



**UNIwersYTET
MIKOŁAJA KOPERNIKA
W TORUNIU**

Collegium Medicum
im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy

Bydgoszcz rok 2023



UNIwersytet
MIKOŁAJA KOPERNIKA
W TORUNIU
Wydział Lekarski
Collegium Medicum w Bydgoszczy

Małgorzata Smoguła

**Prewalencja chorób wywoływanych przez pierwotniaki pasożytnicze
oraz wpływ wybranych czynników na ich przeżywalność
i wykrywanie na przykładzie *Giardia intestinalis* i *Toxoplasma gondii***

Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu

Promotor:

dr hab. n. med. Celestyna Miła-Kierzenkowska, prof. UMK

Bydgoszcz rok 2023

Składam serdeczne podziękowania

Pani dr hab. n. med. Celestynie Mila-Kierzenkowskiej, prof. UMK
za nieocenioną pomoc w prowadzeniu badań i publikacji uzyskanych
wyników oraz opracowaniu niniejszej pracy.

SPIS TREŚCI

WYKAZ SKRÓTÓW	6
I. WSTĘP	7
1. <i>Giardia intestinalis</i>	7
1.1. Rys historyczny	7
1.2. Epidemiologia	8
1.3. Charakterystyka	8
1.4. Formy rozwojowe	9
1.5. Cykl rozwojowy	10
1.6. Giardioza	11
1.7. Diagnostyka	12
1.8. Leczenie	14
2. <i>Toxoplasma gondii</i>	14
2.1. Rys historyczny	14
2.2. Epidemiologia	15
2.3. Charakterystyka	16
2.4. Formy rozwojowe	16
2.5. Cykl rozwojowy	18
2.6. Toksoplazmoza	19
2.7. Diagnostyka	21
2.8. Leczenie	22
II. CEL PRACY	24
III. CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA	25
1. ETAP 1	25
2. ETAP 2	25
3. ETAP 3	26

4. ETAP 4	27
5. ETAP 5	28
IV. OMÓWIENIE WYNIKÓW	29
WYKAZ PUBLIKACJI	31
PUBLIKACJA 1	32
PUBLIKACJA 2	41
PUBLIKACJA 3	51
PUBLIKACJA 4	58
V. PODSUMOWANIE I WNIOSKI	73
VI. STRESZCZENIE.....	74
VII. ABSTRACT.....	77
VIII. PIŚMIENNICTWO.....	80
SPIS TABEL	86
SPIS RYCIN	87
ZAŁĄCZNIK NR 1. OŚWIADCZENIA WSPÓŁAUTORÓW	88
ZAŁĄCZNIK NR 2. ZGODA KOMISJI BIOETYCZNEJ	92

WYKAZ SKRÓTÓW

AIDS	zespół nabytego upośledzenia odporności (ang. acquired immunodeficiency syndrome)
CDC	Amerykańskie Centrum Kontroli i Zapobiegania Chorób (ang. Centers for Disease Control and Prevention)
DPDx	strona internetowa Wydziału CDC ds. Chorób Pasożytniczych i Malarii (ang. website of CDC's Division of Parasitic Diseases and Malaria)
ELFA	test enzymoimmunofluorescencyjny (ang. enzyme-linked fluorescent assay)
ELISA	test immunoenzymatyczny (ang. enzyme-linked immunosorbent assay)
FDA	Agencja Żywności i Leków (ang. Food and Drug Administration)
GDH	dehydrogenaza glutaminianowa (EC 1.4.1.2-4; ang. glutamate dehydrogenase)
HIV	ludzki wirus upośledzenia odporności (ang. human immunodeficiency virus)
IFN-γ	interferon gamma (ang. interferon gamma)
IgA	immunoglobulina A (ang. immunoglobulin A)
IgE	immunoglobulina E (ang. immunoglobulin E)
IgG	immunoglobulina G (ang. immunoglobulin G)
IgM	immunoglobulina M (ang. immunoglobulin M)
IL-1	interleukina 1 (ang. interleukin 1)
IL-12	interleukina 1 (ang. interleukin 12)
IL-18	interleukina 1 (ang. interleukin 18)
IL-2	interleukina 2 (ang. interleukin 2)
LAMP	izotermiczna metoda amplifikacji materiału genetycznego (ang. loop-mediated isothermal amplification)
PCR	łańcuchowa reakcja polimerazy (ang. polymerase chain reaction)
qPCR	ilościowa łańcuchowa reakcja polimerazy, PCR w czasie rzeczywistym (ang. quantitative polymerase chain reaction, real-time PCR)
SFDT	test barwnikowy Sabina-Feldmana (ang. The Sabin-Feldman Dye Test)
SSU	mała podjednostka (ang. small subunit)
TNF-α	czynnik martwicy nowotworu α (ang. tumor necrosis factor alpha)
TPI	izomeraza triozofosforanowa (EC 5.3.1.1; ang. triose phosphate isomerase)
WHO	Światowa Organizacja Zdrowia (ang. World Health Organization)

I. WSTĘP

Giardioza i toksoplazmoza to choroby wywoływane przez pasożytnicze pierwotniaki. Należą one do jednych z najbardziej rozpowszechnionych zarażeń pasożytniczych na świecie, powodujących miliony zachorowań i zgonów rocznie. W przeszłości wiele z tych zarażeń było związanych głównie z obszarami tropikalnymi lub subtropikalnymi. Obecnie jednak zmiany klimatu i ekologii wektorów, znaczny wzrost popularności podróży międzynarodowych, konflikty zbrojne czy migracje ludzi i zwierząt wpłynęły na rozprzestrzenianie się niektórych chorób pasożytniczych w krajach rozwiniętych [1]. *Giardia intestinalis* i *Toxoplasma gondii* wraz z *Cryptosporidium* spp. to najczęstsze pierwotniaki przenoszone drogą pokarmową przez zanieczyszczoną żywność [2].

1. *Giardia intestinalis*

1.1. Rys historyczny

Pierwotniak *Giardia* został po raz pierwszy zidentyfikowany przez Antona van Leeuwenhoek'a w 1681 roku. Opisując swoje odkrycia w liście do Towarzystwa Królewskiego w Londynie, van Leeuwenhoek zwrócił uwagę na możliwy związek między chorobą jelit a zidentyfikowanym przez siebie organizmem. Pomimo tej obserwacji, pierwotniak był uważany za niepatogennego komensala przez prawie 300 lat. Jeszcze w latach pięćdziesiątych XX wieku badania nad przenoszeniem *Giardia* sugerowały, że organizm ten nie jest patogenny [3]. Pasożyt jelitowy został później dokładniej opisany przez czeskiego lekarza Viléma Dušana Lambła (1859), który nazwał go *Cercomonas intestinalis*. W 1888 roku Blanchard rozpoznając nieprawidłowe umiejscowienie rodzajowe, utworzył nowy rodzaj *Lambliia*. W 1915 roku Stiles zmienił nazwę gatunkową na *Giardia lamblia*, na cześć Viléma Dušana Lambła i francuskiego zoologa Alfreda Mathieu Giarda. W przeszłości i obecnie *G. lamblia*, *G. duodenalis* oraz *G. intestinalis* są często używane jako synonimy [4]. Rozwój metod molekularnych umożliwił ocenę genetycznego zróżnicowania *Giardia*, a tym samym powstanie baz genomowych (<https://Giardiadb.org/>) [5]. W 2004 roku *Giardia* wraz z *Cryptosporidium* jako pierwotniaki stanowiące większość przyczyn chorób biegunkowych na całym świecie, zostały dołączone do inicjatywy Światowej Organizacji Zdrowia (WHO, ang. World Health Organization) na rzecz zaniedbanych chorób (WHO Neglected Diseases Initiative) w celu prowadzenia dalszych badań nad biologią, epidemiologią, chorobą, leczeniem i zapobieganiem [6].

1.2. Epidemiologia

Giardia intestinalis jest jedną z głównych przyczyn ostrej i uporczywej biegunki u ludzi. Giardioza występuje u około 280 milionów ludzi rocznie i przyczynia się do 2,5 miliona zgonów rocznie. Zarażenia pierwotniakami jelitowymi zajmują drugie miejsce, po malarii, jako przyczyna zachorowalności i śmiertelności [7]. Częstość występowania zarażeń *Giardia intestinalis* wynosi od 2 do 7% w krajach rozwiniętych i od 20 do 30% w krajach rozwijających się [8].

W Polsce w początkowym okresie obowiązkowego zgłaszania zachorowań na giardiozę obserwowano stopniowy wzrost liczby przypadków (w roku 2003 zarejestrowano 2416, w 2004 – 3074 i w 2005 – 3337 przypadków). Od 2005 roku roczna liczba rejestrowanych zachorowań na giardiozę ma tendencję spadkową [9].

Zarażenia występują częściej u dzieci, zwłaszcza w wieku przedszkolnym, niż u dorosłych [10,11]. Grupy wysokiego ryzyka obejmują niemowlęta i małe dzieci, osoby starsze, osoby w ośrodkach opieki, podróżnych oraz osoby z obniżoną odpornością [8]. Choroby pasożytnicze wywoływane pasożytami jelitowymi, w tym *Giardia intestinalis*, są związane z ciężką biegunką u pacjentów zakażonych ludzkim wirusem upośledzenia odporności (HIV, ang. human immunodeficiency virus) / z zespołem nabytego upośledzenia odporności (AIDS, ang. acquired immunodeficiency syndrome) zarówno w krajach słabo rozwiniętych, jak i uprzemysłowionych [12]. Do zarażenia dochodzi drogą fekalno-oralną. Możliwe drogi przenoszenia *Giardia intestinalis* to człowiek-człowiek, zanieczyszczona woda lub żywność, a także zwierzę-człowiek (choć pasożyt wykazuje niski potencjał zoonotyczny). Przegląd epidemii chorób przenoszonych przez wodę w latach 2004-2010 wykazał, że *Giardia* odpowiada za 70 na 199 (~35%) zgłoszonych ognisk chorób u ludzi wywołanych przez pierwotniaki przenoszone przez wodę w krajach o wysokich dochodach [13]. Zarażona osoba może wydalać około 10^8 do 10^{10} cyst dziennie aby doszło do zarażenia, podczas gdy do zarażenia wystarczy spożycie 10 do 100 cyst [14].

1.3. Charakterystyka

Giardia intestinalis to jednokomórkowy wiciowiec. Jako organizm mikroaerofilny wykazuje wiele cech prokariotycznych w procesach metabolicznych. *Giardia* charakteryzuje się bardzo zwartym genomem ze znacznym uproszczeniem większości procesów

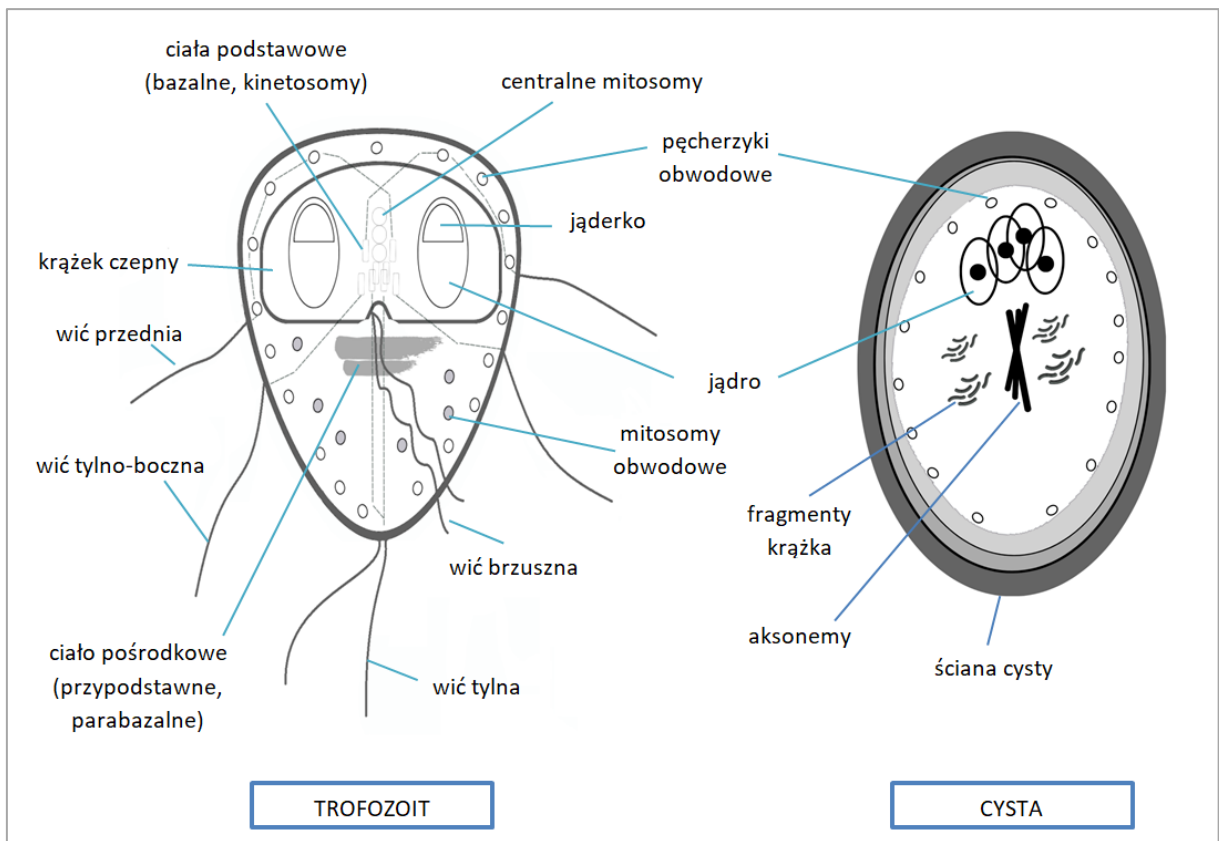
komórkowych. Nie posiada niektórych typowych organelli wyższych komórek eukariotycznych, takich jak aparat Golgiego, peroksosomy i mitochondria oddechowe [15].

1.4. Formy rozwojowe

Giardia występuje w postaci dwóch form rozwojowych: wegetatywnego, ruchliwego trofozoitu i odpornej na czynniki środowiskowe formy inwazyjnej — cysty (Ryc. 1) [16].

Forma trofozoitu ma rozmiary ok. 10-20 x 5-15 μm oraz charakterystyczny gruszkowaty kształt. W pobliżu bieguna przedniego posiada dwa elipsoidalne jądra komórkowe z chromatyną skupioną w środku wokół kariosomu. Między jądrami komórkowymi znajduje się 8 kinetosomów, z których wychodzą 4 pary wolnych wici umożliwiających ruch. Wici tylne na odcinku od kinetosomów do powierzchni komórki tworzą włókna wzmacniające – aksonemy, krzyżujące się z dwoma ciałami pośrodkowymi. Są to struktury (dawniej utożsamiane z ciałami przypodstawnymi) specyficzne dla rodzaju *Giardia*, ważne dla funkcjonowania tarczy przyssawkowej. Tarcza ta (dawniej określana jako krążek czepny) znajduje się na przednim biegunie strony brzusznej, jest wzmocniona cienkim włókienkiem usztywniającym oraz zawiera specjalne białka – giardyny. Tarcza przyssawkowa jest unikatowym organellum, służącym do przyczepiania się pierwotniaka do błony śluzowej jelita. Trofozoity rozmnażają się przez podział podłużny i nie są w stanie przetrwać poza przewodem pokarmowym żywiciela [17].

