

УДК 636.7:616.99:576:595.132.5

DOI: 10.31073/vet\_biotech42-02

ЄВСТАФ'ЄВА В.О.<sup>1, 2</sup>, д-р вет. наук, проф., e-mail: evstva@ukr.net,

МЕЛЬНИЧУК В.В.<sup>1, 2</sup>, канд. вет. наук, доц., e-mail: melnychuk86@ukr.net,

ПРИХОДЬКО Ю.О.<sup>2</sup>, д-р вет. наук, проф., член-кор. НААН, e-mail: parasitdad@gmail.com,

КРИВОРУЧЕНКО Д.О.\*<sup>1</sup>, e-mail: denys.kryvoruchenko@gmail.com

<sup>1</sup>Полтавський державний аграрний університет

<sup>2</sup>Інститут ветеринарної медицини НААН

## ПОРІВНЯЛЬНА ЕФЕКТИВНІСТЬ СПОСОБІВ ПРОВЕДЕННЯ ІДЕНТИФІКАЦІЇ НЕМАТОД *DIROFILARIA IMMITIS*

Проведеними паразитологічними дослідженнями встановлено високу ефективність запропонованого способу фарбування нематод *Dirofilaria immitis*, який дозволяє отримати високий ступінь забарвлення та видимості їх морфологічних структур. Спосіб із застосуванням як барвника розчину Люголя перевищував ступінь видимості нематод за мікроскопічного дослідження порівняно із відомими методами із застосуванням 1 %-го спиртового розчину діамантового зеленого та без додавання барвника. Запропонований спосіб призводив до високого ступеня видимості 7 із 9 морфологічних показників у самців та всіх досліджених показників у самок дирофілярій.

Отримані дані дозволяють рекомендувати запропонований спосіб фарбування нематод *D. immitis* з метою підвищення точності їх ідентифікації.

**Ключові слова:** дирофіляріоз, собаки, *Dirofilaria immitis*, нематоди, ідентифікація, ефективність

**Вступ.** Згідно з літературними даними та результатами досліджень багатьох авторів, дирофіляріоз собак, викликаний видом *Dirofilaria immitis* (Nematoda, Onchocercidae), є найбільш патогенним і поширеним у світі. Його небезпечність підтверджується високою летальністю інвазованих тварин, низькими результатами у їх лікуванні та специфічним циклом розвитку паразита, де зараження відбувається через укуси кровосисних комах – комарів [1–3].

Через вплив на здоров'я та добробут тварин-компаньйонів дирофіляріоз має величезне ветеринарне та економічне значення, особливо в Північній Америці, Європі, Азії та Австралії [4–7]. У собак інвазія викликається молодими і дорослими нематодами, що призводять до серцево-легеневої патології, а також мікрофіляріями, що циркулюють у кровоносному руслі

\* Аспірант, науковий керівник – д-р вет. наук В.О. Євстаф'єва

тварин. Дирофілярії виду *D. immitis* можуть інвазувати котів, де захворювання, переважно, протікає важче. У хазяїна цього виду лише невелика кількість незрілих або дорослих дирофілярій можуть викликати загибель тварин. Причому дорослі нематоди, виявлені від котів, морфологічно бувають коротші, а мікрофілярії циркулюють в крові нетривалий час [8–11].

Відповідно до наукових даних розповсюдження дирофіляріозу серед м'ясоїдних тварин поступово зростає в усьому світі, головним чином, через зміни клімату та освоєння нових територій комарами-переносниками мікрофілярій, таких як *Ae. albopictus*, *Ae. koreicus* тощо [12, 13].

Більшість науковців доводять необхідність ідентифікації *D. immitis* з використанням визначення основних та додаткових морфологічних структур як у самок, так і у самців паразитів [14, 15]. Зокрема, було описано декілька нових анатомічних варіацій *D. immitis*, де дослідники обстежили нематод цього виду, виділених з леопардів і пінгвінів у японському зоопарку. Вони повідомили про наявність тонких поздовжніх кутикулярних валиків по всій довжині тіла, які були виявлені за допомогою звичайної світлової мікроскопії [16]. Тому, актуальним є визначення ефективності загальновідомих та нових способів проведення ідентифікації *D. immitis*, що дозволить підвищити інформативність та точність проведення діагностики дирофіляріозу.

