев, у яких таксони були згруповані подібним чином, відображене поруч із гілками, що вказує на підтримку кожного розгалуження.

Побудова початкового дерева для евристичного пошуку виконувалася автоматично: було застосовано алгоритми Neighbor-Join та BioNJ до матриці попарних відстаней, обчислених згідно з параметрами моделі Тамури 3. Згодом обиралися топологія з найвищим значенням логарифмічної правдоподібності. Одержане дерево представлено у масштабі, де довжина гілок відповідає кількості нуклеотидних замін на одну ділянку, що дозволяє оцінити рівень дивергенції між послідовностями (рис. 3.2).

У даному аналізі було використано 59 нуклеотидних послідовностей, що забезпечує комплексність еволюційної реконструкції на основі

доступних даних. Усі розрахунки та візуалізація філогенетичного дерева проводилися за допомогою програми MEGA X, яка дозволяє оптимізувати параметри для досягнення максимальної точності в моделюванні еволюційних процесів.

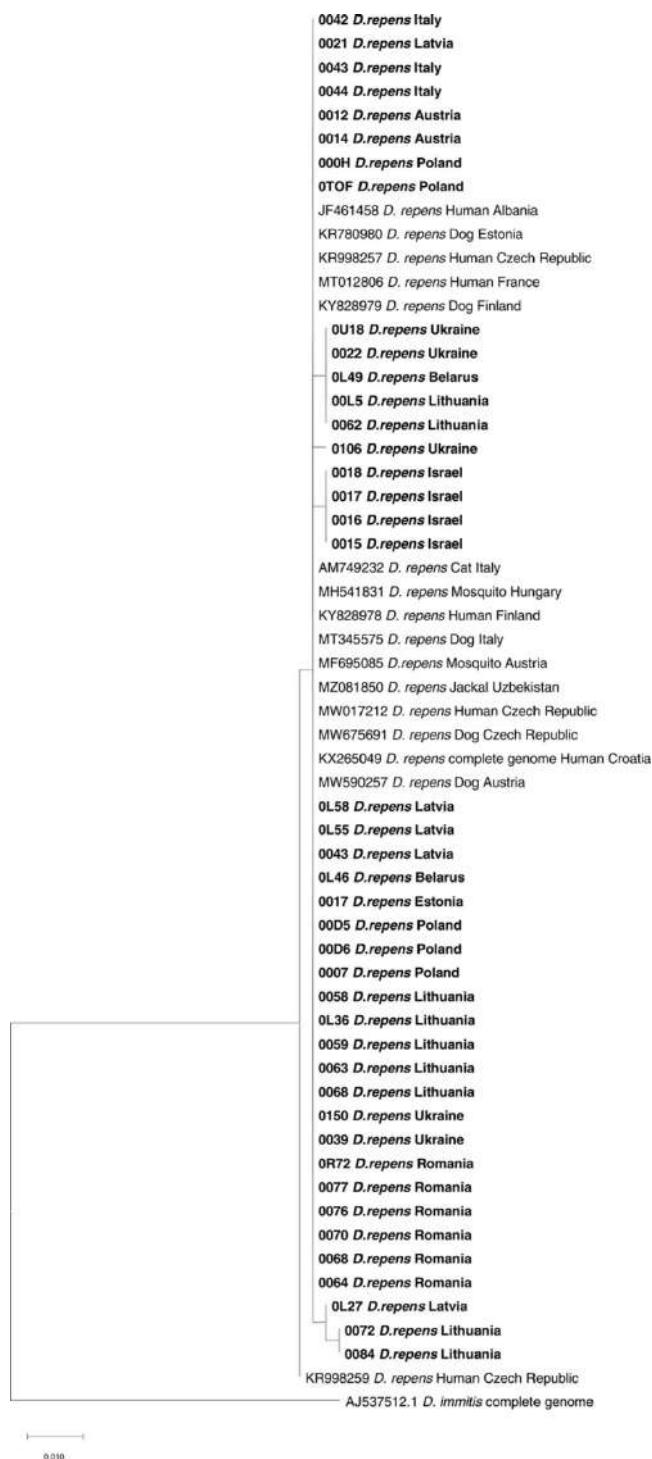


Рис. 3.2 Генеалогічне дерево COI для аналізу еволюційних зв'язків *D. repens*.

Еволюційна історія другого фрагмента гена COI була реконструйована за допомогою методу максимальної правдоподібності із використанням моделі Тамура-Нея, що дозволило точно відобразити генетичні зв'язки між послідовностями. Отримане філогенетичне дерево, яке має найвищу логарифмічну ймовірність ($-878,31$), демонструє можливі еволюційні взаємозв'язки серед зразків. Відсоток дерев, у яких таксони згруповані подібним чином, наведено біля кожної гілки, що свідчить про ступінь підтримки певних кластерів (рис.3.3).

Початкове дерево для евристичного пошуку було побудовано автоматично із застосуванням алгоритмів Neighbor-Join і BioNJ, що працювали на матриці попарних відстаней, оцінених відповідно до моделі Тамура-Нея. З-поміж можливих топологій обрано ту, що мала найвище значення логарифмічної правдоподібності. Дерево зображено в масштабі, де довжина гілок відображає кількість нуклеотидних замін на одну ділянку, що є індикатором рівня еволюційного розходження між секвенованими зразками.

Аналіз охоплював 51 нуклеотидну послідовність, що забезпечило достатню репрезентативність для адекватного відображення еволюційних взаємозв'язків. Усі розрахунки та візуалізація філогенетичного дерева виконувалися в програмному середовищі MEGA X, що сприяло точності та надійності отриманих результатів.

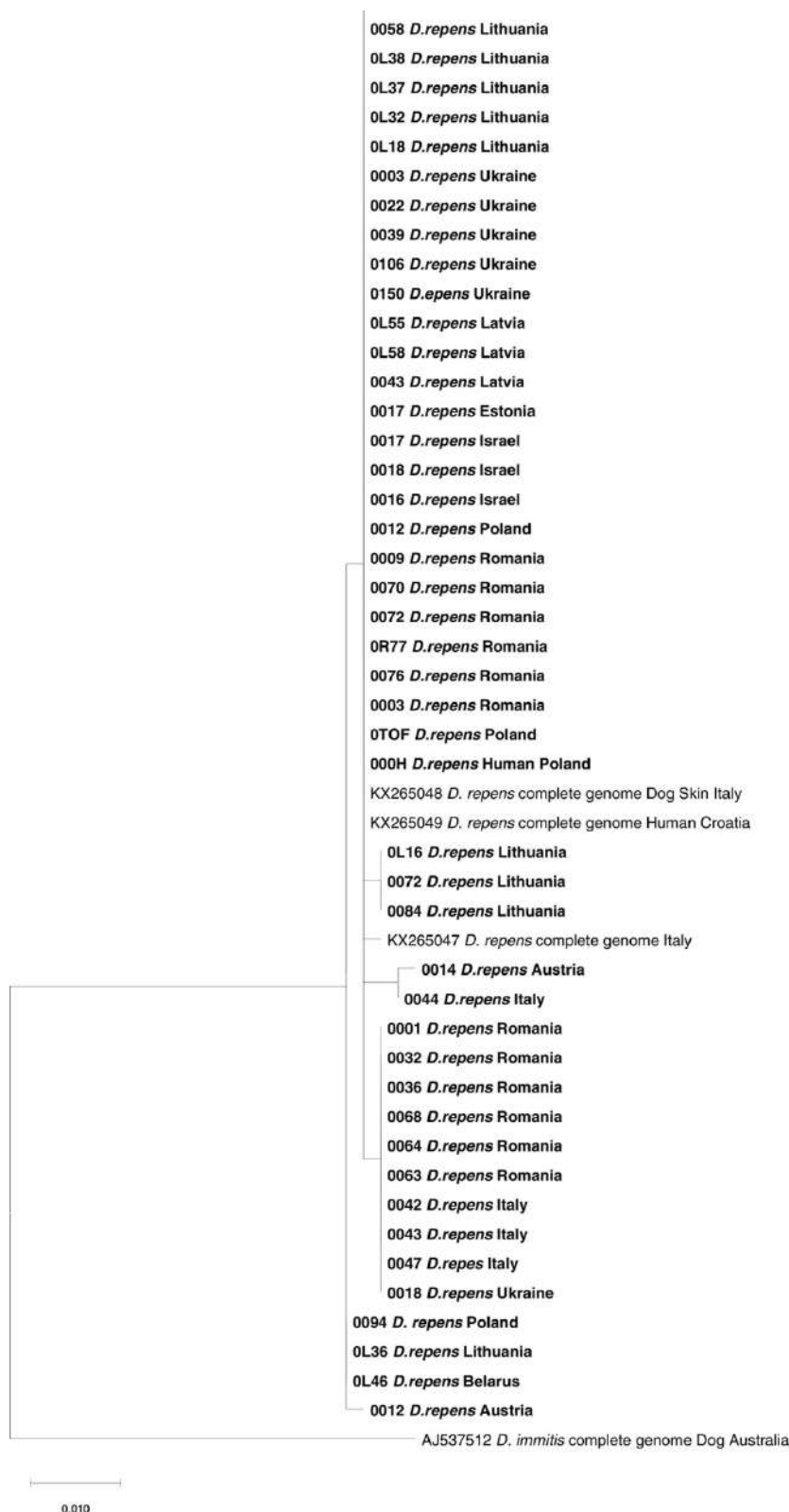


Рис. 3.3 Еволюційний аналіз другого фрагмента COI *D. repens*

Філогенетичне дерево, побудоване для фрагмента гена NADH довжиною 355 п.о., представлено на рис. 3.4 Аналіз показав, що переважна

більшість послідовностей, отриманих у даному дослідженні, а також у попередніх дослідженнях, формують одну основну гілку, тоді як лише кілька послідовностей утворюють дві додаткові гілки, що свідчить про певний рівень еволюційної стабільності серед проаналізованих зразків.

Еволюційна історія була реконструйована за допомогою методу максимальної правдоподібності в поєднанні з 3-параметричною моделлю Тамури для гена NADH. Отримане дерево показує найвищу логарифмічну ймовірність ($-649,18$), що є індикатором високої ймовірності коректності отриманих результатів. Відсоток дерев, у яких асоційовані таксони згруповані разом, зазначено поруч із відповідними гілками, що надає інформацію про ступінь підтримки кожної з груп.

Початкове дерево для евристичного пошуку було сформовано автоматично за допомогою алгоритмів Neighbor-Join і BioNJ, які працювали на основі матриці попарних відстаней, оцінених відповідно до моделі параметрів Тамура 3. З-поміж усіх можливих топологій було обрано ту, що демонструє найвищі значення логарифмічної правдоподібності. Дерево зображено в масштабі, де довжина гілок відображає кількість нуклеотидних замін на одну ділянку, що дозволяє оцінити рівень еволюційної дивергенції між секвенованими зразками.

Аналіз включав 63 нуклеотидні послідовності, що забезпечило достатню репрезентативність для коректного відображення еволюційних взаємозв'язків. Усі обчислення та візуалізація філогенетичного дерева проводилися в програмному середовищі MEGA X, що гарантує надійність отриманих даних і їх точність.

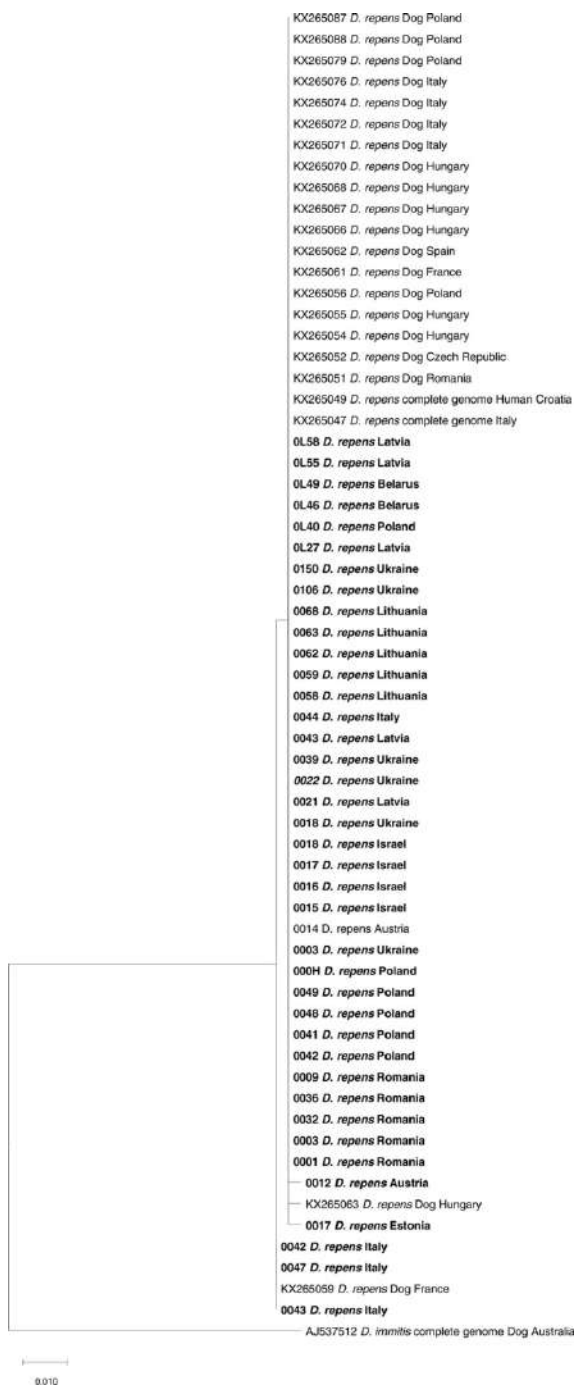


Рис. 3.4 Філогенетичний аналіз гена NADH (355 п. о.): дерево, побудоване за методом максимальної правдоподібності

3.1.3 Молекулярно-генетичний аналіз збудника бабезіозу

ДНК *Babesia* spp. було ідентифіковано у 357 собак з 1662 досліджених, що становить 21,5 %. З них 82 % собак проявляли клінічні симптоми захворювання, тоді як 3,8 % залишалися безсимптомними.

Собаки походили з Хмельницької та Чернівецької областей, що свідчить про поширеність бабезіозу в цих регіонах ($p < 0,001$). Вік собак варіював від 2 до 10 років, причому більшість тварин (62 %) були у віці від 4 до 8 років. Серед досліджених порід переважали німецькі вівчарки, лабрадори, а також метиси, що підкреслює вразливість як робочих, так і домашніх собак до інвазії. За статевим розподілом, 52 % тварин були самцями, а 48 % – самками.

Найпоширенішими клінічними ознаками, які спостерігали у 82 % собак із симптомами, були виражена млявість, відсутність апетиту та лихоманка (підвищення температури тіла до 40°C і більше). У більшості собак відмічалось загальне пригнічення стану, апатія та швидка втомлюваність. Майже у всіх тварин спостерігалися зміни у сечовипусканні, включаючи наявність темної сечі, що свідчить про гемоліз еритроцитів і розвиток анемії. У 79 % випадків було виявлено жовтушність слизових оболонок та шкірних покривів, що також свідчить про анемію та печінкову недостатність. Інші клінічні прояви включали збільшення селезінки та печінки, а також тахікардію та тахіпное.

Собаки, які залишалися безсимптомними, не виявляли жодних ознак захворювання при клінічному обстеженні, проте були носіями збудника, що підкреслює важливість ранньої діагностики для запобігання розповсюдженню інвазії.

У рамках даного дослідження було секвеновано 19 ампліконів ДНК, отриманих від собак, що підтвердило наявність інвазії *Babesia canis* з ідентичністю від 99,4 % до 100 % з відомими ізолятами *B. canis*, отриманими від собак і червоних лисиць (номери доступу MN134074, MN173223, MN704759). Цей високий рівень ідентичності свідчить про те, що вивчені зразки є спорідненими з популяціями *B. canis*, поширеними в природному середовищі.

Таблиця 3.3

Характеристика ізолюваних ампліконів *Babesia canis* від собак

Номер амплікона (GenBank ID)	Вид	Ізолят	Ген	Тип послідовності
OM362460.2	<i>Babesia canis</i>	61	мала субодиниця рибосомної РНК	часткова послідовність
OM362459.1	<i>Babesia canis</i>	136	мала субодиниця рибосомної РНК	часткова послідовність
OM362458.1	<i>Babesia canis</i>	137	мала субодиниця рибосомної РНК	часткова послідовність

OM362460.2	TGGAATGATGGTGACCCAAACCCCTACCCAGAGTAGCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCA	60
OM362459.1	TGGAATGATGGTGACCCAAACCCCTACCCAGAGTAGCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCA	60
OM362458.1	TGGAATGATGGTGACCCAAACCCCTACCCAGAGTAGCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCA	60

OM362460.2	GCAGCCGCGGTAAATCCAGCTCCAATAGCGTATATTAACCTTGTTCAGTTAAAAAGCTC	120
OM362459.1	GCAGCCGCGGTAAATCCAGCTCCAATAGCGTATATTAACCTTGTTCAGTTAAAAAGCTC	120
OM362458.1	GCAGCCGCGGTAAATCCAGCTCCAATAGCGTATATTAACCTTGTTCAGTTAAAAAGCTC	120

OM362460.2	GTAGTTGTATTTTTCGCTTGACGGTTTGACCATTTGGTTGGTTATTCGTTTTCGCTTTT	180
OM362459.1	GTAGTTGTATTTTTCGCTTGACGGTTTGACCATTTGGTTGGTTATTCGTTTTCGCTTTT	180
OM362458.1	GTAGTTGTATTTTTCGCTTGACGGTTTGACCATTTGGTTGGTTATTCGTTTTCGCTTTT	180

OM362460.2	GGGAATTTCCCTTTTACTTTGAGAAAAATTAGAGTGTTC AAGCAGACTTTGTCTTGAA	240
OM362459.1	GGGAATTTCCCTTTTACTTTGAGAAAAATTAGAGTGTTC AAGCAGACTTTGTCTTGAA	240
OM362458.1	GGGAATTTCCCTTTTACTTTGAGAAAAATTAGAGTGTTC AAGCAGACTTTGTCTTGAA	240

OM362460.2	TACTTCAGCATGGAATAATAGAGTAGGACTTTGGTTCTATTTGTTGGTTATTGAACCTT	300
OM362459.1	TACTTCAGCATGGAATAATAGAGTAGGACTTTGGTTCTATTTGTTGGTTATTGAACCTT	300
OM362458.1	TACTTCAGCATGGAATAATAGAGTAGGACTTTGGTTCTATTTGTTGGTTATTGAACCTT	300

OM362460.2	AGTAATGGTTAATAGGAACGGTTGGGGGCATTCGTATTTAACTGTCAGAGGTGAAATTCT	360
OM362459.1	AGTAATGGTTAATAGGAACGGTTGGGGGCATTCGTATTTAACTGTCAGAGGTGAAATTCT	360
OM362458.1	AGTAATGGTTAATAGGAACGGTTGGGGGCATTCGTATTTAACTGTCAGAGGTGAAATTCT	360

OM362460.2	TAGATTTGTTAAAGACGAACTACTGCGAAAGCATTTGCCAAGGACGTTCCATTAAATCAA	420
OM362459.1	TAGATTTGTTAAAGACGAACTACTGCGAAAGCATTTGCCAAGGACGTTCCATTAAATCAA	420
OM362458.1	TAGATTTGTTAAAGACGAACTACTGCGAAAGCATTTGCCAAGGACGTTCCATTAAATCAA	420

OM362460.2	GAACGAAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCAGATACCGTCGTAGTCCTAACCATAAACTAT	480
OM362459.1	GAACGAAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCAGATACCGTCGTAGTCCTAACCATAAACTAT	480
OM362458.1	GAACGAAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCAGATACCGTCGTAGTCCTAACCATAAACTAT	480

OM362460.2	GCCGA 485	
OM362459.1	GCCGA 485	
OM362458.1	GCCGA 485	

Додатковий аналіз хроматограм 18S рДНК, отриманих із послідовностей *B. canis*, виявив присутність паралогів. В аналізованих

зразках були виявлені подвійні піки у вирішальних позиціях ядра, зокрема в позиціях 609-610 у межах повної довжини послідовності гена 18S рРНК (AY072926) (рис.3.5). Ці подвійні піки вказують на генетичні варіації, що свідчить про генетичну неоднорідність в популяціях *B. canis*.

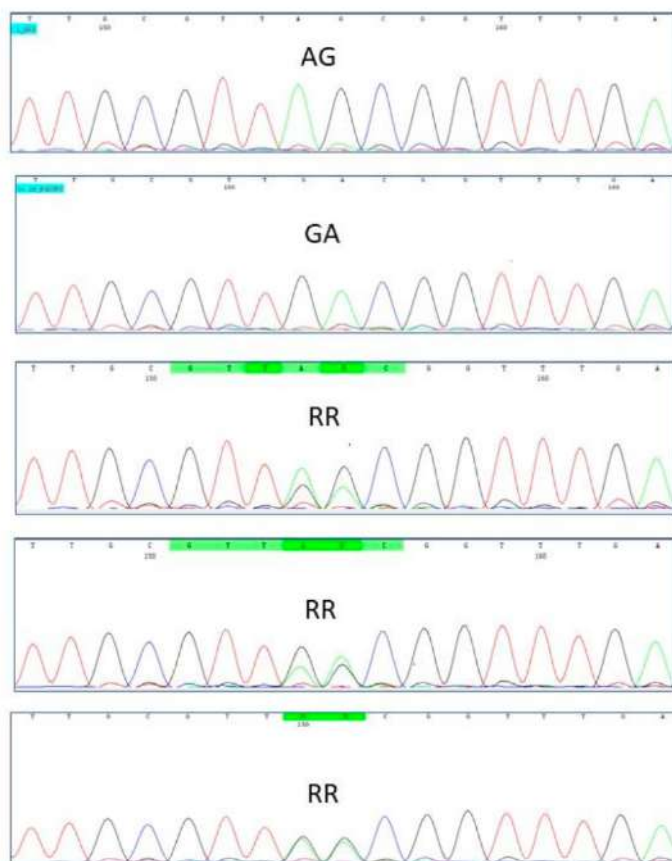


Рис. 3.5 Хроматограми, на яких представлено паралоги 18S рДНК

Серед 19 ампліконів у двох зразках була виявлена чиста хроматограма з нуклеотидами GA, що відповідає генотипу А [35]. У 8 зразках було виявлено нуклеотиди AG, які відповідають генотипу В [35]. Натомість 9 інших послідовностей демонстрували подвійні піки у зазначених позиціях, що свідчить про наявність різних паралогів, а отже, про генетичну різноманітність всередині популяції. Лише амплікони, які були представлені «чистими» хроматограмами, були збережені в базі даних GenBank, що підкреслює важливість високої якості даних для генетичних досліджень та їх подальшого використання в наукових базах даних.

Отримані результати вказують на значну генетичну варіативність *B. canis* у досліджуваних популяціях собак, що має важливе значення для подальших досліджень в області ветеринарної паразитології та епізоотології. Аналіз присутності паралогів у 18S рДНК надає нові перспективи для розуміння еволюційних зв'язків та різноманітності *B. canis* серед різних господарів.

За результатами молекулярно-генетичного аналізу було порівняно всі вісім зразків, депонованих з України у генетичному банку. Зразки були зібрані в Хмельницькій і Вінницькій областях, а також у Чорнобильській зоні як від кліщів, так і від собак. Побудоване філогенетичне дерево відображає еволюційні зв'язки між цими зразками, дозволяючи оцінити рівень їхньої генетичної спорідненості.