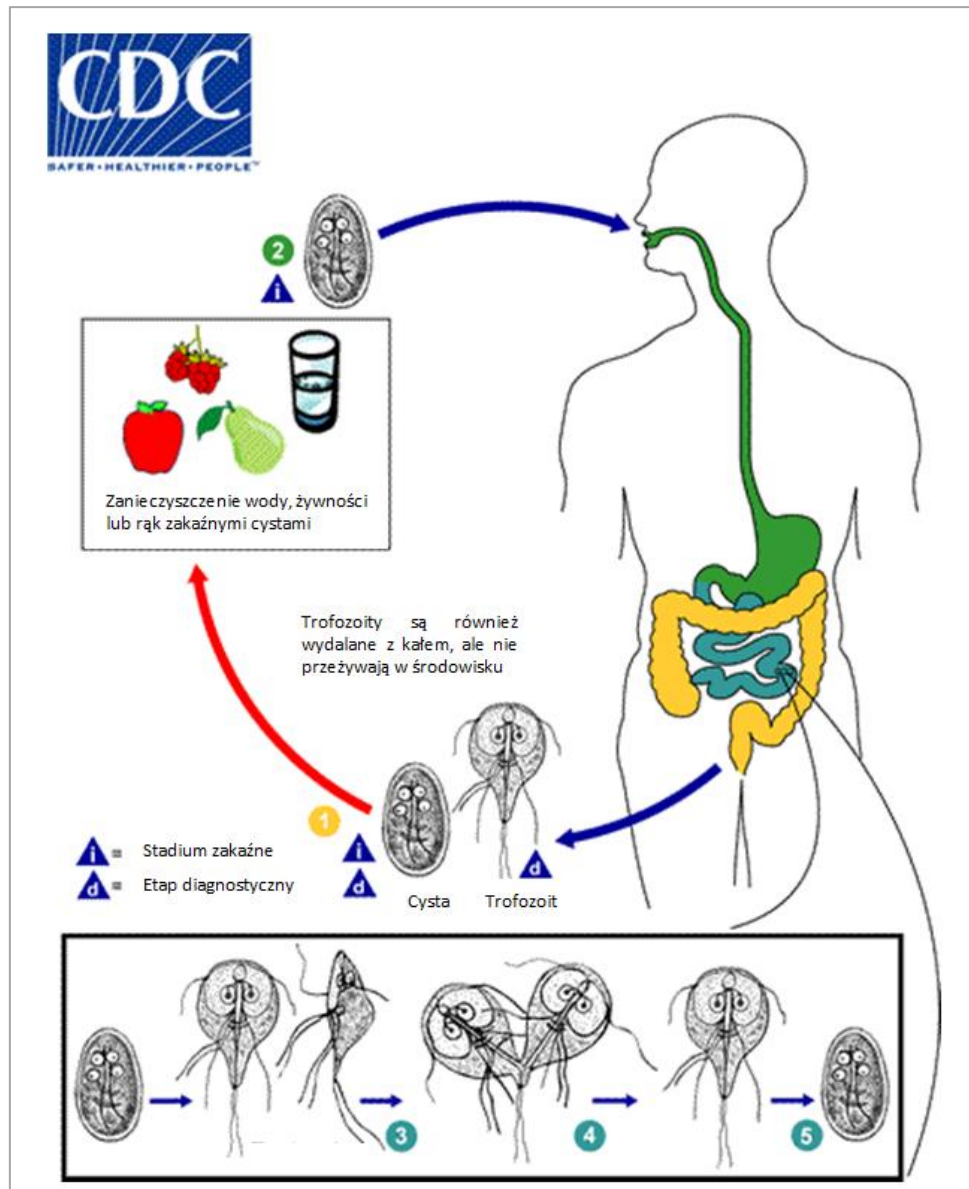
Cysty, o wymiarach 11-14 x 7-10 μm mają zwykle owalny kształt i posiadają 2 lub 4 jądra komórkowe, zawiązki wici i aksonem oraz ciała sierpowate, które są fragmentami mikrotubularnego szkieletu tarczy przyssawkowej, służącymi do jej odbudowania. Cytoplazma cysty wyraźnie odstaje od błony komórkowej. Cysty *Giardia* są nieruchliwe [17]. Cysta jest jedynym stadium rozwoju *G. intestinalis* zdolnym do przeżycia poza organizmem żywiciela i odpowiada za zapoczątkowanie nowego cyklu rozwojowego. Cysty są wysoce odporne na czynniki środowiskowe, takie jak temperatura, wilgotność, pH podłoża lub procesy oczyszczania wody, takie jak chlorowanie. Jednak napromienianie UV jest uważane za bardzo skuteczne pod względem inaktywacji cyst *G. lamblia* [18]. Cysty zachowują żywotność przez kilka miesięcy w wodzie o temperaturze poniżej 10°C i kilka tygodni w temperaturze pokojowej [16].



Ryc. 1. Schemat budowy trofozoitu i cysty *Giardia intestinalis* na podstawie Ankarklev i wsp. [19], zmienione.

1.5. Cykl rozwojowy

Po połknięciu cyst, dostają się one do przewodu pokarmowego, gdzie w proksymalnej części jelita cienkiego (w procesie nazywanym ekscystacją) przez kwaśne środowisko w żołądku oraz obecność żółci i trypsyny w dwunastnicy są stymulowane do przekształcenia w ruchliwe trofozoity. Każda cysta wytwarza dwa trofozoity. W bogatym w składniki odżywcze i ubogim w tlen środowisku górnego odcinka jelita trofozoity namnażają się przez podłużne podwójne rozszczepienie, pozostając w świetle proksymalnej części jelita cienkiego, gdzie mogą być wolne lub przyczepione do kosmków jelitowych na powierzchnia błony śluzowej jelita cienkiego, dzięki obecności krążka czepnego. Gdy gęstość pasożytów wzrasta, a trofozoity przemieszczają się do dolnego odcinka przewodu pokarmowego w kierunku okrężnicy, napotykają obniżony poziom cholesterolu, wzrost pH oraz wzrost stężenia żółci i kwasu mlekowego. Warunki te powodują, że niektóre trofozoity różnicują się w zakaźne cysty (encystacja), które są wydalane z kałem i stają się źródłem nowych zarażeń (Ryc. 2) [20,21,22].



Ryc. 2. Cykl rozwojowy *Giardia intestinalis* (za zgodą DPDx, Centers for Disease Control and Prevention) [23].

1.6. Giardioza

1.6.1. Postacie kliniczne giardiozy

Spektrum obrazu klinicznego waha się od bezobjawowego nosicielstwa do ciężkiej biegunki i zespołu złego wchłaniania. Ostra giardioza rozwija się po okresie inkubacji trwającym od 1 do 14 dni (średnio 7 dni) i zwykle trwa od 1 do 3 tygodni. Do najczęstszych objawów w przypadku ostrego zarażenia należą biegunka, ból brzucha, wzdęcia, nudności, wymioty, złe samopoczucie, cuchnące i tłuste stolce (stolce tłuszczowe) oraz utrata masy ciała. Rzadziej występujące objawy to gorączka, zaparcia i pokrzywka [24,25]. Przewlekła giardioza może następować po ostrej fazie choroby lub może rozwinąć się przy braku

wcześniejszej ostrej choroby. W przewlekłej giardiozie objawy nawracają, może wystąpić zespół złego wchłaniania i osłabienie. Inne objawy przewlekłej giardiozy mogą obejmować: luźne stolce, utratę masy ciała, depresję i skurcze brzucha. Inwazja *Giardia* może powodować także niedokrwistość z niedoboru żelaza, opóźnienie wzrostu u dzieci oraz inne fizyczne i psychiczne problemy zdrowotne [24,26,27].

1.7. Diagnostyka

Diagnostyka laboratoryjna zarażeń *Giardia intestinalis* opiera się głównie na metodzie mikroskopowej i wykazaniu obecności cyst lub trofozoitów w próbkach kału. Dostępne są również testy immunoenzymatyczne pozwalające na wykrywanie koproantygenów *Giardia*. Rozwój metod molekularnych sprawia, że te metody są coraz częściej wykorzystywane przy diagnozowaniu zarażeń tym pierwotniakiem [28].

Mikroskopowa identyfikacja cyst i trofozoitów *Giardia* w próbkach kału jest uważana za złoty standard w diagnostyce giardiozy. Czułość technik mikroskopowych zależy od zastosowania metod bezpośrednich lub zagęszczających, liczby badanych próbek kału oraz umiejętności i doświadczenia osób wykonujących badanie. Metody bezpośrednie obejmują preparat mikroskopowy wykonany poprzez zawieszenie kału w soli fizjologicznej (0,9% NaCl) lub płynie Lugola [29]. Z kolei metody zagęszczające obejmują flotację i dekantację. Pozwalają one na wykrycie niewielkiej liczby cyst *Giardia* i służą oddzieleniu cyst pierwotniaka od nadmiaru resztek kałowych. Metody flotacyjne pozwalają na separację niektórych cyst pierwotniaka przy użyciu cieczy o dużym ciężarze właściwym, takich jak nasycony NaCl, NaNO₃, ZnSO₄ (końcowy ciężar właściwy około 1,20), przy czym siarczan cynku jest zalecany jako najlepszy wśród nasyconych roztworów do wykrywania cyst *Giardia*. Cysty i inne elementy pasożyta unoszą się na powierzchni, a resztki kałowe gromadzą się na dnie próbki. Etap wirowania próbek w metodach flotacji ma na celu zwiększenie wydajności odzyskiwania cyst. Procedury sedymentacyjne są zalecanymi metodami jako najłatwiejszymi do wykonania i mniej podatnymi na błędy techniczne. Metoda umożliwia wykrycie cyst *Giardia* i innych pasożytów jelitowych w osadzie kałowym. Technika sedymentacji formalina-eter/formalina-octan etylu zdaje się być najbardziej skuteczna i ma ogólne zastosowanie. W metodzie sedymentacji występuje mniejsze zniekształcenie cyst *Giardia* w porównaniu z flotacją w siarczanie cynku [29,30].

Jedną z metod ułatwiających wykrywanie *Giardia intestinalis* jest także hodowla tego pierwotniaka. Nie jest ona stosowana rutynowo w laboratoriach diagnostycznych. Metoda ta jest wykorzystywana w laboratoriach naukowo-badawczych do doświadczeń wymagających zastosowania dużej liczby trofozoitów. Wyróżnia się dwa rodzaje hodowli: monokseniczne, gdzie pasożyt jest hodowany w obecności jednego dodatkowego gatunku flory i akseniczne, w których brak jest jakiegokolwiek innej żywej komórki. Najbardziej powszechną i odpowiednią pożywką stosowaną do hodowli aksenicznych *Giardia* jest pożywka Diamonda „TYI-S-33”, zmodyfikowana przez Keistera [29].

Metody immunoenzymatyczne (ELISA, ang. enzyme-linked immunosorbent assay) z kolei służą do wykrywania koproantygeny *Giardia intestinalis* w próbkach kału. Testy wykorzystują przeciwciała monoklonalne do jakościowego wykrywania antygeny swoistego dla *Giardia* (GSA 65). Czułość i specyficzność testów immunoenzymatycznych może różnić się pomiędzy zestawami różnych producentów. Intensywność absorbancji produktu reakcji analizowana jest wizualnie lub automatycznie z zastosowaniem czytnika mikroplamki [31].

Wprowadzanie technik molekularnych, w szczególności opartych na łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR, ang. polymerase chain reaction), np. real-time PCR (PCR w czasie rzeczywistym), nested PCR (zagnieżdżony PCR) i powiązanych z nimi metod zapewnia wyższą czułość i swoistość reakcji w porównaniu zarówno z testami mikroskopowymi, jak i immunoenzymatycznymi [32]. Docelowa sekwencja genów, która może zostać wykorzystana w badaniach molekularnych gatunków *Giardia*, to geny kodujące małe podjednostki (SSU, ang. small subunit) rybosomalnego RNA, a także geny kodujące dehydrogenazę glutaminianową (GDH, ang. glutamate dehydrogenase), izomerazę triozofosforanową (TPI, ang. triose phosphate isomerase) i β -giardinę (białko w dysku adhezyjnym *Giardia*) [33,34].

W celu zdiagnozowania zarażenia *Giardia* można również przeprowadzić biopsję endoskopową i badanie treści dwunastnicy wraz z niezwłocznym badaniem mikroskopowym treści jelitowej na obecność trofozoitów. Alternatywną metodą, dzisiaj stosowaną niezwykle rzadko, jest Entero-Test (test sznurkowy), w którym pacjent połyka sznurek z umieszczoną na końcu kapsułką, którego koniec przykleja się do policzka. Po upływie około 4 godzin od połknięcia sznurek usuwa się w celu zbadania mikroskopowego pod kątem trofozoitów lub innych organizmów pasożytniczych [5].

1.8. Leczenie

Jedyną dostępną opcją leczenia jest farmakoterapia, gdyż obecnie brak jest skutecznej i zatwierdzonej dla ludzi szczepionki przeciwko giardiozie. Każdorazowo zaleca się leczenie potwierdzonych przypadków giardiozy w celu likwidacji objawów i skrócenia przebiegu choroby. Skuteczne leczenie może zmniejszyć ryzyko powikłań i ograniczyć rozprzestrzenianie się zarażenia [35].

Pierwszym lekiem, który został dopuszczony do powszechnego użytku w leczeniu giardiozy, była chinakryna, która przez wiele lat była uważana za lek z wyboru. Metronidazol był pierwszym opracowanym 5-nitroimidazolem, który zaczęto stosować w latach 60. XX wieku w leczeniu giardiozy i wielu innych zarażeń wywołanych przez beztlenowe pierwotniaki oraz zakażeń wywołanych przez bakterie. Metronidazol jest obecnie, wraz z innymi nitroimidazolami, lekiem z wyboru w przypadku giardiozy, chociaż nie został zatwierdzony przez Agencję Żywności i Leków (FDA, ang. Food and Drug Administration) dla tego wskazania. Opracowano nowsze 5-nitroimidazole, w tym tinidazol, który jest pochodną metronidazolu i jest stosowany w Europie od 1969 r., ale został zatwierdzony przez FDA dopiero w 2004 r. Tinidazol jest bardziej skuteczny niż metronidazol lub albendazol. Nitazoksanid jest związkiem nitroheterocyklicznym, który wyróżnia się jako jedyny skuteczny lek w leczeniu zarażenia wywołanego przez *Cryptosporidium* spp., a także w przypadku giardiozy. Jego średnia skuteczność jest znacznie niższa niż w przypadku nitroimidazoli, czy albendazolu. Paromomycyna jest niewchłanianym z przewodu pokarmowego aminoglikozydem o umiarkowanej skuteczności i czasami jest stosowana w zwalczaniu lambliozy pierwszym trymestrze ciąży. Skuteczność chlorochiny jest porównywalna z nitroimidazolami [5].

2. *Toxoplasma gondii*

2.1. Rys historyczny

Pasożytniczy pierwotniak *Toxoplasma gondii* został po raz pierwszy zaobserwowany i opisany w 1908 roku, niezależnie i jednocześnie, przez A. Splendore u królika w Brazylii oraz przez C. Nicolle i L. Manceaux u północnoafrykańskiego gryzonia *Ctenodactylus gundi*, w Tunezji. Początkowo błędnie zakładano, że pasożyt jest spokrewniony z *Leishmania*, ale później został nazwany *Toxoplasma gondii* przez Nicolle i Manceaux oraz *Toxoplasma cuniculi* przez Splendore, od nazw gatunków żywicieli, u których poszczególni naukowcy

po raz pierwszy wykryli pasożyta. Od 1908 do 1930 roku *T. gondii* obserwowano u wielu różnych zwierząt, ale dopiero w 1937 roku pomyślnie go wyizolowano. Wykazano wówczas, że jest bezwzględny pasożytem wewnątrzkomórkowym i może być pasażowany między zwierzętami (Sabin i Olitsky). Następnie potwierdzono, że ludzkie i zwierzęce izolaty pasożyta były identyczne. W 1948 Sabin i Feldman opracowali test serologiczny – test barwnikowy Sabina-Feldmana (SFDT ang. The Sabin-Feldman Dye Test), którego szerokie zastosowanie doprowadziło do uświadomienia, że zarażenie *T. gondii* nie jest rzadkim, ale raczej powszechnym zarażeniem ludzi i zwierząt [36].

2.2. Epidemiologia

Częstość występowania zarażeń *Toxoplasma gondii* na świecie waha się od mniej niż 10% do ponad 90% w zależności od nawyków społecznych, warunków klimatycznych, standardów higienicznych i regionów geograficznych [37]. Według Amerykańskiego Centrum Kontroli i Zapobiegania Chorób (CDC, ang. Centers for Disease Control and Prevention) prawie 22,5% populacji w wieku ≥ 12 lat w USA jest zarażonych *Toxoplasma gondii*. Zapadalność na toksoplazmozę w Europie wynosi 75%, podczas gdy w Azji, Afryce i Ameryce Południowej odsetek zachorowań jest nawet wyższy - do 90%. Na terenach wiejskich, w gospodarstwach o złych warunkach higienicznych toksoplazmoza jest chorobą endemiczną [38].

Do zarażenia *Toxoplasma gondii* może dojść poprzez spożywanie niedogotowanego mięsa zwierząt z cystami tkankowymi (zawierającymi bradyzoity), spożywanie pokarmu lub wody zanieczyszczonych odchodami kotów lub zanieczyszczonymi próbkami środowiskowymi, takimi jak gleba zanieczyszczona odchodami kota domowego (zawierająca oocysty ze sporozoitami), a także przez transfuzję krwi lub przeszczep narządu (zawierający tachyzoity) lub przez łożysko od matki do płodu (przez tachyzoity) [39].

T. gondii u osób immunokompetentnych pozostaje w stanie uśpienia w postaci bradyzoitów, jednak w przypadku osłabienia funkcjonowania układu odpornościowego przekształca się w formę aktywną, co prowadzi do klinicznej manifestacji choroby i stwarza wysokie ryzyko poważnych problemów zdrowotnych u osób immunoniekompetentnych. Obniżona odporność może występować u pacjentów z HIV/AIDS, osób po przeszczepie narządu lub szpiku kostnego pozostających w immunosupresji, pacjentów z chorobą Hodgkina i stłuszczeniem wątroby lub w przypadku ciąży [40,41]. Kobiety zarażone *T. gondii*

przed zajściem w ciążę zazwyczaj nie przekazują pasożyta swoim płodom. Ogólne prawdopodobieństwo, że ostre zarażenie *T. gondii* może spowodować toksoplazmozę wrodzoną, szacuje się na około 30%, z wyższym ryzykiem w trzecim trymestrze ciąży. Niektóre czynniki środowiskowe, behawioralne, socjodemograficzne i położnicze zostały zasugerowane jako podwyższające ryzyko zarażenia *T. gondii* u kobiet w ciąży. Przykładami takich czynników są położenie geograficzne, spożycie zanieczyszczonej wody lub niedogotowanego mięsa, obecność kotów w gospodarstwie domowym, narażenie na zanieczyszczoną glebę (poprzez uprawę roli lub ogrodnictwo gołymi rękami), historia samoistnych poronień (poronień) i starszy wiek matki [42].