**Метою роботи** було встановити ефективність запропонованого та загальновідомих способів проведення ідентифікації нематод *Dirofilaria immitis*, виділених від собак.

**Матеріали і методи досліджень.** Роботу виконували впродовж 2022–2023 рр. на базі лабораторії паразитології Полтавського державного аграрного університету. З метою встановлення ефективності способів проведення ідентифікації дирофілярій було здійснено підготовку нематод *D. immitis* за трьома різними методиками по 5 екземплярів гельмінтів (5 самців і 5 самок), а саме:

1) спосіб I – запропонований спосіб ідентифікації *D. immitis* із застосуванням як барвника розчину Люголя;

2) спосіб II – просвітлення нематод *D. immitis* із застосуванням лактофенолу [17];

3) спосіб III – ідентифікація нематод *D. immitis* із застосуванням як барвника 1 % спиртового розчину діамантового зеленого [18].

Визначали ступінь видимості та забарвлення: кутикули головного кінця, нервового кільця, стравоходу, ділянки переходу стравоходу в кишківник; у самців – спікул, хвостових сосочків, орнаментацию кутикули в ділянці хвоста; у самок – ділянки вульви та петель матки.

Ступінь забарвлення морфологічних структур тіла нематоди *D. immitis* визначали шляхом перегляду препаратів під мікроскопом за збільшення  $\times 100$ ,  $\times 400$ . Ступінь видимості морфологічних структур тіла нематод умовно поділили на: слабкий, середній, високий.

**Результати досліджень та обговорення.** Проведеними дослідженнями встановлено, що запропонований спосіб ідентифікації *D. immitis* із застосуванням як барвника розчину Люголя (спосіб I) проявив високий ступінь видимості 7 із 9 морфологічних показників у самців (табл. 1).

Зокрема, запропонований спосіб проявив високий ступінь просвітлення у самців головного кінця, стравоходу, ділянки переходу стравоходу в кишківник, хвостового кінця (рис. 1 а) довгої спікули (рис. 2 а), хвостових сосочків (рис. 3 а), орнаментатії кутикули в ділянці хвоста. Середній ступінь видимості відзначали під час дослідження нервового кільця та короткої спікули дирофілярій.

Таблиця 1

**Ступінь видимості морфологічних структур тіла самців нематод *Dirofilaria immitis***

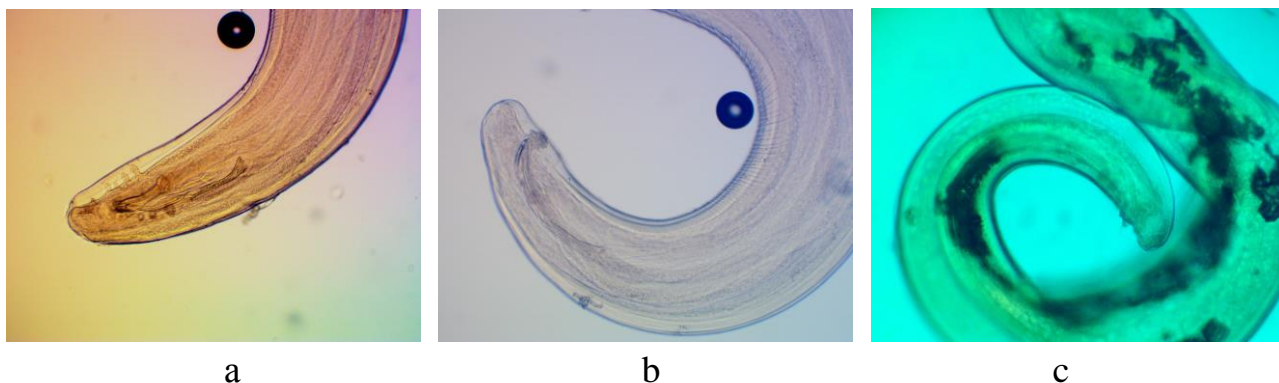
Морфологічні структури нематоди	Способи проведення ідентифікації		
	I	II	III
Кутикула головного кінця	***	**	**
Нервове кільце	**	•	*
Стравохід	***	*	*
Ділянка переходу стравоходу в кишківник	***	*	*
Хвостовий кінець	***	**	**
Спікули:			
– довга	***	**	*
– коротка	**	*	*
Хвостові сосочки	***	*	*
Орнаментатія кутикули в ділянці хвостового кінця	***	*	**