Dog_Khmelnyskyi	TTGTCTTGTAAATGGAAATGATGGTGACCCAAACCCCTACCAAGAGTAGCAATTGGAGGGCA	60
Der_reticul_Chernobyl	-----	0
Der_reticul_dog2_Khmeln	-----ACCAGAGTAGCAATTGGAGGGCA	23
Dog3_Vinnytsya	-----TGGAAATGATGGTGACCCAAACCCCTACCAAGAGTAGCAATTGGAGGGCA	48
Dog2_Vinnytsya	-----TGGAAATGATGGTGACCCAAACCCCTACCAAGAGTAGCAATTGGAGGGCA	48
Der_reticul_dog1_Khmeln	-----ACCAGAGTAGCAATTGGAGGGCA	23
Dog1_Vinnytsya	-----TGGAAATGATGGTGACCCAAACCCCTACCAAGAGTAGCAATTGGAGGGCA	48
Der_reticul_dog3_Khmeln	-----ACCAGAGTAGCAATTGGAGGGCA	23
Dog_Khmelnyskyi	AGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAAATCCAGCTCCAATAGCGTATATTTAACTTGTGTGCA	120
Der_reticul_Chernobyl	AGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAAATCCAGCTCCAATAGCGTATATTTAACTTGTGTGCA	60
Der_reticul_dog2_Khmeln	AGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAAATCCAGCTCCAATAGCGTATATTTAACTTGTGTGCA	83
Dog3_Vinnytsya	AGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAAATCCAGCTCCAATAGCGTATATTTAACTTGTGTGCA	108
Dog2_Vinnytsya	AGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAAATCCAGCTCCAATAGCGTATATTTAACTTGTGTGCA	108
Der_reticul_dog1_Khmeln	AGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAAATCCAGCTCCAATAGCGTATATTTAACTTGTGTGCA	83
Dog1_Vinnytsya	AGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAAATCCAGCTCCAATAGCGTATATTTAACTTGTGTGCA	108
Der_reticul_dog3_Khmeln	AGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAAATCCAGCTCCAATAGCGTATATTTAACTTGTGTGCA	83

Dog_Khmelnyskyi	GTTAAAAAGCTCGTAGTTGTATTTTTCGCTTGACGGTTTGACCATTTGGTTGGTTATTTTC	180
Der_reticul_Chernobyl	GTTAAAAAGCTCGTAGTTGTATTTTTCGCTTGACGGTTTGACCATTTGGTTGGTTATTTTC	120
Der_reticul_dog2_Khmeln	GTTAAAAAGCTCGTAGTTGTATTTTTCGCTTGACGGTTTGACCATTTGGTTGGTTATTTTC	143
Dog3_Vinnytsya	GTTAAAAAGCTCGTAGTTGTATTTTTCGCTTGACGGTTTGACCATTTGGTTGGTTATTTTC	168
Dog2_Vinnytsya	GTTAAAAAGCTCGTAGTTGTATTTTTCGCTTGACGGTTTGACCATTTGGTTGGTTATTTTC	168
Der_reticul_dog1_Khmeln	GTTAAAAAGCTCGTAGTTGTATTTTTCGCTTGACGGTTTGACCATTTGGTTGGTTATTTTC	143
Dog1_Vinnytsya	GTTAAAAAGCTCGTAGTTGTATTTTTCGCTTGACGGTTTGACCATTTGGTTGGTTATTTTC	168
Der_reticul_dog3_Khmeln	GTTAAAAAGCTCGTAGTTGTATTTTTCGCTTGACGGTTTGACCATTTGGTTGGTTATTTTC	143

Dog_Khmelnyskyi	GTTTTCGCTTTTGGGAATTTCCCTTTTACTTTGAGAAAATTAGAGTGTTCACAGCAGAC	240
Der_reticul_Chernobyl	GTTTTCGCTTTTGGGAATTTCCCTTTTACTTTGAGAAAATTAGAGTGTTCACAGCAGAC	180
Der_reticul_dog2_Khmeln	GTTTTCGCTTTTGGGAATTTCCCTTTTACTTTGAGAAAATTAGAGTGTTCACAGCAGAC	203
Dog3_Vinnytsya	GTTTTCGCTTTTGGGAATTTCCCTTTTACTTTGAGAAAATTAGAGTGTTCACAGCAGAC	228
Dog2_Vinnytsya	GTTTTCGCTTTTGGGAATTTCCCTTTTACTTTGAGAAAATTAGAGTGTTCACAGCAGAC	228
Der_reticul_dog1_Khmeln	GTTTTCGCTTTTGGGAATTTCCCTTTTACTTTGAGAAAATTAGAGTGTTCACAGCAGAC	203
Dog1_Vinnytsya	GTTTTCGCTTTTGGGAATTTCCCTTTTACTTTGAGAAAATTAGAGTGTTCACAGCAGAC	228
Der_reticul_dog3_Khmeln	GTTTTCGCTTTTGGGAATTTCCCTTTTACTTTGAGAAAATTAGAGTGTTCACAGCAGAC	203

Dog_Khmelnyskyi	TTTTGTCTTGAATACTTCAGCATGGAATAATAGAGTAGGACTTTGGTTCTATTTTGTGTG	300
Der_reticul_Chernobyl	TTTTGTCTTGAATACTTCAGCATGGAATAATAGAGTAGGACTTTGGTTCTATTTTGTGTG	240
Der_reticul_dog2_Khmeln	TTTTGTCTTGAATACTTCAGCATGGAATAATAGAGTAGGACTTTGGTTCTATTTTGTGTG	263
Dog3_Vinnytsya	TTTTGTCTTGAATACTTCAGCATGGAATAATAGAGTAGGACTTTGGTTCTATTTTGTGTG	288

Dog2_Vinnytsya	TTTTGTCTTGAACTTCAGCATGGAATAATAGAGTAGGACTTTGGTTCTATTTTGTGG	288
Der_reticul_dog1_Khmeln	TTTTGTCTTGAACTTCAGCATGGAATAATAGAGTAGGACTTTGGTTCTATTTTGTGG	263
Dog1_Vinnytsya	TTTTGTCTTGAACTTCAGCATGGAATAATAGAGTAGGACTTTGGTTCTATTTTGTGG	288
Der_reticul_dog3_Khmeln	TTTTGTCTTGAACTTCAGCATGGAATAATAGAGTAGGACTTTGGTTCTATTTTGTGG	263

Dog_Khmelnyskyi	TTAT	304
Der_reticul_Chernobyl	TTATTGAACCTTAGTAATGGTTAATAGGAACGGTTGGGGGCATTCGTATTTAACTGTCAG	300
Der_reticul_dog2_Khmeln	TTATTGAACCTTAGTAATGGTTAATAGGAACGGTTGGGGGCATAA-----	308
Dog3_Vinnytsya	TTATTGAACCTTAGTAATGGTTAATAGGAACGGTTGGGGGCATTCGTATTTAACTGTCAG	348
Dog2_Vinnytsya	TTATTGAACCTTAGTAATGGTTAATAGGAACGGTTGGGGGCATTCGTATTTAACTGTCAG	348
Der_reticul_dog1_Khmeln	TTATTGAACCTTAGTAATGGTTAATAGGAACGGTTGGGGGCATAA-----	308
Dog1_Vinnytsya	TTATTGAACCTTAGTAATGGTTAATAGGAACGGTTGGGGGCATTCGTATTTAACTGTCAG	348
Der_reticul_dog3_Khmeln	TTATTGAACCTTAGTAATGGTTAATAGGAACGGTTGGGGGCATAA-----	308

Dog_Khmelnyskyi		304
Der_reticul_Chernobyl	AGGTGAAATTCTTAGATTTGTAAAGACGAACTACTGCGAAAGCATTTGCCAAGGACGTT	360
Der_reticul_dog2_Khmeln		308
Dog3_Vinnytsya	AGGTGAAATTCTTAGATTTGTAAAGACGAACTACTGCGAAAGCATTTGCCAAGGACGTT	408
Dog2_Vinnytsya	AGGTGAAATTCTTAGATTTGTAAAGACGAACTACTGCGAAAGCATTTGCCAAGGACGTT	408
Der_reticul_dog1_Khmeln		308
Dog1_Vinnytsya	AGGTGAAATTCTTAGATTTGTAAAGACGAACTACTGCGAAAGCATTTGCCAAGGACGTT	408
Der_reticul_dog3_Khmeln		308
Dog_Khmelnyskyi		304
Der_reticul_Chernobyl	TCCATTAATCAAGAACGAAAGTA-----	383
Der_reticul_dog2_Khmeln		308
Dog3_Vinnytsya	TCCATTAATCAAGAACGAAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCAGATACCGTCGTAGTCCTA	468
Dog2_Vinnytsya	TCCATTAATCAAGAACGAAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCAGATACCGTCGTAGTCCTA	468
Der_reticul_dog1_Khmeln		308
Dog1_Vinnytsya	TCCATTAATCAAGAACGAAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCAGATACCGTCGTAGTCCTA	468
Der_reticul_dog3_Khmeln		308
Dog_Khmelnyskyi	-----	304
Der_reticul_Chernobyl	-----	383
Der_reticul_dog2_Khmeln	-----	308
Dog3_Vinnytsya	ACCATAAACTATGCCGA	485
Dog2_Vinnytsya	ACCATAAACTATGCCGA	485
Der_reticul_dog1_Khmeln	-----	308
Dog1_Vinnytsya	ACCATAAACTATGCCGA	485
Der_reticul_dog3_Khmeln	-----	308

За результатами аналізу було побудовано філогенетичне дерево на основі отриманих послідовностей, що дозволило оцінити рівень спорідненості між ізолятами збудника бабезіозу, виділеними від собак із різних регіонів України (рис. 3.6). Аналіз продемонстрував наявність окремих кластерів, що відповідають географічному походженню зразків. Так, зразки, виділені від собак із Вінниці (Dog1_Vinnytsya, Dog2_Vinnytsya, Dog3_Vinnytsya), утворили монофілетичну групу з мінімальними генетичними відмінностями, що свідчить про їх високу спорідненість і, можливо, спільне джерело інвазування. Аналогічну кластеризацію було виявлено серед зразків, отриманих від собак із Хмельницького (Der_reticul_dog1_Khmeln, Der_reticul_dog2_Khmeln,

Der_reticul_dog3_Khmel), що також демонстрували низьку варіативність послідовностей.

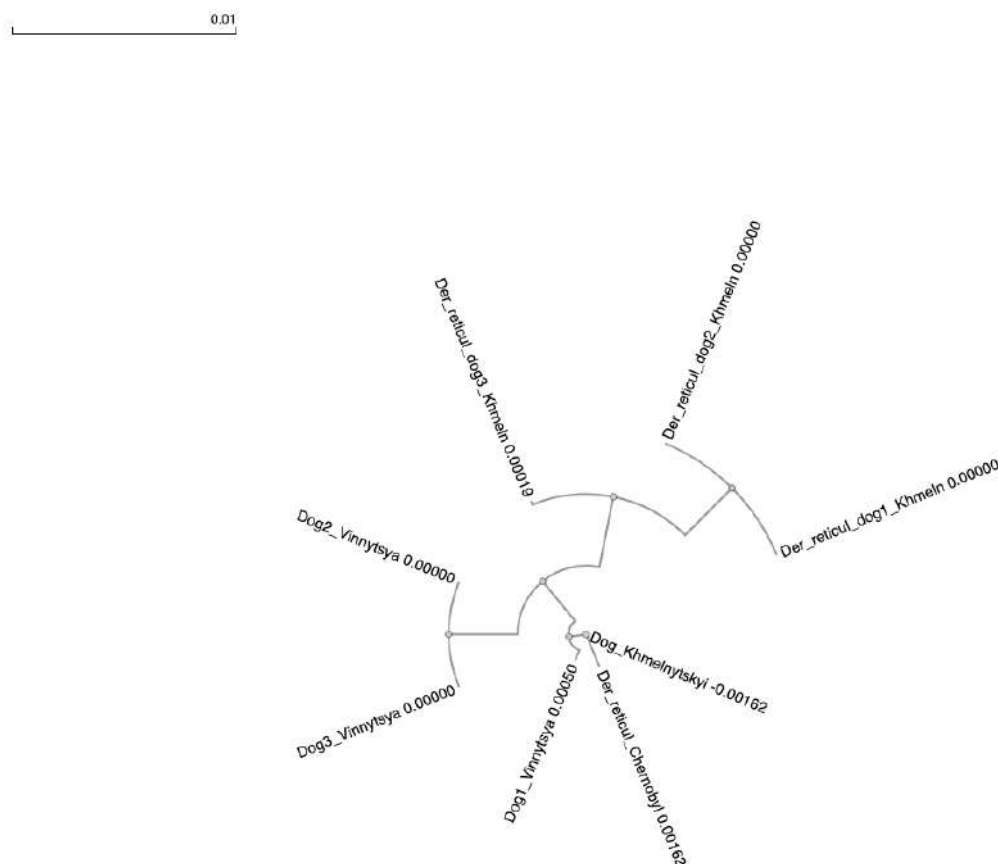


Рис. 3.6 Філогенетичне дерево ізолятів збудника бабезіозу собак з різних регіонів України

Водночас спостерігалось значне розходження між ізолятами з різних регіонів, зокрема зразок Dog_Khmelnytskyi утворював окрему філогенетичну гілку, що може свідчити про наявність іншого генетичного варіанту збудника або про віддалене епізоотологічне походження інвазії. Подібна ситуація спостерігалася і для ізоляту Der_reticul_Chernobyl, який мав найвищу генетичну відстань відносно інших зразків, що може свідчити про циркуляцію різних штамів *Babesia* spp. у досліджених регіонах.

Отримані результати вказують на регіональні особливості поширення збудника бабезіозу серед собак в Україні та дозволяють припустити можливе існування різних шляхів передачі та природних осередків інвазії.

Проведений аналіз також підкреслює необхідність подальшого молекулярно-генетичного дослідження циркулюючих штамів, що сприятиме кращому розумінню епізоотологічних характеристик збудника та розробці ефективних заходів контролю захворювання.

3.2 Результати серологічного та мікроскопічного дослідження на дирофіляріоз у собак

Для дослідження було відібрано 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 були варіабельними, 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, еритема 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.

Досліджено сироватки крові від 192 собак на наявність антигену *D. immitis* (експрес-тест Heartworm Ag, Vet Expert). Антиген було виявлено у 14 (7,3 %) зразках стандартною методикою і у 49 (25,5 %) зразках після термічної обробки (табл. 3.4). Дослідження крові за допомогою методу Кнотта виявило, що 23 (21,7 %) тварини мали мікрофілярії. Зокрема, 9 собак були позитивними на *D. immitis*, 14 на *D. repens*, і 5 собак були коінвазовані обома видами філярій, що було підтверджено ПЛР.

Таблиця 3.4

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

Метод дослідження	Показник	Кількість позитивних зразків	Відсоток позитивних зразків (%)
Експрес-тест Heartworm Ag	Виявлено антиген <i>D. immitis</i> (стандартний метод)	14	7,3
	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

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 $310,2 \pm 6,9$ мкм і $5,10 \pm 1,68$ мкм

відповідно, а для *D. repens* ці показники становили $360,12 \pm 2,82$ мкм і $7,85 \pm 1,23$ мкм.

З шести 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 дослідженні 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*.

3.3 Гематологічні дослідження собак інвазованих *D. repens* і *D. immitis*

У проведеному дослідженні, яке охопило 248 зразків крові собак, у 32 тварин (12,9 %) було виявлено мікрофілярії *D. repens*, що свідчить про значну поширеність інвазії серед популяції собак Хмельницької і Вінницької областей. Зокрема, серед собак, інвазованих *D. repens*, було встановлено значні зміни у гематологічних та біохімічних показниках. Так, порівняно з неінвазованими особинами, інвазовані *D. repens* мали значно нижчі показники кількості лімфоцитів ($p < 0,001$), еритроцитів ($p < 0,001$), гематокриту ($p < 0,001$) та тромбоцитів ($p < 0,01$), що свідчить про наявність анемічних процесів та можливих порушень у коагуляційній системі. Крім того, у цих собак було зафіксовано підвищену активність лужної фосфатази ($p < 0,01$) та креатиніну ($p < 0,01$), що може свідчити про порушення функцій нирок та печінки.

Цікаво, що серед собак, які були інвазовані *D. repens*, але не проявляли клінічних ознак також було виявлено зниження рівня еритроцитів ($p < 0,001$), гематокриту ($p < 0,001$) і лімфоцитів ($p < 0,01$), при цьому концентрація глюкози була підвищеною ($p < 0,023$). Також спостерігалася тенденція до підвищення активності лужної фосфатази ($p < 0,1$), що потребує додаткових досліджень для підтвердження цих змін (табл. 3.5).

Таблиця 3.5

Гематологічні зміни у собак інвазованих *D. repens*

Показник	Середні значення для собак, інвазованих <i>D. repens</i>	Норма
Еритроцити	$3,6 \pm 0,8$ ***	$4,8-9,3 \cdot 10^{12}/\text{л}$
Гемоглобін	$263,1 \pm 16,7$	300–380 мг/л
Гематокрит	$22,4 \pm 5,2$ ***	36–55 %
Лімфоцити	$8,7 \pm 3,6$ ***	12–30 %
Тромбоцити	$132,3 \pm 24,9$ **	$150-400 \cdot 10^9/\text{л}$
Лужна фосфатаза	$187,5 \pm 42,1$ **	10–150 од/л
Креатинін	$157,8 \pm 20,6$ **	44–138 мкмоль/л
Глюкоза	$9,4 \pm 0,7$ *	3,9–8,3 ммоль/л

Примітка: * – $p < 0,1$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$ за порівняння з фізіологічними нормами.

У собак, інвазованих *D. immitis*, було виявлено значні зміни у гематологічних показниках. З 19 тварин 12 мали анемію (63,2 %), 9 – підвищену кількість лейкоцитів (47,4 %), 6 – периферичну еозинофілію (31,6 %), 7 – базофілію (36,8 %) і 10 – зниження рівня гемоглобіну (52,6 %) (табл. 3.6). Ці дані підтверджують виражену імунну відповідь та системне ураження, яке супроводжує інвазію.

Таблиця 3.6

Гематологічні зміни у собак інвазованих *D. immitis*

Показник	Середні значення для собак, інвазованих <i>D. immitis</i>	Норма
Еритроцити	3,2±0,4***	4,8–9,3 10 ¹² /л
Гемоглобін	246,8±27,2*	300–380 мг/л
Лейкоцити	18,9±2,8*	6,0–15,0 10 ⁹ /л
Лімфоцити	7,8±2,3***	12–30 %
Тромбоцити	121,4±19,7**	150–400 10 ⁹ /л
АсАТ	97,3±11,6**	5–55 од/л
АлАТ	164,9±22,3***	5–107 од/л
Загальний білок	83,4±5,1	51–78 г/л
Сечовина	14,7±6,1	2,5–9,6 ммоль/л
Альбумін	17,6±5,2	24–44 г/л
Еозинофіли	23,7±4,9*	2–10 %
Базофіли	7,2±2,1*	0–1 %
Ретикулоцити	5,2±1,3	0–1 %

Примітка: * – $p < 0,1$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$ за порівняння з фізіологічними нормами.

Біохімічні зміни у собак уражених *D. immitis* були також помітними. Підвищена активність аспартатамінотрансферази (АсАТ) була виявлена у 3 собак (15,8 %), активність аланінамінотрансферази (АлАТ) – у 5 (26,3 %). Підвищення загального білка спостерігалось у 8 собак (42,1 %), а підвищений рівень сечовини – у 4 (21 %). Це свідчить про можливі порушення в роботі печінки, м'язової тканини та нирок внаслідок хронічної дирофіляріозної інвазії.

У цьому ж дослідженні було виявлено ознаки регенерації еритроцитів у 31,6 % із проаналізованих тварин. Показники регенерації оцінювалися за

допомогою визначення рівня ретикулоцитів у зразках крові, що вказує на спробу організму відновити кількість еритроцитів під час інвазійного навантаження.

Тромбоцитопенія була виявлена у 26,3 % собак (5 зразків із 19), що може бути зумовлено підвищенням використанням тромбоцитів у процесах коагуляції або їхньою міграцією до уражених тканин, зокрема легень, як це зазначено у випадках з *D. immitis*.

Гіперпротеїнемія була зафіксована у багатьох собак, що вказує на запальні процеси, спричинені паразитарною інвазією. Середній рівень загального білка у сироватці крові становив $83,4 \pm 5,1$ г/л, що перевищувало нормальні значення.

Гіпоальбумінемія була виявлена у 8 собак із дирофіляріозом, що вказує на хронічну запальну відповідь та стимуляцію імунної системи.

Лімфопенія, пов'язана з інвазією, спостерігалася у 73,7 % собак (14 із 19), що підтверджує негативний вплив паразитарних інвазій на імунну систему тварин.

3.4 Рентгенологічні дослідження собак за ураження *D. immitis*

У процесі рентгенологічних досліджень було встановлено чітку залежність між рентгенологічними ознаками та важкістю дирофіляріозу у собак. Дослідження охоплювали детальний аналіз артеріальних змін, ураження легеневої паренхіми, а також морфологічні зміни серцево-судинної системи та грудної порожнини. Зокрема, оцінювали розширення, звивистість та структурні зміни у легневих артеріях. У більш тяжких випадках спостерігалася дилатація судин та втрата їхньої еластичності, що вказує на наявність проліферативного ендартеріїту. Ураження легеневої паренхіми характеризувалося ступенем інфільтрації, наявністю інтерстиціальних змін, ущільненням тканини легень та можливими новоутвореннями, спричиненими запальними процесами або тканинною

реакцією на паразитарну інвазію. У тяжких випадках фіксувалися масивні ураження та зміни, що нагадують пухлинні маси.

Окрім цього, значна увага приділялася змінам серцевого силуету, зокрема збільшенню правого шлуночка та зміні розмірів серця загалом. У випадках з легеневою гіпертензією та кардіомегалією на пізніх стадіях було помітно посилення серцевого силуету на рентгенограмах. Також спостерігалися плевральні зміни, які включали накопичення плевральної рідини, що вказує на підвищений тиск у легневих судинах та можливу серцеву недостатність. Зміни в розмірах правої легеневої артерії та розширення правих відділів серця також оцінювалися, оскільки вони є типовими для прогресуючого дирофіляріозу.

Ці рентгенологічні зміни дозволили систематизувати та розмежувати різні ступені важкості захворювання, що є важливим для діагностики та планування подальшого лікування собак, інвазованих *D. immitis* (табл.3.7).

Таблиця 3.7

Рентгенологічні зміни у собак з різним ступенем ураження за дирофіляріозу

Ступінь важкості захворюван ня	Рентгенологічні ознаки	Зміни в легневих артеріях	Інші зміни
Легкий перебіг	Незначне розширення легневих артерій, мінімальні зміни в паренхімі легенів	Невелике розширення, іноді звивистість артерій, без втрати еластичності	Інтерстиціальні зміни

Середній перебіг	Чітке зниження судинної чіткості, щільність основної легеневої артерії, аномалії в розмірах та формах артерій	Розширення артерій хвостової частки легень, звивистість, тупе закінчення артерій	Збільшення правого шлуночка, правої легеневої артерії, збільшення серцевого силуету
Важкий перебіг	Масивні ураження легеневої паренхіми, наявність аномальних утворень, схожих на пухлинні маси	Розширення, дилатація та підвищена звивистість легеневих артерій через проліферативний ендартеріт	Збільшення правого шлуночка, накопичення плевральної рідини, збільшення печінки у деяких випадках
Легенева гіпертензія (ЛГ)	Кардіомегалія на пізніх стадіях, посилення серцевого силуету на рентгенограмах	Звивистість та розширення легеневих артерій, втрата еластичності, найбільш виражена у правій легеневій артерії	Накопичення плевральної рідини, серцева недостатність, інфільтрація паренхіми легень

На ранніх стадіях захворювання виявляли ураження, спричинені присутністю дорослих паразитів *D. immitis* у легеневих артеріях, що призводило до легеневої гіпертензії. Легенева гіпертензія виникала внаслідок проліферативного ендартеріту, що спричиняв розширення,

звивистість та втрату еластичності легеневих судин (рис. 3.7). У собак із легким перебігом захворювання було виявлено лише незначне розширення легеневих артерій, з мінімальними змінами в легеневій паренхімі. У частини тварин спостерігались інтерстиціальні зміни, пов'язані з віковими змінами.

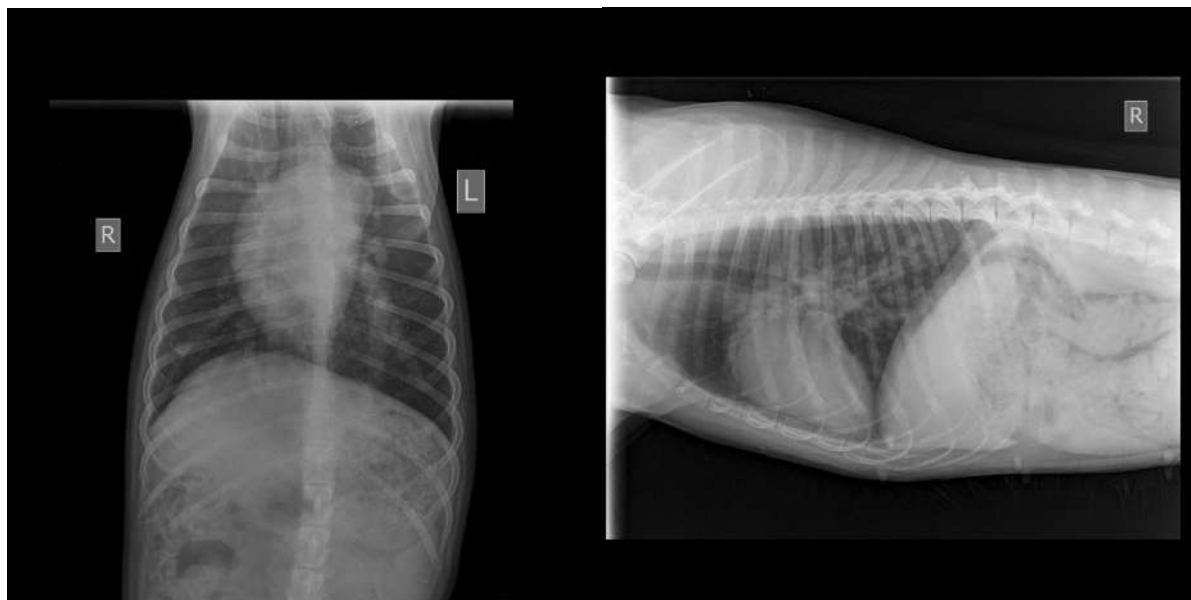


Рис. 3.7 Ознаки дилатації легеневої артерії, регургітація першого ступеня на клапані легеневої артерії, наявність гіперехогенних лінійних структур у правій гілці легеневої артерії

При середній і тяжкій формах дирофіляріозу спостерігалось більш виражене розширення легеневих артерій і погіршення судинної чіткості. Основна легенева артерія і її гілки ставали щільнішими та деформованими, що відповідало проявам проліферативного ендартеріїту, характерного для пізніх стадій інвазії *D. immitis*. У трьох собак відзначалося значне збільшення легеневих артерій, що корелювало з прогресуванням легеневої гіпертензії (рис. 3.8).



Рис. Серцевий силует без змін. Каудальна порожниста вена та легеневі судини розширені. У легеневій паренхімі візуалізується бронхо-інтерстиціальне неструктуроване затемнення.

Збільшення правого шлуночка, головної легеневої артерії та правої часткової легеневої артерії були найбільш поширеними рентгенологічними змінами, які відображали ураження легеневої системи за дирофіляріозу (рис. 3.9). У наших дослідженнях також спостерігалось збільшення правого шлуночка та розширення легневих артерій, що супроводжувалося кардіомегалією на пізніх стадіях хвороби. У деяких випадках також спостерігали інфільтрацію легеневої паренхіми, що посилювало симптоми захворювання.



Рис. 3.9 Ознаки правосторонньої кардіомегалії. Каудальна порожниста вена та легеневі судини розширені. Ущільнення стінок бронхів.

Середній показник розширення легеневих артерій перевищував ширину ребра у три рази, а в окремих випадках – до шести разів. Найбільш вираженими зміни були у правій легеневій артерії, що узгоджується з даними інших досліджень, які повідомляли про часті зміни у випадках легеневої гіпертензії. Також було зафіксовано підвищену звивистість легеневих артерій у зв'язку з розвитком ендартеріїту, що призводило до втрати їхньої еластичності.

У собак із важким перебігом захворювання було виявлено аномальні утворення в легеневій тканині, що нагадували пухлинні маси, проте не відповідали типовим характеристикам новоутворень. Результати також підтверджують, що при легеневій гіпертензії часто спостерігається збільшення серцевого силуету на рентгенограмах грудної клітки, особливо при прогресуванні хвороби і наявності симптомів.