2.3. Charakterystyka

Komórki *Toxoplasma gondii* posiadają trzy błony: zewnętrzną błonę plazmatyczną oraz tak zwany kompleks błon wewnętrznych. Na apikalnym biegunie komórki znajdują się pierścienie polarne. Pierwszy z nich odpowiedzialny jest za wzmacnianie kompleksu błon wewnętrznych, natomiast drugi łączy się z mikrotubulami tworzącymi uźebrowanie komórki pasożyta. Na biegunie tym znajduje się też konoid zbudowany z sześciu mikrotubul biorący udział w inwazji pasożyta do komórek żywiciela [43].

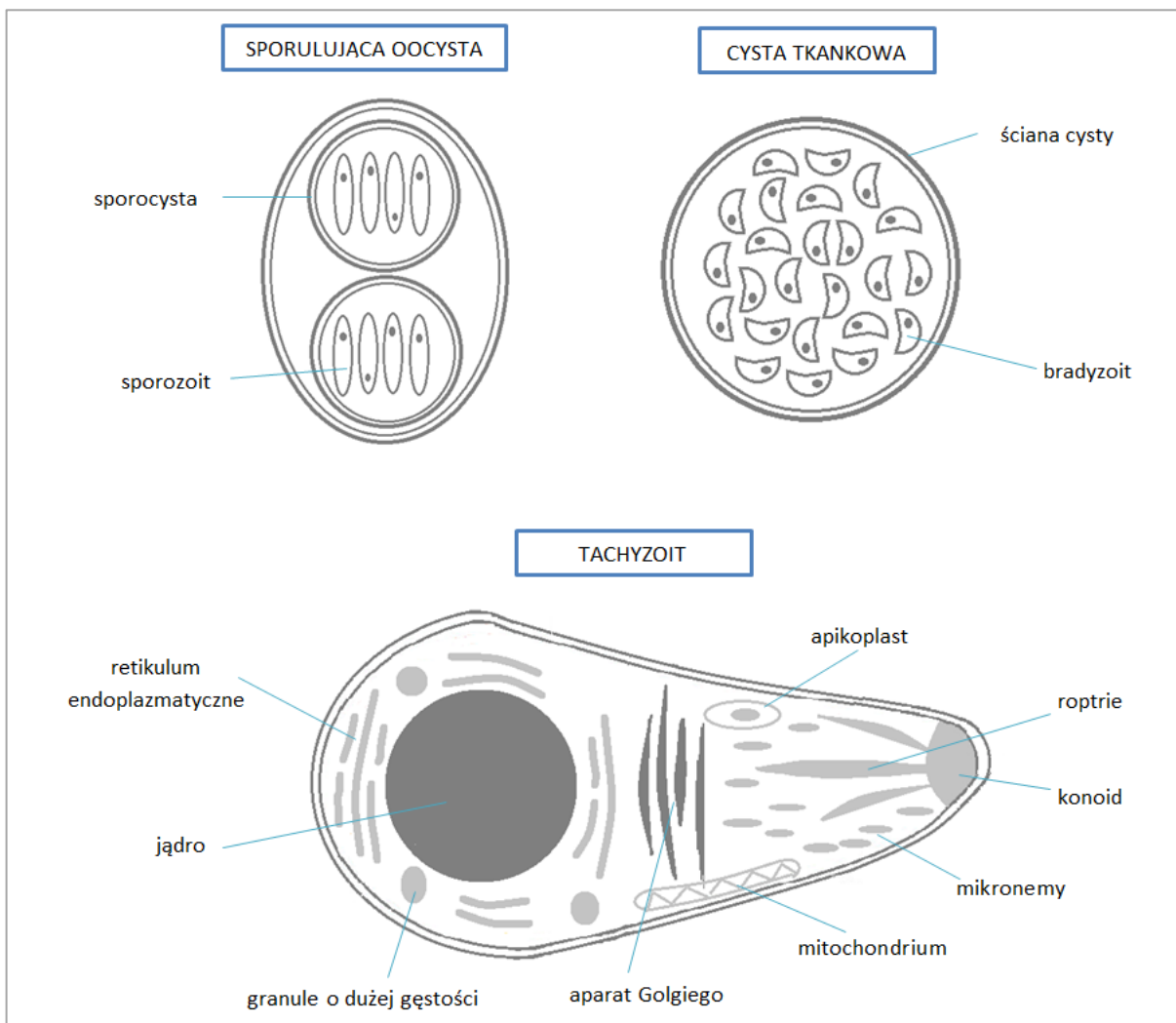
T. gondii jest bezwzględny pasożytem wewnątrzkomórkowym, którego przetrwanie opiera się na trzech różnych organellach wydzielniczych: mikronemach, roptriach oraz granulach o dużej gęstości. Podczas inwazji pasożyta do komórek żywiciela wydzielają one odpowiednie białka, których zadaniem jest umożliwienie przyłączenia się do receptorów komórkowych żywiciela, sfałdowanie błony komórkowej w określonym miejscu, utworzenie kompleksów budujących połączenie ruchome tzw. „moving junction” oraz utworzenie wakuoli pasożytniczej [44,45].

W komórkach *T. gondii* znajdują się także charakterystyczne dla wszystkich *Eucaryota* organelle takie jak aparat Golgiego, siateczka śródplazmatyczna czy mitochondria [46].

2.4. Formy rozwojowe

T. gondii występuje w postaci 3 inwazyjnych form rozwojowych: w postaci tachyzoitów – form szybko namnażających się wegetatywnie; w postaci cyst tkankowych zawierających bradyzoity – formy przetrwalne, wolno namnażające się wegetatywnie; w postaci oocyst powstających podczas rozmnażania płciowego – są to formy przetrwalne

zawierające postaci inwazyjne, czyli sporozoity (Ryc. 3). Sporulujące oocysty są wysoce odporne na warunki środowiskowe i zachowują żywotność w wodzie lub w suchych warunkach przez kilka miesięcy [47]. Jedna sporulująca oocysta (11 x 13 μm) zawiera dwie sporocysty (6 x 8 μm), z których każda posiada cztery zakaźne sporozoity (2 x 6-8 μm) [48]. Tachyzoit (2 x 6 μm) zawiera centralnie ułożone jądro oraz chromatynę zlokalizowaną w jego środkowej części. Bradyzoity znajdują się w cystach tkankowych. Wielkość każdej cysty różni się w zależności od wieku, szczepu pasożyta i charakteru komórki gospodarza. Małe cysty mają średnicę około 5 μm , podczas gdy dojrzałe cysty mogą osiągnąć 60 μm i mogą zawierać około 2000 bradyzoitów [47].



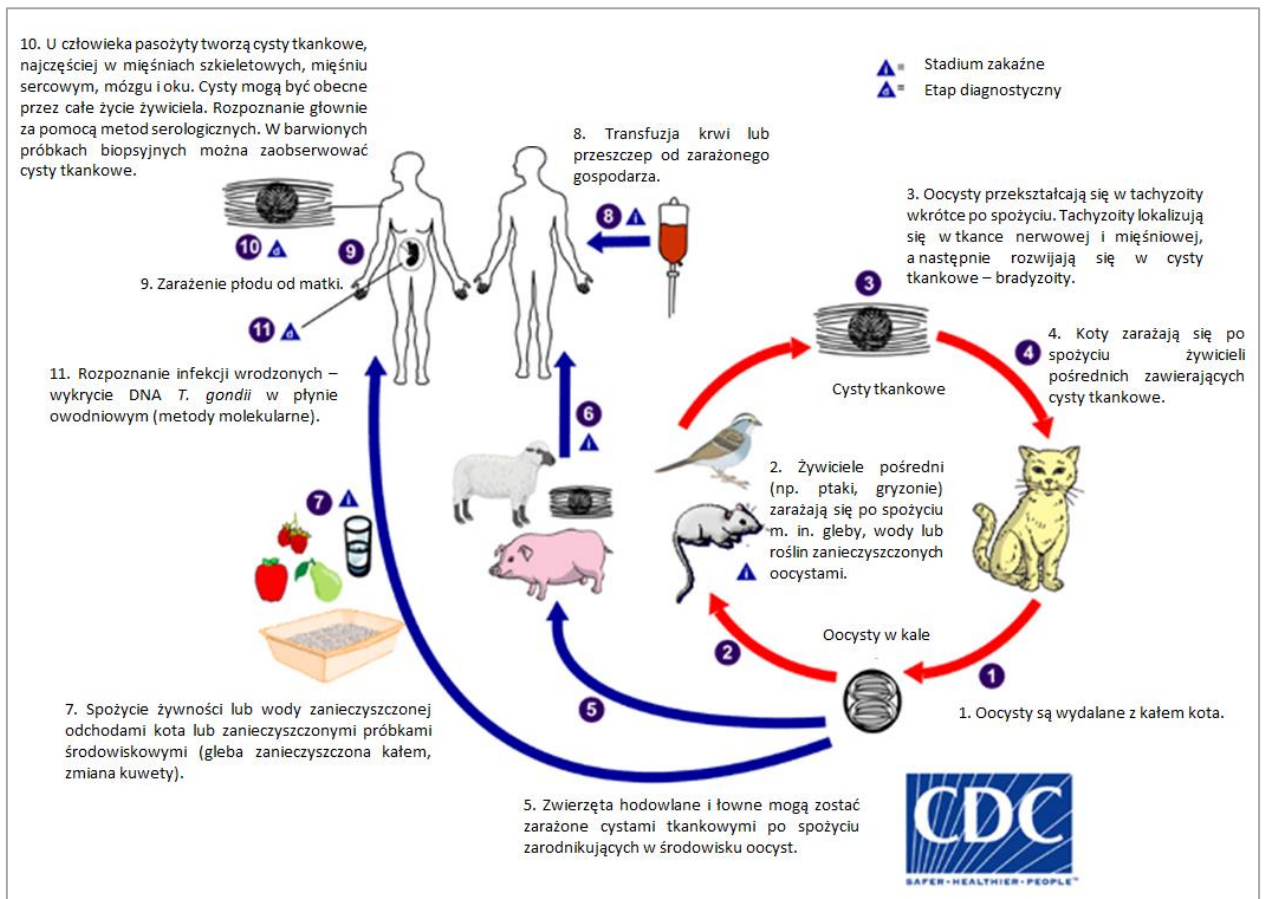
Ryc. 3. Formy rozwojowe *Toxoplasma gondii* na podstawie Attias i wsp. [47], zmienione.

2.5. Cykl rozwojowy

Rozwój płciowy *T. gondii* odbywa się u żywiciela ostatecznego, tj. kota i innych zwierząt z rodziny kotowatych (*Felidae*). Koty mogą zarazić się pierwotniakiem nie wcześniej niż w czwartym tygodniu życia, czyli wówczas, gdy zaczynają spożywać pokarm stały. Młode koty podatne są na zarażenie różnymi postaciami *Toxoplasma gondii* - tachyzoitami i bradyzoitami znajdującymi się w cystach tkankowych, głównie mięśniach upolowanych małych zwierząt na przykład gryzoni, ptaków lub sporozoitami (trofozoitami) zawartymi w oocystach obecnych w kale, zanieczyszczającym wodę lub pokarm spożywany przez kota. Koty zarażają się jednak najczęściej cystami tkankowymi. Po spożyciu przez kota pokarmu zawierającego cysty tkankowe lub oocysty, uwolnione w przewodzie pokarmowym trofozoity lub tachyzoity wnikają do komórek nabłonkowych jelita cienkiego, gdzie następuje cykl płciowy i tworzy się zygota z otoczką (oocysta). Nowo utworzone w organizmie kota oocysty uwalniają się do światła jelita, skąd z kałem wydostają się do środowiska zewnętrznego. W ciągu około 2 tygodni kot codziennie wydalą z kałem ok. 10 milionów oocyst. Oocysta staje się inwazyjna dopiero po 1–5 dniach przebywania w sprzyjających warunkach wilgotności i temperatury [49,50].

Rozwój bezpłciowy *T. gondii* odbywa się u żywiciela pośredniego – człowieka i innych ssaków i ptaków. W jelicie cienkim żywiciela następuje uwalnianie postaci inwazyjnych pierwotniaka *T. gondii*: sporozoitów z oocyst, bradyzoitów z cyst lub tachyzoitów z pseudocyst. Formy inwazyjne wnikają następnie do komórek krwi (makrofagi, neutrofile, limfocyty), z którą rozprzestrzeniają się w całym organizmie. W ostrej fazie zarażenia w komórkach powstają ogniska martwiczo-zapalne między innymi w węzłach chłonnych, w mięśniach poprzecznie prążkowanych, w tym w mięśniu sercowym oraz w mięśniach gładkich, w gałce ocznej, czy w ośrodkowym układzie nerwowym. Proces wnikania inwazyjnych postaci pasożyta do komórek odbywa się przy udziale wytwarzanych przez niego enzymów – lizozymu i hialuronidazy. Wewnątrz komórki żywiciela pasożyt wytwarza wodniczkę, która chroni go przed litycznym działaniem enzymów zawartych w cytoplazmie. Wewnątrz wodniczki następują liczne podziały pasożyta doprowadzające do rozpadu niszczonej komórki i uwolnienia tachyzoitów (trofozoitów) odpowiedzialnych za ostrą fazę zarażenia. Ostry stan zapalny komórki rozwijający się w miejscu uwolnienia tachyzoitów hamuje dalszy wysiew pasożytów. Immunoglobuliny (przeciwciała) klasy A (IgA, ang. immunoglobulin A), klasy M (IgM, ang. immunoglobulin M), klasy E (IgE,

ang. immunoglobulin E), pojawiające się od drugiego tygodnia trwania zarażenia, są odpowiedzialne za supresję parazytemii, tworzenie cyst oraz ustępowanie ostrego okresu choroby. Trofozoity występujące w cystach nazywa się bradyzoitami ze względu na ich powolne namnażanie. Cysty mogą przetrwać w organizmie żywiciela i lokalizować się w tkankach każdego narządu. Ich wymiary wahają się w zakresie od 10 do 100 μm . Sprawny układ immunologiczny gospodarza utrzymuje zarażenie w stanie utajenia. W stanach obniżonej odporności (na przykład w przypadku zakażenia wirusem HIV) uaktywniony zostaje proces podziałów, bradyzoity niszczą wtedy komórkę, w której była zlokalizowana cysta, w konsekwencji powodując toksoplazmozę lokalną lub rozsianą (Ryc. 4) [51,52,53].



Ryc. 4. Cykl życiowy *Toxoplasma gondii* (za zgodą DPDx, Centers for Disease Control and Prevention) [39].

2.6. Toksoplazmoza

W zależności od zastosowanego kryterium toksoplazmozę dzieli się na różne typy jednostek chorobowych (Tabela 1).

Tabela 1. Podział toksoplazmozy na podstawie Kruszewski i wsp. [54].

Kryterium	Podział
moment zarażenia	- wrodzona - nabyta
Przebieg	- utajona - przewlekła - podostra - ostra
objawy kliniczne	- bezobjawowa (utajona) - objawowa
sposób zarażenia	- pierwotna - nawrotowa
umiejscowienie zmian patologicznych	- narządowa lub układowa - uogólniona

2.6.1. Postacie kliniczne toksoplazmozy

U osób z prawidłową odpornością zarażenie *T. gondii* zwykle powoduje jedynie łagodne objawy i rzadko wymaga interwencji. Chorobotwórcze tachyzoity są szybko tłumione przez odpowiedź immunologiczną, w której główną rolę odgrywa interferon gamma (IFN- γ , ang. interferon gamma) wytwarzany przez limfocyty T CD4+, wspierany przez szereg innych komórek odpornościowych, takich jak cytokiny, w tym w szczególności interleukina 12 (IL-12, ang. interleukin 12), interleukina 18 (IL-18, ang. interleukin 18), interleukina 1 (IL-1, ang. interleukin 1) i interleukina 2 (IL-2, ang. interleukin 2) oraz czynnik martwicy nowotworu α (TNF- α , ang. tumor necrosis factor alfa), wrodzone rozpoznawanie immunologiczne oraz cząsteczki i mechanizmy efektorowe. Jednak późniejsze różnicowanie tachyzoitów w bradyzoity prowadzi do powstawania długowiecznych cyst tkankowych w mięśniach i ośrodkowym układzie nerwowym. Prawdopodobnie utrzymują się one przez całe życie żywiciela, również pod kontrolą procesów zależnych od IFN- γ [55].

Cysty tkankowe są zdolne do reaktywacji do ostrego stadium tachyzoitu, co jest szczególnie ważne dla osób z obniżoną odpornością, zwłaszcza pacjentów z AIDS, u których populacje limfocytów T CD4+ są drastycznie zmniejszone. Reaktywacja może prowadzić do powstawania uszkodzeń mózgu i związanego z tym toksoplazmatycznego zapalenia mózgu, które jest śmiertelne, jeśli nie jest leczone [56].