**Примітка:** ступінь видимості – \* – слабкий; \*\* – середній; \*\*\* – високий; • – не візуалізується.

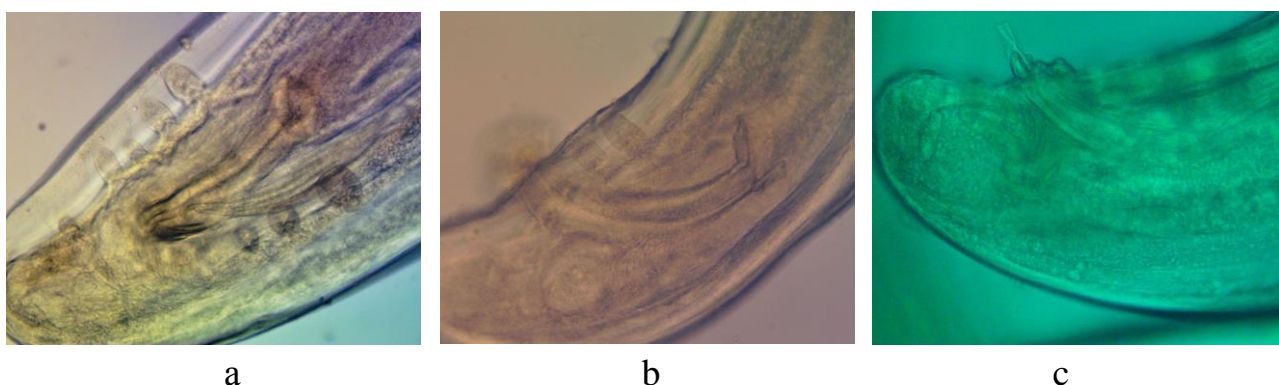
Водночас за використання способу II (із застосуванням лактофенолу) кутикула головного кінця, хвостовий кінець (рис. 1 b), довга спікула (рис. 2 b) мали середній ступінь видимості. Стравохід, ділянка переходу стравоходу в кишківник, коротка спікула (рис. 2 b), хвостові сосочки (рис. 3 b) та орнаментатія кутикули в ділянці хвоста мали слабкий ступінь видимості. Саме тоді нервове кільце за використання цього способу не візуалізувалося.

Під час проведення ідентифікації нематод *D. immitis* із застосуванням як барвника 1 % спиртового розчину діамантового зеленого (спосіб III) кутикула