У важких випадках ускладнення рентгенологічних досліджень виникали через накопичення плевральної рідини, що маскувало деякі патологічні зміни (рис. 3.10). Однак попри це, характерні зміни у легеневих

артеріях залишалися добре візуалізованими, що дозволило точно оцінити стан тварин. Розширення, дилатація та підвищена звивистість легневих артерій залишалися ключовими діагностичними ознаками уражень, спричинених паразитами.

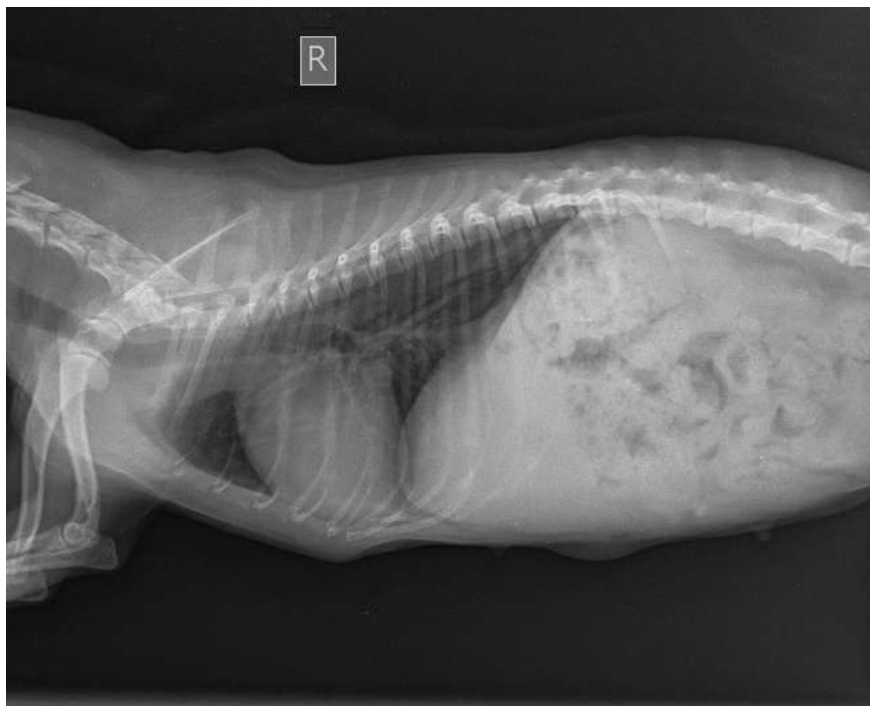


Рис. 3.10 Ознаки кардіомегалії із збільшенням серцевого силуету, розширення каудальної порожнистої вени, наявність інтерстиціального набряку легень. Можлива фізіологічна компресія легень на фазі видиху.

Таким чином, результати досліджень свідчать про чітку кореляцію між рентгенологічними змінами та прогресуванням захворювання. Це робить рентгенологічний аналіз важливим діагностичним інструментом для оцінки стану собак за дирофіляріозу та вибору подальшої тактики лікування.

3.5 Ксеномоніторингові дослідження комарів за дирофіляріозу

Комарів для досліджень збирали протягом 2022-2023 років на території Вінницької і Хмельницької областей протягом вечірніх годин.

Комарів збирали 2-3 рази на місяць з травня по жовтень за загально прийнятими методами.

Село Мукша Китайгородська Хмельницької області (48.673244253453674, 26.622072279928332) знаходиться в межах вологого континентального клімату із теплим літом. Клімат помірно континентальний з м'якою зимою (середня температура січня – 5 °С) і теплим, вологим (середня температура липня + 19 °С) літом. Кількість опадів, 70 % яких припадає на теплий період, становить 500 – 640 мм на рік. Рівень наповнення річок водою в області становить лише 20 % від необхідного стандарту [134]. Всього тут було зібрано 1364 комарі, з них *Aedes* spp. – 602, *Culex* spp. – 500, *Anopheles* spp. – 262 (рис. 3.11).

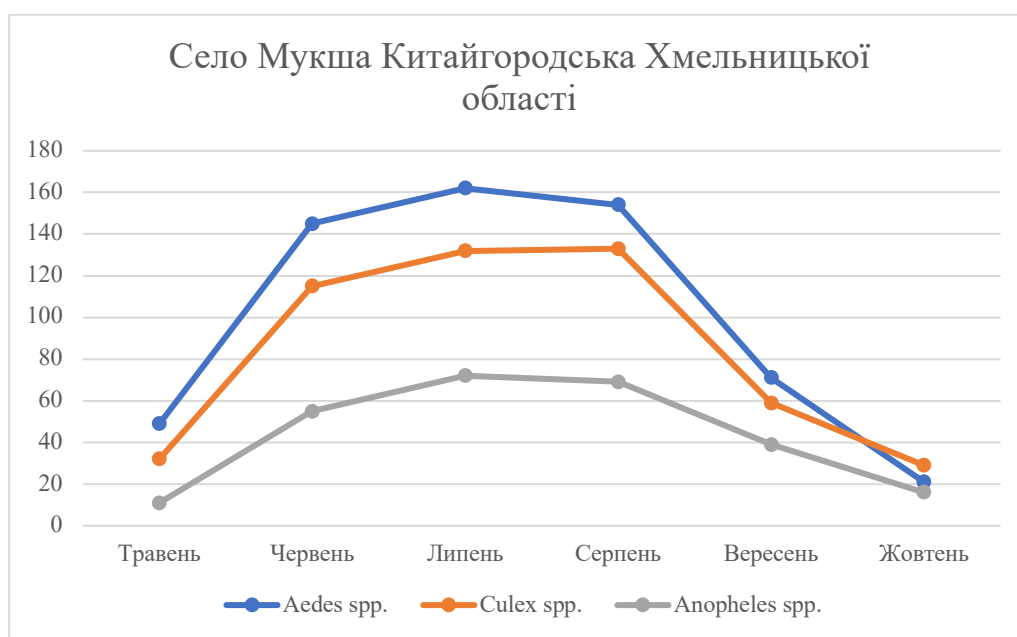


Рис. 3.11 Динаміка чисельності комарів за місяцями Село Мукша Китайгородська Хмельницької області

Село Велика Слобідка Хмельницької області (48.57415016893395, 26.716890392185984) знаходиться в межах вологого континентального клімату із теплим літом у так званому «теплому Поділлі», тут весна настає на 2 тижні раніше. Село лежить на березі річки Мукша і Дністер на відстані 15 кілометрів від автодороги Т 2325 від Кам'янця-Подільського [134].

Всього тут було зібрано 425 комарі, з них *Aedes* spp. – 247, *Culex* spp. – 133, *Anopheles* spp. – 45 (рис. 3.12).

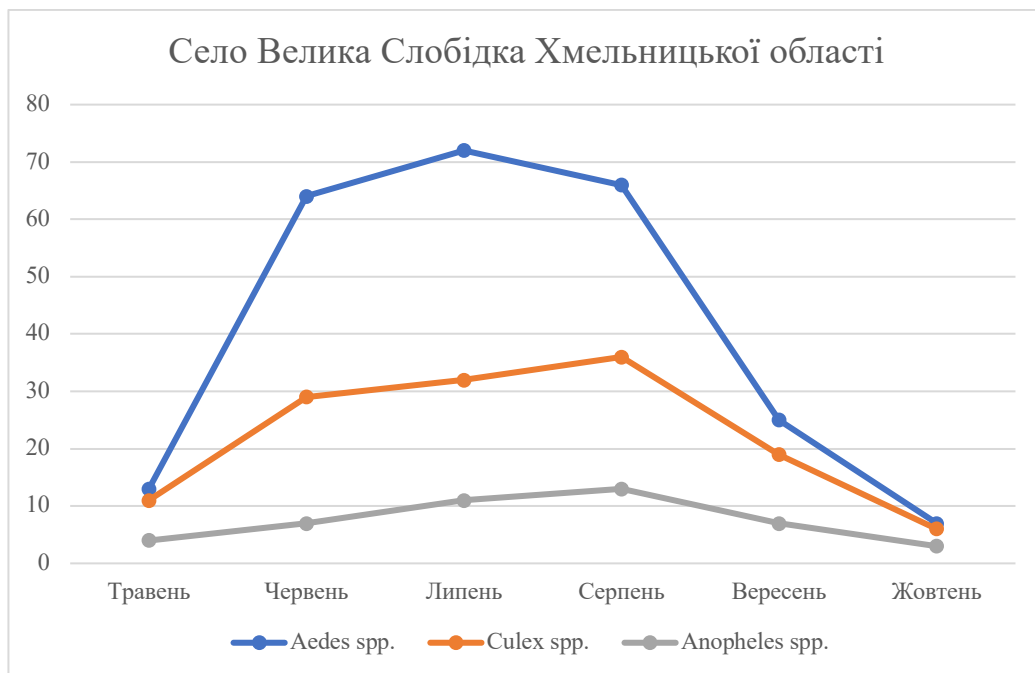


Рис. 3.12 Динаміка чисельності комарів за місяцями Село Велика Слобідка Хмельницької області

Місто Вінниця, Вишенське озеро (49.215066, 28.424914) розташоване в помірному кліматичному поясі. Для міста властиве тривале неспекотне, досить вологе літо та порівняно коротка м'яка зима. Середня температура січня – 5,8 °С, липня + 18,3 °С. Річна кількість опадів 638 мм. Через несприятливі кліматичні явища на території міста спостерігаються хуртовини (від 6 до 20 днів на рік), тумани в холодний період року (37 – 60 днів), грози з градом (3 – 5 днів). Тривалість світлового дня коливається від 8 до 16,5 годин. Всього тут було зібрано 1506 комарі, з них *Aedes* spp. – 577, *Culex* spp. – 636, *Anopheles* spp. – 293 (рис. 3.13).

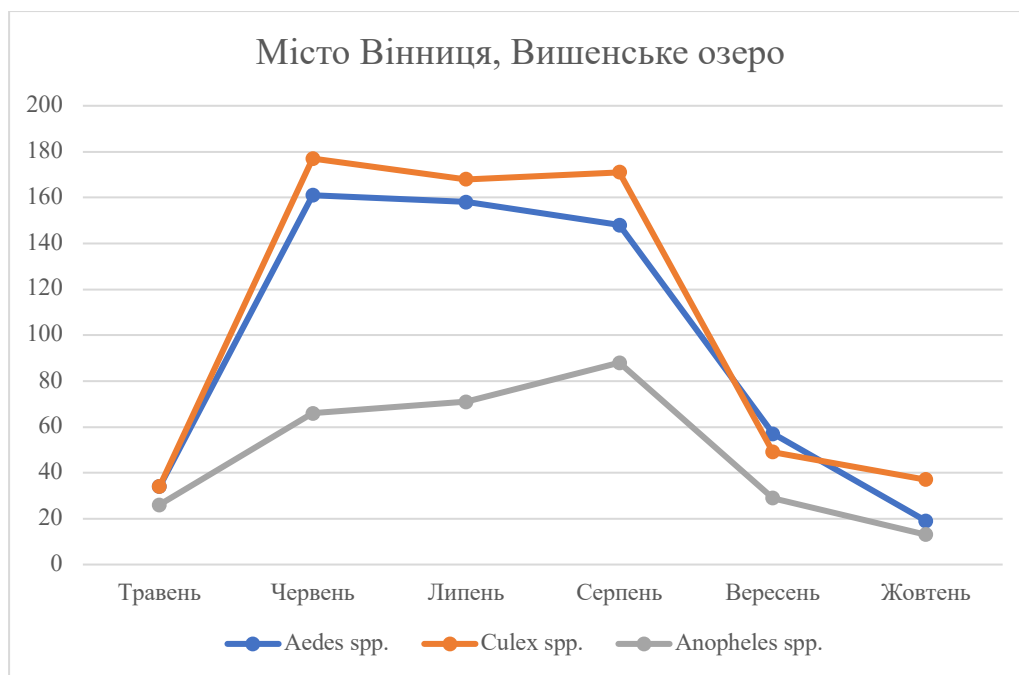


Рис. 3.13 Динаміка чисельності комарів за місяцями у м. Вінниця, Вишенське озеро

Село Микулинці Вінницької області (49.259024563354274, 28.153761603204142). Клімат області – помірно континентальний, середня температура січня: -5°C , середня температура липня: $+20^{\circ}\text{C}$; річна кількість опадів: 520 – 590 мм, з них 80 % випадають в теплий період. В селі протікає річка Згар. Площа становить 0,246 квадратних кілометрів. Всього тут було зібрано 455 комарі, з них *Aedes* spp. – 267, *Culex* spp. – 137, *Anopheles* spp. – 51 (рис. 3.14).

Зібрані зразки транспортували у лабораторію і зберігали при -18°C . Комарів морфологічно ідентифікували за загальноприйнятими методиками [131].

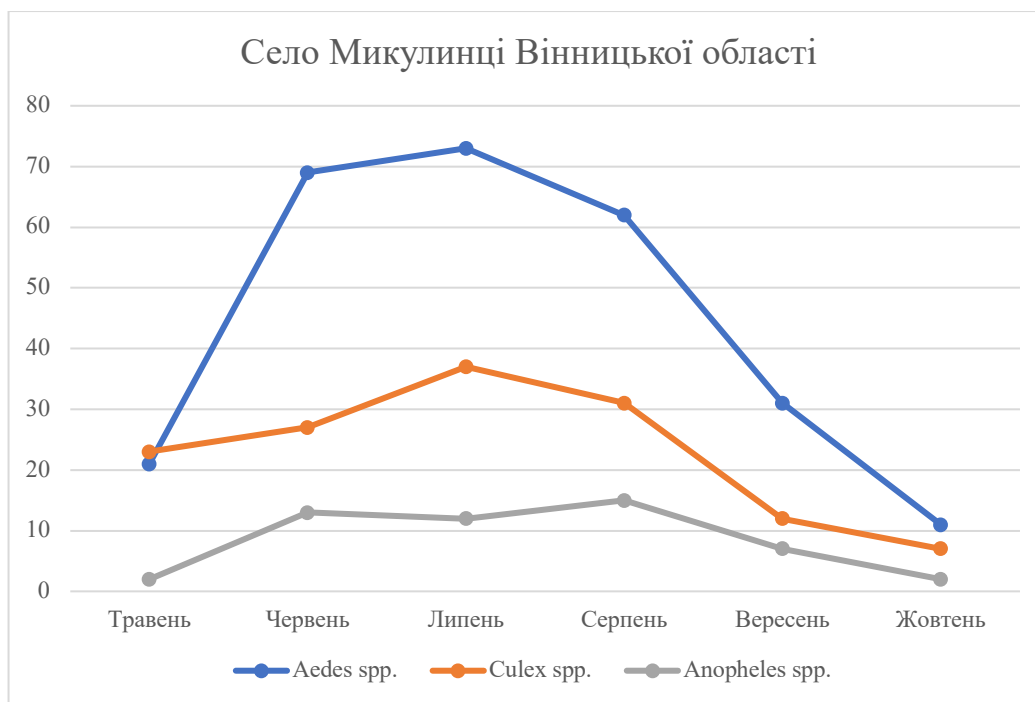


Рис. 3.14 Динаміка чисельності комарів за місяцями, Село Микулинці Вінницької області

При вивченні видового складу комарів було встановлено, що в даному регіоні зустрічаються три види: домінантним видом є *Aedes* spp. – 45,1 %, *Culex* spp. – 37,5 %, *Anopheles* spp. – 17,4 %. Порівнюючи різноманіття видів, чисельність і розподіл комарів серед приміських і міських досліджених територій, ми спостерігали у 4,5 рази вищу концентрацію комарів у міських районах.

Так на територіях Мукші Китайгородської і міста Вінниця спостерігалася вища концентрація комарів. В загальному щільність видів *Aedes* spp., *Culex* spp. і *Anopheles* spp. була у 3,3 та 5,2 та 6,7 разів більшою, ніж у приміському середовищі (рис. 3.15).

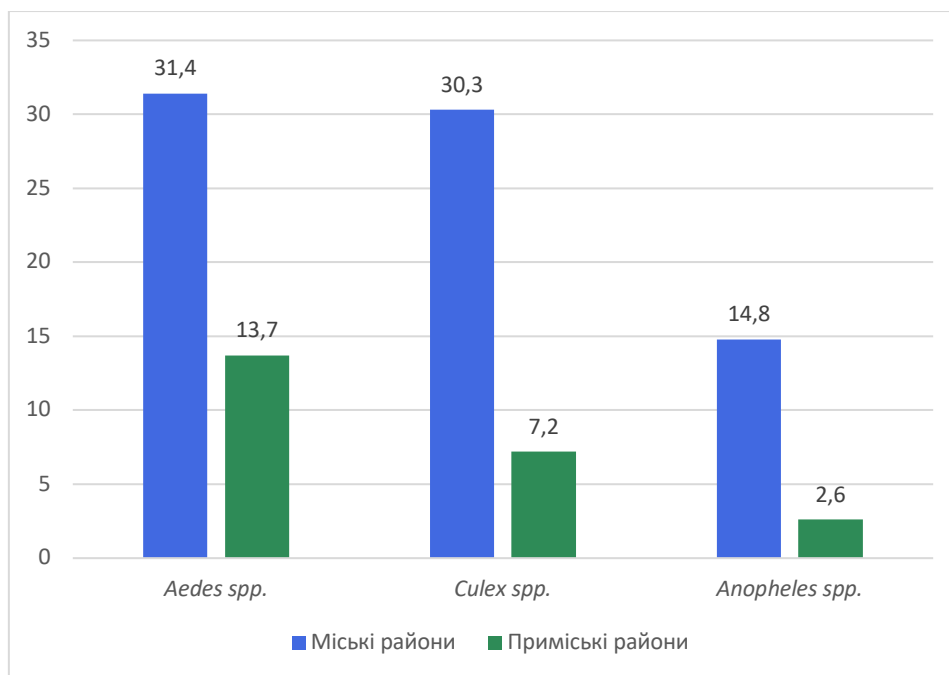


Рис. 3.15 Частка комарів у міських і приміських територіях Хмельницької і Вінницької областей

Популяції комарів у міських та приміських районах виявили суттєві відмінності, які залежали від середовища їхнього існування, наявності водойм, поведінкових особливостей та сезонних змін (табл. 3.8). Вид *Aedes* spp. домінував у міських районах, де їхня частка становила 31,4 % від загальної кількості зібраних комарів. Цей вид був особливо численним біля штучних водойм, таких як декоративні ставки, дренажні канави та каналізаційні люки, де стояча вода сприяла їх активному розмноженню. У приміських районах їхня частка була значно нижчою — лише 13,7 %, що свідчить про обмеженість водних ресурсів для їхнього розмноження в цих умовах.

Комарі *Culex* spp., які складали 30,3 % від загальної кількості комарів у містах, також активно використовували штучні водойми, зокрема парки та озера, для розмноження. У приміських районах їхня чисельність була меншою — 7,2 %, що свідчить про те, що вони краще пристосовані до

урбанізованих умов. У приміських зонах вони віддавали перевагу природним водоймам, таким як ставки чи болотисті місцевості.

Таблиця 3.8

Динаміка чисельності комарів за місяцями та місцями збору

Місце збору	Місяць	<i>Aedes</i> spp.	<i>Culex</i> spp.	<i>Anopheles</i> spp.
Село Мукша Китайгородська Хмельницької області	Травень	49	32	11
	Червень	145	115	55
	Липень	162	132	72
	Серпень	154	133	69
	Вересень	71	59	39
	Жовтень	21	29	16
Місто Вінниця, Вишенське озеро	Травень	34	34	26
	Червень	161	177	66
	Липень	158	168	71
	Серпень	148	171	88
	Вересень	57	49	29
	Жовтень	19	37	13
Село Велика Слобідка Хмельницької області	Травень	13	11	4
	Червень	64	29	7
	Липень	72	32	11
	Серпень	66	36	13
	Вересень	25	19	7
	Жовтень	7	6	3
Село Микулинці Вінницької області	Травень	21	23	2
	Червень	69	27	13
	Липень	73	37	12
	Серпень	62	31	15
	Вересень	31	12	7
	Жовтень	11	7	2
Загальна кількість		1693	1406	651

Anopheles spp. домінували також у міських районах, де їхня чисельність сягала 14,8 % від загальної кількості, тоді як на приміських

територіях їхня частка була значно нижчою – лише 2,6 %. Це пов'язано з потребою *Anopheles* spp. у чистих природних водоймах для розвитку личинок. Таким чином, наявність водойм виявилася ключовим фактором, який визначав поширення та чисельність комарів: штучні резервуари з стоячою водою у міських районах сприяли високій чисельності *Aedes* spp. і *Culex* spp., тоді як природні водойми у приміських районах підтримували значну популяцію *Anopheles* spp..

Особливості поведінки комарів також відіграли важливу роль у нашому дослідженні. *Aedes* spp. були активні переважно вдень, з піковою активністю вранці та пізно ввечері. Вони активно кусали людей, що підвищувало ризик передачі збудників хвороб у денний час. *Culex* spp. мали нічну активність, з піковим часом у сутінках, і кусали як птахів, так і людей чи інших ссавців. *Anopheles* spp., активні під час сутінків та вночі, були особливо небезпечними через здатність переносити збудників малярії, хоча у нашому дослідженні увага була зосереджена на інших збудниках, таких як *Dirofilaria* spp..

Популяція комарів демонструє значні коливання, які тісно пов'язані зі зміною пір року протягом календарного року. Найбільш виражений сплеск активності комарів спостерігається в літні місяці, зокрема з червня по серпень. У цей період зафіксовано, що 62 % усіх комарів, зібраних протягом року, припадає саме на ці три місяці. Це збільшення чисельності комарів можна пояснити оптимальними умовами для їхнього розвитку, оскільки температура та вологість досягають своїх пікових значень. Такі кліматичні умови створюють ідеальне середовище для розмноження комарів, сприяючи їхньому швидкому розповсюдженню. На противагу цьому, у періоди травня та жовтня спостерігається значне зниження активності комарів, коли лише близько 15 % від загальної популяції залишаються активними. Це явище можна пояснити кількома факторами. По-перше, значне падіння температури в ці перехідні періоди негативно

впливає на їхню активність, їх життєдіяльність безпосередньо залежить від температурних умов навколишнього середовища. По-друге, літо часто приносить підвищену кількість опадів і вологості, створюючи більше місць розмноження, таких як застійні водойми. Ці умови сприяють яйцекладці комарів та розвитку личинок. Таким чином, сезонні зміни клімату суттєво впливають на динаміку популяції комарів, визначаючи їхню активність і чисельність у різні пори року.

Інші фактори, такі як наявність тварин та вологість, також вплинули на популяції комарів. Наприклад, у міських районах наявність домашніх тварин, зокрема собак та котів, створювала додаткові джерела живлення для комарів, що сприяло збільшенню їх чисельності. У приміських районах худоба та дикі тварини відігравали подібну роль. Підвищена температура і вологість у міських районах, особливо через ефект теплових островів, сприяли розмноженню комарів, що пояснює їхню на 20 % вищу активність порівняно з приміськими районами.

Таким чином, комарі продемонстрували значні відмінності у поширенні, поведінці та сезонній активності залежно від середовища їхнього існування, що є важливим аспектом для оцінки ризиків поширення інвазій і необхідності розробки ефективних заходів моніторингу та контролю.

Молекулярно-генетичні дослідження комарів на зараженість D. repens і D. immitis

Для проведення молекулярних досліджень і виділення ДНК комарів було розділено на 75 проб, що склалися із 50 особин одного виду, зібраних в одному місці. 3750 комарів було досліджено на наявність *D. repens* і *D. immitis*. З 75 проб було виявлено 6 (8 %) позитивних на ДНК *Dirofilaria* spp., що склалися з комарів *Aedes* spp. і *Culex* spp. ДНК *D. repens* була підтверджена в усіх 6 позитивних пробах (8 %), з них 4 проби (5,3 %) також були позитивними на *D. immitis* (табл. 3.9).

Таблиця 3.9

**Виявлення ДНК *Dirofilaria* spp. серед комарів на території
Хмельницької і Вінницької областей**

Рід комарів	Кількість	Кількість проб	<i>D. repens</i>	<i>D. immitis</i>	<i>D. repens</i> / <i>D. immitis</i>
<i>Aedes</i> spp.	1693	34	4	2	2
<i>Culex</i> spp.	1406	28	2	2	2
<i>Anopheles</i> spp.	651	13	0	0	0

Для остаточної ідентифікації ДНК позитивні зразки були підтверджені за допомогою секвенування продуктів ПЛР, яке показало 98–100 % гомологію з послідовністю *D. repens*, і 96–99 % з *D. immitis*.

Наше дослідження було зосереджено на молекулярному скринінгу на *Dirofilaria* spp. ДНК комарів, що надало результати щодо потенційних переносників *D. repens* і *D. immitis* в Україні. Дослідженнями встановлено території з потенційно зараженими комарами *Aedes* spp. і *Culex* spp., що становить ризик передачі дирофіляріозу та можливе існування резервуарів захворювання.

3.6 Оцінка ефективності та безпечності терапевтичних схем лікування за дирофіляріозу у собак

Для проведення досліджень ефективності лікування було відібрано 12 собак, з яких 4 були самками та 8 – самцями, по 6 собак у першій і другій групах. Вік собак варіював від 2 до 12 років, а вага – від 8 до 75 кг.

У першій групі дві собаки (33 %) мали легку стадію захворювання, ще три (50 %) перебували на помірній стадії, а одна собака (17 %) мала важку стадію патології. У цій групі не спостерігалось випадків синдрому порожнистої вени. У двох собак (33 %) першої групи було виявлено

мікрофіляремію. Тест VetExpert на антиген дав позитивний результат у п'яти випадках (83 %), однак мікрофілярії не було виявлено у чотирьох собак. Для подальшої діагностики у чотирьох пацієнтів першої групи проводилося ПЛР-дослідження, з яких всі показали позитивні результати на наявність *D. immitis*. У трьох собак було встановлено коінвазію з *D. repens*.

У другій групі три собаки (50 %) мали легку стадію захворювання, дві собаки (33 %) – помірну стадію, і одна собака (17 %) мала важку стадію патології. У цій групі також не було випадків синдрому порожнистої вени. У чотирьох собак (67 %) виявлено мікрофіляремію. Тест VetExpert на антиген дав позитивний результат також у двох випадках. ПЛР-дослідження проводилося у всіх собак показали позитивний результат на *D. immitis*. У двох собак було діагностовано коінвазію *D. immitis* і *D. repens*.