Wertykalna transmisja *T. gondii* z matki na płód występuje najczęściej po pierwotnym zarażeniu matki w czasie ciąży. Prawdopodobieństwo transmisji z matki na płód jest największe w trzecim trymestrze ciąży. Z kolei ciężkość wrodzonej choroby jest odwrotnie

proporcjonalna do wieku ciążowego. W związku z tym zarażenia w pierwszym trymestrze zazwyczaj powodują najcięższe objawy kliniczne u noworodków, w tym samoistne poronienie lub poród martwego płodu. Około 75% wrodzonych przypadków toksoplazmozy ma charakter subkliniczny. Wrodzone zarażenia *T. gondii* u noworodków, które przeżyły, mogą mimo wszystko powodować różne nieprawidłowości utrzymujące się przez całe życie i mogą obejmować upośledzenie rozwoju umysłowego, słuchu lub wzroku [57].

Postać kliniczna choroby może również wystąpić u zdrowych, immunokompetentnych osób dorosłych. W szczególności objawiają się postacią oczną, jedną z najczęściej identyfikowanych przyczyn zapalenia błony naczyniowej oka. Zarażenie może być również związane z chorobami o podłożu zapalnym, schizofrenią, różnymi typami nowotworów i potencjalnie innymi chorobami mózgu [55,58].

2.7. Diagnostyka

Metodą referencyjną w diagnostyce toksoplazmozy jest test barwnikowy Sabina-Feldmana (SFDT). Test ten opiera się na wykrywaniu swoistych przeciwciał przeciwko *Toxoplasma gondii* w badanej surowicy. Surowicę badaną inkubuje się z zawiesiną trofozoitów w obecności aktywatora, który stanowi dopełniacz surowicy ludzkiej. Następnie dodawany jest roztwór barwiący – błękit metylenowy. W przypadku braku przeciwciał w badanej surowicy, w reakcji obserwuje się zabarwienie żywych trofozoitów. Jeśli w surowicy badanej obecne są przeciwciała, wówczas wiążą się one z antygenami na powierzchni komórek pasożyta. Kompleks antygen-przeciwciało aktywuje z kolei układ dopełniacza, prowadząc do lizy pasożytów, które nie barwią się roztworem błękitu metylenowego. Miano surowicy dodatkowo określa jej rozcieńczenie, przy którym stosunek pasożytów zabarwionych do niezabarwionych wynosi 1:1. Metoda jest wysoce czuła i swoista, ale nie różnicuje klas przeciwciał [59].

W rutynowej diagnostyce powszechnie stosowane są metody serologiczne oparte na wykrywaniu przeciwciał przeciwko *T. gondii*. Najczęściej stosowaną metodą jest metoda serologiczna, w której oznacza się poziom immunoglobulin (przeciwciał) klasy G (IgG, ang. immunoglobulin G) i IgM oraz wykonuje test awidności IgG w próbce surowicy krwi pacjenta. Coraz częściej stosowane techniki molekularne do wykrywania materiału genetycznego pierwotniaków są bardziej czułe i dokładne. Do często stosowanych metod molekularnych należą konwencjonalna reakcja łańcuchowa polimerazy (PCR), ilościowa

reakcja PCR (qPCR, ang. quantitative polimerase chain reaction) i izotermiczna metoda amplifikacji (LAMP, ang. loop-mediated isothermal amplification). Techniki histologiczne są metodą rzadko stosowaną. Stosowane są głównie do wykrywania stadium bradyzoitu w tkankach narządów, takich jak serce, wątroba i mózg. Tkanki zostają utrwalone na szkiełku, a następnie wybarwione hematoksyliną i eozyną (H&E). Test biologiczny *in vivo* z wykorzystaniem modelu zwierzęcego (myszy/szczura) służy do badania próbek, takich jak odchody kotów, wątroba, płuca i homogenat mózgu żywiciela pośredniego, poprzez inokulację, a następnie testowanie zwierzęcia na obecność zarażenia. Test jest kosztowny i czasochłonny, ale jest niezawodnym sposobem pomiaru żywotności i czynnika wirulencji różnych szczepów. Z kolei hodowla tkankowa *in vitro* eliminuje wykorzystywanie zwierząt poprzez zapewnienie sztucznego środowiska, w którym próbki podejrzewane o obecność *T. gondii*, takie jak krew, są hodowane w pożywce [39,60].

2.8. Leczenie

Prowadzonych jest wiele badań w celu opracowania szczepionki przeciwko *T. gondii*. Testowane są szczepionki: inaktywowane, żywe atenuowane, DNA, białkowe, epitopowe i żywe wektorowe. Chociaż poczyniono znaczne postępy w poszukiwaniu i opracowywaniu szczepionek zapobiegających zarażeniu *T. gondii*, nadal nie ma skutecznej i bezpiecznej szczepionki przeciw toksoplazmozie, która eliminowałaby cysty tkankowe i/lub całkowicie blokowałaby transmisję pionową [61,62].

Obecnie zalecane leki stosowane w leczeniu toksoplazmozy ukierunkowane są na fazę tachyzoitową pasożyta i nie eliminują pasożytów otorbionych w tkankach. Aktywne zarażenie charakteryzuje się obecnością tachyzoitów, podczas gdy obecność cyst tkankowych jest charakterystyczna dla postaci utajonej choroby. Pirymetamina, uważana za najskuteczniejszy lek przeciwko toksoplazmozie i jest standardowym elementem terapii. Lek ten jest antagonistą kwasu foliowego i może powodować, zależne od dawki, zahamowanie czynności szpiku kostnego, które może być łagodzone przez jednoczesne podawanie kwasu folinowego (leukoworyny). Leukoworyna chroni szpik kostny przed toksycznym działaniem pirymetaminy. Należy również uwzględnić drugi lek, taki jak sulfadiazyna lub klindamycyna (w przypadku nadwrażliwości na leki zawierające sulfonamidy). Dostępne są także inne schematy leczenia, w tym pirymetamina w połączeniu z atowakwonem, klarytromycyną lub azytromycyną lub monoterapia trimetoprimem-

sulfametoksazolem lub atowakwonem - jednak żaden nie okazał się lepszy od standardowej terapii [63].

Leczenie osób dorosłych z prawidłową odpornością w przypadku toksoplazmozy węzłowej jest rzadko wskazane, gdyż ta postać choroby zwykle ustępuje samoistnie. Jeśli choroba jest klinicznie widoczna lub objawy są ciężkie lub przewlekłe, leczenie może być wskazane przez okres od 2 do 4 tygodni. Leczenie postaci ocznej toksoplazmozy powinno opierać się na pełnej ocenie okulistycznej, a decyzja o leczeniu zależy od wielu parametrów, w tym ostrości zmiany, stopnia zapalenia, ostrości wzroku oraz rozmiaru, lokalizacji i utrzymywania się zmiany. W przypadku toksoplazmozy ocznej terapię należy prowadzić przez 4 do 6 tygodni, po czym powinno się ocenić stan pacjenta [64].

Postępowanie w przypadku zarażenia matki i płodu różni się w zależności od ośrodka leczenia. Ogólnie rzecz biorąc kobietom, u których zarażenie zostało nabyte i zdiagnozowane przed 18 tygodniem ciąży, a zarażenie płodu nie jest udokumentowane ani podejrzewane zaleca się spiramycynę. Spiramycyna zmniejsza transmisję pasożyta do płodu i jest najskuteczniejsza, jeśli zostanie rozpoczęta w ciągu 8 tygodni od serokonwersji. Pirymetamina, sulfadiazyna i leukoworyna są zalecane w przypadku zarażeń nabytych w 18. tygodniu ciąży lub później oraz w przypadku udokumentowanego lub podejrzewanego zarażenia u płodu. Noworodki z zarażeniem wrodzonym są na ogół leczone pirymetaminą, sulfonamidem i leukoworyną przez 12 miesięcy [64,65].

Toksoplazmoza u pacjentów z niedoborem odporności jest często śmiertelna, jeśli nie jest leczona. Kontynuacja leczenia jest zalecana przez co najmniej 4-6 tygodni po ustąpieniu objawów klinicznych, ale może być konieczna nawet przez 6 miesięcy lub dłużej. U pacjentów z AIDS występują nawroty i zaleca się leczenie podtrzymujące do czasu uzyskania znaczącej poprawy immunologicznej w odpowiedzi na terapię przeciwretrowirusową [66].

II. CEL PRACY

Choroby pasożytnicze stanowią istotny problem ochrony zdrowia, a łatwość rozprzestrzeniania się pasożytniczych pierwotniaków może powodować wzrost częstości zarażeń wśród ludzi. Do zarażenia *Giardia intestinalis* dochodzi głównie drogą pokarmową przez spożywanie żywności lub wody zanieczyszczonej cystami tego pasożyta. W związku z tym, bezpieczeństwo biologiczne żywności i kontrola procesów produkcyjnych ma ogromne znaczenie w ograniczeniu rozprzestrzeniania się i eliminacji inwazji. Różne czynniki chemiczne i fizyczne, jak również biologiczne mogą wpływać na występowanie i przeżywalność tego pasożytniczego pierwotniaka. W zależności od rodzaju czynnika mogą one bezpośrednio wpływać na niszczenie form inwazyjnych poprzez ich dodawanie do żywności, a z drugiej strony mogą wpływać na zaburzenie wyników badań diagnostycznych. Z kolei w przypadku pasożytniczego pierwotniaka *Toxoplasma gondii* istnieje wiele metod serologicznych pozwalających na wykrywanie zarażenia, które mają jednak różną efektywność. Istotny jest dobór metod o jak najwyższej czułości i swoistości, szczególnie w przypadku osób zakażonych wirusem HIV, gdyż wczesne wykrycie może zapobiec rozwojowi ciężkiej postaci toksoplazmozy u tych pacjentów. W celu wykrycia zarażenia *T. gondii* konieczne może być rutynowe stosowanie metod molekularnych.

Celem badań w ramach niniejszej pracy była ocena prewalencji chorób wywoływanych przez pierwotniaki pasożytnicze oraz wpływu wybranych czynników fizycznych, chemicznych i biologicznych na ich przeżywalność i wykrywanie na przykładzie *Giardia intestinalis* i *Toxoplasma gondii*. W tym celu zaplanowano:

- analizę prewalencji *Giardia intestinalis* wśród mieszkańców województwa kujawsko-pomorskiego;
- ocenę wpływu wybranych czynników biologicznych oraz chemicznych na przeżywalność i wykrywanie cyst pierwotniaków *Giardia intestinalis* metodą mikroskopową oraz immunoenzymatyczną w próbkach kału;
- ocenę wpływu wybranych czynników fizycznych i chemicznych na wykrywanie *Giardia intestinalis* metodą mikroskopową oraz metodą real-time PCR w próbkach pochodzących z hodowli aksenicznej;
- badanie miana przeciwciał przeciwko *Toxoplasma gondii* w surowicy krwi osób badanych w kierunku obecności wirusa HIV (z powodu ryzyka zakażenia) wśród mieszkańców województwa kujawsko-pomorskiego.

III. CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

Realizacja założonych celów pracy obejmowała kilka etapów.

1. ETAP 1

Ocena prewalencji *Giardia intestinalis* w wybranej populacji mieszkańców województwa kujawsko-pomorskiego.

Do oceny prewalencji *Giardia intestinalis* wśród mieszkańców województwa kujawsko-pomorskiego wykorzystano wyniki badań parazytologicznych wykonywanych w latach 2000-2020 w Wojewódzkiej Stacji Sanitarno-Epidemiologicznej w Bydgoszczy.

W badanym okresie diagnostykę laboratoryjną w kierunku wykrywania obecności *Giardia intestinalis* prowadzono metodą mikroskopową i immunoenzymatyczną z wykorzystaniem próbek kału. W badaniu mikroskopowym oceniano rozmazy bezpośrednie (z płynem Lugola oraz z 0,9% roztworem NaCl), rozmazu bezpośredniego oraz wykonane z wykorzystaniem metod zagęszczających pasożyty - flotacji wg Fausta (w siarczanie cynku) oraz dekantacji. Preparaty oglądano pod powiększeniem obiektywu 10x, 20x, a końcową identyfikację prowadzono pod powiększeniem obiektywu 40x. Do wykrywania obecności koproantygeny *Giardia intestinalis* (GSA-65) użyto testu immunoenzymatycznego (test GIARDIA II firmy TechLab).

2. ETAP 2

Wpływ wybranych czynników na wykrywanie *Giardia intestinalis* metodą mikroskopową oraz immunoenzymatyczną w próbkach kału.

Do badań wykorzystano 20 próbek kału, zarchiwizowanych w latach 1998-2018 w Wojewódzkiej Stacji Sanitarno-Epidemiologicznej w Bydgoszczy, pobranych zarówno od pacjentów skierowanych na badania pasożytnicze przez lekarza placówki medycznej, jak i od osób prywatnych. W próbkach tych oceniono wpływ wybranych czynników, takich jak szczepy bakteryjne, wirusy i substancje dodawane do żywności na wykrywanie *Giardia intestinalis* metodami mikroskopowymi i immunoenzymatycznymi.

W badaniu wykorzystano następujące drobnoustroje: *Salmonella* Enteritidis (ATCC 13076), *Shigella sonnei* (ATCC 9290), *Yersinia enterocolitica* (ATCC 23715)

oraz norowirusy ze względu na ich dostępność oraz fakt, że są jednymi z najczęstszych czynników etiologicznych zatruć pokarmowych. Badanie kału jest zazwyczaj ukierunkowane na wykrywanie wymienionych mikroorganizmów. W związku z powyższym, przeanalizowano wpływ obecności bakterii i wirusów w kale na wykrywanie *Giardia intestinalis* metodą mikroskopową i immunoenzymatyczną.

W przypadku substancji dodawanych do żywności użyto środków wykorzystywanych na szeroką skalę w przemyśle spożywczym. Ocenie poddano wpływ sorbinianu potasu (E202), gumy guar (E412), glutaminianu monosodowego (E621) oraz kwasu cytrynowego (E330) na wykrywanie w kale cyst w metodzie mikroskopowej i koproantygeny *Giardia intestinalis* z zastosowaniem testu immunoenzymatycznego (test GIARDIA II firmy TechLab). Przeanalizowano wpływ wybranych produktów chemicznych na wyniki badań w kierunku obecności pierwotniaka.

3. ETAP 3

Wpływ wybranych czynników fizycznych i chemicznych na wykrywanie *Giardia intestinalis* metodą mikroskopową oraz real-time PCR w hodowli akseniczej.

W tym etapie zbadano wpływ wybranych czynników fizycznych i chemicznych na ocenę przeżywalności i wykrywanie *Giardia intestinalis*. W związku z niską prevalencją pasożyta, a tym samym ograniczoną dostępnością próbek dodatnich mogących stanowić materiał badany, badania wykonano z wykorzystaniem trofozoitów pierwotniaka pochodzących z hodowli akseniczej *Giardia intestinalis* ze szczepu uzyskanego dzięki uprzejmości Instytutu Medycyny Morskiej i Tropikalnej w Gdyni (Gdański Uniwersytet Medyczny).

Przeżywalność *Giardia intestinalis* i wykrywanie DNA pasożyta oceniano po poddaniu pierwotniaka wpływowi 22 wybranych czynników fizycznych i chemicznych, takich jak: promieniowanie UV (15 min, 30 min), temperatura (100°C, 2-8°C, -20°C), etanol (70%, 96%), środki dezynfekcyjne, alkohol benzyłowy, podchloryn sodu, formalina, kwas cytrynowy (E330), maltodekstryna, cytrynian sodu (E331), mleczan wapnia (E327), glikol propylenowy, benzoian sodu, wodorowęglan sodu i 10% NaOH. Wykorzystano dostępne środki fizyczne i chemiczne, które mogą być wykorzystane do zwiększenia bezpieczeństwa biologicznego, np. środowiska i żywności jako środki dezynfekujące lub konserwujące. W przypadku

niektórych substancji sporządzono roztwory w stężeniach najczęściej spotykanych w medycynie, żywności czy kosmetykach.

Ze względu na brak lub znikomy wpływ czynników badanych na wyniki badań w metodzie mikroskopowej i immunoenzymatycznej w etapie 2., w etapie 3. badań wybrano inne czynniki (za wyjątkiem kwasu cytrynowego), celem rozszerzenia badania i sprawdzenia wpływu innych czynników na wykrywanie *Giardia intestinalis*.

Diagnostykę laboratoryjną prowadzono metodą mikroskopową i metodą real-time PCR, przy użyciu aparatu LightCycler 480 II firmy Roche. Analizę wpływu każdego czynnika powtórzono 4-krotnie, a kontrolę badania stanowiła czysta hodowla *G. intestinalis*. Kryterium wyniku pozytywnego w ocenie przeżywalności pasożytów była obserwacja ruchu trofozoitów w co najmniej jednym preparacie w metodzie mikroskopowej, natomiast w metodzie real-time PCR było to wykrycie DNA pasożyta w co najmniej jednej reakcji.

W badaniu wykorzystano trofozoity będące dominującą formą w kale biegunkowym. W rutynowej diagnostyce wykrywane są cysty pierwotniaka, jednakże w przeprowadzonym badaniu istotne znaczenie miało wykrywanie obecności materiału genetycznego *Giardia intestinalis*, a nie konkretnej formy rozwojowej. Celem badania było porównanie metody mikroskopowej i real-time PCR w wykrywaniu pierwotniaka po poddaniu działaniu najczęściej stosowanych procedur dezynfekcyjnych oraz najczęściej wykorzystywanych środków m. in. w medycynie, produkcji żywności czy kosmetyce.