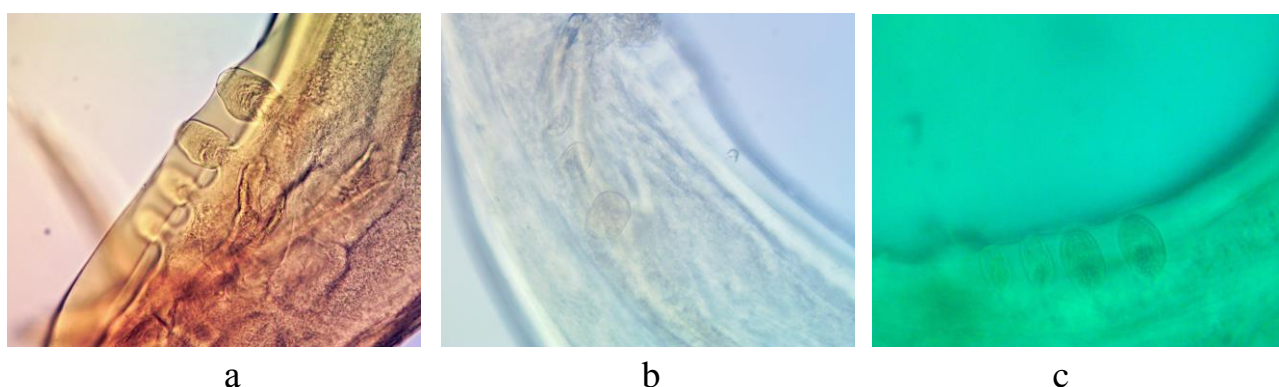
головного кінця хвостовий кінець (рис. 1 с) та орнаментация кутикули в ділянці хвоста мали середній ступінь видимості. Нервове кільце, стравохід, ділянка переходу стравоходу в кишківник, спікули (рис. 3 б) та хвостові сосочки (рис. 3 с) мали слабкий ступінь видимості.



**Рис. 1.** Ступінь видимості хвостового кінця у самців нематод *D. immitis* за використання: а – способу I, б – способу II, с – способу III (× 100)



**Рис. 2.** Ступінь видимості спікул у самців нематод *D. immitis* за використання: а – способу I, б – способу II, с – способу III (× 400)



**Рис. 3.** Ступінь видимості хвостових сосочків у самців нематод *D. immitis* за використання: а – способу I, б – способу II, с – способу III (× 400)

У разі застосування запропонованого способу ідентифікації *D. immitis* (спосіб I) всі досліджені морфологічні показники у самок дирофілярій мали високий ступінь видимості (табл. 2).

Таблиця 2

**Ступінь видимості морфологічних структур тіла самок нематод  
*Dirofilaria immitis***

Морфологічні структури нематоди	Способи проведення ідентифікації		
	I	II	III
Кутикула головного кінця	***	**	**
Нервове кільце	***	•	•
Стравохід	***	**	**
Ділянка переходу стравоходу в кишківник	***	*	**
Хвостовий кінець	***	**	**
Ділянка вульви	***	•	*
Петлі матки	***	•	*

**Примітка:** ступінь видимості – \* – слабкий; \*\* – середній; \*\*\* – високий; • – не візуалізується.

Просвітлення дирофілярій за способом II мав середній ступінь видимості кутикули головного кінця, стравоходу, хвостового кінця та слабкий ступінь видимості ділянки переходу стравоходу в кишківник. Водночас нервове кільце, ділянка вульви та петлі матки за мікроскопії не візуалізувалися.

За використання способу III у самок дирофілярій кутикула головного кінця, стравохід, ділянка переходу стравоходу в кишківник та хвостовий кінець мали середній ступінь видимості, а ділянка вульви та петлі матки – слабкий ступінь видимості. Мікроскопічно не візуалізували нервове кільце.

Аналізуючи отримані дані, можна зазначити, що висока ефективність запропонованого способу фарбування нематод *D. immitis* підтверджена проведеними нами раніше дослідженнями. Застосовуючи цей спосіб при ідентифікації дирофілярій у самців, ми додатково запропонували визначати 11 показників, які характеризують розміри спікул та розташування ануса. Водночас у самок додатково запропоновано визначати 7 показників, які характеризують місце розташування вульви, ануса та ширину тіла у цих ділянках [14].

Отримані дані дозволяють рекомендувати запропонований спосіб фарбування нематод *D. immitis* з метою підвищення точності їх ідентифікації.

**Висновки та перспективи подальших досліджень:**

1. Спосіб ідентифікації *D. immitis* із застосуванням як барвника розчину Люголя перевищував ефективність загальновідомих способів просвітлення та фарбування нематод.

2. Запропонований спосіб фарбування нематод *Dirofilaria immitis* забезпечує високий ступінь видимості кутикули головного кінця, стравоходу, ділянки переходу стравоходу в кишківник, у самців – довгої спікули, хвостових сосочків, орнаментацию кутикули в ділянці хвоста, у самок – нервового кільця, ділянки вульви та петель матки.