У собак, інвазованих *D. immitis*, спостерігалися значні зміни в гематологічних показниках. Серед 12 тварин анемію виявлено у 8 (66,7 %), підвищену кількість лейкоцитів – у 5 (41,7 %), периферичну еозинофілію – у 4 (33,3 %), базофілію – у 3 (25 %), а знижений рівень гемоглобіну – у 7 (58,3 %) (табл. 3.10). Ці дані свідчать про виражену імунну відповідь і системні порушення, що супроводжують інвазію.

Біохімічні зміни також були помітні. Підвищену активність аспартатамінотрансферази (АсАТ) зафіксовано у 2 собак (16,7 %), аланінамінотрансферази (АлАТ) – у 3 (25 %). Загальний білок був підвищений у 5 собак (41,7 %), а сечовина – у 2 (16,7 %), що може вказувати на можливі порушення в роботі печінки, м'язової тканини та нирок через хронічний перебіг дирофіляріозу.

Також у 33,3 % тварин виявлено ознаки регенерації еритроцитів, що вказує на відновлення організмом кількості еритроцитів під час інвазійного навантаження. Тромбоцитопенія зафіксована у 25 % собак (3 зразки із 12), що може бути зумовлено підвищенням використанням тромбоцитів для коагуляції або їх міграцією до уражених тканин, зокрема легень.

Таблиця 3.10

Гематологічні зміни у собак, інвазованих *D. immitis*

Показник	Середні значення для собак, інвазованих <i>D. immitis</i>	Норма
Еритроцити	3,5±0,3 ***	4,8–9,3 10 ¹² /л
Гемоглобін	240,2±28,5*	300–380 мг/л
Лейкоцити	17,5±2,9*	6,0–15,0 10 ⁹ /л
Лімфоцити	8,1±2,1***	12–30 %
Тромбоцити	125,6±20,2**	150–400 10 ⁹ /л
АсАТ	95,1±10,8**	5–55 од/л
АлАТ	162,4±21,1***	5–107 од/л
Загальний білок	82,9±5,5	51–78 г/л
Сечовина	15,3±5,8	2,5–9,6 ммоль/л
Альбумін	18,1±5,0	24–44 г/л
Еозинофіли	22,4±4,7*	2–10 %
Базофіли	6,9±2,0*	0–1 %
Ретикулоцити	5,5±1,4	0–1 %

Примітка: * – $p < 0,1$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$ за порівняння з фізіологічними нормами.

Гіперпротеїнемія у багатьох собак свідчила про запальні процеси, спричинені паразитарною інвазією, із середнім рівнем загального білка $83,4 \pm 5,1$ г/л, що перевищує норму. Гіпоальбумінемія спостерігалася у 6 собак, що свідчить про хронічну запальну відповідь. Лімфопенія була виявлена у 66,7 % собак, підтверджуючи негативний вплив паразитарної інвазії на імунну систему.

У нашому дослідженні ми розподілили 12 собак на дві групи по 6 тварин: першу та другу. Першій групі вводили лише меларсомін у дозі 2,5 мг/кг двічі — на 60-й та 90-й дні після початку лікування (табл.3.11). Перед

кожною ін'єкцією меларсоміну вводили дексаметазон у дозі 0,1-0,2 мг/кг внутрішньом'язово для зменшення ризику тромбоемболії. Стан собак контролювали під час лікування, але додаткових медикаментів або профілактичних засобів у контрольній групі не застосовували.

У другій групі ми використовували розширену схему лікування, що включала меларсомін у дозі 2,5 мг/кг тричі – на 60-й, 90-й та 91-й дні. Перед першою ін'єкцією меларсоміну, у разі наявності симптомів захворювання, собакам призначали преднізолон перорально у дозі 0,5-1,0 мг/кг за тиждень до початку лікування. Продовжували прийом преднізолону протягом 4 тижнів після кожної ін'єкції меларсоміну. На перший день лікування, відповідно до інструкцій, топічно застосовували моксидектин для знищення мікрофілярій. У разі наявності мікрофілярій перед початком основного лікування призначали антигістамінні препарати (хлоропірамін у дозі 0,5-1,0 мг/кг внутрішньом'язово) та глюкокортикоїди (дексаметазон у дозі 0,1-0,2 мг/кг внутрішньом'язово). Для профілактики тромбоемболії застосовували атерокард у дозі 2-4 мг/кг один раз на день орально, а для захисту шлунково-кишкового тракту від побічних ефектів преднізолону використовували квамател у дозі 0,5-2,0 мг/кг один або два рази на день, або омепразол у дозі 0,5-1,0 мг/кг з такою ж частотою. Також додавали пробіотики для підтримки здоров'я шлунково-кишкового тракту. Протягом 28 днів призначали доксициклін у дозі 10 мг/кг двічі на день для профілактики ускладнень. На 30-й та 90-й день проводили повторні дози моксидектину топічно. Між 60-м і 69-м днями для профілактики тромбоемболії вводили далтепарин натрію у дозі 100-150 МО/кг один раз на день підшкірно протягом 10 днів.

Результати лікування оцінювали через чотири місяці після початку терапії за допомогою досліджень на наявність мікрофілярій, а також через дев'ять місяців, використовуючи антигенний тест для точнішого виявлення мікрофілярій.

Таблиця 3.11

**Порівняння використаних препаратів у контрольній та дослідній
групах**

Препарат	Дозування та спосіб застосування	Перша група	Друга група
Меларсомін (Імітицид, Меріал)	2,5 мг/кг, внутрішньом'язово	На 60-й і 90-й день	На 60-й, 90-й, і 91-й день
Преднізолон (Преднізолон, Ветлайн)	0,5-1,0 мг/кг, перорально	-	За тиждень до першої ін'єкції, тривалість 4 тижні після кожної ін'єкції меларсоміну
Дексаметазон (Дексаметазон, Ветлайн)	0,1-0,2 мг/кг, внутрішньом'язово	Перед ін'єкціями меларсоміну	Перед ін'єкціями меларсоміну, перед моксидектином для профілактики анафілаксії
Моксидектин (Адвокат, Баєр)	Топічно	-	На 1-й, 30-й, та 90-й дні
Клопідогрель (Атерокард, АТ Київський вітамінний завод)	2-4 мг/кг, перорально	-	Щодня для профілактики тромбоемболії
фамотидин (Квамател, Гедеон Ріхтер)	0,5-2,0 мг/кг, один або два рази на день	-	Під час застосування преднізолону
Омепразол (Омепразол-Тева, Тева Фарма)	0,5-1,0 мг/кг, один або два рази на день	-	Альтернатива квамателу під час застосування преднізолону
Хлоропірамін (Хлоропіраміну гідрохлорид, Здоров'я)	0,5-1,0 мг/кг, внутрішньом'язово	-	Перед моксидектином, якщо є мікрофілярії
Доксициклін (Доксицил, Укрзооветпром постач)	10 мг/кг, двічі на день, перорально	-	Протягом 28 днів
Далтепарин натрію (Фрагмін, Пфайзер)	100-150 МО/кг, підшкірно, раз на день	-	Протягом 10 днів між 60-м і 69-м днями

Собаки, у яких були виявлені мікрофілярії, знаходилися під ретельним спостереженням в умовах інтенсивної терапії протягом 10 годин після першого застосування моксидектину для запобігання анафілактичним реакціям. У випадку собак без мікрофіляремії госпіталізація не була необхідною, однак було рекомендовано обмежити фізичну активність як під час лікування, так і після нього, щоб мінімізувати ризик ускладнень.

На 60-й та 90-91-й дні лікування, після введення меларсоміну, забезпечували госпіталізацію з обмеженням активності собак у клітці протягом 24 та 48 годин. Це дозволяло здійснювати постійний контроль за їхнім станом та оперативно реагувати на будь-які зміни їх стану. Протягом трьох днів після кожної ін'єкції меларсоміну проводили фізичне обстеження для виявлення можливих системних ускладнень, пов'язаних із посттерапевтичною реакцією. Такий ретельний підхід до лікування та контролю за станом здоров'я тварин сприяв максимальній ефективності терапії та значно знижував ризик ускладнень.

Дослідження включало 12 собак, розподілених на першу і другу групи по 6 тварин кожна. В обох групах застосовували меларсомін, але в першій групі використовували його лише двічі та без комбінації з іншими препаратами, тоді як у другій групі меларсомін вводили тричі в комбінації з доксицикліном та іншими супутніми препаратами для підтримки ефективності лікування.

Слід зазначити, що використання запропонованих схем за лікування дирофіляріозної інвазії у собак мало різні показники терапевтичної ефективності (табл. 3.12). До початку лікування в обох групах собак показник екстенсивності інвазії (ЕІ) становив 100%, а середня інтенсивність мікрофіляремії – 267 та 272 мікрофілярій/мл відповідно. На 4-й місяць після початку лікування у першій групі собак було зафіксовано зменшення кількості мікрофілярій на 87,3 % (до 34 екз./мл), при цьому екстенсивність

інвазії становила 16,7 %. Таким чином, екстенс- та інтенсефективність лікування на цей термін становили 83,3% та 87,3% відповідно.

Таблиця 3.12

Терапевтична ефективність різних схем лікування собак спонтанно інвазованих *D. immitis*

Група тварин	Показники ефективності	До початку лікування	Місяць після початку лікування	
			4	9
Перша	ЕІ, %	100	16,7	0
	П, мікрофілярій/мл	267	34	0
	ЕЕ, %	0	83,3	100
	ІЕ, %	0	87,3	100
Друга	ЕІ, %	100	0	0
	П, мікрофілярій/мл	272	0	0
	ЕЕ, %	0	100	100
	ІЕ, %	0	100	100

На 4-й місяць після початку лікування у першій групі собак було зафіксовано зменшення кількості мікрофілярій на 87,3 % (до 34 екз./мл), при цьому екстенсивність інвазії становила 16,7 %. Таким чином, екстенс- та інтенсефективність лікування на цей термін становили 83,3% та 87,3% відповідно. Варто наголосити, що через 9 місяців після початку терапії у тварин цієї групи мікрофілярії у крові не виявлялися, а показники екстенсивності та інтенсивності інвазії знизилися до нуля, що свідчить про 100% ефективність застосованої схеми.

У другій групі собак позитивна динаміка відзначалася вже на 4-й місяць лікування: кількість мікрофілярій зменшилася до нуля, що відповідає 100% інтенс- та екстенсефективності. Такі результати свідчать

про більш швидку та виражену дію обраного терапевтичного підходу у цій групі.

Під час терапії моксидектином у жодній із груп не було зареєстровано анафілактичних реакцій, навіть у собак із мікрофілярією. Проте побічні ефекти виявлялися у процесі лікування доксицикліном. У другій групі два собаки мали симптоми блювоти, анорексії та діареї. Симптоми були успішно усунуті після симптоматичної терапії та зниження дози доксицикліну з 10 мг/кг до 5 мг/кг двічі на день, що дозволило продовжити курс лікування без перерв.

У першій групі побічні реакції були виражені більш інтенсивно. Три собаки проявляли стійку діарею та анорексію, що вимагало повторної корекції доз препаратів. Серед цих собак також відзначалися епізоди блювоти після введення меларсоміну у двох випадках, які потребували додаткової підтримуючої терапії для усунення симптомів.

Після терапії меларсоміном у другій групі спостерігалися лише легкі побічні реакції, зокрема діарея у двох собак та періодична анорексія у однієї собаки, які самотійно минали протягом кількох днів. У першій групі чотири собаки (67 %) мали виражену блювоту, а у трьох спостерігалася діарея, що потребувала симптоматичного лікування протягом кількох днів.

Щодо місцевих реакцій на ін'єкції меларсоміну, у другій групі лише у двох собак відзначали незначне набрякання в місці ін'єкції, яке самотійно зникло через кілька тижнів. У першій групі у чотирьох собак спостерігалася значне набрякання та біль у місці введення препарату, що викликало дискомфорт протягом тижня.

Загальні результати терапії через чотири місяці після початку лікування показали відсутність мікрофілярій у всіх собак другої групи, підтверджену методом Кнотта, тоді як у першій групі в одного собаки все ще спостерігалися мікрофілярії, що вимагало додаткового курсу лікування. Через дев'ять місяців антигенний тест був негативним у всіх собак другої

групи, підтверджуючи ефективність комплексної терапії. У першій групі тест також був негативним, проте клінічні ускладнення та часті побічні реакції свідчили про меншу ефективність та безпечність застосованої терапії у порівнянні з другою групою.

РОЗДІЛ 4

АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ

Трансмісивні (векторні) хвороби, що передаються членистоногими переносниками, викликають серйозне занепокоєння як у ветеринарній медицині, так і в охороні здоров'я людей. Дані захворювання можуть передаватись через кліщів та комарів, які є не лише носіями інфекційних та інвазійних хвороб, але й активними учасниками епізоотологічних процесів. Інвазії, викликані цими переносниками, можуть проявлятися у собак у різноманітних формах – від безсимптомних до важких клінічних станів, що потребують термінового лікування. Зоонозний ризик, пов'язаний із трансмісивними хворобами, також не можна ігнорувати, оскільки деякі з цих захворювань можуть передаватися від тварин до людей, що створює додаткові виклики для громадського здоров'я. Поширеність та захворюваність варіюють в залежності від регіону, оскільки на них впливають різноманітні екологічні, соціальні та біологічні фактори, такі як кліматичні умови, наявність переносників, а також поведінка людей і тварин.

Методи молекулярного скринінгу, такі ПЛР та секвенування, продемонстрували значні переваги над традиційними діагностичними методами, такими як мазки крові, у виявленні захворювань, що передаються членистоногими у собак. Молекулярна діагностика забезпечує вищу чутливість і специфічність, що дозволяє виявляти збудники навіть у безсимптомних випадках або при низькій паразитемії, що є критично важливим для ранньої діагностики та ефективного лікування трансмісивних хвороб у собак. Традиційні методи обмежені низькою чутливістю та специфічністю, значною мірою покладаючись на досвід виконавця. До прикладу, у дослідженні, проведеному в Малайзії, за допомогою мазків крові було виявлено трансмісивні захворювання лише у 20 %

безсимптомних собак, тоді як звичайна ПЛР виявила їх у 50 %, демонструючи в 2,5 рази вищу чутливість та специфічність [135]. Метод ПЛР широко використовується у ветеринарних клініках і показав вищу надійність порівняно з мазками крові, виявляючи таких збудників як анаплазма, бабезія та ерліхія [135,136]. Секвенування наступного покоління може виявляти кілька збудників одночасно, надаючи всебічний огляд трансмісивних хвороб, присутніх у зразку. Було встановлено, що даний метод здатний виявляти 17 різноманітних збудників одночасно з високою чутливістю та специфічністю, порівняною з ПЛР у реальному часі [137]. Молекулярні методи діагностики було використано в різних регіонах, виявляючи відмінності в поширеності збудників. Не зважаючи на численні переваги молекулярного скринінгу, ці методи стикаються з певними складнощами. Вартість та технічна підтримка, необхідні для таких методів можуть бути дороговартісними, особливо в умовах з обмеженими ресурсами. Крім того, хоча молекулярні методи можуть виявити мінімальний рівень ДНК збудників, їх результати не завжди корелюють з клінічними захворюваннями, що потребує ретельної інтерпретації [138]. Молекулярні методи скринінгу забезпечують більш чутливу та специфічну альтернативу традиційним діагностичним методам виявлення трансмісивних хвороб у собак, є особливо цінними для виявлення безсимптомних інвазій і коінвазій, які часто не діагностуються звичайними методами. Однак впровадження цих передових методів повинно враховувати їхню вартість, доступність та потребу в кваліфікованому персоналі, особливо в умовах обмежених ресурсів.

Поширеність дирофіляріозу, спричиненого *Dirofilaria* spp., як у людей, так і у собак в Україні є серйозною проблемою охорони здоров'я населення. Захворювання людей, викликане *D. repens*, все частіше реєструється по всій країні, з помітним зростанням випадків за останні

десятиліття. Аналогічно поширений дирофіляріоз собак, при цьому значна частка собак заражена, що створює ризик передачі зоонозу людині.

З 1997 по 2012 рік в Україні зареєстровано 1465 випадків дирофіляріозу серед людей, з найвищою захворюваністю в Херсонській області (9,79 на 100 000 осіб) та найнижчим у Західній Україні (0,07-1,68 на 100 000 осіб). Захворювання широко поширене, вражає всі області, і найчастіше зустрічається серед осіб віком 21-40 років [49].

Захворювання розширює ареал і були зареєстровані випадки у Київській, Донецькій, Запорізькій, Дніпропетровській, Херсонській та Чернігівській областях [49].

Інвазія зазвичай проявляється як підшкірні ураження, часто розташовані на голові та навколо очей, але також можуть вражати кінцівки та інші частини тіла [49].

В Україні приблизно 24,1 % собак інвазовані *Dirofilaria* spp., при цьому більш висока сприйнятливість спостерігається у собак самців порівняно з самками [139]. У Харківській області поширеність *Dirofilaria* spp. у собак становила 37,03 %, при цьому переважаючим видом є *D. repens* [63]. У Сумській області дирофіляріоз діагностували у 57,6 % випадків як моноінвазію, з сезонним піком у червні та жовтні [62].

Субклінічна природа захворювання у собак часто призводить до недостатньої діагностики, що підтримує безперервний життєвий цикл паразита. Для вирішення цієї проблеми необхідні вдосконалені діагностичні інструменти та обізнаність населення [25].

Зміни клімату та збільшення міграції домашніх тварин сприяли поширенню нематод *Dirofilaria* spp. у Європі, включаючи Україну [25]. Наявність переносників комарів, таких як роди *Aedes* та *Culex*, додатково підтримує передачу захворювання [63].

Відсутність швидких та надійних діагностичних інструментів та недостатня обізнаність серед практикуючих лікарів сприяють подальшому

поширенню дирофіляріозу. Посилена співпраця між ветеринарними лікарями, епідеміологами та експертами з охорони здоров'я має вирішальне значення для ефективних заходів контролю [25].

Хоча поширеність дирофіляріозу в Україні викликає занепокоєння, важливо зазначити, що докладено зусиль для покращення діагностичних можливостей та підвищення обізнаності серед медичних працівників та населення. Створення національної системи нагляду за дирофіляріозом стало позитивним кроком до кращого запобігання та контролю захворювання [49]. Однак для подальшого зменшення захворюваності необхідні постійні дослідження та ініціативи в галузі охорони здоров'я.

Крім того, нами було виявлено кількох собак із коінвазіями *B. canis*, *Borrelia burgdorferi* s. l. і *D. repens*. Коінвазії *B. canis* і *D. repens* були виявлені раніше у багатьох собак із Польщі, у собак із Словаччини, а також у собак із Литви [129,140,141]. Потрійна коінвазія *B. canis*, *Borrelia burgdorferi* s.l. і *D. repens* також нещодавно була виявлена у собаки малінуа з Австрії та коінвазію чотирма збудниками, *D. repens*, *A. phagocytophilum*, *Borrelia* spp. і *B. canis*, було зареєстровано у двох собак із Литви [140,142]. Супутні інвазії можуть бути результатом більшого контакту із переносниками, кліщами і комарами, але також можуть бути пов'язані з більш високою індивідуальною сприйнятливістю. У попередніх дослідженнях собаки уражені *D. repens* виявилися більш сприйнятливими до інвазії *B. canis* [121]. Коінвазії, включаючи дирофіляріоз, можуть стати більш поширеним серед собак у Центральній, Східній та Північній Європі через розширення ареалу цього збудника та ендемічність бабезіозу у цих регіонах Європи [143].

Опублікованих даних про поширеність збудника *B. canis* серед кліщів *D. reticulatus*, а також серед собак, в Україні мало, однак вони також корелюють із нашими дослідженнями [144,145]. У нашому дослідженні ДНК *B. canis* була ідентифікована у собак з клінічними ознаками, і вперше

представлено дані про наявність паралогів *B. canis* в українських собак. Аналіз хроматограм виявив наявність ідентичних паралогів у собак із Центральної Польщі та України, що свідчить про те, що географічні відмінності в їх розподілі малоймовірні. Ідентифіковані паралоги узгоджувалися з результатами попереднього дослідження, де встановлено їх присутність у гені 18S рДНК *B. canis* у собак із Польщі [146].

ДНК *B. canis* також була ідентифікована у невеликого відсотка клінічно здорових собак. Субклінічні інвазії *B. canis* раніше спостерігалися у собак, у тому числі у собак з Австрії та у їздових собак з Польщі [142,147]. Проте в попередніх дослідженнях було виявлено набагато вищий відсоток носіїв серед клінічно здорових собак (25 %), ніж у поточному дослідженні. Нижчий відсоток ураження *B. canis* може відображати кращу обізнаність власників тварин і ветеринарних лікарів і кращу профілактику проти кліщів [129].

За результатами нашого дослідження 21,5 % собак були позитивними на бабезіоз і в результаті ідентифіковано збудника *B. canis*. Це узгоджується з попередніми дослідженнями, оскільки *B. canis* протягом останніх років є ендемічним збудником бабезіозу серед собак в Україні. Поширеність бабезіозу у собак в Україні варіює в різних регіонах, при цьому конкретні дослідження висвітлюють поширення та фактори, що впливають на захворювання.

Бабезіоз, викликаний найпростішими паразитами роду *Babesia*, передається переважно кліщами і становить значний ризик для здоров'я собак в Україні. Показники поширеності та фактори, що впливають на поширення захворювання, були задокументовані в різних дослідженнях, проведених у різних містах України. Дослідження, проведене у Києві з 2014 по перше півріччя 2017 року, показало, що з 2030 обстежених собак 416 були заражені *B. canis*, що становило 20,5 % [148]. У дослідженні також відзначено сезонність, з більш високими показниками зараження навесні

(квітень-травень) та восени (вересень-жовтень), що корелює з активністю переносників кліщів *D. reticulatus* [148]. Здатність цих кліщів передавати збудника собакам протягом короткого періоду (всього 8 годин) ще більше підкреслює високий ризик зараження [149].

У Полтаві у дослідженні з 2007 по 2016 рік зафіксовано 7866 випадків бабезіозу у собак. Хвороба була виявлена протягом всього року, з піком випадків у квітні та вересні-жовтні [150]. Дослідження підкреслило, що самці частіше страждали, ніж самки на 20 %, а молодші собаки (2-3 роки) були більш сприйнятливими порівняно зі старими собаками. На поширеність бабезіозу впливають такі фактори навколишнього середовища, як температура, яка впливає на активність кліщів і, отже, на передачу захворювання [148,150]. Також була відзначена сприйнятливість до породи, причому безпородні собаки, німецькі вівчарки та ротвейлери були більш схильні до інвазії.

Хоча дослідження дають цінне уявлення про поширеність бабезіозу в окремих регіонах України, важливо враховувати, що ці висновки можуть бути не репрезентативними для всієї країни. Варіації клімату, популяції кліщів та демографії собак можуть призвести до відмінностей у показниках поширеності в різних областях. Потрібні подальші дослідження, щоб отримати всебічне розуміння поширеності захворювання по всій країні.

У нашому дослідженні, було встановлено, що 82 % домашніх собак з симптомами та 3,8 % безсимптомних домашніх собак були заражені *Babesia* spp. Це підкреслює значну поширеність бабезіозу в регіоні [147]. Переміщення собак через соціально-політичні чинники, такі як транслокація собак з України до Польщі після російського вторгнення, також сприяло поширенню захворювань, що передаються переносниками, включаючи бабезіоз [40].

Наше дослідження базувалося на молекулярному виявленні ДНК збудників хвороб у зразках крові собак. Переважна більшість

опублікованих досліджень, однак, базуються на виявленні антитіл проти трансмісивних захворювань, отже, відображають загальну поширеність інвазії, а не поточні захворювання [151,152]. Серологічні дослідження широко використовуються для діагностики захворювань спричинених *Borrelia burgdorferi* у собак [153]. Серопоширеність антитіл до *Borrelia burgdorferi* s. l. сильно відрізняється у собак з різних країн і регіонів. У двох масштабних епізоотологічних дослідженнях у США, які охоплювали 2010–2017 та 2013–2019 роки, серопревалентність коливалася в межах 1,2–16 % залежно від року та штату [154]. Цікаво, що хоча поширеність зменшилася в старих ендемічних регіонах, було встановлено, що бореліоз поширюється в нових регіонах зі збільшенням поширеності серед популяцій собак. У недавньому дослідженні, проведеному в Канаді, серопревалентність була значно нижчою, приблизно 2–3 % [155].

У Європі за епізоотологічними дослідженнями було виявлено подібну розбіжність у серопревалентності бореліозу між країнами і регіонами та породами і групами собак [153]. Найвища серопревалентність була відзначена у двох групах бернських зенненхундів з Австрії, включаючи здорових собак і собак із захворюванням нирок (43 і 54 % відповідно) [156]. Загалом у собак у європейських країнах рівень серопревалентності зберігається на такому ж рівні, що й у Північній Америці, на рівні 1–12 % [153,156]. Варто пам'ятати, що серопревалентність у собак позитивно пов'язана із захворюваністю на бореліоз у людей [151]. Наші показники поширеності серед домашніх собак в Україні (4,5 %) знаходяться в цьому ж діапазоні, але вищі, ніж дані, отримані серед бродячих собак у Болгарії (0,6 %), і нижчі, ніж серед військових робочих собак з Австрії (11 %) [142,157]. У дослідженнях у Польщі серопоширеність становила також 4–11 % [153,158].

Філогенетичний і молекулярний аналіз дозволили ідентифікувати *Borrelia burgdorferi* s. s. у трьох позитивних зразках від собак у поточному

дослідженні. Цей вид спричиняє бореліоз собак у Європі та Північній Америці, а також був ідентифікований раніше у собак у північно-західній Польщі [127,159]. Він є патогенним для людини і спричиняє хворобу Лайма. У трьох дослідженнях у Польщі ДНК *Borrelia afzelii* була виявлена у собак, включаючи летальний випадок міокардиту [158,160]. Крім того, *Borrelia garinii* є причиною бореліозу собак у Європі. Цікаво, що обидва *Borrelia afzelii* і *Borrelia burgdorferi* s. s., більш поширені серед кліщів в Україні, ніж інші види борелій як у природних, так і в приміських зонах, тому домінування *Borrelia burgdorferi* s. s. у собак може відображати його вищу патогенність для цих господарів [128,144]. У попередньому дослідженні в Україні було також виявлено *B. spielmanii* і *B. valaisiana* серед досліджених кліщів *I. ricinus* [144].