4. ETAP 4

Ocena seroprewalencji *Toxoplasma gondii* u osób o wysokim ryzyku zakażenia wirusem HIV wśród mieszkańców województwa kujawsko-pomorskiego.

Oceniono seroprewalencję *Toxoplasma gondii* w populacji osób o wysokim ryzyku zakażenia wirusem HIV będących mieszkańcami województwa kujawsko-pomorskiego. Przebadano 43 próbki surowicy krwi pobrane od pacjentów Punktu Konsultacyjno-Diagnostycznego Krajowego Centrum ds. AIDS w Bydgoszczy w kierunku obecności przeciwciał anti-HIV-1/HIV-2 i antygenu p24 oraz przeciwciał w klasie IgM i IgG przeciwko *Toxoplasma gondii*. W przypadku dodatniego wyniku badania na obecność przeciwciał przeciwko *Toxoplasma gondii* w klasie IgG wykonywano test awidności przeciwciał IgG.

Badania wykonano metodą enzymoimmunofluorescencyjną (ELFA, ang. enzyme-linked fluorescent assay) przy użyciu analizatora immunologicznego VIDAS firmy bioMerieux.

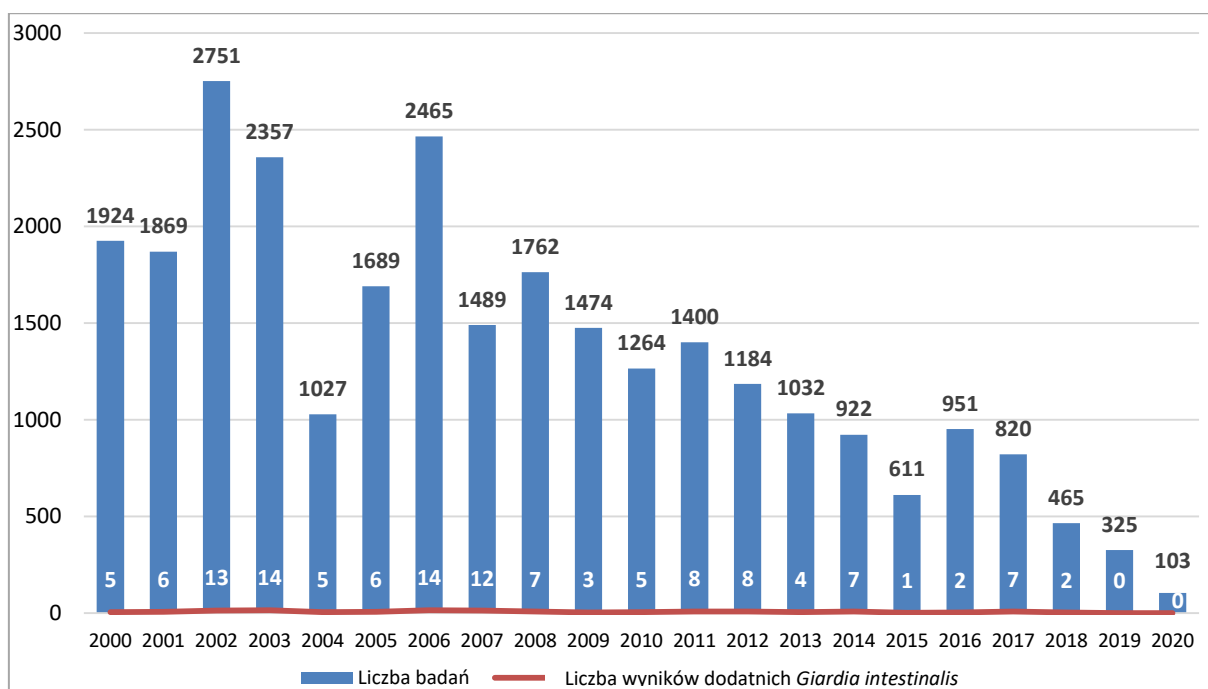
5. ETAP 5

Postępy i wyzwania w diagnostyce toksoplazmozy u pacjentów zakażonych wirusem HIV.

Dokonano analizy literatury dotyczącej dostępnych metod diagnostycznych służących wykrywaniu *Toxoplasma gondii* u osób immunoniekompetyentnych, zwłaszcza u pacjentów zakażonych wirusem HIV. Przeanalizowano dostępne metody serologiczne, jak i molekularne.

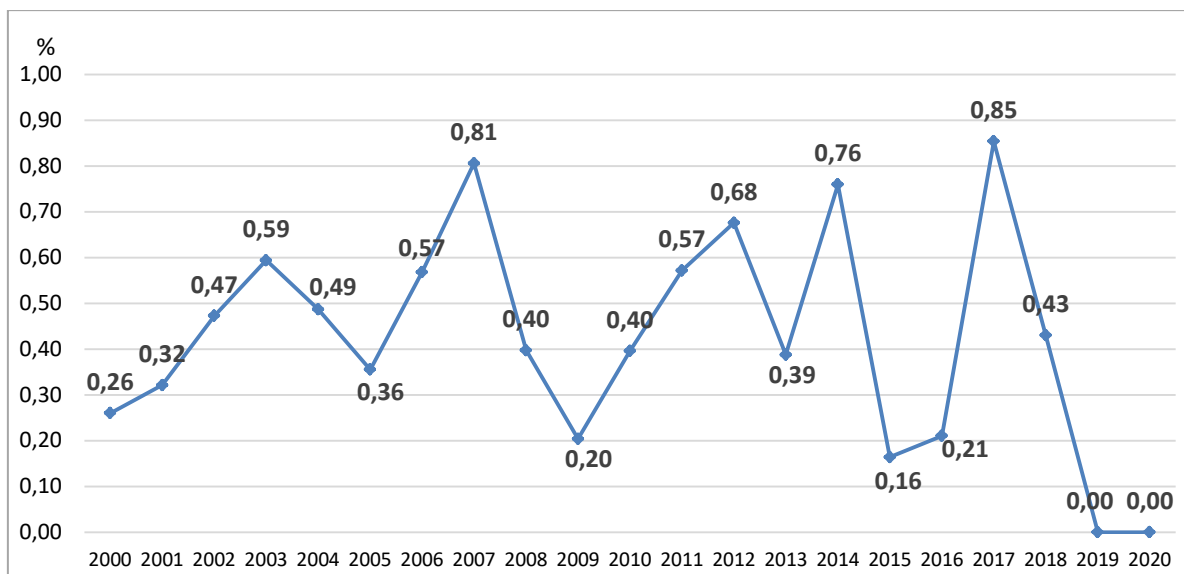
IV. OMÓWIENIE WYNIKÓW

W latach 2000-2020 Wojewódzkiej Stacji Sanitarno-Epidemiologicznej w Bydgoszczy przebadano łącznie 27 884 próbek w kierunku obecności *Giardia intestinalis*. Obecność pasożyta stwierdzono w 129 próbkach spośród badanych. Stosunek liczby wszystkich badań parazytologicznych do liczby dodatnich wyników badań w kierunku obecności *Giardia intestinalis* w poszczególnych latach w badanym okresie przedstawia Ryc. 5.



Ryc. 5. Prewalencja *Giardia intestinalis* w wybranej populacji województwa kujawsko-pomorskiego w latach 2000-2020.

Analiza danych wskazuje, że odsetek dodatnich wyników badań w kierunku *Giardia intestinalis* w latach 2000-2018 w populacji mieszkańców województwa kujawsko-pomorskiego był zmienny na przestrzeni lat i utrzymywał się na poziomie 0,16% - 0,85% (średnio 0,47%). W ostatnich latach prowadzenia badań w kierunku obecności *Giardia intestinalis* w ramach niniejszej pracy (lata 2019 i 2020) nie stwierdzono dodatnich wyników potwierdzających zarażenie tym pasożytem (Ryc. 6).



Ryc. 6. Odsetek dodatnich wyników badań w kierunku *Giardia intestinalis* w wybranej populacji województwa kujawsko-pomorskiego w latach 2000-2020.

Niski odsetek zarażeń może wskazywać na dobre warunki sanitarno-higieniczne i materialno-bytowe osób badanych. Dane odnoszące się do częstości występowania wykrywanych pasożytów przewodu pokarmowego w latach 2000-2020 wśród mieszkańców województwa kujawsko-pomorskiego mogą być jednak niedoszacowane ze względu na to, iż badaniami objęto tylko część populacji. Na terenie województwa kujawsko-pomorskiego istnieje bowiem kilka laboratoriów prowadzących diagnostyczne badania parazytologiczne. W związku z niską prevalencją *Giardia inetstinalis*, a tym samym ograniczoną dostępnością próbek dodatnich mogących stanowić materiał badany, część badań została wykonana z wykorzystaniem trofozoitów pierwotniaka pochodzących z hodowli aksecicznej.

Pozostałe wyniki badań, ich interpretacja oraz dyskusja uzyskanych wyników zostały opisane w cyklu publikacji prezentowanych poniżej. Na cykl publikacji składają się trzy prace oryginalne i jedna praca poglądowa.

WYKAZ PUBLIKACJI

1. Smoguła Małgorzata, Mila-Kierzenkowska Celestyna, Szewczyk-Golec Karolina. The Influence of Selected Factors on the Detection of *Giardia intestinalis* by Microscopic and Immunoenzymatic Methods. Iran J Parasitol. 2023;18(1): 30-37. <https://ijpa.tums.ac.ir/index.php/ijpa/article/view/3687>

Punktacja Ministerstwa Edukacji i Nauki = 70 pkt., wskaźnik Impact Factor = 1,217.

2. Smoguła Małgorzata, Wesołowski Roland, Pawłowska Marta, Mila-Kierzenkowska Celestyna. Influence of Selected Factors on the Survival Assessment and Detection of *Giardia intestinalis* DNA in Axenic Culture. Pathogens 2023, 12(2):316. <https://doi.org/10.3390/pathogens12020316>

Punktacja Ministerstwa Edukacji i Nauki = 100 pkt., wskaźnik Impact Factor = 4,531.

3. Smoguła Małgorzata, Pawłowska Marta, Wesołowski Roland, Szewczyk-Golec Karolina, Mila-Kierzenkowska Celestyna. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in people at an increased risk of HIV infection – a pilot study. Diagnostyka Laboratoryjna 2022; 58 (1): 9-14. <https://doi.org/10.5604/01.3001.0016.0045>

Punktacja Ministerstwa Edukacji i Nauki = 40 pkt.

4. Wesołowski Roland, Pawłowska Marta, Smoguła Małgorzata, Szewczyk-Golec Karolina. Advances and Challenges in Diagnostics of Toxoplasmosis in HIV-Infected Patients. Pathogens 2023, 12(1):110. <https://doi.org/10.3390/pathogens12010110>

Punktacja Ministerstwa Edukacji i Nauki = 100 pkt., wskaźnik Impact Factor = 4,531.

Sumaryczna punktacja wg Ministerstwa Edukacji i Nauki = 310 punktów

Sumaryczny wskaźnik IF = 10,279

PUBLIKACJA 1

Smogula Małgorzata, Mila-Kierzenkowska Celestyna, Szewczyk-Golec Karolina. The Influence of Selected Factors on the Detection of *Giardia intestinalis* by Microscopic and Immunoenzymatic Methods. Iran J Parasitol. 2023;18(1): 30-37. <https://ijpa.tums.ac.ir/index.php/ijpa/article/view/3687>

W badaniach oceniono wpływ wybranych czynników biologicznych, takich jak szczepy bakteryjne, wirusy oraz chemicznych - substancje dodawane do żywności na wykrywanie *Giardia intestinalis* metodami mikroskopowymi i immunoenzymatycznymi.

W pracy wykazano, że cysty *Giardia intestinalis* wykrywane są metodami mikroskopowymi, jak i immunoenzymatycznymi z taką samą czułością, wynoszącą 100%. Stwierdzono ponadto, że obecność mikroorganizmów, takich jak bakterie i wirusy, nie wpływa na wykrywanie *Giardia intestinalis* zarówno metodami mikroskopowymi, jak i immunoenzymatycznymi w próbkach kału. Wynik oznaczenia *G. intestinalis* po dodaniu sorbinianu potasu był dodatni w 90% próbek, natomiast po dodaniu kwasu cytrynowego tylko w 25% próbek.

Wyniki badań wskazują, że kwas cytrynowy zmniejsza wykrywalność, a zatem zapewne przeżywalność *G. intestinalis*, co sugeruje, że dodawany do żywności jako przeciwutleniacz może zwiększać jej bezpieczeństwo.



Tehran University of Medical
Sciences Publication
<http://tums.ac.ir>

Iran J Parasitol

Open access Journal at
<http://ijpa.tums.ac.ir>



Iranian Society of Parasitology
<http://isp.tums.ac.ir>

Original Article

The Influence of Selected Factors on the Detection of *Giardia intestinalis* by Microscopic and Immunoenzymatic Methods

*Malgorzata Smogula, Celestyna Mila-Kierzenkowska, Karolina Szewczyk-Golec

Department of Medical Biology and Biochemistry, L. Rydygier Collegium Medicum in Bydgoszcz, Nicolaus Copernicus University in Toruń, Toruń, Poland

Received 14 Aug 2022
Accepted 12 Nov 2022

Keywords:

Food additives;
Giardia intestinalis;
Immunoenzymatic method;
Microscopic method

*Correspondence Email:

malgorzata.smogula@gmail.com

Abstract

Background: *Giardia intestinalis* is one of the most common parasites in humans. Contaminated food and water can be a source of infection. Substances added to food are intended to increase its safety. We aimed to determine the influence of various microorganisms and compounds that stimulate digestive functions, as well as preservatives and antioxidants on the detection of *G. intestinalis* by microscopic and immunoenzymatic methods.

Methods: Twenty stool samples, archived in 1998-2018 in the Provincial Sanitary and Epidemiological Station in Bydgoszcz (Poland), collected both from patients referred for parasitic examinations by a doctor of a medical facility and from private individuals, were used to assess the impact of selected factors (such as bacterial strains, viruses and substances added to food) on the detection of *G. intestinalis* by microscopic and immunoenzymatic methods.

Results: *G. intestinalis* was detected by both microscopic and immunoenzymatic methods with the same sensitivity (100%). The result of the *G. intestinalis* determination was positive in 90% of the samples after the addition of potassium sorbate, and in 25% of the samples after the addition of citric acid.

Conclusion: The presence of other microorganism such as bacteria and viruses does not influence on the detection of *G. intestinalis* by microscopic and immunoenzymatic methods in stool samples. Citric acid as an antioxidant added to foods affects the detection of *G. intestinalis*. Due to the small number of samples used, it is necessary to continue research on the impact of various factors on the detection of protozoa.



Copyright © 2023 Smogula et al. Published by Tehran University of Medical Sciences.

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International license.

(<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>). Non-commercial uses of the work are permitted, provided the original work is properly cited

Introduction

Giardia intestinalis is a cosmopolitan flagellate that can be present in the small intestine of the human being in the form of trophozoite and cysts (1). The protozoan is one of the most common parasites that cause disease in humans. It is the main cause of water-diarrhea in the United States and Europe (2). The incidence rate is between 10% and 50% in developing countries and between 2% and 5% in many developed countries (3). *G. intestinalis* may be an important cause of mass diarrhea in day-care centers due to the transmission of the fecal-oral infection among children (4). Due to the fact that this is the most common way of spreading the infection, it also applies to patients of psychiatric institutions and members of their families, as well as people who prefer oral-genital or oral-anal relations (5). The infection can also be caused by consumption of food and drinking water contaminated with stools and less frequently may be due to fertilization of crops, as the presence of protozoan cysts was found on vegetables and fruits (1).

Parasites transmitted by food are classified as one of the contemporary food safety hazards, hence both the effective elimination of all hazards and their systematic and effective control are needed in order to provide food of adequate quality as well as health security (6). For this reason, various substances are added to food, as defined in the Ordinance of the Minister of Health of 22 November 2010 on permitted additional substances.

Fixative additives constitute one of the most important groups of food additives, in respect of the safety and quality of food products (7). Eight groups are distinguished among additional substances:

- 1) Colorants (E100-199),
- 2) Preservative (E200-299),
- 3) Acidity regulators (E300-399),

- 4) Thickener, stabilizer, emulsifier (E400-499),
- 5) Anticaking agents (E500-599),
- 6) Flavour enhancer (E600-699),
- 7) Miscellaneous (E700-999),
- 8) Additional chemicals (E1000-1999) (8).

The use of preservatives allows primarily to extend the shelf life of some products. The mechanism of action of preservatives is related to their effects on the biochemical processes of the microbe cell, in particular:

- Destruction of the cell wall, e.g. by reducing its permeability, plasmolysis or denaturation,
- Interference with the genetic mechanism, e.g. by its damage (mutagenic effects),
- Inactivation of some enzymes (e.g. reductive action of sulphites on disulphide bonds of enzymes), inactivation of metabolites necessary for the development of microorganisms (e.g. vitamins, amino acids) (9).

Antioxidants are a group of agents that prolong the stability of food products by inhibiting oxidation as a result of accepting free radicals initiating the oxidation process and introducing a hydrogen atom into a free radical. The resulting radical of the antioxidant is stable and forms stable products. Antioxidants used in food are divided into:

- Typical antioxidants (natural or synthetic),
- Substances with an antioxidant effect in addition to other activities,
- Substances supporting antioxidants, so-called synergists (10).