Отримані нами результати щодо застосування та ефективності запропонованого способу фарбування нематод *D. immitis* будуть використані у наступних випробуваннях для підвищення ефективності способів ідентифікації нематод виду *Dirofilaria repens*.

**COMPARATIVE EFFICIENCY OF IDENTIFICATION METHODS OF DIROFILARIA IMMITIS NEMATODES** / Yevstafieva V., Melnychuk V., Prykhodko Yu., Kryvoruchenko D.

**Introduction.** Due to its impact on the health and welfare of companion animals, dirofilariasis is of great veterinary and economic importance in many countries around the world. In dogs, the invasion is caused by young and adult nematodes, which lead to cardiopulmonary pathology, as well as microfilaries circulating in the bloodstream of animals. Most scientists prove the need to identify *D. immitis* using the definition of the main and additional morphological structures in both female and male parasites.

**The goal of the work** was to establish the effectiveness of the proposed and commonly known methods of identification of *Dirofilaria immitis* nematodes isolated from dogs.

**Materials and methods.** The work was performed on the basis of the Laboratory of Parasitology of the Poltava State Agrarian University. In order to establish the effectiveness of the dirofilariasis identification methods, the preparation of *D. immitis* nematodes was carried out using three different methods: Lugol's solution; lactophenol; 1% alcohol solution of diamond green. The degree of visibility of the morphological structures of the nematode body is conventionally divided into: weak, medium, high.

**Results of research and discussion.** The conducted parasitological studies established the high efficiency of the proposed method of staining nematodes *D. immitis*, which allows obtaining a high degree of staining of their morphological structures. The method with the use of Lugol's solution as a dye exceeded the degree of visibility of nematodes under microscopic examination compared to known methods with the use of a 1 % alcohol solution of diamond green and without the addition of a dye. The proposed method led to a high degree of visibility of 6 out of 8 morphological indicators in males and all investigated indicators in female dirofilariasis.

**Conclusions and prospects for further research:**

1. The method of identification of *D. immitis* with the use of Lugol's solution as a dye exceeded the efficiency of the well-known methods of illumination and staining of nematodes.

2. The proposed method of staining nematodes *Dirofilaria immitis* provides a high degree of visibility of the cuticle of the head end, the esophagus, the section of the passage of the esophagus into the intestine, in males – the long spicule, tail papillae, ornamentation of the cuticle in the tail area, in females – the nerve ring, the vulva and uterine loops.

*The results obtained by us regarding the application and efficiency of the proposed method of staining nematodes D. immitis will be used in the following tests to improve the efficiency of methods of identification of nematodes of the species Dirofilaria repens.*