Проведене нами дослідження вперше надає дані про гаплотипи *D. repens* в Україні і пов'язує ці генетично різноманітні дані та розкриває зв'язок з іншими країнами Європи.

За результатами генотипування нами було проаналізовано і визначено різноманітні гаплотипи серед мітохондріального геному, що кодує мтДНК *D. repens*. Комбіновані маркери мтДНК (гени COI і NADH) дозволили розмежувати чотири гаплотипи і виявили деякі докази географічної сегрегації гаплотипів. Зокрема, за результатами дослідження встановлено тісний зв'язок між гаплотипами виявленими в Україні з іншими гаплотипами з ендемічних регіонів у Європі (Польща, Литва, Латвія, Румунія) та географічну сегрегацію кількох гаплотипів. Особливості географічної сегрегації гаплотипів можуть відображати шляхи нещодавньої експансії *D. repens*, як природними, так і антропогенними шляхами (транспортування собак). Цікаво, що ми ідентифікували один гаплотип, який дуже поширений у Польщі, Литві та Латвії, але не ідентифікований в Австрії чи Італії. Таким чином, цей гаплотип може представляти окремий

дуже домінантний гаплотип філярій, добре пристосованих до конкретних кліматичних умов у цьому регіоні Європи.

У нашому дослідженні було виділено чотири гаплотипи на основі двох комбінованих маркерів мітохондріального геному мтДНК. Подібним чином, у нещодавньому комплексному дослідженні трансмісивних гельмінтозів на основі двох маркерів мтДНК (COI та 12S рРНК), отриманих із бази даних GenBank, було ідентифіковано 16 різних гаплотипів серед амінокислотних послідовностей *D. repens*, і більшість з них (12 різних гаплотипів *D. repens*) були виявлені в Європі [117]. Досить велику кількість послідовностей було виявлено у Польщі, що дозволило виділити три гаплотипи [161]. Дані сукупності гаплотипів виявили досить широке розмаїття генома мтДНК *D. repens* у Європі та підтверджують географічну сегрегацію гаплотипів [117].

Найпоширеніший перший гаплотип виявлений у нашому дослідженні також було виявлено у Польщі, Литві, Латвії та Румунії. Усі ці країни знаходяться в Центральній/Східній та Північній Європі, що потребує додаткових досліджень цих маркерів мтДНК з інших неєвропейських регіонів, щоб підтвердити, чи даний гаплотип присутній у цих регіонах чи циркулює виключно у Європі. У літературі представлено небагато повідомлень про інвазування *D. repens* у собак у таких країнах, як Ірак, де поширеність становила лише 1 %, і Шрі-Ланка, де поширеність досягала 69 % [162,163].

Цікаво, що хоча перший гаплотип був поширений досить обмежено у Центральній/Східній та Північній Європі, він був найпоширенішим серед ідентифікованих гаплотипів [161]. За результатами аналізу спорідненості комбінованих маркерів мтДНК, було встановлено, що перший гаплотип був основним, від якого еволюціонували всі інші гаплотипи. В даному аналізі більшість досліджених ізолятів були з Польщі, що могло спричинити упередження на користь даного гаплотипу. З іншого боку, поширеність

інвазії *D. repens* у Польщі відносно висока, в діапазоні 12–25 %, тому поширеність цього конкретного гаплотипу може бути високою в регіоні [51,129,161].

За результатами досліджень і аналізу встановлено близьку генетичну подібність між *D. repens* з України та Польщі і країн Балтії, де спостерігалось домінування першого гаплотипу у всіх країнах. Причинами, що сприяли даній ситуації може бути природне поширення паразитів (тобто мігруючими м'ясоїдними тваринами, комарами) або антропонозні фактори (перевезення домашніх тварин/імпорт/експорт). Варто підкреслити, що країни Балтії (Литва, Латвія та Естонія) є територією широкого поширення *Dirofilaria* spp. у Північній Європі [51].

Несподівана висока різноманітність гаплотипів *D. repens* у Литві та Латвії може бути пов'язана з добре сформованими популяціями паразитів у цих балтійських країнах, що підтверджується відносно високою поширеністю серед собак, про яку повідомлялося в таких дослідженнях: у Литві до 37,7 %, у Латвії до 17,5 % та випадки зараження людей [164,165]. Цей регіон вважається давно ендемічним щодо *D. repens* і може сприяти еволюції генетичного різноманіття *D. repens*.

Другий гаплотип виявлений нами в Україні можна було згрупувати із іншими гаплотипами виявленими також в Литві.

У попередньому філогенетичному дослідженні *Dirofilaria* spp. серед випадків захворювання у людей в Україні за допомогою маркера 12S рРНК встановлено, що послідовності *D. repens*, зібрані з різних регіонів України, генетично подібні до послідовностей з Південної Європи [48]. Відомо, що Україна є ендемічним регіоном, і в період з 1997 по 2012 рік у різних регіонах України було зареєстровано 1465 випадків захворювання людей [49]. Два з п'яти українських ізолятів належали до першого гаплотипу, який є найпоширенішим гаплотипом у Польщі та Румунії. Обидві країни межують з Україною, що може пояснити спільні гаплотипи. Крім того,

подібні кліматичні умови в цьому регіоні Європи можуть сприяти поширенню певних генотипів філярій. Відомо, що Румунія є ендемічним регіоном щодо дирофіляріозу і останні дослідження повідомляють про екстенсивність інвазії близько 10 % у собак із західних і південно-західних регіонів країни [25].

За літературними даними відомо, що в Австрії та Італії циркулюють три інші гаплотипи, яких немає в жодній іншій країні [161]. Однак було проаналізовано лише невелику кількість зразків із цих двох країн, що може не відображати усієї ситуації. Для належної оцінки гаплотипів необхідно проведення подальших досліджень. Дані гаплотипи мали найбільшу спорідненість із гаплотипом з Румунії, який може підтримувати регіональне поширення паразита. Крім того, поширеність *D. repens* у Південній Італії становила лише 0,1 %, а у Центральній Італії – 7,4 %. Ця помітна різниця в поширеності між регіонами в одній країні може вказувати на те, що географічна сегрегація може бути каталізатором для трьох унікальних гаплотипів [166].

Останні дослідження, проведені в Австрії, показали, що поширеність *D. repens* у собак, що живуть на вулиці становить лише 2 % [51]. Цікаво, що навіть за такої низької поширеності генетична різноманітність у *D. repens* все ще була присутня, враховуючи, що лише два ізоляти з дослідження представляли два різних гаплотипи, генетично близькі до італійського та румунського гаплотипів [161].

Диференціація гаплотипів була заснована на двох мітохондріальних локусах, таким чином, вона відображає лише генетичне різноманіття в материнських лініях. Щоб доповнити наш аналіз, ми також проаналізувати різноманітність у локусі ITS-1 рибосомної ДНК. Було виділено два чіткі гаплотипи. Було встановлено, що послідовність ITS-1 з повного рибосомального генома *D. repens*, опублікована на основі аналізу дорослої

самки гельмінта, представляє європейський гаплотип В через відсутність мотиву ААТ у позиції 1897 п. о. (AB973229) [122].

За філогенетичними деревами, побудованими за послідовностями COI і NADH та ITS-1, було підтверджено і описано вперше чотири гаплотипи *D. repens* в Україні. Наші послідовності депоновані разом із еталонними послідовностями в GenBank.

Результати нашого дослідження підтверджують попередні спостереження, які вказують на те, що собаки, інвазовані *D. immitis*, можуть демонструвати хибнонегативні результати при дослідженні на антиген. Ці собаки виявлялися позитивними після проведення термічної обробки зразків, як було також показано в роботах Little (2014), Velasques (2014), а також Drake (2015) [57,151,167]. Додатково, результати нашого дослідження були підтверджені виявленням мікрофілярій у собак, з подальшою ідентифікацією видів за допомогою ПЛР. У дослідженні Ionica та ін. (2015) було виявлено дев'ять (24,3 %) зразків, які спочатку давали негативні результати на антиген, але в подальшому були підтверджені як позитивні на *D. immitis* за допомогою ПЛР [168]. Ці результати, ймовірно, зумовлені низькою кількістю дорослих гельмінтів, що циркулюють у організмі тварини, або ж відтермінованим виробленням антигену. Ці факти є надзвичайно важливими, оскільки більшість епізоотологічних досліджень покладаються на результати досліджень на антиген, які можуть недооцінювати реальну поширеність інвазії. Важливо зазначити, що дослідження на наявність дирофіляріозу за допомогою ПЛР виявило, що традиційні дослідження на антигени не здатні виявити всіх інвазованих собак. У нашому дослідженні загальна поширеність інвазії *D. immitis* склала 25,5 % при термічній обробці зразків, тоді як без обробки цей показник становив лише 7,3 %. Це свідчить про необхідність перегляду діагностичних підходів та впровадження більш чутливих методів для

виявлення дирофіляріозу у собак, що, в свою чергу, може допомогти у кращому розумінні епізоотології цієї хвороби.

В останніх дослідженнях було підтверджено цікаву тенденцію, що стосується собак, які мають коінвазії *D. immitis* і *D. repens*. Встановлено, що собаки, які отримують щомісячні ін'єкції макроциклічних лактонів та доксицикліну, можуть демонструвати хибнонегативні результати при дослідженнях на антиген до дирофіляріозу. Це вказує на те, що традиційні тест-системи на антиген не є надійним індикатором для собак, які проходять лікування, що поступово знищує паразитів [57]. Ці дані підкреслюють важливість врахування лікувальних методів при проведенні діагностики. Також це свідчить про те, що нагрівання зразків може призводити до руйнування комплексів антиген-антитіло, що, у свою чергу, може вплинути на результати дослідження. Ці результати вказують на важливість комплексного підходу до діагностики та лікування дирофіляріозу, що може суттєво вплинути на здоров'я собак.

Виявлення видів *Dirofilaria* spp. у західній частині України свідчить про те, що ці паразити активно поширюються з південних та східних регіонів. Однак важливо зазначити, що статистичні дані про поширеність захворювання можуть бути не повними і хибнонегативними. Особливу увагу привертають також опубліковані результати, які стосуються перехресної реактивності тестів на антиген *D. immitis* при паразитуванні в організмі *D. repens*. Дослідження Іоніса та ін. (2014) виявило можливу перехресну реакцію між цими двома видами, оскільки дев'ять зразків, які показали позитивний результат на антиген *D. immitis*, також виявилися позитивними на *D. repens* при проведенні ПЛР [168]. Це може бути інтерпретовано як наявність супутньої інвазії, де *D. immitis* може бути в латентній формі, або ж як результат пригнічення мікрофілярій *D. immitis* через присутність мікрофілярій *D. repens*. Ці результати підкреслюють важливість комплексного підходу до діагностики та лікування

дирофіляріозу, а також необхідність подальших досліджень для розуміння взаємодії між цими паразитами.

У роботах Pantchev та ін. (2009) було зазначено, що потенційна перехресна реакція між *D. repens* і *D. immitis* була виключена, що свідчить про специфічність цих паразитів у контексті діагностики [47]. У нашому дослідженні ми також виявили в одному випадку реактивність тесту на антиген, за інвазії *D. repens*, що підкреслює важливість точної ідентифікації цих паразитів у клінічній практиці. В літературі було згадано про можливість перехресної реакції з *Angiostrongylus vasorum* та *Spirocerca lupi*, що підкреслює необхідність подальшого дослідження специфічності антигенних тестів [169,170]. Попередні дослідження, що проводилися під час розробки перших антигенних тестів, показали, що сироватка від собак, інвазованих іншими поширеними гельмінтами, не викликала перехресної реакції з антигеном *D. immitis*, за винятком випадків, пов'язаних із *Dipetalonema reconditum* [171]. Це свідчить про те, що, хоча філярії можуть мати подібні антигени, специфічність тестів залишається критично важливою для правильного діагнозу. Цікаво, що Brunner і ін. (1988) не виявили перехресних реакцій між кишковими паразитами та *D. reconditum*, що ще більше підкреслює унікальність антигенних профілів різних видів паразитів [172]. Ці дані вказують на важливість розробки нових, чутливих і специфічних діагностичних тестів, які дозволять точно ідентифікувати інвазії, спричинені цими паразитами, без ризику помилкових позитивних результатів через перехресні реакції.

Пояснити дані результати досить складно, що свідчить про необхідність проведення подальших досліджень у цій галузі. Однією з можливих причин таких результатів може бути те, що імунохроматографічні тест-системи на антиген, які використовували в попередніх дослідженнях, мають поліклональне покриття антитіл, що може призводити до зниження специфічності дослідження. Крім того, як було

зазначено раніше, антигени різних видів філярій мають певну схожість, що може давати перехресну реактивність і здатність розпізнавати антигени *D. repens*.

Цікаво, що одна із чотирнадцяти собак у нашому дослідженні, яка спочатку показала негативний результат перед термічною обробкою, стала позитивною після нагрівання сироватки. Це може свідчити про те, що *D. repens* може індукувати утворення імунного комплексу так само, як і *D. immitis*. В такому випадку, руйнування імунного комплексу під час термічної обробки могло б призвести до вивільнення антигенів, які перехресно реагують з тестами. Іншим можливим поясненням отриманих результатів є те, що собаки можуть бути коінвазовані як *D. immitis*, так і *D. repens* одночасно. Це підкреслює необхідність глибшого вивчення взаємодії між цими паразитами та їх впливу на здоров'я собак, а також можливі наслідки для діагностики та лікування.

Необхідне проведення подальшого детального дослідження рівня сироваткового білка та співвідношення альбумінів і глобулінів у собак, у яких спостерігається сероконверсія після термічної обробки сироватки крові. Це необхідно для визначення – чи утворення імунних комплексів є наслідком гіперглобулінемічного стану. За даними дослідження Little та ін. (2014), сироватка крові собак з гіпергаммаглобулінемією, які заражені іншими паразитами, здатна блокувати виявлення антигену до *D. immitis* за допомогою комерційних тестів [151]. Це дослідження показало, що нагрівання сироватки може усунути це блокування, що, в свою чергу, дозволяє виявити антиген. Таким чином, можна припустити, що собаки, які стали позитивними на антиген *D. immitis* після термічної обробки, могли бути спочатку негативними, але насправді мали коінвазію з іншими збудниками. Якщо супутні інвазії, викликані збудниками, що індукують гіпергаммаглобулінемію (такими як *Leishmania infantum*, *Ehrlichia canis*, *Babesia* spp.), впливають на результати дослідження на антиген, це може

мати суттєві наслідки для досліджень поширеності *D. immitis* у регіонах, де ці інвазії співіснують одночасно.

Отже, дослідження досягло своїх цілей, однак існують деякі недоліки, які потребують уваги. По-перше, через обмеження, пов'язані з даним імунохроматографічним тестом, зразки крові, які показали позитивний результат на *D. immitis*, не були досліджені за допомогою спектрофотометрії. Це означає, що оптична щільність тесту на антиген не могла бути використана для виявлення кореляції між рівнем інвазії та титром антигену. По-друге, можливість коінвазії собак з іншими збудниками є ще одним важливим аспектом. Якщо супутні інвазії, викликані збудниками, які спричиняють гіпергаммаглобулінемію, можуть впливати на результати досліджень на антиген, це матиме значні наслідки для подальших досліджень поширеності та діагностики дирофіляріозу.

Молекулярний ксеномоніторинг, виявлення ДНК або РНК збудника у резервуарних господарях є індикатором циркуляції захворювань і загрози здоров'ю людини і тварин. Даний підхід був розроблений після значних досягнень у лабораторних і молекулярних методах протягом останніх двадцяти років і може грати важливу роль у епізоотологічних дослідженнях за трансмісивних захворювань. На сьогоднішній день у літературі немає доступних даних щодо моніторингу популяцій комарів на дирофіляріоз на території України. Нами вперше було проведено дослідження на території Хмельницької і Вінницької областей, де спостерігались випадки захворювання серед собак. У попередніх дослідженнях встановлено, що поширеність *D. repens* серед собак в Україні складає 18,9 %. Коінвазія *D. repens* і *D. immitis* була виявлена у двох собак. У 2019 році нами було досліджено 155 собак із Західної України та виявлено відносно низьку поширеність *D. repens* (3,9 %) [60]. Проте значно вищу поширеність спостерігали серед власників собак із Київської області, де інвазування *D. repens* було виявлено у 26,1 %. До прикладу, у Словаччині поширеність *D.*

repens серед собак складає 10 %, а в ендемічних районах досягає рівня 30 % [29].

З точки зору ветеринарної медицини нематода *D. immitis* є більш важливою як збудник серцево-легеневої форми захворювання. Дирофіляріоз спричинений *D. immitis* є ендемічним в Україні, і хоча фактична поширеність серед собак не вивчена, зареєстровано ряд повідомлень про його діагностику серед собак. Так, *D. immitis* була ідентифікована у 23 собак із Києва (4 %) [173]. Дирофіляріоз спричинений *D. immitis* також нещодавно був виявлений у двох собак, переселених з України до Польщі в результаті переміщення біженців. Одна із собак в анамнезі раніше хворіла на дирофіляріоз. Також було зареєстровано ряд випадків зараження людей [48,49]. Таким чином, загальна поширеність *D. immitis* є досить високою і корелює з поширеністю зареєстрованою в інших ендемічних країнах [95].

Одним із ключових факторів поширення дирофіляріозу є температура навколишнього середовища, яка впливає не лише на географічний розподіл переносників, але й на кінцеву тривалість розвитку паразита всередині комара та швидкість поширення захворювання. Усі ендемічні території, а також зони підвищеної захворюваності собак зосереджені в теплій кліматичній зоні, де, окрім сприятливих умов для розвитку паразитів, є й сприятливі умови для розвитку та виживання переносників [29]. Нижча частота захворювань у холодніших північних регіонах, ймовірно, пов'язана з менш придатними умовами та відсутністю відповідних переносників. Деякі види комарів виявляють невелику специфічність для певних територій, а також, залежно від місцевих факторів середовища, змінюється щільність їх популяції.

Відповідно до ряду європейських досліджень, виявлення одного інвазованого комара *Dirofilaria* spp. потребувало аналізу десятків тисяч комарів, що ускладнює моніторинг дирофіляріозу за допомогою ПЛР-

ксеномоніторингу з економічної точки зору. В теперішній час дані дослідження про ксеномоніторинг комарів на *D. repens* у Європі представлені у Австрії, з Чеської Республіки, Німеччини, Угорщини, Італії, Польщі та Словаччини, але результати не можуть бути кількісно порівняні. За результатами публікацій, відоме лише єдине дослідження про ПЛР-ксеномоніторинг, який був проведений для ідентифікації компетентних векторів для *D. repens* у Європі [16]. Тому необхідні подальші дослідження, які розкриють особливості і потенційні загрози поширення даного зоонозу.

Розповсюдження дирофіляріозу є результатом кліматичних змін, які впливають на територію України. За останнє двадцятиліття кожен рік в Україні був теплішим, ніж середньостатистичні показники за довготривалий період, і 2020 рік став найспекотнішим роком у Європі та Україні, перевищивши на 2,8°C середній показник 1961-1990 рр.

Збільшення кількості автохтонних інвазій у собак і людей пов'язане з умовами, які сприяють виживанню переносників і розповсюдженню видів комарів, що раніше не були типові для певної місцевості. Незважаючи на заходи з інформування власників собак щодо поточної ситуації і загрози ураження дирофіляріозом, профілактичні заходи залишаються безуспішними.

Ксеномоніторинг комарів є важливим і необхідним інструментом для визначення розповсюдження дирофіляріозу та ідентифікації його векторів у природних середовищах. Цей метод дозволяє виявляти інвазованих комарів та визначати рівень ризику передачі інвазії людям і тваринам. Здійснюючи моніторинг комарів можна вчасно виявляти території з високим ризиком зараження дирофіляріозом і вживати ефективні заходи контролю та профілактики. Це особливо важливо в контексті змін клімату та розширення ареалу потенційних резервуарних господарів, що може призвести до збільшення поширення захворювання. Таким чином,

ксеномоніторинг комарів є ключовим елементом стратегій контролю дирофіляріозу.

Дирофіляріоз, спричинений паразитарною нематодою *D. immitis*, може спричиняти значні зміни гематологічних показників у заражених собак. Інвазія призводить до ряду змін компонентів крові, що відображає важкість паразитарної інвазії та фізіологічну реакцію хазяїна. Ці зміни мають важливе значення для ефективної діагностики та лікування захворювання. Інвазовані собаки демонструють помітне зниження кількості еритроцитів, при цьому зниження стає більш вираженим у міру збільшення інтенсивності інвазії. Наприклад, кількість еритроцитів може зменшитися до 47,21 % у важких випадках. Рівень гемоглобіну також значно падає, зі зниженням до 42,27 % у собак із сильною інвазією [64]. Це зниження свідчить про анемію, яка є поширеним наслідком дирофіляріозу. Лейкоцитоз, або збільшення кількості лейкоцитів, є також однією із характерних ознак у інвазованих собак. Кількість лейкоцитів може збільшуватися на 44,98 % у важких випадках [64]. Диференціальні показники крові виявляють значне підвищення еозинофілів, яке може збільшитися до 62,38 % [64,174]. Еозинофілія є типовою відповіддю на паразитарні інвазії. Кількість нейтрофілів і моноцитів також має тенденцію до збільшення, хоча ці зміни менш виражені порівняно з еозинофілами. Тромбоцитопенія або зниження кількості тромбоцитів спостерігається у інвазованих собак зі зниженням до 42,84 % у важких випадках. Рівень гематокриту, який відображає частку об'єму крові, зайнятого еритроцитами, також значно знижуються, що свідчить про анемію та знижену здатність переносити кисень. Швидкість осідання еритроцитів (ШОЕ) значно збільшується, що свідчить про запалення та наявність хронічного захворювання [64].

Біохімічні зміни включають підвищення рівня ферментів сироватки крові, таких як АЛАТ, АсАТ і активності лужної фосфатази, що відображає

стрес або ураження печінки. Крім цього встановлено, що рівень сіалової кислоти в сироватці крові, як загальний, так і пов'язаний з ліпідами, підвищений у інвазованих собак, що свідчить про зміни цілісності клітинної мембрани та запалення [174].

Собаки, інвазовані *D. repens*, також демонструють значні зміни показників крові, включаючи нижчу кількість лімфоцитів, еритроцитів та тромбоцитів, а також зниження гематокриту. У дослідженнях інших авторів виявлено нерегенеративну легку та помірну анемію, помірну та важку тромбоцитопенію та лейкоцитоз, що характеризується гранулоцитозом, лімфоцитозом та моноцитозом, включаючи 4,9-кратне збільшення гранулоцитів, зокрема еозинофілів, і легкий ретикулоцитоз, що не перевищує 20 % від фізіологічної норми [175]. Понад 65 % інвазованих собак мали анемію, а 45 % мали кількість тромбоцитів нижче 200 000/мкл [176]. Крім того, спостерігалися підвищення активності лужної фосфатази та креатиніну. У субпопуляції клінічно здорових собак спостерігалися подібні зміни, що вказує на те, що інвазія *D. repens* може впливати на біологічні функції навіть у безсимптомних випадках, що свідчить про потенційний стан хронічного стресу у інвазованого господаря.

Отже, гематологічні зміни у собак за дирофіляріозу можуть змінюватися залежно від інтенсивності інвазії та реакції організму окремої собаки. Деякі дослідження показують, що, незважаючи на ці зміни, багато собак залишаються безсимптомними, підкреслюючи складність взаємодії хазяїн-паразит та потенціал субклінічних інвазій [177]. Крім того, наявність коінвазій або інших особливостей організму може ще більше ускладнити гематологічний профіль, що вимагає комплексного діагностичного підходу [75]. Розуміння цих варіацій має вирішальне значення для ефективної діагностики та планування лікування у ветеринарній практиці.

Найпоширеніші рентгенографічні зміни, що спостерігаються у собак з дирофіляріозом, в першу чергу пов'язані зі змінами у серцево-легеневій

системі. Ці зміни свідчать про вплив захворювання на серце та легені, оскільки дорослі гельмінти *D. immitis* паразитують у легеневих артеріях та правій частині серця. Рентгенографічна оцінка є важливим діагностичним інструментом для виявлення цих змін та оцінки важкості захворювання.

Рентгенограми часто виявляють збільшене серце, особливо правий шлуночок, через підвищене навантаження та тиск від наявності серцевих паразитів. Це збільшення може призвести до появи круглого серця, що свідчить про гіпертрофію правого шлуночка [178,179]. Приблизно 47 % собак в одному дослідженні демонстрували зміни форми та силуету серця, що свідчить про структурний вплив захворювання на серце [180]. В уражених собак часто спостерігаються звивисті та розширені легеневі артерії на рентгенограмах. Ці зміни обумовлені фізичною присутністю нематод і відповідно як наслідок пошкодженням судин.

Рентгенографічні докази звуження та обструкції легеневих артерій є широко поширеними, що відображає ремоделювання судин та пошкодження, спричинені захворюванням [181]. На рентгенограмах можуть також спостерігатись різні паренхіматозні ураження, включаючи альвеолярні, інтерстиціальні та бронховаскулярні зміни. Ці ознаки більш виражені навколо гілок легеневих артерій і характерні для місць скупчення дирофілярій [182].

Наявність серцевих гельмінтів може призвести до зниження радіопрозорості або затемнення легенів, що свідчить про застійні явища у легенях та набряки [179]. Досить рідко, але також можуть реєструватись плевральні випоти в невеликому відсотку випадків, що свідчить про накопичення рідини в плевральному просторі через серцеву недостатність [180].

Гістологічні дослідження показали дилатацію та гіперпластичні зміни в малих легеневих венах і венулах, які не завжди можуть бути помітні на

стандартних рентгенограмах, але сприяють загальній легеневій гіпертензії та порушенням кровообігу [181].

Хоча рентгенографічні зміни дають значне уявлення про наявність та важкість дирофіляріозу, вони не є виключно діагностичними. Інші методи діагностики, такі як аналіз крові на мікрофілярії та ехокардіографія, часто використовуються спільно для підтвердження наявності паразитів. Крім того, важкість рентгенографічних змін може змінюватися залежно від ступеня ураження та тривалості зараження, підкреслюючи важливість комплексних діагностичних підходів.