Thickeners affect the consistency of products, increase their elasticity, and also inhibit the formation of foam in production processes, slow down crystallization, emulsification and gelation (11).

The aim of this study was to determine the effect of various microorganisms and compounds that stimulate digestive functions, as well as preservatives and antioxidants on the detection of *G. intestinalis* by microscopic and immunoenzymatic methods.

Materials & Methods

Twenty stool samples, archived in 1998-2018 in the Provincial Sanitary and Epidemiological Station in Bydgoszcz (Poland), collected both from patients referred for parasitic examinations by a doctor of a medical facility and from private individuals, were used to assess the impact of selected factors on the detection of *G. intestinalis* by microscopic and immunoenzymatic methods.

To determine the effect of the presence of other microorganisms, such as bacteria and viruses, on the test results in the detection of *G. intestinalis*, three reference strains were used, namely *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076, *Shigella sonnei* ATCC 9290 and *Yersinia enterocolitica* ATCC 23715. In addition, a sample containing noroviruses was used. Suspensions with a density of 0.5 McF were prepared in a solution of 0.9% NaCl.

In the case of the assessment of the effect of substances added to food on the detection of protozoa, potassium sorbate E202, guar gum E412, monosodium glutamate E621 and citric acid E330 were used. All substances were dissolved in distilled water before use.

Laboratory diagnostics were carried out by microscopic and immunoenzymatic methods. The microscopic examination included four methods: a direct smear in 0.9% NaCl solution, direct smear in Lugol's fluid, Faust's flotation (zinc sulphate) and decantation. Preparations were viewed under a magnification of

10x and 20x, and the identification was carried out at a magnification of 40x. The enzyme immunoassay from TechLab (30405) was used to detect the presence of the coproantigen of *G. intestinalis* (GSA-65).

Results

Twenty fecal samples were analyzed, the result of detection of the *G. intestinalis* antigen by ELISA was positive in all samples after adding *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076. In the case of *S. sonnei* ATCC 9290, a positive immunoenzymatic test was observed. All *G. intestinalis* antigen assays were positive after adding the strain *Y. enterocolitica* ATCC 23715. All samples gave a positive result for the protozoan antigen after the addition of noroviruses to fecal samples containing *G. intestinalis* (Table 1).

Taking into account the microorganisms added to fecal samples (bacteria and viruses), in the microscopic method, the presence of *G. intestinalis* cysts was detected in 100% of stool specimens.

In the case of substances added to food, the analysis of the results showed that after the addition of potassium sorbate, the result of the *G. intestinalis* antigen was positive in 18 (90%) samples, while 2 (10%) samples gave negative results. In the case of guar gum, a positive ELISA test was recorded in all samples. After the addition of monosodium glutamate, 100% of the samples were positive in the enzyme immunoassay. In turn, the addition of citric acid allowed the detection of the protozoan antigen in 5 samples, and in 15 cases the result of the determination was negative, which accounted for 25% and 75% respectively (Table 2).

Table 1: Absorbance values of the *Giardia intestinalis* antigen assay after the addition of *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076, *Shigella sonnei* ATCC 9290, *Yersinia enterocolitica* ATCC 23715 and noroviruses.

Sample number	<i>Salmonella Enteritidis</i>		<i>Shigella sonnei</i>		<i>Yersinia enterocolitica</i>		Noroviruses	
	Reading value	Result	Reading value	Result	Reading value	Result	Reading value	Result
1	2,088	POS	2,122	POS	2,107	POS	2,119	POS
2	0,762	POS	0,960	POS	2,058	POS	2,123	POS
5	2,105	POS	2,039	POS	2,116	POS	2,038	POS
8	1,895	POS	1,977	POS	2,023	POS	2,008	POS
43	2,122	POS	2,107	POS	2,121	POS	2,109	POS
47	2,117	POS	2,087	POS	2,120	POS	2,082	POS
58	0,416	POS	2,116	POS	0,431	POS	2,111	POS
64	2,052	POS	2,075	POS	2,052	POS	2,069	POS
71	1,842	POS	2,036	POS	1,847	POS	2,118	POS
85	2,075	POS	2,119	POS	2,087	POS	2,117	POS
88	2,096	POS	1,989	POS	2,099	POS	1,734	POS
109	2,072	POS	2,051	POS	2,076	POS	2,054	POS
111	2,080	POS	2,082	POS	2,119	POS	2,105	POS
113	1,660	POS	1,558	POS	1,681	POS	2,053	POS
114	2,037	POS	2,113	POS	2,039	POS	2,116	POS
122	2,050	POS	2,072	POS	2,054	POS	2,073	POS
123	2,105	POS	2,132	POS	2,107	POS	2,122	POS
133	2,085	POS	2,125	POS	2,081	POS	2,124	POS
134	2,110	POS	2,042	POS	2,109	POS	2,035	POS
137	2,075	POS	2,055	POS	2,076	POS	2,043	POS

Table 2: Absorbance values of the *Giardia intestinalis* antigen assay after the addition of potassium sorbate (E202), guar gum (E412), monosodium glutamate (E621) and citric acid (E330)

Sample number	Potassium sorbate		Guar gum		Monosodium glutamate		Citric acid	
	Reading value	Result	Reading value	Result	Reading value	Result	Reading value	Result
1	2,100	POS	2,129	POS	2,109	POS	2,083	POS
2	0,336	POS	0,878	POS	0,400	POS	0,016	NEG
5	0,185	POS	2,027	POS	1,935	POS	0,007	NEG
8	0,979	POS	1,310	POS	0,852	POS	0,007	NEG
43	0,223	POS	2,103	POS	2,117	POS	0,007	NEG
47	2,020	POS	2,079	POS	2,116	POS	0,020	NEG
58	0,016	NEG	0,157	POS	0,284	POS	0,012	NEG
64	0,888	POS	2,065	POS	2,045	POS	0,008	NEG
71	0,492	POS	1,869	POS	1,479	POS	0,006	NEG
85	2,070	POS	2,114	POS	2,072	POS	1,148	POS
88	0,005	NEG	1,648	POS	1,390	POS	0,011	NEG
109	0,767	POS	2,040	POS	2,049	POS	0,335	POS
111	1,240	POS	1,941	POS	1,143	POS	0,020	NEG
113	0,437	POS	1,088	POS	0,323	POS	0,008	NEG
114	0,280	POS	2,090	POS	1,733	POS	0,008	NEG
122	0,697	POS	2,065	POS	2,048	POS	0,010	NEG
123	0,820	POS	2,122	POS	2,099	POS	0,032	NEG
133	1,856	POS	2,114	POS	2,078	POS	0,145	POS
134	2,082	POS	2,030	POS	2,107	POS	1,663	POS
137	1,853	POS	2,046	POS	2,055	POS	0,034	NEG

The mean differences in the absorbance value in the enzyme immunoassay test are shown in Fig. 1. In the case of assays after the addition of microorganisms, it was observed that the average absorbance was slightly higher

than at the first reading, whereas for substances added to food, the average absorbance readings were lower, compared to the first reading.

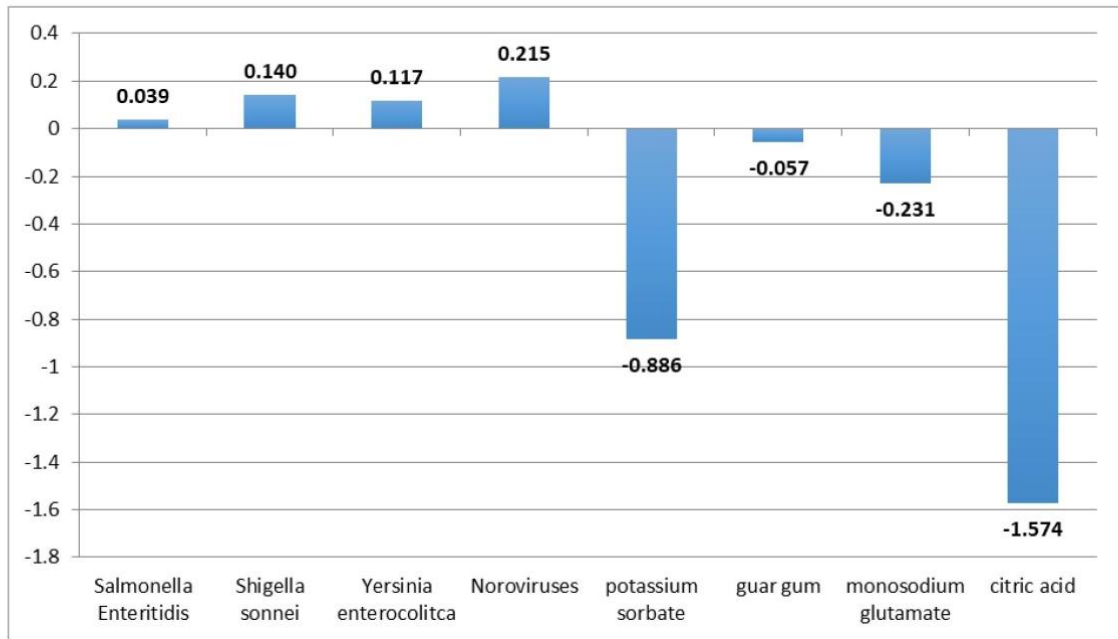


Fig. 1: Average differences in the absorbance between the first reading and the next after the addition of microorganisms or substances added to food

Taking into account the substances added to food, most often in microscopic preparations, cysts were observed after the addition of potassium sorbate - 90%, guar gum - 100% and monosodium glutamate - 100%. However, in the case of citric acid microscopic examination, the presence of cysts was found in 15% of the samples.

Discussion

The analysis shows that *G. intestinalis* was detected by both microscopic and immunoenzymatic methods with the same sensitivity (100%). Rogawski et al. (12) indicated a different situation because in their studies the sensitivity of microscopy was 46.2%, and the speci-

ficity was 99.3%, compared to the enzyme immunoassay. A positive microscopic examination was 21% less likely to be reported when the stool was watery or liquid than when it was formed. However, no correlation was observed between the stool consistency and the results of the EIA test. Addis et al. (13) detected *G. intestinalis* by microscopy in 99 samples from children attending day-care centers. 93 samples were positive - sensitivity of 93.9% using the ELISA test. In the microscopic examination, 534 negative samples were found; among them the ELISA was positive for 32 samples. Taking into account the sensitivity of both methods for all true positive samples, the sensitivity (83.2%) for microscopy and for the enzyme immunoassay

was 95% (13). In turn, in the US, fecal samples were examined by microscopic, immunofluorescent and immunoenzymatic methods. Of all 512 samples, 33 were positive using an immunofluorescence test, giving a diagnostic sensitivity of 100%. For the enzyme immunoassay, the sensitivity was 97%, as *G. intestinalis* was detected in 32 samples from 33 positive. The least sensitive was the microscopic method (81.8%), in which 27 samples were found to be positive for protozoa (14).

In this study, stool samples were used from patients referred for parasitic examinations by a physician of a medical facility or from private individuals. In the examination of samples from clinical microbiological laboratories and day care centers for young children, three methods were used to detect *G. intestinalis*: microscopy, immunoelectrophoresis counter-current (CIE) and ELISA. For samples derived from children attending children's centers, the sensitivity of CIE was 88% and of ELISA - 94% when compared to microscopy, while for laboratory samples, it was 96% and 90%, respectively (15).

The detection of *G. intestinalis* by means of microscopy, direct immunofluorescence (DIF) and flow cytometry (FC) was compared at the Children's Hospital of the University of Mansour. The presence of the protozoan was found in 40, 52 and 38 samples respectively. Compared to DIF, the sensitivity of microscopy was 76.9%, while FC had a sensitivity of 73.1% (16).

In turn, Behr et al. (17), in addition to the methods used by a presented study, to detect *G. intestinalis*, performed a serological test for the presence of IgG, IgM and IgA antibodies in adults who experienced gastrointestinal symptoms after travel. Microscopically, the presence of the parasite was found in 74 stool specimens, whereas the coproantigen was detected in 73 samples (sensitivity 98.6%). However, by comparing microscopy with the enzyme immunoassay and serum antibody testing, the sensitivity was 87.5%, 57% (IgG) and 50% (IgM), respectively. Serology seems to be

less diagnostically useful due to its lower accuracy (17). In a prospective study to compare the routine method and direct immunofluorescence (DFA) in the detection of *Giardia*, a significantly higher sensitivity for DFA was obtained - 99.2%, while for the microscopic method it was 66.4% (18). No dependence was observed while analyzing the influence of selected microorganisms on *G. intestinalis* determination, which confirms the possibility of using microscopic and immunoenzymatic methods in the diagnosis of protozoan infections with co-existing infections with intestinal pathogens. In turn, as far as compounds that stimulate digestive functions, preservatives and antioxidants are concerned, a small influence of potassium sorbate and a significant effect of citric acid on the results of the determinations were found. The antibacterial properties of citric acid were previously described in the literature (19-20).

There are no papers on the influence of other microorganisms and compounds stimulating digestive functions, preservatives and antioxidants on the detection of *G. intestinalis* in the literature. It is necessary to continue research on the impact of various factors on the detection of protozoa due to the small number of samples used in presented study.

Conclusion

The presence of other microorganisms does not affect the results of microscopic and immunoenzymatic tests used to detect the presence of *G. intestinalis* in stool samples.

Citric acid affects the result of the test for *G. intestinalis* thus as an antioxidant added to foods, it can increase their safety.

Acknowledgements

No financial support was received for this study.

Conflict of Interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Halliez MC, Buret AG. Extra-intestinal and long term consequences of *Giardia duodenalis* infections. *World J Gastroenterol*. 2013 Dec 21;19(47):8974-85. doi: 10.3748/wjg.v19.i47.8974.
- Rossignol JF. *Cryptosporidium* and *Giardia*: treatment options and prospects for new drugs. *Exp Parasitol*. 2010 Jan;124(1):45-53. doi: 10.1016/j.exppara.2009.07.005.
- Choy S, Al-Mekhlafi H, Mahdy M, et al. Prevalence and Associated Risk Factors of *Giardia* Infection among Indigenous Communities in Rural Malaysia. *Sci Rep*. 2014 4:6909. doi: 10.1038/srep06909.
- Roshidi N, Mohd Hassan NH, Abdul Hadi A, Arifin N. Current state of infection and prevalence of giardiasis in Malaysia: a review of 20 years of research. *Peer J*. 2021 Nov 11;9:e12483. doi: 10.7717/peerj.12483.
- Lee R. Health care problems of lesbian, gay, bisexual, and transgender patients. *West J Med*. 2000 172 (6): 403-8. doi: 10.1136/ewj.172.6.403.
- Franssen F, Gerard C, Cozma-Petruț A, et al. Inactivation of parasite transmission stages: Efficacy of treatments on food of animal origin. *Trends in Food Science & Technology*. 2019; 83: 114-128. doi: 10.1016/j.tifs.2018.11.009.
- Awuchi, CG, Twinomuhwezi, H, Igwe, VS, et al. Food Additives and Food Preservatives for Domestic and Industrial Food Applications. *Journal of Animal Health*. 2020; 2(1): 1-16.
- Faustino M, Veiga M, Sousa P, Costa EM, Silva S, Pintado M. Agro-Food Byproducts as a New Source of Natural Food Additives. *Molecules*. 2019 Mar 18;24(6):1056. doi: 10.3390/molecules24061056.
- Silva MM, Lidon FC. Food preservatives – An overview on applications and side effects. *Emirates Journal of Food and Agriculture*. 2016. 28(6): 366-373. doi: 10.9755/ejfa.2016-04-351.
- Silva MM, Lidon FC. An overview on applications and side effects of antioxidant food additives. *Emirates Journal of Food and Agriculture*. 2016. 28(12): 823-832. doi: 10.9755/ejfa.2016-07-806.
- Saltmarsh M, Chapter 1: Food Additives and Why They Are Used, in *Saltmarsh's Essential Guide to Food Additives (5)*, 2020, 1-9. doi: 10.1039/9781839161063-00001.
- Rogawski ET, Bartelt LA, Platts-Mills JA, et al. Determinants and Impact of *Giardia* Infection in the First 2 Years of Life in the MAL-ED Birth Cohort. *J Pediatric Infect Dis Soc*. 2017; 6(2):153–60. doi: 10.1093/jpids/piw082.
- Addiss DG, Mathews HM, Stewart JM, et al. Evaluation of a Commercially Available Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for *Giardia lamblia* Antigen in Stool. *J Clin Microbiol*. 1991; 29: 1137-1142. doi: 10.1128/jcm.29.6.1137-1142.1991.
- Zimmerman SK, Needham CA. Comparison of Conventional Stool Concentration and Preserved-Smear Methods with Merifluor *Cryptosporidium*/*Giardia* Direct Immunofluorescence Assay and ProSpecT *Giardia* EZ Microplate Assay for Detection of *Giardia lamblia*. *J Clin Microbiol*. 1995; 33: 1942–1943. doi: 10.1128/jcm.33.7.1942-1943.1995.
- Janoff EN, Craft JC, Pickering LK, et al. Diagnosis of *Giardia lamblia* Infections by Detection of Parasite-Specific Antigens. *J Clin Microbiol*. 1989; 27: 431-435. doi: 10.1128/jcm.27.3.431-435.1989.
- El-Nahas, HA, Salem DA, El-Henawy AA, et al. *Giardia* Diagnostic Methods in Human Fecal Samples: A Comparative Study. *Cytometry B Clin Cytom*. 2013; 84B:44–49. doi: 10.1002/cyto.b.21048.
- Behr MA, Kokoskin E, Gyorkos TW, et al. Laboratory diagnosis for *Giardia lamblia* infection: A comparison of microscopy, coprodiagnosis and serology. *Can J Infect Dis*. 1996; 8(1):33-38. doi: 10.1155/1997/270179.
- Alles AJ, Waldron MA, Sierra LS, et al. Prospective Comparison of Direct Immunofluorescence and Conventional Staining Methods for Detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* spp. in Human Fecal Specimens. *J Clin Microbiol*. 1995; 33: 1632–1634. doi: 10.1128/jcm.33.6.1632-1634.1995.