**Keywords:** dirofilariasis, dogs, Dirofilaria immitis, nematodes, identification, efficiency.

#### REFERENCES

1. Genchi, C., & Kramer, L.H. (2020). The prevalence of Dirofilaria immitis and *D. repens* in the Old World. *Veterinary Parasitology*, 280, 108995. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2019.108995>
2. Maerz, I. (2020). Clinical and diagnostic imaging findings in 37 rescued dogs with heartworm disease in Germany. *Veterinary Parasitology*, 283, 109156. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2020.109156>.
3. Romano, A.E., Saunders, A.B., Gordon, S.G., & Wesselowski, S. (2021). Intracardiac heartworms in dogs: Clinical and echocardiographic characteristics in 72 cases (2010-2019). *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 35(1), 88-97. <https://doi.org/10.1111/jvim.15985>
4. Kunathasan Chelliah, M., & Šlapeta, J. (2019). The prevalence and trends of canine heartworm (*Dirofilaria immitis*) in Kuala Lumpur, Malaysia (1970-2018). *Veterinary Parasitology, Regional Studies and Reports*, 16, 100272. <https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2019.100272>.
5. Panayotova-Pencheva, M., Šnábel, V., Dakova, V., Čabanová, V., Cavallero, S., Trifonova, A., Mirchev, R., Hurníková, Z., Vasilková, Z., & Miterpáková, M. (2020). Dirofilaria immitis in Bulgaria: the first genetic baseline data and an overview of the Current Status. *Helminthologia*, 57(3), 211-218. <https://doi.org/10.2478/helm-2020-0026>.
6. Noack, S., Harrington, J., Carithers, D.S., Kaminsky, R., & Selzer, P.M. (2021). Heartworm disease – overview, intervention, and industry perspective. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 16, 65-89. <https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2021.03.004>.
7. Adagra, C., Squires, R., Adagra, A., Elliman, J., & Constantinoiu, C. (2021). Prevalence of infection with *Dirofilaria immitis* in cats in Townsville, Australia. *Veterinary Parasitology, Regional Studies and Reports*, 24, 100580. <https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2021.100580>.
8. Ames, M.K., & Atkins, C.E. (2020). Treatment of dogs with severe heartworm disease. *Veterinary Parasitology*, 283, 109131. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2020.109131>.
9. Selzer, P.M., & Epe, C. (2021). Antiparasitics in animal health: quo vadis? *Trends in Parasitology*, 37(1), 77-89. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2020.09.004>.
10. Grillini, M., Frangipane di Regalbono, A., Tessarin, C., Beraldo, P., Cassini, R., Marchiori, E., & Simonato, G. (2022). Evidence of *Dirofilaria immitis* in felids in North-Eastern Italy. *Pathogens*, 11(10), 1216. <https://doi.org/10.3390/pathogens11101216>.
11. Lemos, N.M.O., Alberigi, B., Labarthe, N., Knacfuss, F.B., Baldani, C. D., & da Silva, M. F. A. (2022). How does *Dirofilaria immitis* infection impact the health of dogs referred to cardiology care. *Brazilian Journal of Veterinary Medicine*, 44, e002622. <https://doi.org/10.29374/2527-2179.bjvm002622>.
12. Todorovic, S., & McKay, T. (2020). Potential mosquito (Diptera: Culicidae) vectors of *Dirofilaria immitis* from residential entryways in Northeast Arkansas. *Veterinary Parasitology*, 282, 109105. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2020.109105>.
13. Kurucz, K., Kiss, V., Zana, B., Jakab, F., & Kemenesi, G. (2018). Filarial nematode (order: Spirurida) surveillance in urban habitats, in the city of Pécs (Hungary). *Parasitology Research*, 117(10), 3355-3360. <https://doi.org/10.1007/s00436-018-6066-5>.

14. Kryvoruchenko. D., Prykhodko. Y., Mazannyi, O., Titarenko, O., Reva, I., & Sherstiuk, L. (2021). Differential diagnosis of *Dirofilaria immitis* nematodes (Nematoda, Onchocercidae). *Regulatory Mechanisms in Biosystems*, 12(4), 642-648. <https://doi.org/10.15421/022188>.
15. Khodabakhsh, M., Malmasi, A., Mohebali, M., Zarei, Z., Kia, E.B., & Azarm, A. (2016). Feline dirofilariosis due to *Dirofilaria immitis* in Meshkin Shahr District, Northwestern Iran. *Iranian Journal of Parasitology*, 11(2), 269-273.
16. Murata, K., Yanai, T., Agatsuma, T., & Uni, S. (2003). *Dirofilaria immitis* infection of a snow leopard (*Uncia uncia*) in a Japanese zoo with mitochondrial DNA analysis. *Journal of Veterinary Medical Science*, 65(8), 945-947. <https://doi.org/10.1292/jvms.65.945>.
17. Capstick, C.K. (1956). Lactophenol preparations for soil nematodes. *Nature*, 177(4515), 896-897. <https://doi.org/10.1038/177896b0>.
18. Shemet, O.S. (2013). Differential diagnosis strogylatosis of horses in the farms of Poltava region. *Agrarian Bulletin of the Black Sea Littoria*, 68, 323-327 [in Ukrainian].