Одним із завдань нашого дослідження було вдосконалення схеми лікування дирофіляріозу з використанням триразового введення меларсоміну у поєднанні з іншими препаратами для зменшення посттерапевтичних ускладнень, особливо під час терапії доксицикліном і меларсоміном [104]. Іншими авторами також рекомендована подібна схема лікування дирофіляріозу собак [104].

Результат лікування перевіряли шляхом проведення дослідження на мікрофілярії і антигени на 4-й і 9-й місяць після початку лікування, що рекомендовано іншими дослідниками. Однак Maxwell та ін. (2014) виявили, що у собак можуть циркулювати антитіла досить довго після лікування, що може призводити до хибно позитивних результатів при дослідженнях на антигени у цей час. Це явище пояснюється тим, що загиблі мікрофілярії можуть продовжувати вивільняти антигени у кровотік після їх загибелі [183]. У останніх рекомендаціях щодо лікування дирофіляріозу контрольне дослідження на антиген рекомендовано через рік після початку лікування [104].

У нашому дослідженні ми застосовували моксидектин як додаткову терапію до лікування меларсоміном. Цей макроциклічний лактон є безпечним і ефективним як профілактичний засіб проти мікрофілярій [184]. McCall та ін. (2014) досліджували моксидектин в формі спот-он у собак з

мікрофілярією, експериментально інвазованих *D. immitis*, і не спостерігали жодних побічних реакцій [15]. Vagi та ін. (2017) також під час досліджень моксидектину на двадцяти двох собаках з мікрофілярією не зареєстрували жодних анафілактичних реакцій [185]. Легкі побічні реакції на даний препарат було зареєстровано у нашому дослідженні у контрольній групі у якій не застосовували додаткову терапію. Однак відомо, що моксидектин інколи може спричиняти побічні реакції. Fok та ін. (2010) повідомляли про слабкість, анорексію та нудоту у 4,5 % досліджених собак інвазованих *D. repens* у яких застосовували моксидектин [186]. Оскільки інколи можуть виникати небажані реакції, спричинені застосуванням моксидектину, нами запропоновано попередньо застосовувати у пацієнтів з мікрофілярією преднізолон і атерокард протягом одного тижня. Крім того, ми використовували глюкокортикоїди та антигістамінні препарати у перший день застосування моксидектину разом із тимчасовою госпіталізацією, як це раніше було рекомендовано при застосуванні івермектину [27,104,187].

За гістологічними дослідженнями було встановлено, що мікрофілярії *D. immitis* можуть бути виявлені у різних органах, спричиняючи до прикладу легеневі гранульоматозні ураження, а також можуть спричиняти судинні ушкодження та інші зміни [21,188]. Дані дослідження підтверджують необхідність застосування супутньої терапії, а саме використання препарату атерокард як інгібітора агрегації тромбоцитів під час першого застосування моксидектину, що рекомендовано також іншими дослідниками [187]. Yoon та ін. (2013) використовували антикоагулянт еноксапарин перед хірургічним видаленням дирофілярій з легеневої артерії для запобігання тромбоемболії [187]. У нашому дослідженні ми його використали також після першої ін'єкції меларсоміну. Отже, ми можемо стверджувати, що дана терапія забезпечила відсутність ускладнень після застосування меларсоміну.

У інших дослідженнях також було повідомлено про ефективність моксидектину щодо дорослих особин, окрім мікрофілярій [189]. У випадках описаних у цьому дослідженні, ефективність моксидектину і меларсоміну могла бути пояснена синергізмом дії, що забезпечило також 100 % одужання наших пацієнтів.

Доксициклін рекомендований до використання як частина комплексного лікування дирофіляріозу. Рекомендована доза (10 мг/кг двічі на день) за рекомендаціями Американського товариства серцевих гельмінтів (AHS) є відносно високою і може викликати побічні ефекти з боку шлунково-кишкового тракту [104]. Schulz та ін. (2011) досліджували побічні ефекти доксицикліну у 386 собак під час терапії різних захворювань [190]. У 18,3 % собак було зареєстровано кашель, діарею у 7 % та анорексію у 2,5 % собак. Крім того було досліджено біохімічні показники крові, і встановлено підвищення активності АлАТ у 39,4 % та підвищення активності АсАТ у 36,4 % випадків. Ми також реєстрували підвищення рівня ферментів печінки у деяких випадках, проте ми не проводили рутинне лабораторне обстеження всіх пацієнтів під час подальшого спостереження. У нашому дослідженні ми не реєстрували кашель як побічний ефект доксицикліну. Частота виникнення порушень з боку шлунково-кишкового тракту у наших пацієнтів була вищою, ніж у дослідженнях Maxwell та ін. (2014) [183].

У нашому дослідженні кількість собак з місцевими реакціями була вищою, ніж у Maxwell та ін. (2014). Однак у більшості наших пацієнтів спостерігалися лише легкі та тимчасові місцеві реакції без клінічної значущості. У наших пацієнтів не було виявлено абсцесів, на відміну від трьох випадків у Vagi та ін. (2017). Меларсомін швидко всмоктується з м'язів, однак неправильно введений препарат може спричинити параліч спинного мозку, тому важливо уникати цього за допомогою правильного утримання і техніки введення [191–193].

В літературі є різні думки щодо необхідності обмеження активності та седації собак під час ін'єкції меларсоміну. Запропоновано виконувати цю процедуру навіть без седації і в стоячому положенні тварин або використовувати анальгетики, такі як трамадол або гідрокодон [104,194]. Bagi та ін. (2017) використовували загальну анестезію, досягнуту комбінацією внутрішньовенно введених ксилозину, діазепаму і кетаміну [185]. Одним із рекомендованих препаратів може бути буторфанол, синтетичний опіоїдний препарат, який має як седативний, так і анальгезуючий ефекти з мінімальними кардіоваскулярними побічними ефектами [195]. Однак у нашому дослідженні ми вводили препарат без седації, а лише з фіксацією тварин.

Системні реакції організму за використання меларсоміну були не частими у нашому дослідженні. Анорексія та діарея могли бути викликані меларсоміном. У однієї собаки спостерігався незначний і тимчасовий кашель після введення меларсоміну. Це могло бути спричинено незначною тромбоемболією через загиблих паразитів або як побічний ефект самого препарату [27,196]. Дуже рідко серед ускладнень може спостерігатися еозинофільний пневмоніт і пневмоторакс. Ми не реєстрували дані явища під час наших досліджень. Згідно з літературними даними, попередня терапія зазначених ускладнень дозволяє специфічне лікування дирофіляріозу навіть у важко хворих пацієнтів. Таким чином, повне клінічне одужання може бути досягнуто у більшості цих собак. Вони можуть мати гарну якість життя, однак їх фізична активність може бути дещо обмежена щодо інтенсивних навантажень. В окремих випадках пульмональна тромбоемболія і правошлуночкова недостатність можуть потребувати більш тривалої підтримуючої терапії.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі отримано нові дані щодо поширення та видового складу збудників трансмісивних інвазій собак у Вінницькій, Хмельницькій та Чернівецькій областях України. З'ясовано особливості коінвазування *Dirofilaria spp.*, *Babesia spp.* і *Borrelia spp.* у собак та удосконалено спосіб серологічного та мікроскопічного дослідження на дирофіліаріоз. Визначено особливості молекулярно-генетичної ідентифікації *Dirofilaria spp.* та охарактеризовано генетичну варіативність збудника *D. repens*. Проаналізовано гематологічні показники собак, інвазованих *D. repens* і *D. immitis* та визначено особливості рентгенологічних змін у собак за ураження *D. immitis*. Проведено апробацію ксеномоніторингових досліджень комарів та визначено їх ефективність за дирофіліаріозу собак. З'ясовано ефективність та безпечність терапевтичних схем лікування за дирофіліаріозу у собак.

1. За результатами молекулярного скринінгу собак із Вінницької, Хмельницької та Чернівецької областей України на наявність трансмісивних інвазій встановлено, що загальна частка інвазованих тварин становила 34,6 %. Найбільш поширеним збудником виявлено *Babesia spp.* – у 21,5 % обстежених собак. Інвазії *Dirofilaria spp.* зафіксовано у 6,4 % тварин, причому найвищий рівень ураженості зареєстровано у Вінницькій області. Збудники роду *Borrelia spp.* виявлено у 6,7 % собак у всіх трьох областях. *Neoehrlichia mikurensis* діагностовано лише у 0,2 % тварин.

2. Для молекулярної ідентифікації *D. repens* визначено три видоспецифічні генетичні маркери – фрагменти генів мітохондріальної ДНК COI, NADH та ядерного маркера ITS-1 рДНК. Усі три маркери продемонстрували високу специфічність і чутливість. Секвенування підтвердило ідентичність, а отримані послідовності були депоновані в міжнародну базу GenBank з відповідними реєстраційними номерами: COI

(1-й фрагмент): ON540885, ON540884, ON540886, ON540887, ON540883; COI (2-й фрагмент): ON540062, ON540060, ON540063, ON540061, ON540064; NADH: ON572064, ON572107, ON572053, ON572106, ON572049; ITS-1: ON554183, ON554184, ON554185.

3. Встановлено чотири гаплотипи *D. repens*, включно з двома варіантами ITS-1 (А і В), які відрізнялись делецією з трьох нуклеотидів. Філогенетичний аналіз гена COI показав 97–100 % ідентичність із ізолятами з Європи, що свідчить про генетичну спорідненість паразитів.

4. Коінвазія *Babesia* spp. та *Borrelia* spp. виявлена у 3,6 % випадків. ДНК *Babesia canis* виявлено у 21,5 % зразків, з яких 82 % мали клінічні ознаки, а 3,8 % – були безсимптомними носіями. Секвенування підтвердило високу ідентичність (99,4–100 %) з ізолятами від собак і лисиць. Генетичний аналіз 18S рДНК виявив паралоги з подвійними піками, що свідчить про генетичну неоднорідність *B. canis*. Ідентифіковано генотипи А, В та змішані профілі.

5. Запропоновано удосконалення діагностики дирофіляріозу за допомогою попередньої термічної обробки зразків крові перед серологічним тестуванням. Після нагрівання (104 °С, 10 хв) чутливість експрес-тесту VetExpert на *D. immitis* зросла з 7,3 % до 25,5 %. Модифікований метод Кнотта з концентруванням та спеціальним фарбуванням підвищив виявлення мікрофілярій до 21,7 %, що на 9 % більше порівняно зі звичайною мікроскопією.

6. У собак з *Dirofilaria repens* виявлено вірогідне зниження еритроцитів у 2,1 раза, гематокриту на 37,8%, лімфоцитів у 1,4 раза ($p < 0,001$), тромбоцитів на 11,8% ($p < 0,01$) та підвищення лужної фосфатази у 1,25 раза, креатиніну на 14,4% ($p < 0,01$) і глюкози на 13,3% ($p < 0,05$). Дані вказують на анемію, імуносупресію та порушення функції печінки і нирок.

У собак, інвазованих *D. immitis*, зафіксовано вірогідне зниження еритроцитів у 2,5 раза, гемоглобіну на 17,7% ($p < 0,001$ і $p < 0,05$ відповідно), лімфоцитів у 1,5 раза ($p < 0,001$), тромбоцитів на 19,1% ($p < 0,01$), підвищення лейкоцитів на 26% ($p < 0,05$), АсАТ у 1,8 раза ($p < 0,01$), АлАТ у 1,5 раза ($p < 0,001$), еозинофілів у 2,4 раза та базофілів у 7 разів ($p < 0,05$). Показники загального білка та сечовини були підвищені, а альбуміну — знижений, що свідчить про анемію, запалення, печінкову та ниркову дисфункцію.

7. Основними рентгенологічними ознаками за дирофіляріозу спричиненого *D. immitis* у собак були розширення та звивистість легеневих артерій (75 %) і збільшення правого шлуночка серця (60 %), що вказувало на розвиток легеневої гіпертензії. На ранніх стадіях (28 %) відзначалося помірне розширення легеневих артерій і незначне збільшення серцевого силуету. У 46 % собак із помірним ступенем тяжкості спостерігали ущільнення легеневої тканини та посилення судинного малюнка. У важких випадках (26 %) виявляли дилатацію легеневої артерії, значне збільшення правого шлуночка та плевральний випіт (40 %).

8. Ксеномоніторинг комарів підтвердив свою ефективність як інструмент виявлення природних осередків дирофіляріозу. Серед 3750 досліджених комарів ДНК *D. repens* виявлено у 8 % проб, а *D. immitis* — у 5,3 %, що вказує на активну циркуляцію збудників у регіоні та обґрунтовує доцільність використання ксеномоніторингу для раннього виявлення ризиків та оцінки епізоотологічної ситуації.

9. Дослідження ефективності та безпечності терапевтичних схем лікування дирофіляріозу у собак показало, що повна елімінація мікрофілярій досягалася у всіх тварин уже на 4-й місяць при використанні комбінованої схеми з меларсоміном і доксицикліном (ЕЕ = 100%, ІЕ = 100%). Натомість у групі з дворазовим введенням меларсоміну ЕЕ на 30-й день становила 83,3%, а ІЕ — 87,3%, що свідчить про нижчу терапевтичну ефективність.

ПРОПОЗИЦІЇ ВИРОБНИЦТВУ

1. Для підвищення точності серологічної діагностики дирофіляріозу рекомендовано проведення термічної обробки сироватки крові собак перед проведенням тестування з використанням імунохроматографічних (ІХА) тест-систем.

2. Для терапії собак за дирофіляріозу рекомендовано застосовувати комплексну схему лікування, яка включає триразове введення меларсоміну (2,5 мг/кг на 60-й, 90-й та 91-й дні) у поєднанні з доксицикліном та супутньою підтримуючою терапією. Перед початком лікування рекомендується застосування глюкокортикоїдів.

3. Результати досліджень можна використовувати для викладання дисциплін «Паразитологія та інвазійні хвороби тварин», «Глобальна паразитологія» для підготовки здобувачів вищої освіти вищих навчальних закладів III і IV рівнів акредитації за спеціальністю «Ветеринарна медицина».

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Abdoli, A., Olfatifar, M., Badri, M., Zaki, L., Bijani, B., Pirestani, M., et al. (2024). A global systematic review and meta-analysis on the babesiosis in dogs with special reference to *Babesia canis*. *Veterinary Medicine and Science*, 10(3).
2. Socha, W., Kwasnik, M., Larska, M., Rola, J., & Rozek, W. (2022). Vector-borne viral diseases as a current threat for human and animal health – One Health perspective. *Journal of Clinical Medicine*, 11(11), 3026.
3. Ramalho-Ortigao, M., & Gubler, D. J. (2020). Human diseases associated with vectors (arthropods in disease transmission). *Hunter's Tropical Medicine and Emerging Infectious Diseases*, 1063–1069.
4. Savić, S., Vidić, B., Grgić, Z., Potkonjak, A., & Spasojević, L. (2014). Emerging vector-borne diseases – Incidence through vectors. *Frontiers in Public Health*, 2.
5. Leitner, W. W., Wali, T., Kincaid, R., & Costero-Saint Denis, A. (2015). Arthropod vectors and disease transmission: Translational aspects. In M. Q. Benedict (Ed.), *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 9(11), e0004107.
6. Touray, M., Bakirci, S., Ulug, D., Gulsen, S. H., Cimen, H., Yavasoglu, S. I., et al. (2023, July). Arthropod vectors of disease agents: Their role in public and veterinary health in Turkiye and their control measures. *Acta Tropica*, 243, 106893.
7. Laroche, M., Béranger, J. M., Delaunay, P., Charrel, R., Pradines, B., Berger, F., et al. (2017). Medical entomology: A reemerging field of research to better understand vector-borne infectious diseases. *Clinical Infectious Diseases*, 65, 30–38.
8. Dantas-Torres, F., & Otranto, D. (2016). Best practices for preventing vector-borne diseases in dogs and humans. *Trends in Parasitology*, 32(1), 43–55.

9. Chacón, S. C. (2023). Vector borne diseases related with companion animals in Panama: A review. *European Journal of Veterinary Medicine*, 3(1), 1–10.
10. Day, M. J. (2011). One Health: The importance of companion animal vector-borne diseases. *Parasites & Vectors*, 4, 49.
11. Folly, A. J., Dorey-Robinson, D., Hernández-Triana, L. M., Phipps, L. P., & Johnson, N. (2020). Emerging threats to animals in the United Kingdom by arthropod-borne diseases. *Frontiers in Veterinary Science*, 7, 20.
12. Anderson, R. C. (2001). Filarioid nematodes. In W. M. Samuel, M. J. Pybus, & A. A. Kocan (Eds.), *Parasitic Diseases of Wild Mammals* (1st ed.). Wiley, 342–356.
13. McCall, J. W., Genchi, C., Kramer, L. H., Guerrero, J., & Venco, L. (2008). Chapter 4: Heartworm disease in animals and humans. In *Advances in Parasitology*, 66, 193–285.
14. Simón, F., Siles-Lucas, M., Morchón, R., González-Miguel, J., Mellado, I., Carretón, E., et al. (2012). Human and animal dirofilariasis: The emergence of a zoonotic mosaic. *Clinical Microbiology Reviews*, 25(3), 507–544.
15. McCall, J. W., Arther, R., Davis, W., & Settje, T. (2014). Safety and efficacy of 10% imidacloprid + 2.5% moxidectin for the treatment of *Dirofilaria immitis* circulating microfilariae in experimentally infected dogs. *Veterinary Parasitology*, 206(1–2), 86–92.
16. Cancrini, G., Magi, M., Gabrielli, S., Arispici, M., Tolari, F., Dell’Omodarme, M., et al. (2006). Natural vectors of dirofilariasis in rural and urban areas of the Tuscan Region, Central Italy. *Journal of Medical Entomology*, 43(3), 574–579.
17. McGreevy, P. B., Theis, J. H., Lavoipierre, M. M. J., & Clark, J. (1974). Studies on filariasis. III. *Dirofilaria immitis*: Emergence of infective larvae from the mouthparts of *Aedes aegypti*. *Journal of Helminthology*, 48(4), 221–228.

18. Kume, S., & Itagaki, S. (1955). On the life-cycle of *Dirofilaria immitis* in the dog as the final host. *British Veterinary Journal*, 111(1), 16–24.
19. Lichtenfels, J. R., Pilitt, P. A., & Wergin, W. P. (1987). *Dirofilaria immitis*: Fine structure of cuticle during development in dogs. *Proceedings of the Helminthological Society of Washington*, 54(1), 133–140.
20. Orihel, T. (1961). Morphology of the larval stages of *Dirofilaria immitis* in the dog. *Journal of Parasitology*, 47, 251–262.
21. Rawlings, C. (1986). *Heartworm disease in dogs and cats*. Philadelphia: Saunders.
22. Ishihara, K., Kitagawa, H., Ojima, M., Yagata, Y., & Suganuma, Y. (1978). Clinicopathological studies on canine dirofilarial hemoglobinuria. *Japanese Journal of Veterinary Science*, 40(5), 525–537.
23. Genchi, C., Rinaldi, L., & Cringoli, G. (2007). *Dirofilaria immitis* and *D. repens* in dog and cat and human infections. *Mappe Parassitologiche*. Italy.
24. Maiti, S. (2022). Dirofilariasis. In S. C. Parija & A. Chaudhury (Eds.), *Textbook of Parasitic Zoonoses* (pp. 541–555). Singapore: Springer Nature Singapore.
25. Capelli, G., Genchi, C., Baneth, G., Bourdeau, P., Brianti, E., Cardoso, L., et al. (2018). Recent advances on *Dirofilaria repens* in dogs and humans in Europe. *Parasites & Vectors*, 11(1), 663.
26. Mircean, M., Ionică, A. M., Mircean, V., Györke, A., Codea, A. R., Tăbăran, F. A., et al. (2017). Clinical and pathological effects of *Dirofilaria repens* and *Dirofilaria immitis* in a dog with a natural co-infection. *Parasitology International*, 66(3), 331–334.
27. Bowman, D. D., & Atkins, C. E. (2009). Heartworm biology, treatment, and control. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 39(6), 1127–1158.
28. Dillon, A. R., Blagburn, B. L., Tillson, M., Brawner, W., Welles, B., Johnson, C., et al. (2017). Heartworm-associated respiratory disease (HARD)

induced by immature adult *Dirofilaria immitis* in cats. *Parasites & Vectors*, 10(S2), 514.

29. Bocková, E., Iglódyová, A., & Kočišová, A. (2015). Potential mosquito (Diptera: Culicidae) vector of *Dirofilaria repens* and *Dirofilaria immitis* in urban areas of Eastern Slovakia. *Parasitology Research*, 114(12), 4487–4492.

30. Aonuma, H., Yoshimura, A., Perera, N., Shinzawa, N., Bando, H., Oshiro, S., et al. (2009). Loop-mediated isothermal amplification applied to filarial parasites detection in the mosquito vectors: *Dirofilaria immitis* as a study model. *Parasites & Vectors*, 2(1), 15.

31. Шеремет В.П. (1998) Кровосисні комарі України: Навч. посібник для студентів біологічного факультету. К.: РВЦ Київський університет, 34с.

32. Czajka, C., Becker, N., Jöst, H., Poppert, S., Schmidt-Chanasit, J., Krüger, A., et al. (2014). Stable transmission of *Dirofilaria repens* nematodes, Northern Germany. *Emerging Infectious Diseases*, 20(2), 328–330.

33. Latrofa, M. S., Montarsi, F., Ciocchetta, S., Annoscia, G., Dantas-Torres, F., Ravagnan, S., et al. (2012). Molecular xenomonitoring of *Dirofilaria immitis* and *Dirofilaria repens* in mosquitoes from north-eastern Italy by real-time PCR coupled with melting curve analysis. *Parasites & Vectors*, 5(1), 76.

34. Zittra, C., Kocziha, Z., Pinnyei, S., Harl, J., Kieser, K., Laciny, A., et al. (2015). Screening blood-fed mosquitoes for the diagnosis of filarioid helminths and avian malaria. *Parasites & Vectors*, 8(1), 16.

35. Kemenesi, G., Kurucz, K., Kepner, A., Dallos, B., Oldal, M., Herczeg, R., et al. (2015). Circulation of *Dirofilaria repens*, *Setaria tundra*, and *Onchocercidae* species in Hungary during the period 2011–2013. *Veterinary Parasitology*, 214(1–2), 108–113.

36. Şuleşco, T., Von Thien, H., Toderaş, L., Toderaş, I., Lühken, R., & Tannich, E. (2016). Circulation of *Dirofilaria repens* and *Dirofilaria immitis* in Moldova. *Parasites & Vectors*, 9(1), 627.

37. Ionică, A. M., Zittra, C., Wimmer, V., Leitner, N., Votýpka, J., Modrý, D., et al. (2017). Mosquitoes in the Danube Delta: Searching for vectors of filarioid helminths and avian malaria. *Parasites & Vectors*, 10(1), 324.
38. Tahir, D., Bittar, F., Barré-Cardi, H., Sow, D., Dahmani, M., Mediannikov, O., et al. (2017). Molecular survey of *Dirofilaria immitis* and *Dirofilaria repens* by new real-time TaqMan® PCR assay in dogs and mosquitoes (Diptera: Culicidae) in Corsica (France). *Veterinary Parasitology*, 235, 1–7.
39. Jacsó, O., Mándoki, M., Majoros, G., Pétsch, M., Mortarino, M., Genchi, C., et al. (2009). First autochthonous *Dirofilaria immitis* (Leidy, 1856) infection in a dog in Hungary. *Helminthologia*, 46(3), 159–161.
40. 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.
41. Taylor, A. E. R. (1960). The development of *Dirofilaria immitis* in the mosquito *Aedes aegypti*. *Journal of Helminthology*, 34(1–2), 27–38.
42. Masny, A., Sałamatin, R., Rozej-Bielicka, W., & Golab, E. (2016). Is molecular xenomonitoring of mosquitoes for *Dirofilaria repens* suitable for dirofilariosis surveillance in endemic regions? *Parasitology Research*, 115(2), 511–525.
43. Ferreira, C. A. C., De Pinho Mixão, V., Novo, M. T. L. M., Calado, M. M. P., Gonçalves, L. A. P., Belo, S. M. D., et al. (2015). First molecular identification of mosquito vectors of *Dirofilaria immitis* in continental Portugal. *Parasites & Vectors*, 8(1), 139.
44. Erickson, S. M., Fischer, K., Weil, G. J., Christensen, B. M., & Fischer, P. U. (2009). Distribution of *Brugia malayi* larvae and DNA in vector and non-vector mosquitoes: Implications for molecular diagnostics. *Parasites & Vectors*, 2(1), 56.

45. Thanchomnang, T., Intapan, P. M., Tantrawatpan, C., Lulitanond, V., Chungpivat, S., Taweethavonsawat, P., et al. (2013). Rapid detection and identification of *Wuchereria bancrofti*, *Brugia malayi*, *B. pahangi*, and *Dirofilaria immitis* in mosquito vectors and blood samples by high-resolution melting real-time PCR. *Korean Journal of Parasitology*, 51(6), 645–650.

46. Sassnau, R., Kohn, M., Demeler, J., Kohn, B., Müller, E., Krücken, J., et al. (2013). Is *Dirofilaria repens* endemic in the Havelland District in Brandenburg, Germany? *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 13(12), 888–891.

47. 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(Suppl 1), 101–114.

48. Rossi, A., Peix, Á., Pavlikovskaya, T., Sagach, O., Nikolaenko, S., Chizh, N., et al. (2015). Genetic diversity of *Dirofilaria* spp. isolated from subcutaneous and ocular lesions of human patients in Ukraine. *Acta Tropica*, 142, 1–4.

49. Sałamatin, R., Pavlikovska, T., Sagach, O., Nikolayenko, S., Korniyushin, V., Kharchenko, V., et al. (2013). Human dirofilariasis due to *Dirofilaria repens* in Ukraine, an emergent zoonosis: Epidemiological report of 1465 cases. *Acta Parasitologica*, 58(4).

50. Farkas, R., Mag, V., Gyurkovszky, M., Takács, N., Vörös, K., & Solymosi, N. (2020). The current situation of canine dirofilariosis in Hungary. *Parasitology Research*, 119(1), 129–135.