19. Al-Nabulsi AA, Olaimat AN, Osaili TM, et al. Use of acetic and citric acids to control *Salmonella Typhimurium* in tahini (sesame paste). Food Microbiol. 2014; 42, 102–108. doi: 10.1016/j.fm.2014.02.020.
20. Bermúdez-Aguirre D, Barbosa-Cánovas GV. Disinfection of selected vegetables under non-thermal treatments: Chlorine, acid citric, ultra-violet light and ozone. Food Control. 2013; 29(1), 82–90. doi: 10.1016/j.foodcont.2012.05.073.

PUBLIKACJA 2

Smoguła Małgorzata, Wesołowski Roland, Pawłowska Marta, Mila-Kierzenkowska Celestyna. Influence of Selected Factors on the Survival Assessment and Detection of *Giardia intestinalis* DNA in Axenic Culture. *Pathogens* 2023, 12(2):316. <https://doi.org/10.3390/pathogens12020316>

W badaniach oceniono wpływ wybranych czynników fizycznych i chemicznych na ocenę przeżywalności i wykrywanie DNA *Giardia intestinalis* w hodowli akseniczej. Diagnostykę laboratoryjną prowadzono metodą mikroskopową i metodą real-time PCR.

W przeprowadzonych badaniach z użyciem metody mikroskopowej nie zaobserwowano wpływu 5 substancji (22,7%): maltodekstryny, cytrynianu sodu E331, mleczanu wapnia E327, glikolu propylenowego i wodorowęglanu sodu na wykrywanie *G. intestinalis*. Natomiast brak ruchu trofozoitów odnotowano w przypadku 17 pozostałych czynników. Oceniając wpływ wszystkich czynników na wykrywanie DNA *G. intestinalis* metodą real-time PCR, 19 z nich nie wykazało wpływu na przebieg reakcji. Jedynie w przypadku trzech substancji stwierdzono ich wpływ na wykrycie obecności materiału genetycznego pierwotniaka i były to podchloryn sodu, formalina i wodorowęglan sodu.

W przypadku maltodekstryny, cytrynianu sodu E331, mleczanu wapnia E327 i glikolu propylenowego w obu metodach uzyskano takie same wyniki jak w przypadku czystej hodowli *G. intestinalis*, tj. zaobserwowano ruch trofozoitów i wykryto materiał genetyczny pierwotniaka. Wpływ promieniowania UV, różnych wartości temperatury, etanolu, środków dezynfekcyjnych, kwasu cytrynowego E330, benzoesu sodu i 10% NaOH spowodował, że w metodzie mikroskopowej nie wykazano ruchu trofozoitów, natomiast uzyskano wynik dodatni w reakcji real-time PCR. Z kolei w przypadku wodorowęglanu sodu zaobserwowano ruch trofozoitów, ale nie stwierdzono obecności DNA *Giardia*, co może wskazywać, że jest on inhibitorem reakcji PCR.

Nowoczesne metody diagnostyczne zwiększają możliwości wykrywania pasożytów poprzez detekcję ich materiału genetycznego. Metody takie jak PCR charakteryzują się większą czułością diagnostyczną niż techniki mikroskopowe. W przypadku wykluczenia obecności *Giardia intestinalis* wyłącznie na podstawie metody mikroskopowej możliwe jest uzyskanie wyników fałszywie ujemnych, gdyż trofozoity bardzo szybko giną w materiale klinicznym.

Article

Influence of Selected Factors on the Survival Assessment and Detection of *Giardia intestinalis* DNA in Axenic Culture

Małgorzata Smogula ^{*}, Roland Wesołowski ^{*}, Marta Pawłowska  and Celestyna Mila-Kierzenkowska 

Department of Medical Biology and Biochemistry, Ludwik Rydygier Collegium Medicum in Bydgoszcz, Nicolaus Copernicus University in Toruń, 87-100 Toruń, Poland

* Correspondence: malgorzata.smogula@gmail.com (M.S.); roland@cm.umk.pl (R.W.)

Abstract: *Giardia intestinalis* is one of the most common food-borne protozoa. The sensitivity of pathogens to physical and chemical factors is the basis for developing measures to reduce the incidence of the population. Several methods are available to detect the presence of *G. intestinalis*. The study determines the influence of 22 selected factors on the survival assessment and detection of *G. intestinalis* DNA in trophozoites axenically cultured. The influence of a given factor on the test result was observed in the case of 17 factors (77.3%) in the microscopic method, while only in the case of 3 (13.6%) substances in the real-time PCR method. Prevention of *G. intestinalis* infections, e.g., by ensuring food and water safety, is a crucial issue affecting public health. The experiment was conducted on trophozoites as the first approach. It is necessary to continue research and observe the epidemiological situation. In future studies, the impact of the studied factors on the survival assessment and detection of *Giardia intestinalis* DNA in axenically cultured cysts should be determined.

Keywords: *Giardia intestinalis*; microscopic method; real-time PCR method



Citation: Smogula, M.; Wesołowski, R.; Pawłowska, M.; Mila-Kierzenkowska, C. Influence of Selected Factors on the Survival Assessment and Detection of *Giardia intestinalis* DNA in Axenic Culture. *Pathogens* **2023**, *12*, 316. <https://doi.org/10.3390/pathogens12020316>

Academic Editor: Annunziata Giangaspero

Received: 11 January 2023

Revised: 9 February 2023

Accepted: 13 February 2023

Published: 14 February 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Giardia intestinalis (syn. *Giardia lamblia* and *Giardia duodenalis*) is a protozoan parasite found in the small intestine of humans and some animals. The prevalence of *Giardia* infection ranges from about 2–5% in the industrialized world to 20–30% in low- and middle-income countries, with children tending to be infected more frequently than adults [1]. Infection with this flagellate usually occurs after consuming food or water containing *Giardia* cysts or directly via the fecal–oral route [2]. *Giardiasis* may be asymptomatic or symptomatic, acute or chronic. The clinical picture of giardiasis is greatly influenced by the host's immune response, duration of infection, virulence, and infectious dose of the parasite. The main symptoms that may appear during infection are nausea, diarrhea (followed by dehydration), abdominal pain, vomiting, and flatulence [3,4]. During the life cycle, the protozoan forms a mobile trophozoite and an invasive cyst [5]. The trophozoite is the vegetative form and replicates in the host's small intestine. The eight flagella provide motility, and the ventral disk mediates attachment to the intestinal wall, where it gains its nutrients. More distally, in the small intestine, and even extending to the large intestine, the trophozoite encysts into a cyst that is environmentally stable and can be transmitted to the next host through the fecal–oral route [6]. Flagellar motility is a key factor in *Giardia* pathogenesis and colonization of the host small intestine [7]. It is a crucial process for initiating and maintaining infection in the gut, permitting the parasite to avoid peristaltic flow and consequently search for suitable sites to attach to the intestinal lumen [8]. The presence of preservatives in food may therefore affect the parasite's survival in the human digestive system. The weakening of the motility of trophozoites may lead to their removal from the human digestive system.

Cryptosporidium spp., *G. intestinalis*, and *Toxoplasma gondii* are the most common food-borne protozoa. The main factors contributing to the occurrence of foodborne diseases are

raw food, excessive temperature, improper storage, improper handling, undercooking, and cross-contamination. The greatest threats come from food of animal origin, fresh produce, and ready-to-eat products, which are new food safety concerns [9].

The sensitivity of pathogens to physical and chemical factors is the basis for developing measures to reduce the incidence of the population. Sensitivity to physical factors plays an essential role in the disinfection of products that either should not be treated with chemicals (fresh fruit, milk, etc.) or are exposed to low concentrations of chemicals that do not affect all types of pathogens (e.g., chlorination water, salting or marinating meat, fish, and vegetables) or have a very high resistance to chemicals, and disinfection is mainly done by physical methods (e.g., helminths). Sensitivity to drying can be both main (spices, tea, dried fruit, dried meat, and fish) and additional (dry fruit concentrates for the production of juices and juice drinks, powdered milk, powdered eggs, etc.) measures to reduce risk when processing products of plant and animal origin. Temperature sensitivity is an essential criterion for preventing the spread of biological agents among humans. High temperatures are the basis of disinfection in technological processes of product processing. Low temperatures play an essential role in the disinfection and storage of products. However, some pathogens successfully survive and reproduce at temperatures close to zero [10].

Several methods are available to detect the presence of *G. intestinalis*. Culturing intestinal protozoa allows learning about, among others, the biology of parasites, their growth rate, virulence factors, susceptibility to new drugs, and the development of resistant strains [11]. Although cultivating human intestinal protozoa is useful for detection and diagnostic purposes, routine culture techniques were not established for *Giardia* spp. in the clinical diagnostic laboratory. Cultivation of *Giardia* spp. is applied in the research laboratory for many types of studies requiring many trophozoites. The *Giardia* spp. is grown in the monoxenic and axenic type of culture system. In the monoxenic system, the parasite has been grown in the presence of a single additional flora organism species. In axenic culture, the parasite has been grown without any other accompanied alive cell. The most common and suitable used medium for *Giardia* axenic culture is Diamond's medium "TYI-S-33" [12].

The developed molecular methods demonstrate considerable specificity and sensitivity compared with microscopy and antigen detection methods. Compared with conventional methods, methods based on detecting intestinal protozoa DNA are faster, have higher sensitivity and specificity, can detect multiple parasites simultaneously, and can quantify and genotype parasitic DNA [13]. Another added advantage of these tools is the direct detection and molecular characterization of the identified parasite [14]. Some studies suggest PCR detection of these protozoa is more sensitive than methodologies such as microscopy and ELISAs, while others have noted a significant lack of sensitivity. This variation in reported sensitivities may be linked to factors such as DNA extraction methods, the presence of PCR inhibitors, gene region, and the variety of sample types being analyzed, e.g., fecal, soil, and water. A standardized molecular detection method that is rapid, affordable, sensitive, and specific across a range of sample types still needs to be discovered [15].

The small number of cases of giardiasis detected in Poland may be due to the small number of samples tested or the influence of specific factors/methods used to increase food and water safety. Food safety is one of the most significant challenges in today's world. It is essential to maintain appropriate standards when processing food.

The study aimed to determine the influence of selected factors on the survival assessment and detection of *G. intestinalis* DNA in axenic culture. Observations from this study will allow assessing whether the factors used act as potential inhibitors of the PCR reaction.

2. Materials and Methods

The research material was an axenic culture of the *G. intestinalis* strain obtained from the Institute of Maritime and Tropical Medicine in Gdynia. The TYI-S-33 medium was prepared for culturing. To 250 mL of deionized water was added 250 mg of KH_2PO_4 , 150 mg of KH_2PO_4 , 500 mg of L-cysteine, 500 mg of NaCl, 100 mg of l-ascorbic acid, 5.7 mg

of ferric ammonium citrate, 187.5 mg of bovine bile, 7.5 g Bacto Peptone, and 5 g glucose (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). All ingredients were mixed thoroughly, and the pH of the solution was adjusted to 7.0. The medium was then sterilized using syringe filters with a pore size of 0.2 µm. After filtration, 25 mL of calf serum, 0.25 mL of gentamicin solution (Krka d.d., Novo Mesto, Slovenia), and 0.9% NaCl (2 mL of gentamicin 40 mg/mL + 7 mL of 0.9% NaCl) were added. The medium was then poured into 20 mL tubes. The culture was passaged every 7 days. Before passaging *G. intestinalis*, the medium was heated to 37 °C.

The survival of *G. intestinalis* and the detection of protozoan DNA were assessed after exposure to various factors (Table 1).

Table 1. Factors used to evaluate their effect on survival and DNA detection of *Giardia intestinalis*.

Factor	Solution	Time/Volume
UV 15 min	-	15 min
UV 30 min	-	30 min
temp. 100 °C	-	10 min
temp. 2–8 °C	-	24 h
temp. −20 °C	-	24 h
ethanol 70% p.a. (POCH, Gliwice, Poland)	-	100 µL
ethanol 96% p.a. (POCH, Gliwice, Poland)	-	100 µL
disinfectant 1 (Line Antybakteria 70)—for hands, surfaces, and objects with antibacterial and antifungal properties (SYL-CHEM, Bydgoszcz, Poland)	-	100 µL
disinfectant 2 (Dezynmax TZF)—for hands, surfaces, and devices with virucidal, bactericidal, and fungicidal activity (TZF POLFA, Warsaw, Poland)	-	100 µL
disinfectant 3 (Trisept TZF)—for hands with virucidal activity (TZF POLFA, Warsaw, Poland)	-	100 µL
benzyl alcohol 100% (Biomus, Lublin, Poland)	2%	100 µL
sodium hypochlorite 15% (Biomus, Lublin, Poland)	-	100 µL
formalin 35–38% (Hardron Scientific, Kielce, Poland)	10%	100 µL
citric acid E330 (AGNEX, Białystok, Poland)	30%	100 µL
maltodextrin (AGNEX, Białystok, Poland)	10%	100 µL
sodium citrate E331 (AGNEX, Białystok, Poland)	5%	100 µL
calcium lactate E327 (AGNEX, Białystok, Poland)	1%	100 µL
propylene glycol (Hardron Scientific, Kielce, Poland)	10%	100 µL
sodium benzoate (Hardron Scientific, Kielce, Poland)	65%	100 µL
sodium bicarbonate (Hardron Scientific, Kielce, Poland)	5%	100 µL
10% NaOH (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)	-	100 µL

Available physical and chemical agents were used, which can be used to increase the biological safety of, e.g., the environment and food as disinfectants or preservatives. In the case of some substances, solutions were prepared with the most commonly used concentrations, e.g., in medicine, food, or cosmetics. The analysis of the influence of each factor was repeated 4 times, and the study control was pure *G. intestinalis* culture. The criterion of a positive result was the observation of trophozoite movement in at least one preparation in the microscopic method, while in the real-time PCR method it was the detection of DNA in at least one reaction.

The microscopic method was used to assess the survival of *G. intestinalis* after being subjected to selected factors. Laboratory diagnostics for detecting protozoan DNA was performed by real-time PCR using an open system—Light Cycler 480 II (Roche, Basel, Switzerland). The following reagents were used in the open system: manual isolation kit (Roche, High Pure PCR Template Preparation Kit—catalog no. 11796828001); DNA Process Control Kit also containing reagents to prepare Master Mix reaction mix (Roche, DNA Process Control Kit Trial Pack—Cat. No. 07339666001); and primers and controls (TIBMOBIO, Berlin, Germany, LightMix Modular *Giardia*—catalog no. 07979754001).

In the open system, the nucleic acid is isolated in the first stage of the study using the Roche manual isolation kit. The process begins with the preparation of the analyzed material. The *Giardia* culture (200 µL) is centrifuged at 7000 rpm, and then the cell pellet is resuspended in PBS (200 µL). Then, an internal control (20 µL), Binding Buffer (200 µL), and Proteinase K (40 µL) are added. After 10 min of incubation at 70 °C, isopropanol (100 µL, WARCHEM, Warsaw, Poland) is added. The sample volume is then transferred to the column (High Filter Tube) and centrifuged for 1 min at 11,000 rpm. In the next step, an inhibitor (Inhibitor Removal Buffer; 500 µL) is added to remove PCR inhibitory impurities. The sample is centrifuged again. The washing process by adding a buffer (Wash Buffer; 500 µL) aims to purify RNA from various salts, proteins, or other contaminants. The sample is then centrifuged again, and the rinsing step is repeated. After centrifugation, the sample is dried by short spinning at the maximum speed of 13,000 rpm for 10 s. In the last step, the bound nucleic acid is eluted by adding an appropriate buffer heated to 70 °C (Elution Buffer; 200 µL) and centrifuging for 1 min at 11,000 rpm. The obtained isolate (eluate) contains the tested genetic material for further diagnostics. The following research stage is a one-stage real-time PCR reaction in the LightCycler 480 II apparatus. DNA is replicated with the participation of polymerase according to the following scheme:

- Initial denaturation—separation of double-stranded DNA under the influence of high temperature;
- Attachment of primers/probes (annealing);
- Amplification (elongation).

The reaction follows the profile programmed on the device. The real-time PCR method enables the detection of amplified fragments in real time.

The LightCycler 480 II instrument measures the emitted fluorescence and plots the result. All obtained results from the reading channels are analyzed and compared with positive and negative controls.