51. Fuehrer, H. P., Auer, H., Leschnik, M., Silbermayr, K., Duscher, G., & Joachim, A. (2016). *Dirofilaria* in humans, dogs, and vectors in Austria (1978–2014) – From imported pathogens to the endemicity of *Dirofilaria repens*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 10(5), e0004547.

52. Overgaauw, P., & Van Dijk, E. (2009). Autochthonous case of *Dirofilaria repens* in a dog in the Netherlands. *Veterinary Record*, 164(5), 158.

53. Széll, Z., Bacsadi, Á., Szeredi, L., Nemes, C., Fézer, B., Bakcsa, E., et al. (2020). Rapid spread and emergence of heartworm resulting from climate and climate-driven ecological changes in Hungary. *Veterinary Parasitology*, 280, 109067.

54. Montoya-Alonso, J. A., Morchón, R., Falcón-Cordón, Y., Falcón-Cordón, S., Simón, F., & Carretón, E. (2017). Prevalence of heartworm in dogs and cats of Madrid, Spain. *Parasites & Vectors*, 10(1), 354.

55. Genchi, C., & Kramer, L. H. (2020). The prevalence of *Dirofilaria immitis* and *D. repens* in the Old World. *Veterinary Parasitology*, 280, 108995.

56. Ciuca, L., Caruso, V., Illiano, S., Bosco, A., Maurelli, M. P., & Rinaldi, L. (2023). Emerging risk of *Dirofilariaspp.* infection in shelter dogs in southern Italy. *Frontiers in Veterinary Science*, 10, 1112036.

57. 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), 68.

58. Torres-Chable, O., Baak-Baak, C., Cigarroa-Toledo, N., Blitvich, B., Brito-Argaez, L., Alvarado-Kantun, Y., et al. (2018). Molecular detection of *Dirofilaria immitis* in dogs and mosquitoes in Tabasco, Mexico. *Journal of Vector Borne Diseases*, 55(2), 151.

59. Panarese, R., Iatta, R., Mendoza-Roldan, J. A., Szlosek, D., Braff, J., Liu, J., et al. (2020). Comparison of diagnostic tools for the detection of *Dirofilaria immitis* infection in dogs. *Pathogens*, 9(6), 499.

60. Alsarraf, M., Levytska, V., Mierzejewska, E. J., Poliukhovych, V., Rodo, A., Alsarraf, M., et al. (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.

61. Miterpáková, M., Antolová, D., Rampalová, J., Undesser, M., Krajčovič, T., & Víchová, B. (2022). *Dirofilaria immitis* pulmonary dirofilariasis, Slovakia. *Emerging Infectious Diseases*, 28(2), 482–485.
62. Nahorna, L. V., & Negreba, J. V. (2022). Epizootological monitoring of dirofilariasis in dogs in Sumy region. *Scientific and Technical Bulletin of the State Scientific Research Control Institute of Veterinary Medicinal Products and Feed Additives and Institute of Animal Biology*, 23(1), 98–104.
63. Paliy, A. P., Sumakova, N. V., Pavlichenko, O. V., Paliy, A. P., Reshetylo, O. I., Kovalenko, L. M., et al. (2022). Monitoring of animal dirofilariosis incidence in Kharkiv Region of Ukraine. *Zoodiversity*, 56(2), 153–164.
64. Криворученко, Д. О. (2022). Біохімічні показники сироватки крові собак хворих на дирофіляріоз. *Вісник Полтавської Державної Аграрної Академії*, (1), 164–170.
65. Кручиненко, О. В. (2022). Поширення та діагностика дирофіляріозу собак у місті Полтава. *Вісник Полтавської Державної Аграрної Академії*, (3), 130–136.
66. Мушинський, А. Б., Карчевська, Т. М., Керничний, С. П., Савчук, Л. Б., & Бетлінська, Т. В. (2024). Паразитарні захворювання собак в умовах міської популяції. *Scientific Progress and Innovations*, 27(3), 100–104.
67. Medlock, J. M., Barrass, I., Kerrod, E., Taylor, M. A., & Leach, S. (2007). Analysis of climatic predictions for extrinsic incubation of *Dirofilaria* in the United Kingdom. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 7(1), 4–14.
68. Knight, D. H., & Lok, J. B. (1998). Seasonality of heartworm infection and implications for chemoprophylaxis. *Clinical Techniques in Small Animal Practice*, 13(2), 77–82.
69. Tasić-Otašević, S. A., Trenkić Božinović, M. S., Gabrielli, S. V., & Genchi, C. (2015). Canine and human *Dirofilaria* infections in the Balkan Peninsula. *Veterinary Parasitology*, 209(3–4), 151–156.

70. Morchón, R., Carretón, E., González-Miguel, J., & Mellado-Hernández, I. (2012). Heartworm disease (*Dirofilaria immitis*) and their vectors in Europe – New distribution trends. *Frontiers in Physiology*, 3.

71. Montarsi, F., Ciocchetta, S., Devine, G., Ravagnan, S., Mutinelli, F., Frangipane Di Regalbono, A., et al. (2015). Development of *Dirofilaria immitis* within the mosquito *Aedes (Finlaya) koreicus*, a new invasive species for Europe. *Parasites & Vectors*, 8(1), 177.

72. Silaghi, C., Beck, R., Capelli, G., Montarsi, F., & Mathis, A. (2017). Development of *Dirofilaria immitis* and *Dirofilaria repens* in *Aedes japonicus* and *Aedes geniculatus*. *Parasites & Vectors*, 10(1), 94.

73. Adebayo, O. O., Akande, F. A., & Adenubi, O. T. (2020). Canine dirofilariasis: A case report and review of the literature. *Folia Veterinaria*, 64(3), 75–81.

74. Bendas, A. J. R., Alberigi, B., Galardo, S., Labarthe, N., & Almeida, F. M. D. (2022). Clinical and blood count findings in dogs naturally infected with *Dirofilaria immitis*. *Brazilian Journal of Veterinary Medicine*, 44, e001922.

75. Kumar, A., Anjay, & Kumar, D. (2021). Haematological alterations during concurrent infection of *Dirofilaria immitis* and *Ancylostoma caninum* infections in dog and its therapeutic management: A case report. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 9(2), 185–186.

76. Grandi, G., Živičnjak, T., & Beck, R. (2007). Pathogenesis of *Dirofilaria* spp. infections. *Mappe Parassitologiche*, (8), 59–67.

77. Munnell, J. F., Weldon, J. S., Lewis, R. E., Thrall, D. E., & McCall, J. W. (1980). Intimal lesions of the pulmonary artery in dogs with experimental dirofilariasis. *American Journal of Veterinary Research*, 41(7), 1108–1112.

78. Schaub, R. G., Rawlings, C. A., & Keith, J. C. (1981). Platelet adhesion and myointimal proliferation in canine pulmonary arteries. *American Journal of Pathology*, 104(1), 13–22.

79. Ross, R. (1986). The pathogenesis of atherosclerosis – An update. *New England Journal of Medicine*, 314(8), 488–500.
80. Uchide, T., & Saida, K. (2005). Elevated endothelin-1 expression in dogs with heartworm disease. *Journal of Veterinary Medical Science*, 67(11), 1155–1161.
81. Wang, S., Zhang, N., Zhang, Z., Wang, D., Yao, Z., Zhang, H., et al. (2016). Prevalence of *Dirofilaria immitis* infection in dogs in Henan province, central China. *Parasite*, 23, 43.
82. Sironi, M., Bandi, C., Sacchi, L., Sacco, B. D., Damiani, G., & Genchi, C. (1995). Molecular evidence for a close relative of the arthropod endosymbiont *Wolbachia* in a filarial worm. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 74(2), 223–227.
83. Kramer, L., Simón, F., Tamarozzi, F., Genchi, M., & Bazzocchi, C. (2005). Is *Wolbachia* complicating the pathological effects of *Dirofilaria immitis* infections? *Veterinary Parasitology*, 133(2–3), 133–136.
84. Fenn, K., Conlon, C., Jones, M., Quail, M. A., Holroyd, N. E., Parkhill, J., et al. (2006). Phylogenetic relationships of the *Wolbachia* of nematodes and arthropods. *PLoS Pathogens*, 2(10), e94.
85. McGarry, H. F., Egerton, G. L., & Taylor, M. J. (2004). Population dynamics of *Wolbachia* bacterial endosymbionts in *Brugia malayi*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 135(1), 57–67.
86. Dillon, A. R., Warner, A. E., Brawner, W., Hudson, J., & Tillson, M. (2008). Activity of pulmonary intravascular macrophages in cats and dogs with and without adult *Dirofilaria immitis*. *Veterinary Parasitology*, 158(3), 171–176.
87. Atkins, C. E., & Litster, A. L. (2006). Heartworm disease. In J. R. August (Ed.), *Consultations in feline internal medicine* (5th ed., pp. 323–330). W.B. Saunders.

88. Venco, L., Genchi, M., Genchi, C., Gatti, D., & Kramer, L. (2011). Can heartworm prevalence in dogs be used as provisional data for assessing the prevalence of the infection in cats? *Veterinary Parasitology*, 176(4), 300–303.

89. Kitagawa, H., Ishihara, K., & Sasaki, Y. (1987). Canine dirofilarial hemoglobinuria: Changes in right heart hemodynamics and heartworm migration from pulmonary artery towards right atrium following β 1-blocker administration. *Japanese Journal of Veterinary Science*, 49(6), 1081–1086.

90. 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), 481.

91. Borthakur, S. K., Ali, M. A., & Patra, G. (2011). Clinical, hematological and biochemical studies in dirofilariosis in dog. *Journal of Veterinary Parasitology*, 25(1), 63–66.

92. Aththanayaka, A. M. M. T. B., Dayananda, B. S. W. M. T. B., Ranasinghe, H. A. K., & Amarasinghe, L. D. (2024). Evolution of dirofilariasis diagnostic techniques from traditional morphological analysis to molecular-based techniques: A comprehensive review. *Frontiers in Parasitology*, 3, 1427449.

93. Maerz, I. (2020). Clinical and diagnostic imaging findings in 37 rescued dogs with heartworm disease in Germany. *Veterinary Parasitology*, 283, 109156.

94. Magnis, J., Lorentz, S., Guardone, L., Grimm, F., Magi, M., Naucke, T. J., et al. (2013). 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(1), 48.

95. Genchi, C., Kramer, L. H., & Rivasi, F. (2011). Dirofilarial infections in Europe. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 11(10), 1307–1317.

96. Chalifoux, L., & Hunt, R. D. (1971). Histochemical differentiation of *Dirofilaria immitis* and *Dipetalonema reconditum*. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 158(5), 601–605.

97. 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.

98. 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.

99. Erawan, I. G. M. K., Tjahajati, I., Nurcahyo, W., & Asmara, W. (2015). Excretory-secretory antigens of male and female heartworms (*Dirofilaria immitis*) which potentially as a diagnostic marker. *Journal of the Indonesian Tropical Animal Agriculture*, 16(4), 463–467.

100. Naghipour, 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.

101. Кисилиця В., Кладницька Л., Сорока Н., Величко С., Донцова О., Величко В. (2020). Порівняльна характеристика методів дослідження собак за дирофіляріозу. *Вісник Сумського Національного Аграрного Університету. Серія: Ветеринарна Медицина*, (3 (50)), 44–53.

102. Yevstafieva, V., Melnychuk, V., Prykhodko, Yu., & Kryvoruchenko, D. (2023). Comparative efficiency of identification methods of *Dirofilaria immitis* nematodes. *Bulletin of Veterinary Biotechnology*, (42), 15–22.

103. Bamorovat, M., Sharifi, I., Fasihi Harandi, M., Nasibi, S., Sadeghi, B., Khedri, J., et al. (2017). Parasitological, serological and molecular study of *Dirofilaria immitis* in domestic dogs, southeastern Iran. *Iranian Journal of Parasitology*, 12(2), 260–266.

104. Nelson, T., McCall, J., Jones, S., & Moerhead, A. (2020). Current canine guidelines for the prevention, diagnosis, and management of heartworm (*Dirofilaria immitis*) infection in dogs. *American Heartworm Society*. Retrieved from https://d3ft8sckhnqim2.cloudfront.net/images/pdf/2018_AHS_Canine_Guidelines_rev_7-25-19.pdf?1564157216

105. Simsek, S., & Ciftci, A. T. (2016). Serological and molecular detection of *Dirofilaria* species in stray dogs and investigation of *Wolbachia* DNA by PCR in Turkey. *Journal of Arthropod-Borne Diseases*, 10(4), 445–453.

106. Pietrzak, D., Łuczak, J. W., & Wiśniewski, M. (2024). Detecting *Dirofilaria immitis*: Current practices and novel diagnostic methods. *Pathogens*, 13(11), 950.

107. Gioia, G., Lecová, L., Genchi, M., Ferri, E., Genchi, C., & Mortarino, M. (2010). Highly sensitive multiplex PCR for simultaneous detection and discrimination of *Dirofilaria immitis* and *Dirofilaria repens* in canine peripheral blood. *Veterinary Parasitology*, 172(1–2), 160–163.

108. Yevstafieva, V., Kryvoruchenko, D., Melnychuk, V., Nikiforova, O., Kone, M., & Barabolia, O. (2022). Efficacy of ultrasound in diagnosis of dirofilariasis in dogs caused by *Dirofilaria immitis*. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*, 13(3), 281–286.

109. *Parasitology in veterinary medicine*. (2016). Wageningen: Wageningen Academic Publishers.

110. Peribáñez, M. A., Lucientes, J., Arce, S., Morales, M., Castillo, J. A., & Gracia, M. J. (2001). Histochemical differentiation of *Dirofilaria immitis*, *Dirofilaria repens* and *Acanthocheilonema dracunculoides* microfilariae by staining with a commercial kit, Leucognost-SP®. *Veterinary Parasitology*, 102(1–2), 173–175.

111. Little, S. E., Munzing, C., Heise, S. R., Allen, K. E., Starkey, L. A., Johnson, E. M., et al. (2014). Pre-treatment with heat facilitates detection of

antigen of *Dirofilaria immitis* in canine samples. *Veterinary Parasitology*, 203(1–2), 250–252.

112. Mancuso, C. (2013). *Dirofilaria repens* eyepiece: a case in Calabria and diagnostic indications concerning dirofilariosis. *Microbiologia Medica*, 28(1).

113. Becker, Z., Holló, N., Farkas, R., Gyurkovszky, M., Reiczigel, J., Olaszy, K., et al. (2022). Serodiagnostic difficulties and possibilities of heartworm disease in regions where both *Dirofilaria immitis* and *Dirofilaria repens* infections occur. *Acta Veterinaria Hungarica*, 70(2), 92–99.

114. Favia, G., Tringali, R., & Cancrini, G. (1997). Molecular diagnosis of human dirofilariosis. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 91(8), 961–962.

115. Khanmohammadi, M., Falak, R., Meamar, A. R., Razmjou, E., Mokhtarian, K., Arshadi, M., et al. (2019). Application of *Dirofilaria immitis* immunoreactive proteins in serodiagnosis. *Parasite Immunology*, 41(1), e12598.

116. Zhang, Y. (2022). The understanding of heartworm disease: Diagnosis and treatments. In *American Institute of Physics Conference Series* (Vol. 2589, No. 1, Article 020010). American Institute of Physics.

117. Laidoudi, Y., Medkour, H., Tahir, D., Dahmana, H., Marié, J. L., Varloud, M., et al. (2021). Field evaluation of preventive efficacy of monthly multimodal prophylactic treatment (Milbactor® and Vectra® 3D) against *Dirofilaria* spp. in dogs. *Parasitologia*, 1(3), 130–136.

118. Білоконь, С. В. (2017). *Основи біоетики та біобезпеки: навчальний посібник*. Одеса: Одеський національний університет ім. І. І. Мечникова.

119. Council of Europe. (1986). *European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes*. Strasbourg.

120. Yilmaz, E., Fritzenwanker, M., Pantchev, N., Lendner, M., Wongkamchai, S., Otranto, D., et al. (2016). The mitochondrial genomes of the zoonotic canine filarial parasites *Dirofilaria (Nochtiella) repens* and *Candidatus Dirofilaria (Nochtiella) honkongensis* provide evidence for presence of cryptic species. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 10(10), e0005028.

121. 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), 183.

122. Suzuki, J., Kobayashi, S., Okata, U., Matsuzaki, H., Mori, M., Chen, K. R., et al. (2015). Molecular analysis of *Dirofilaria repens* removed from a subcutaneous nodule in a Japanese woman after a tour to Europe. *Parasite*, 22, 2.

123. Bandelt, H. J., Forster, P., & Rohl, A. (1999). Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 16(1), 37–48.

124. Tamura, K., Stecher, G., & Kumar, S. (2021). MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 11. *Molecular Biology and Evolution*, 38(7), 3022–3027.

125. Bonnet, S., Jouglin, M., L’Hostis, M., & Chauvin, A. (2007). *Babesia* sp. EU1 from roe deer and transmission within *Ixodes ricinus*. *Emerging Infectious Diseases*, 13(8), 1208–1210.

126. Tołkacz, K., Bednarska, M., Alsarraf, M., Dwużnik, D., Grzybek, M., Welc-Falęciak, R., et al. (2017). Prevalence, genetic identity and vertical transmission of *Babesia microti* in three naturally infected species of vole, *Microtus* spp. (Cricetidae). *Parasites & Vectors*, 10(1), 66.

127. Wodecka, B., Rymaszewska, A., Sawczuk, M., & Skotarczak, B. (2009). Detectability of tick-borne agents DNA in the blood of dogs undergoing treatment for borreliosis. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 16(1), 9–14.

128. Kowalec, M., Szewczyk, T., Welc-Falęciak, R., Siński, E., Karbowiak, G., & Bajer, A. (2017). Ticks and the city – Are there any differences between city parks and natural forests in terms of tick abundance and prevalence of spirochaetes? *Parasites & Vectors*, 10(1), 573.

129. Bajer, A., Mierzejewska, E. J., Rodo, A., Bednarska, M., Kowalec, M., & Welc-Falęciak, R. (2014). The risk of vector-borne infections in sled dogs associated with existing and new endemic areas in Poland. *Veterinary Parasitology*, 202(3–4), 276–286.

130. Dwużnik-Szarek, D., Mierzejewska, E. J., Rodo, A., Goździk, K., Behnke-Borowczyk, J., & Kiewra, D., et al. (2021). Monitoring the expansion of *Dermacentor reticulatus* and occurrence of canine babesiosis in Poland in 2016–2018. *Parasites & Vectors*, 14(1), 267.

131. Becker, N., Petric, D., Zgomba, M., Boase, C., Madon, M., Dahl, C. H., & Kaiser, A. (2010). *Mosquitoes and their control* (2nd ed.). Springer, Heidelberg.

132. Rishniw, M., Barr, S. C., Simpson, K. W., Frongillo, M. F., Franz, M., & Dominguez Alpizar, J. L. (2006). Discrimination between six species of canine microfilariae by a single polymerase chain reaction. *Veterinary Parasitology*, 135(3–4), 303–314.

133. Knott, J. (1939). A method for making microfilarial surveys on day blood. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 33(2), 191–196.

134. Томчишина, Н., & Коваленко, С. (1998). *Кам'янець-Подільський район (1923—1998 рр.): Інформаційний довідник*. Кам'янець-Подільський.

135. Jie, T. J., Hamdan, R. H., Okene, I. A. A., Roslan, N. S., Hashim, N. A., Ibrahim, F., et al. (2024). Asymptomatic canine vector-borne diseases and diagnostic performance: Comparison between blood smears vs. conventional PCR. *Journal of Tropical Resources and Sustainable Science*, 12(1), 12–18.

136. Wichianchot, S., Hongsrirachan, N., Maneeruttanarungroj, C., Pinlaor, S., Iamrod, K., Purisarn, A., et al. (2022). A newly developed droplet digital PCR for *Ehrlichia canis* detection: Comparisons to conventional PCR and blood smear techniques. *Journal of Veterinary Medical Science*, 84(6), 831–840.

137. Vasconcelos, E. J. R., Roy, C., Geiger, J. A., Oney, K. M., Koo, M., Ren, S., et al. (2021). Data analysis workflow for the detection of canine vector-borne pathogens using 16S rRNA Next-Generation Sequencing. *BMC Veterinary Research*, 17(1), 262.

138. Oney, K., Koo, M., Roy, C., Ren, S., Quorollo, B., Juhasz, N. B., et al. (2021). Evaluation of a commercial microbial enrichment kit used prior to DNA extraction to improve the molecular detection of vector-borne pathogens from naturally infected dogs. *Journal of Microbiological Methods*, 188, 106163.

139. Дахно, Ю. (2013). *Дирофіліріоз собак (поширення, діагностика та заходи боротьби)* [Автореферат]. Київ: Національний університет біоресурсів і природокористування України.

140. Radzijeuskaja, J., Tamoliūnaitė, D., Sabūnas, V., Aleksandravičienė, A., & Paulauskas, A. (2020). Prevalence and co-infection of mosquito- and tick-borne pathogens in domestic dogs suspected for canine babesiosis in Lithuania. *Biologija*, 66(2).

141. Vichová, B., Miterpáková, M., & Iglódyová, A. (2014). Molecular detection of co-infections with *Anaplasma phagocytophilum* and/or *Babesia canis canis* in *Dirofilaria*-positive dogs from Slovakia. *Veterinary Parasitology*, 203(1–2), 167–172.

142. Sonnberger, B. W., Graf, B., Straubinger, R. K., Rackl, D., Obwaller, A. G., Peschke, R., et al. (2021). Vector-borne pathogens in clinically healthy military working dogs in eastern Austria. *Parasitology International*, 84, 102410.

143. Bajer, A., Beck, A., Beck, R., Behnke, J. M., Dwużnik-Szarek, D., Eichenberger, R. M., et al. (2022). Babesiosis in Southeastern, Central and

Northeastern Europe: An emerging and re-emerging tick-borne disease of humans and animals. *Microorganisms*, 10(5), 945.

144. Levytska, V. A., Mushinsky, A. B., Zubrikova, D., Blanarova, L., Długosz, E., Vichova, B., et al. (2021). Detection of pathogens in ixodid ticks collected from animals and vegetation in five regions of Ukraine. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 12(1), 101586.

145. Rogovskyy, A., Batool, M., Gillis, D. C., Holman, P. J., Nebogatkin, I. V., Rogovska, Y. V., et al. (2018). Diversity of *Borrelia* spirochetes and other zoonotic agents in ticks from Kyiv, Ukraine. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 9(2), 404–409.

146. Hrazdilová, K., Myśliwy, I., Hildebrand, J., Buńkowska-Gawlik, K., Janaczyk, B., Perec-Matysiak, A., et al. (2019). Paralogs vs. genotypes? Variability of *Babesia canis* assessed by 18S rDNA and two mitochondrial markers. *Veterinary Parasitology*, 266, 103–110.

147. Bajer, A., Kowalec, M., Levytska, V., Mierzejewska, E. J., Alsarraf, M., Poliukhovych, V., et al. (2022). Tick-borne pathogens, *Babesia* spp. and *Borrelia burgdorferi* s.l., in sled and companion dogs from Central and North-Eastern Europe. *Pathogens*, 11(5), 499–499.

148. Semenko, O. V., Galat, M. V., Shcherbak, O. V., Galat, V. F., & Shulga, I. V. (2017). Peculiarities of dog babesiosis distribution in Kyiv City. *Vestnik Zoologii*, 51(6), 493–498.

149. Varloud, M., Liebenberg, J., & Fourie, J. J. (2018). Early *Babesia canis* transmission in dogs within 24 h and 8 h of infestation with infected pre-activated male *Dermacentor reticulatus* ticks. *Parasites & Vectors*, 11(1), 41–41.

150. Мокрий, Ю., & Ксьонз, І. (2017). Епізоотологічний моніторинг бабезійної інвазії серед собак у Полтаві. *Науковий вісник Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій імені С. З. Гжицького*, 19(73), 149–153.

151. Little, S., Braff, J., Place, J., Buch, J., Dewage, B. G., Knupp, A., et al. (2021). Canine infection with *Dirofilaria immitis*, *Borrelia burgdorferi*, *Anaplasma* spp., and *Ehrlichia* spp. in the United States, 2013–2019. *Parasites & Vectors*, 14(1), 10.

152. Meyers, A. C., Auckland, L., Meyers, H. F., Rodriguez, C. A., Kontowicz, E., Petersen, C. A., et al. (2021). Epidemiology of vector-borne pathogens among U.S. government working dogs. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 21(5), 358–368.

153. Krämer, F., Schaper, R., Schunack, B., Połozowski, A., Piekarska, J., Szwedko, A., et al. (2014). Serological detection of *Anaplasma phagocytophilum*, *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Ehrlichia canis* antibodies and *Dirofilaria immitis* antigen in a countrywide survey in dogs in Poland. *Parasitology Research*, 113(9), 3229–3239.

154. Dewage, B. G., Little, S., Payton, M., Beall, M., Braff, J., Szlosek, D., et al. (2019). Trends in canine seroprevalence to *Borrelia burgdorferi* and *Anaplasma* spp. in the eastern USA, 2010–2017. *Parasites & Vectors*, 12(1), 476.

155. Evason, M., Stull, J. W., Pearl, D. L., Peregrine, A. S., Jardine, C., Buch, J. S., et al. (2019). Prevalence of *Borrelia burgdorferi*, *Anaplasma* spp., *Ehrlichia* spp. and *Dirofilaria immitis* in Canadian dogs, 2008 to 2015: A repeat cross-sectional study. *Parasites & Vectors*, 12(1), 64.

156. Preyß-Jägeler, C., Hartmann, K., & Dorsch, R. (2020). Changes in renal parameters and their association with subclinical vector-borne infections in Bernese Mountain dogs. *BMC Veterinary Research*, 16(1), 285.

157. Manev, I. (2020). Serological survey of vector-borne pathogens in stray dogs from Sofia area, Bulgaria. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports*, 21, 100441.

158. Dziegiel, B., Adaszek, Ł., Carbonero, A., Łyp, P., Winiarczyk, M., Dębiak, P., et al. (2016). Detection of canine vector-borne diseases in eastern Poland by ELISA and PCR. *Parasitology Research*, 115(3), 1039–1044.

159. Skotarczak, B., Wodecka, B., Rymaszewska, A., Sawczuk, M., Maciejewska, A., Adamska, M., et al. (2005). Prevalence of DNA and antibodies to *Borrelia burgdorferi* sensu lato in dogs suspected of borreliosis. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 12(2), 199–205.

160. Zygmier, W., Górski, P., & Wędrychowicz, H. (2009). Detection of the DNA of *Borrelia afzelii*, *Anaplasma phagocytophilum* and *Babesia canis* in blood samples from dogs in Warsaw. *Veterinary Record*, 164(15), 465–467.

161. Alsarraf, M., Baneth, G., Bogucka-Kocka, A., Ciuca, L., Dwużnik-Szarek, D., Fuehrer, H. P., et al. (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, 109882.

162. Mallawarachchi, C. H., Chandrasena, N. T. G. A., Wickramasinghe, S., Premaratna, R., Gunawardane, N. Y. I. S., Mallawarachchi, N. S. M. S. M., et al. (2018). A preliminary survey of filarial parasites in dogs and cats in Sri Lanka. *PLOS ONE*, 13(11), e0206633.

163. Otranto, D., Iatta, R., Baneth, G., Cavalera, M. A., Bianco, A., Parisi, A., et al. (2019). High prevalence of vector-borne pathogens in domestic and wild carnivores in Iraq. *Acta Tropica*, 197, 105058.

164. Melbarde-Gorkusa, I., Abolins, A., Strumfa, I., Martinsons, A., & Gardovskis, J. (2011). Human dirofilariasis in Latvia – The first case in surgical practice. *Acta Chirurgica Latviensis*, 11(1), 172–174.

165. Sabūnas, V., Radzijeuskaja, J., Sakalauskas, P., Petkevičius, S., Karvelienė, B., Žiliukienė, J., et al. (2019). *Dirofilaria repens* in dogs and humans in Lithuania. *Parasites & Vectors*, 12(1), 177.

166. Macchioni, F., Sed, G., & Cecchi, F. (2020). Canine filarial infections in an area of Central Italy (Tuscany-Latium border) historically free from the disease. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports*, 20, 100404.

167. Velasquez, L., Blagburn, B. L., Duncan-Decoq, R., Johnson, E. M., Allen, K. E., & Meinkoth, J., et al. (2014). Increased prevalence of *Dirofilaria immitis* antigen in canine samples after heat treatment. *Veterinary Parasitology*, 206(1–2), 67–70.

168. Ionică, A. M., Matei, I. A., Mircean, V., Dumitrache, M. O., D'Amico, G., Györke, A., et al. (2015). Current surveys on the prevalence and distribution of *Dirofilaria* spp. and *Acanthocheilonema reconditum* infections in dogs in Romania. *Parasitology Research*, 114(3), 975–982.

169. 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.

170. 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), 258.

171. Gillis, J. M., Smith, R. D., & Todd, K. S. (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.

172. 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.

173. 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.

174. Kesici, H., Deger, Y., Oguz, B., & Özdek, U. (2022). The serum total and lipid-bound sialic acid with hematological-biochemical parameter levels in dogs with dirofilariosis. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society*, 73(1), 3589–3596.

175. Slobodyanik, R., Zykova, S., Belova, L., & Kryazhev, A. (2020). Blood morphology in dogs with dirofilariosis. *Veterinary Medicine*, 210.

176. Edana, G. G., Preena, P., Balan, C., et al. (2023). Hematological characteristics of autochthonous hypermicrofilaremic dirofilariosis in dogs in Kannur District of Kerala (Version 1) [Preprint]. *Research Square*.

177. Bezerra, L. S., Lima, G. R. F., Araújo, V. M. J. de, Teixeira, G. G., Coelho, J. M. A., Farzat, F. de A., et al. (2021). Perfil epidemiológico, hematológico e bioquímico em cães com *Dirofilaria* sp. no Ceará. *Research, Society and Development*, 10(8).

178. Larsson, M. H. M. A., Iwasaki, M., Fernandes Filho, A., D’Errico, A. A., Ogassawara, S., & Dutra, L. F. (1987). Contribuição do diagnóstico clínico da dirofilariose canina. *Revista da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo*, 24(1), 47.

179. Rath, P. K., Panda, S. K., Mishra, B. P., Patra, R. C., & Nath, I. (2014). Thoracic radiography and oxidative stress indices in heartworm affected dogs. *Veterinary World*, 7(9), 689–692.

180. Tudor, N., Ionita, L., Tăpăloagă, D., Tudor, P.G., Ioniță, C., & Vlăgioiu, C. (2014). Radiographic cardiopulmonary changes in dogs with heartworm disease.

181. Ninomiya, H., & Wakao, Y. (2002). Scanning electron microscopy of vascular corrosion casts and histologic examination of pulmonary microvasculature in dogs with dirofilariosis. *American Journal of Veterinary Research*, 63(11), 1538–1544.

182. Carlisle, C. H. (1980). Canine dirofilariasis: Its radiographic appearance. *Veterinary Radiology*, 21(3), 123–130.

183. Maxwell, E., Ryan, K., Reynolds, C., & Pariaut, R. (2014). Outcome of a heartworm treatment protocol in dogs presenting to Louisiana State University from 2008 to 2011: 50 cases. *Veterinary Parasitology*, 206(1–2), 71–77.

184. Genchi, M., Vismarra, A., Lucchetti, C., Viglietti, A., Crosara, S., Gnudi, G., et al. (2019). Efficacy of imidacloprid 10%/moxidectin 2.5% spot-on (Advocate®, Advantage Multi®) and doxycycline for the treatment of natural *Dirofilaria immitis* infections in dogs. *Veterinary Parasitology*, 273, 11–16.

185. Bagi, F., Vörös, K., & Túri, Á. (2017). Preliminary experiences of the diagnosis and complex treatment of canine heartworm diseases: 38 cases. *Magyar Állatorvosok Lapja*, 139(4), 203–213.

186. Fok, É., Jacsó, O., Szebeni, Z., Györffy, A., Sükösd, L., Lukács, Z., et al. (2010). Elimination of *Dirofilaria* (syn. *Noctiella*) *repens* microfilariae in dogs with monthly treatments of moxidectin 2.5%/imidacloprid 10% (Advocate®, Bayer) spot-on. *Parasitology Research*, 106(5), 1141–1149.

187. Yoon, W. K., Choi, R., Lee, S. G., & Hyun, C. (2013). Comparison of 2 retrieval devices for heartworm removal in 52 dogs with heavy worm burden. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 27(3), 469–473.

188. Ceribasi, A., & Simsek, S. (2012). Histopathologic effects of *Dirofilaria immitis* microfilaria on internal organs of dog confirming by PCR technique. *Iranian Journal of Parasitology*, 7(2), 103–107.

189. Jacobson, L. S., & DiGangi, B. A. (2021). An accessible alternative to melarsomine: “Moxi-Doxy” for treatment of adult heartworm infection in dogs. *Frontiers in Veterinary Science*, 8, 702018.

190. Schulz, B. S., Hupfauer, S., Ammer, H., Sauter-Louis, C., & Hartmann, K. (2011). Suspected side effects of doxycycline use in dogs – A retrospective study of 386 cases. *Veterinary Record*, 169(9), 229–229.

191. Hettlich, B. F., Ryan, K., Bergman, R. L., Marks, S. L., Lewis, B. C., Bahr, A., et al. (2003). Neurologic complications after melarsomine dihydrochloride treatment for *Dirofilaria immitis* in three dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 223(10), 1456–1461.

192. Moore, S. A., Mariani, C. L., Van Wettere, A., & Borst, L. B. (2013). Chronic compressive myelopathy and progressive neurologic signs associated with melarsomine dihydrochloride administration in a dog. *Journal of the American Animal Hospital Association*, 49(6), 389–393.

193. Vörös, K., Becker, Z., Kónya, R., Arany-Tóth, A., & Farkas, R. (2022). Application of moxidectin and ultrasound-aided injection of melarsomine during the American Heartworm Society recommended treatment protocol in *Dirofilaria immitis*-infected dogs. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 22(7), 382–390.

194. Ames, M. K., & Atkins, C. E. (2020). Treatment of dogs with severe heartworm disease. *Veterinary Parasitology*, 283, 109131.

195. Budde, J. A., McCluskey, D. M., & Plumb, D. C. (Eds.). (2023). *Plumb's veterinary drug handbook* (10th ed.). Tulsa, OK: Educational Concepts, LLC, dba VetMedux.

196. Hoch, H., & Strickland, K. (2008). Canine and feline dirofilariasis: Prophylaxis, treatment, and complications of treatment. *Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian*, 30(3), 146–151.

Додатки

Додаток А

СПИСОК ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Статті у закордонних виданнях, проіндексованих у базах даних Web of Science Core Collection та/або Scopus:

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 *D. repens* in sled dog kennels from the Baltic countries. *Scientific reports*, 11(1), 1068. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-80208-1> (здобувач виконав систематизацію епізоотичних та епідеміологічних даних, провів молекулярні дослідження, математичну, статистичну обробку даних, узагальнення результатів, підготував матеріали до друку)
2. Bajer, A., Kowalec, M., Levytska, V. A., Mierzejewska, E. J., Alsarraf, M., **Poliukhovych, V.**, Rodo, A., Wężyk, D., & Dwuznik-Szarek, D. (2022). Tick-Borne Pathogens, *Babesia* spp. and *Borrelia burgdorferi* s.l., in Sled and Companion Dogs from Central and North-Eastern Europe. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, 11(5), 499. <https://doi.org/10.3390/pathogens11050499> (здобувач провів збір матеріалу для досліджень, молекулярно-генетичні дослідження, аналіз та узагальнення даних, підготував матеріали до друку)

Статті у наукових фахових виданнях України:

3. **Полюхович В. І.** (2024). Ксеномоніторингові дослідження комарів за дирофіліріозу. *Вісник Сумського національного аграрного університету. Серія: Ветеринарна медицина*, (1(64), 53-57.

<https://doi.org/10.32782/bsnau.vet.2024.1.8> (здобувач провів польові дослідження зі збору комарів, ідентифікував їхню родову та видову приналежність, визначив та порівняв індекси заселення різних біотопів, проаналізував та підготував матеріали до друку)

4. Левицька В. А., **Полюхович В. І.** (2024). Оцінка ефективності досліджень на антиген у діагностиці дирофіляріозу собак. *Scientific Progress & Innovations*, 27(4), 171–175. <https://doi.org/10.31210/spi2024.27.04.29> (здобувач провів порівняння серологічних методів дослідження у діагностиці захворювання, проаналізував дані і підготував матеріали до друку)
5. Левицька В. А., **Полюхович В. І.** (2024). Оцінка ефективності та безпечності терапевтичних схем лікування за дирофіляріозу у собак. *НВ ЛНУ ветеринарної медицини та біотехнологій. Серія: Ветеринарні науки*, 26(116), 101-108. <https://doi.org/10.32718/nvlvet11615> (здобувач проаналізував особливості прояву захворювання у собак, приймав участь у встановленні діагнозу і лікуванні, науково обґрунтував результати, підготував матеріали до друку).

Матеріали і тези наукових конференцій та інші наукові видання, які додатково відображають наукові результати дисертації:

6. Левицька В., Альсараф М., Мушинський А., **Полюхович В.**, Байєр А. Моніторинг і контроль дирофіляріозу собак в Україні. *Міжнародний симпозіум зі зменшення біологічної загрози (IBTRS)*, 29 травня – 2 червня 2021 року, Київ, 2021. (здобувач виконав науково-теоретичний аналіз сучасних підходів до моніторингу та контролю дирофіляріозу собак в Україні, підготував матеріали до друку).

7. **Полюхович В.І.,** Левицька В.А. Діагностика і лікування дирофіляріозу собак. *Матеріали VIII Міжнародної наукової конференції студентської та учнівської молоді «Стан та перспективи виробництва, переробки і використання продукції тваринництва»*, 23 листопада 2021 року, Кам'янець-Подільський, 2021. (здобувач приймав участь у проведенні досліджень з діагностики та лікування дирофіляріозу собак, підготував матеріали до друку).
8. **Полюхович В.І.,** Левицька В.А. Ксеномоніторинг комарів як інструмент для виявлення *Dirofilaria spp* в Україні. *Збірник матеріалів Міжнародної науково-практичної конференції «Зміна клімату та її наслідки для тваринництва і ветеринарної медицини: наукові підходи та інноваційні рішення»*, 10-11 жовтня 2024 року, Одеса: ІКОСГ НААН, 2024. (здобувач виконав дослідження щодо використання ксеномоніторингу комарів для виявлення *Dirofilaria spp* в Україні, проаналізував та узагальнив отримані результати, підготував матеріали до друку).

Додаток Б

Секвеновані нуклеотидні послідовності *Babesia canis*

>OM362460.2 *Babesia canis* isolate 61 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence
 TGGAATGATGGTGACCCAAACCCTCACCAGAGTAGCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCA
 GCAGCCGCGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTAACTTGTTGCAGTTAAAAAGCTC
 GTAGTTGTATTTTTGCGTTGACGGTTTGACCATTGGTTGGTTATTCGTTTTCGCTTTT
 GGGAATTTCCCTTTTTACTTTGAGAAAATTAGAGTGTTTCAAGCAGACTTTTGTCTTGAA
 TACTTCAGCATGGAATAATAGAGTAGGACTTTGGTTCTATTTTGTGGTTATTGAACCTT
 AGTAATGGTTAATAGGAACGGTTGGGGGCATTTCGTATTTAACTGTCAGAGGTGAAATTCT
 TAGATTTGTTAAAGACGAACTACTGCGAAAGCATTTGCCAAGGACGTTTCCATTAATCAA
 GAACGAAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCAGATACCGTCGTAGTCCTAACCATAAACTAT
 GCCGA

>OM362459.1 *Babesia canis* isolate 136 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence
 TGGAATGATGGTGACCCAAACCCTCACCAGAGTAGCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCA
 GCAGCCGCGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTAACTTGTTGCAGTTAAAAAGCTC
 GTAGTTGTATTTTTGCGTTAGCGGTTTGACCATTGGTTGGTTATTCGTTTTCGCTTTT
 GGGAATTTCCCTTTTTACTTTGAGAAAATTAGAGTGTTTCAAGCAGACTTTTGTCTTGAA
 TACTTCAGCATGGAATAATAGAGTAGGACTTTGGTTCTATTTTGTGGTTATTGAACCTT
 AGTAATGGTTAATAGGAACGGTTGGGGGCATTTCGTATTTAACTGTCAGAGGTGAAATTCT
 TAGATTTGTTAAAGACGAACTACTGCGAAAGCATTTGCCAAGGACGTTTCCATTAATCAA
 GAACGAAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCAGATACCGTCGTAGTCCTAACCATAAACTAT
 GCCGA

>OM362458.1 *Babesia canis* isolate 137 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence
 TGGAATGATGGTGACCCAAACCCTCACCAGAGTAGCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCA
 GCAGCCGCGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTAACTTGTTGCAGTTAAAAAGCTC
 GTAGTTGTATTTTTGCGTTAGCGGTTTGACCATTGGTTGGTTATTCGTTTTCGCTTTT
 GGGAATTTCCCTTTTTACTTTGAGAAAATTAGAGTGTTTCAAGCAGACTTTTGTCTTGAA
 TACTTCAGCATGGAATAATAGAGTAGGACTTTGGTTCTATTTTGTGGTTATTGAACCTT
 AGTAATGGTTAATAGGAACGGTTGGGGGCATTTCGTATTTAACTGTCAGAGGTGAAATTCT
 TAGATTTGTTAAAGACGAACTACTGCGAAAGCATTTGCCAAGGACGTTTCCATTAATCAA
 GAACGAAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCAGATACCGTCGTAGTCCTAACCATAAACTAT
 GCCGA

>KF381412.1 *Babesia canis canis* isolate 5KO 18S ribosomal RNA gene, partial sequence
 TTGTCTTGTAATTGGAATGATGGTGACCCAAACCCTCACCAGAGTAGCAATTGGAGGGCA
 AGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTAACTTGTTGCA
 GTTAAAAAGCTCGTAGTTGTATTTTTGCGTTGACGGTTTGACCATTGGTTGGTTATTTT
 GTTTTCGCTTTTGGGAATTTCCCTTTTTACTTTGAGAAAATTAGAGTGTTTCAAGCAGAC
 TTTTGTCTTGAATACTTCAGCATGGAATAATAGAGTAGGACTTTGGTTCTATTTTGTGG
 TTATTGAACCTTAGTAATGGTTAATAGGAACGGTTGGGGGCATTTCGTATTTAACTGTCAG
 AGGTGAAATCTTAGATTTGTTAAAGACGAACTACTGCGAAAGCATTTGCCAAGGACGTT
 TCCATTAATCAAGAACGAAAGTA

>MT346585.1 *Babesia canis canis* isolate 10Bl small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence
 TTGTCTTGTAATTGGAATGATGGTGACCCAAACCCTCACCAGAGTAGCAATTGGAGGGCA
 AGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTAACTTGTTGCA
 GTTAAAAAGCTCGTAGTTGTATTTTTGCGTTGACGGTTTGACCATTGGTTGGTTATTTT
 GTTTTCGCTTTTGGGAATTTCCCTTTTTACTTTGAGAAAATTAGAGTGTTTCAAGCAGAC
 TTTTGTCTTGAATACTTCAGCATGGAATAATAGAGTAGGACTTTGGTTCTATTTTGTGG
 TTAT

>MT346584.1 *Babesia canis canis* isolate 12DR4F small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence
 ACCAGAGTAGCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCCAGCTCCAA
 TAGCGTATATTAACTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGTATTTTTGCGTTAGCGGT
 TTGACCATTGGTTGGTTATTCGTTTTCGCTTTTGGGAATTTCCCTTTTTACTTTGAGA
 AAATTAGAGTGTTTCAAGCAGACTTTTGTCTTGAATACTTCAGCATGGAATAATAGAGTA
 GGACTTTGGTTCTATTTTGTGGTTATTGAACCTTAGTAATGGTTAATAGGAACGGTTG
 GGCATAA

>MT346583.1 *Babesia canis canis* isolate 7DR5F small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence
 ACCAGAGTAGCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCCAGCTCCAA

TAGCGTATATTAACTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGTATTTTTGCGTTAGCGGT
TTGACCATTTGGTTGGTTATTTTCGTTTTTCGCTTTTGGGAATTTCCCTTTTTACTTTGAGA
AAATTAGAGTGTTTCAAGCAGACTTTTGTCTTGAATACTTCAGCATGGAATAATAGAGTA
GGACTTTGGTTCTATTTTGTGTTATTGAACCTTAGTAATGGTTAATAGGAACGGTTGG
GGGCATAA

>MT346582.1 *Babesia canis canis* isolate 7DR1F small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence
ACCAGAGTAGCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCCAGCTCCAA
TAGCGTATATTAACTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGTATTTTTGCGTTTRACGGT
TTGACCATTTGGTTGGTTATTTTCGTTTTTCGCTTTTGGGAATTTCCCTTTTTACTTTGAGA
AAATTAGAGTGTTTCAAGCAGACTTTTGTCTTGAATACTTCAGCATGGAATAATAGAGTA
GGACTTTGGTTCTATTTTGTGTTATTGAACCTTAGTAATGGTTAATAGGAACGGTTGG
GGGCATAA

Додаток В

Акт

впровадження результатів завершених наукових досліджень

1. **Назва впровадження:** удосконалення діагностики та лікування за дирофіляріозу собак.
2. **Підрозділ установи-розробника:** кафедра інфекційних та інвазійних хвороб ЗВО «Подільський державний університет».
3. **Назва організації, де проведено впровадження:** ветеринарна клініка Вет Сервіс, м. Дубно
4. **Рік впровадження:** 2024 рік.
5. **Коротка характеристика впровадження:**
У межах впровадження було застосовано:
Оптимізацію серологічної діагностики дирофіляріозу шляхом використання термічної обробки сироватки крові собак перед проведенням тестування з використанням імунохроматографічних (ІХА) тест-систем.
Удосконалений протокол лікування дирофіляріозу шляхом триразового введення меларсоміну за схемою 60-90-91 день, що сприяє підвищенню ефективності терапії.
6. **Відповідальний за впровадження:**

Від розробника

Василь ПОЛЮХОВИЧ, аспірант кафедри
інфекційних та інвазійних хвороб, ЗВО «ПДУ»

Від ветеринарної клініки

Олександр ХОМИЧ, ветеринарний лікар,
директор ветеринарної клініки Вет Сервіс

«19» вересня 2024 р.




Додаток Г

Акт

впровадження результатів завершених наукових досліджень

1. **Назва впровадження:** удосконалення діагностики та лікування за дирофіляріозу собак.
2. **Підрозділ установи-розробника:** кафедра інфекційних та інвазійних хвороб ЗВО «Подільський державний університет».
3. **Назва організації, де проведено впровадження:** ветеринарна клініка X-Vet, м.Рівне
4. **Рік впровадження:** 2024 рік.
5. **Коротка характеристика впровадження:**
У межах впровадження було застосовано:
Оптимізацію серологічної діагностики дирофіляріозу шляхом використання термічної обробки сироватки крові собак перед проведенням тестування з використанням імунохроматографічних (ІХА) тест-систем.
Удосконалений протокол лікування дирофіляріозу шляхом триразового введення меларсоміну за схемою 60-90-91 день, що сприяє підвищенню ефективності терапії.
6. **Відповідальний за впровадження:**

Від розробника

Василь ПОЛЮХОВИЧ, аспірант кафедри
інфекційних та інвазійних хвороб, ЗВО «ПДУ»



Від ветеринарної клініки

Юлія ХОМИЧ, ветеринарний лікар,
директор ветеринарної клініки X-Vet



«20» вересня 2024 р.

Додаток Д

Акт

впровадження результатів завершених наукових досліджень

1. **Назва впровадження:** удосконалення діагностики та лікування за дирофіляріозу собак.
2. **Підрозділ установи-розробника:** кафедра інфекційних та інвазійних хвороб ЗВО «Подільський державний університет».
3. **Назва організації, де проведено впровадження:** ветеринарна клініка «Фауна-Сервіс», м. Кам'янець-Подільський.
4. **Рік впровадження:** 2024 рік.
5. **Коротка характеристика впровадження:**
У межах впровадження було застосовано:
Оптимізацію серологічної діагностики дирофіляріозу шляхом використання термічної обробки сироватки крові собак перед проведенням тестування з використанням імунохроматографічних (ІХА) тест-систем.
Удосконалений протокол лікування дирофіляріозу шляхом триразового введення меларсоміну за схемою 60-90-91 день, що сприяє підвищенню ефективності терапії.
6. **Відповідальний за впровадження:**

Від розробника

Василь ПОЛЮХОВИЧ, аспірант кафедри
інфекційних та інвазійних хвороб
ЗВО «ПДУ»



Від ветеринарної клініки

Олена СИНІШИНА, ветеринарний лікар
«Фауна-Сервіс»



« 29 » жовтня 2024 р.

Додаток Ж

Акт

впровадження результатів завершених наукових досліджень

1. Назва впровадження: удосконалення діагностики та лікування за дирофіліarioзу собак.
2. Підрозділ установи-розробника: кафедра інфекційних та інвазійних хвороб ЗВО «Подільський державний університет».
3. Назва організації, де проведено впровадження: ветеринарна клініка «ЛікоВеТ», м. Ужгород.
4. Рік впровадження: 2024 рік.
5. Коротка характеристика впровадження: використання термічної обробки сироватки крові собак перед серологічним дослідженням (ІХА тест-системами) на дирофіліarioз; триразове введення меларсоміну (60-90-91 день) за лікування дирофіліarioзу.
6. Відповідальний за впровадження:

Від розробника

Василь ПОЛЮХОВИЧ, аспірант кафедри
інфекційних та інвазійних хвороб
ЗВО «ПДУ»



Від ветеринарної клініки

Оксана БРИГАДІНА, ветеринарний лікар
«ЛікоВеТ»



« 20 » листопада 2024 р.

Додаток И

Акт

впровадження результатів завершених наукових досліджень

1. Назва впровадження: удосконалення діагностики та лікування за дирофіляріозу собак.
2. Підрозділ установи-розробника: кафедра інфекційних та інвазійних хвороб ЗВО «Подільський державний університет».
3. Назва організації, де проведено впровадження: ветеринарна клініка Кіт-Барбос, м. Київ
4. Рік впровадження: 2024 рік.

5. Коротка характеристика впровадження:

У межах впровадження було застосовано:

Оптимізацію серологічної діагностики дирофіляріозу шляхом використання термічної обробки сироватки крові собак перед проведенням тестування з використанням імунохроматографічних (ІХА) тест-систем.

Удосконалений протокол лікування дирофіляріозу шляхом триразового введення меларсоміну за схемою 60-90-91 день, що сприяє підвищенню ефективності терапії.

6. Відповідальний за впровадження:

Від розробника

Василь ПОЛЮХОВИЧ, аспірант кафедри
інфекційних та інвазійних хвороб, ЗВО «ПДУ»

Від ветеринарної клініки

Набока Оксана, ветеринарний лікар,
директор ветеринарної клініки Кіт-Барбос

«16» січня 2025 р.



Додаток К

Акт
впровадження результатів завершених наукових досліджень

1. **Назва впровадження:** удосконалення діагностики та лікування за дирофіляріозу собак.
2. **Підрозділ установи-розробника:** кафедра інфекційних та інвазійних хвороб ЗВО «Подільський державний університет».
3. **Назва організації, де проведено впровадження:** ветеринарний центр Vet House, м.Вінниця
4. **Рік впровадження:** 2024 рік.
5. **Коротка характеристика впровадження:**
У межах впровадження було застосовано:
Оптимізацію серологічної діагностики дирофіляріозу шляхом використання термічної обробки сироватки крові собак перед проведенням тестування з використанням імунохроматографічних (ІХА) тест-систем.
Удосконалений протокол лікування дирофіляріозу шляхом триразового введення меларсоміну за схемою 60-90-91 день, що сприяє підвищенню ефективності терапії.
6. **Відповідальний за впровадження:**

Від розробника

Василь ПОЛЛОХОВИЧ, аспірант кафедри
інфекційних та інвазійних хвороб, ЗВО «ПДУ»



Від ветеринарної клініки

Володимир Біленький, ветеринарний лікар,
директор ветеринарного центру Vet House



«4» грудня 2024 р.