3. Results

In the conducted studies, which analyzed the influence of 22 selected factors on the survival of *G. intestinalis*, no effect was observed in the microscopic method for 5 substances (22.7%): maltodextrin, sodium citrate E331, calcium lactate E327, propylene glycol, and sodium bicarbonate. On the other hand, the lack of trophozoite movement was noted in the case of 17 different factors (77.3%). On the other hand, when assessing the influence of all factors on the detection of *G. intestinalis* DNA using the real-time PCR method, 19 factors (86.4%) showed no effect on the course of the reaction. Only in the case of three substances (13.6%) was their influence on detecting the presence of protozoan genetic material found. The addition of sodium hypochlorite, formalin, and sodium bicarbonate resulted in the absence of *Giardia* DNA. All CP values obtained in the real-time PCR method were in the range of 21.48–28.05. The obtained results are presented in Table 2.

In the case of maltodextrin, sodium citrate E331, calcium lactate E327, and propylene glycol, the same results were obtained in both methods as for pure *G. intestinalis* culture, i.e., the movement of trophozoites was observed, and the genetic material of the protozoan was detected. Due to the influence of UV radiation, various temperatures, ethanol, disinfectants, citric acid E330, sodium benzoate, and 10% NaOH, the microscopic method did not show the movement of trophozoites. At the same time, a positive result was obtained in real-time PCR. In turn, in the case of sodium bicarbonate, the movement of trophozoites was observed, but the presence of *Giardia* DNA was not found.

Table 2. Influence of selected factors on survival and detection of *Giardia intestinalis* DNA.

Factor	The Result of the Microscopic Method	The Result of the Real-Time PCR Method
pure <i>Giardia intestinalis</i> culture	+	+
UV 15 min	-	+
UV 30 min	-	+
temp. 100 °C	-	+
temp. 2–8 °C	-	+
temp. –20 °C	-	+
ethanol 70% p.a.	-	+
ethanol 96% p.a.	-	+
disinfectant 1	-	+
disinfectant 2	-	+
disinfectant 3	-	+

+ trophozoite movement/DNA presence; - no trophozoite movement/no DNA present.

4. Discussion

The analysis shows that only four of the applied factors did not affect the survival and detection results of *G. intestinalis* DNA.

Considering UV radiation, no trophozoite movement was found in the microscopic method, while the real-time PCR showed the protozoan genetic material's presence. Li et al. [16] observed that some *G. lamblia* trophozoites could survive or be reactivated after exposure to UV radiation up to 10 mJ/cm². Evidence of survival or reactivation at the 20 and 40 mJ/cm² UV fluencies was inconclusive, while at 100 mJ/cm², there was no evidence of survival or reactivation. This may impact the criteria used by the drinking water and wastewater industry to ensure the safe reduction in *G. lamblia* cysts in UV disinfection processes [16]. In turn, other studies on UV disinfection of *G. lamblia* cysts in water concluded that UV disinfection at practical doses achieves significant (much greater than 4 logs) inactivation of *G. lamblia* cysts in water without evidence of DNA repair leading to reactivation of infectivity [17]. Adeyemo et al. [18], in their research concerning the efficiency of chlorine and UV in the inactivation of *Cryptosporidium* and *Giardia* in wastewater, observed that *Giardia* is less resistant to UV irradiations than *Cryptosporidium*. UV irradiation has more effect on *Giardia* than chlorine. This is due to the killing effect exhibited by UV on *Giardia* because of its impact on its DNA. UV radiation of 50 mJ/cm² at 280 nm can destroy only *Giardia* cysts from the feces of infected patients to a maximum of 75% [19]. Einarsson et al. [20] examined the response to ultraviolet (UV) radiation, a natural stressor of the intestinal protozoan parasite *G. intestinalis*, and observed that UV radiation of 10 mJ/cm² was effective in killing *Giardia* cysts. The UV action on trophozoites induces DNA replication to stop. Active DNA replication and DNA repair may explain why UV light does not kill trophozoites and encapsulates cells as effectively as nonreplicating cysts. UV radiation induces minor overall changes in gene expression in *Giardia*, but cysts show a stronger response than trophozoites [20].

Analyzing the influence of temperature, the lack of trophozoite movement in the microscopic method and a positive reaction to the presence of *Giardia* DNA in the real-time PCR method were also shown. Utaaker et al. [21], by examining the survival of *Giardia* cysts on lettuce, observed that *Giardia* cysts survive well when kept moist and refrigerated. Survival of *Giardia* cysts was abrogated on lettuce at room temperature. Indeed, an almost 50% die-off of *Giardia* cysts was recorded within the first 24 h. *Giardia* cysts were less robust than *Cryptosporidium* oocysts and would be unlikely to survive under ambient storage conditions on-farm, during the sale, or at home. However, if refrigerated, some contaminating *Giardia* cysts may remain viable and threaten the consumer [21].

Wickramanayake et al. [22], comparing the effect of ozone and storage temperature on cyst survival, *G. lamblia*, and *Giardia muris*, found that the cyst viability was similar over the 25-day storage period ranging from –6 to 37 °C, and the optimal temperature for their long-term survival is around 5 °C. Ozone was highly effective in inactivating the cysts of

both *Giardia* species, with *G. muris* being consistently more resistant than *G. lamblia* at pH 7 and 5 °C and 25 °C [22]. In an experiment involving the influence of several factors on *Giardia* excystation in vitro, it was shown that temperature, pH, time, and medium impact the level of excystation achieved. Excystation was adopted as the criterion of viability. The effect of storage at −13, 8, 21, and 37 °C and exposure to boiling water on the survival of *Giardia* cysts was investigated. Storage at 8 °C allowed for the most extended survival of the cysts, 77 days. Cysts stored at 21 °C were viable for 5 to 24 days, while those at 37 °C never survived for more than 4 days. Freezing and thawing of cysts resulted in almost complete loss of viability, although the low level of viability (<1%) was maintained for at least 14 days. Cysts exposed to boiling water were immediately unable to excystate [23]. In turn, El Mansoury et al. [24] assessed the influence of different degrees of temperature and salinity on the viability and infectivity of *G. lamblia* and *C. parvum* at different storage times. It was shown that boiling the protozoa for one minute minimized their viability to less than 1% and rendered them noninfectious, while exposure to 4 and −4 °C for up to seven days kept them viable and infectious. However, salinity was found effective at high concentrations (50 ppt) or extended storage times at lower concentrations [24].

In the presented study, the use of sodium hypochlorite influenced the results of both methods, making it impossible to observe the trophozoite movement and detect *Giardia* DNA. Jarroll et al. [25] assessed the effect of chlorine concentration under various conditions on the viability of *G. lamblia* cysts. The excretion capacity of *Giardia* cysts was adopted as a criterion for viability. The influence of temperature (25, 15, and 5 °C), pH (6, 7, and 8), contact time of chlorine with the cyst (10, 30, and 60 min), and chlorine concentration (1 to 8 mg/L) were investigated. Cyst survival increased with increasing buffer pH. In combination with chlorination, water temperature proved essential for cyst survival. At 25 °C, 1.5 mg/L exposure for 10 min killed all cysts at pH 6, 7, and 8. At 15 °C, 2.5 mg of chlorine per liter for 10 min killed all cysts at pH 6, but at pH 7 and 8, a small number of cysts remained viable after 30 min, but not after 60 min. At 5 °C, 1 mg of chlorine per liter for 60 min did not kill all cysts at any pH tested. At this temperature, 2 mg of chlorine per liter killed all cysts after 60 min at pH 6 and 7 but not at pH 8. A 4 mg/L chlorine concentration killed all cysts at all three pH values after 60 min but not 30 min. The 8 mg/L chlorine concentration killed all *Giardia* cysts at pH 6 and 7 after contact for 10 min and at pH 8 after 30 min [25]. Kim et al. [26] observed that the killing rate was initially fast when sodium hypochlorite containing 5 or 10 ppm of chlorine was used, but disinfection slowed down. A 3-log reduction could not be achieved even after 2 h. The disinfection efficiency was also reduced at lower temperatures [26].

This study noted the influence of formalin on the test results. Both methods obtained negative results. On the other hand, 70% ethanol did not affect the detection of protozoan DNA. Kuk et al. [27], when examining the effect of stool storage conditions to preserve *Giardia* DNA, found that all stool samples containing cysts that were stored at room temperature, +4 and −20 °C, and in 70% alcohol and 2.5% potassium dichromate, obtained a band of 384 bp specific for *G. intestinalis*. However, this strip was not produced by the samples stored in 10% formaldehyde. In the case of fecal samples containing trophozoites, the same *G. intestinalis*-specific band was obtained only from samples stored in 2.5% potassium dichromate for up to one month [27]. Bezagio et al. [28] also noted that formaldehyde might have a negative impact on the detection of *Giardia duodenalis* by molecular methods. DNA samples were tested for glutamate dehydrogenase (GDH) and β -giardine (β g) genes. GDH and β g genes were not detected when the sample was treated with formaldehyde [28].

Marchin et al. [29] suggest that the disinfectant's effect depends on the *Giardia* wall's thickness, and therefore lasts longer at a lower temperature.

Analyzing the influence of sodium bicarbonate on trophozoite movement and detection of *Giardia* DNA, it was found that it influences the course of the PCR reaction, resulting in the lack of detection of genetic material. Feely et al. [30] suggest that excystation can be stimulated by a bicarbonate–phosphate medium. In this study, *Giardia muris* cysts were incubated briefly in an aqueous-inducing medium of 0.1 M potassium phosphate with 0.1,

0.2, or 0.3 M sodium bicarbonate. High rates of excystation (91.1–96.7%) were recorded within 5 min after placing the cysts in the TYI-S medium [30]. Sodium bicarbonate can be used to prepare the medium for in vitro excystation of *G. lamblia* cysts [31].

Wilke et al. [32] suggest that the lack of PCR amplification from a proportion of the fecal samples can be associated with the storage medium used for the samples. They applied four different, commonly used storage media to investigate their effects over time on subsequent PCR amplification of DNA from *Giardia* cysts in stool samples. Microscopic examination of the samples and real-time PCR were used to analyze 7 samples over 3 months. Storage in ethanol or potassium dichromate at 4 °C gave the best results. If the immunomagnetic separation was used before PCR (as may be appropriate for samples with low cyst numbers), then storage in potassium dichromate gave the best results [32]. A *G. intestinalis*-specific 384 bp band was obtained from all of the cyst-containing stool samples stored at RT, +4 °C and −20 °C and in 70% alcohol and 2.5% potassium dichromate; however, this band was not produced by samples that were stored in 10% formaldehyde. Moreover, for the stool samples containing trophozoites, the same *G. intestinalis*-specific band was only obtained from the samples that were stored in 2.5% potassium dichromate for up to one month. The most suitable storage condition for stool samples to permit the isolation of *G. intestinalis* DNA is in 2.5% potassium dichromate; under these conditions, stool samples may be stored for one month [27].

The study detected no DNA when formalin was added to the culture—storage of samples in formalin results in nucleic acid cross-linking and DNA fragmentation [33]. Formalin damages DNA in three ways: fragmentation, base modification, and cross-linkage within the DNA itself or between DNA and proteins [34]. Similarly, there was no positive PCR reaction when sodium hypochlorite was used. Fischer et al. [35] observed that DNA exposure to sodium hypochlorite prevents PCR amplification of a 76 bp amplicon. Decontamination is defined as the degradation, denaturation, or inactivation of the amplification of nucleic acids [35].

There are no studies on the influence of some of the selected physical and chemical factors on the survival assessment and detection of *G. intestinalis* DNA. It is necessary to continue research on the impact of various factors on detecting protozoa due to the small number of factors used in the presented study.

This study has some limitations. In routine diagnostics, trophozoites and parasite cysts may be detected in the feces of people infected with *Giardia lamblia*. In formed feces, cysts predominate. However, in diarrheal and watery feces, trophozoites are the dominant form. Our research focuses on *Giardia* trophozoites only. In future studies, the impact of the studied factors on the survival assessment and detection of *Giardia intestinalis* DNA in axenically cultured cysts should be determined. The examination of cysts and trophozoites would give a complete picture of the influence of the investigated factors. The involvement of an in vitro encystation protocol should be optimized for the strain used in our study.

5. Conclusions

Most of the factors are used to affect the survival rate of protozoa. It seems that standard disinfection methods using UV, ethanol, or various disinfectants are sufficient to reduce survival. Boiling water or using preservatives such as citric acid can also contribute to this. In turn, detecting DNA in most samples may suggest the need, for example, to extend the period of influence of a specific factor. Therefore, the conducted research should be extended.

The research results indicate a much higher sensitivity of genetic methods used in laboratories than microscopic techniques. Modern diagnostic methods significantly increase the possibility of detecting parasites by detecting their genetic material. In the case of infection, determining the presence of *Giardia intestinalis* based solely on the microscopic method may give false-negative results. Trophozoites die very quickly in clinical material. Using more sensitive techniques, such as PCR, increases the possibility of detecting parasites. The development of a protozoan detection method is needed for food safety monitoring.

Prevention of *G. intestinalis* infections, among others, by ensuring food and water safety is a crucial issue affecting public health. Using preservatives or various disinfection methods affects the survival of protozoa and thus reduces their spread. The main route of infection with *Giardia* is the alimentary canal, so the risk of giardiasis is reduced by increasing food safety. This may contribute to establishing measures to reduce outbreaks of parasitic diseases associated with contaminated food.

Author Contributions: Conceptualization, C.M.-K.; methodology, M.S. and C.M.-K.; data curation, M.S.; investigation, M.S., R.W. and M.P.; formal analysis, M.S. and C.M.-K.; writing—original draft preparation, M.S. and C.M.-K.; writing—review and editing, M.S. and C.M.-K. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request from the corresponding author. The data are not publicly available due to privacy or ethical restrictions.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Belkessa, S.; Ait-Salem, E.; Laatamna, A.; Houali, K.; Sönksen, U.W.; Hakem, A.; Bouchene, Z.; Ghalmi, F.; Stensvold, C.R. Prevalence and Clinical Manifestations of *Giardia intestinalis* and Other Intestinal Parasites in Children and Adults in Algeria. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2021**, *104*, 910–916. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Wu, Y.; Yao, L.; Chen, H.; Zhang, W.; Jiang, Y.; Yang, F.; Liu, A.; Shen, Y. *Giardia duodenalis* in patients with diarrhea and various animals in northeastern China: Prevalence and multilocus genetic characterization. *Parasit. Vectors* **2022**, *15*, 165. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Costache, C.; Kalmár, Z.; Colosi, H.A.; Baciu, A.M.; Opreş, R.V.; Györke, A.; Colosi, I.A. First multilocus sequence typing (MLST) of *Giardia duodenalis* isolates from humans in Romania. *Parasit. Vectors* **2020**, *13*, 387. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Ogbuigwe, P.; Biggs, P.J.; Garcia-Ramirez, J.C.; Knox, M.A.; Pita, A.; Velathanthiri, N.; French, N.P.; Hayman, D.T.S. Uncovering the genetic diversity of *Giardia intestinalis* in isolates from outbreaks in New Zealand. *Infect. Dis. Poverty* **2022**, *11*, 49. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Lagunas-Rangel, F.A.; Yee, J.; Bermúdez-Cruz, R.M. An update on cell division of *Giardia duodenalis* trophozoites. *Microbiol. Res.* **2021**, *250*, 126807. [[CrossRef](#)]
6. Adam, R.D. *Giardia duodenalis*: Biology and Pathogenesis. *Clin. Microbiol. Rev.* **2021**, *34*, e0002419. [[CrossRef](#)]
7. Hochstetter, A.; Pfohl, T. Motility, force generation, and energy consumption of unicellular parasites. *Trends Parasitol.* **2016**, *32*, 531–541. [[CrossRef](#)]
8. Nosala, C.; Dawson, S.C. The critical role of the cytoskeleton in the pathogenesis of *Giardia*. *Curr. Clin. Microbiol. Rep.* **2015**, *2*, 155–162. [[CrossRef](#)]
9. Arienzo, A.; Gallo, V.; Fanali, C.; Antonini, G. Introduction to the Special Issue: Microbiological Safety and Quality of Foods. *Foods* **2022**, *11*, 673. [[CrossRef](#)]
10. Lyashchuk, Y.O.; Novak, A.I.; Kostrova, Y.B.; Shibarshina, O.Y.; Evdokimova, O.V.; Kanina, I.V. The study of persistence of microorganisms and parasites in food products. *IOP Conf. Ser. Earth Environ. Sci.* **2021**, *640*, 062002. [[CrossRef](#)]
11. Vargas-Villarreal, J.; Mata-Cárdenas, B.D.; Hernández-García, M.E.; Garza-González, J.N.; De La Garza-Salinas, L.H.; González-Salazar, F. Modified PEHPS medium as an alternative for the in vitro culture of *Giardia lamblia*. *Biomed. Res. Int.* **2014**, *2014*, 714173. [[CrossRef](#)]
12. Hooshyar, H.; Rostamkhani, P.; Arbabi, M.; Delavari, M. *Giardia lamblia* infection: Review of current diagnostic strategies. *Gastroenterol. Hepatol. Bed Bench* **2019**, *12*, 3–12.
13. Basmacıyan, L.; François, A.; Vincent, A.; Valot, S.; Bonnin, A.; Costa, D.; Razakandrainibe, R.; Morio, F.; Favennec, L.; Dalle, F. Commercial Simplex and Multiplex PCR Assays for the Detection of Intestinal Parasites *Giardia intestinalis*, *Entamoeba* spp., and *Cryptosporidium* spp.: Comparative Evaluation of Seven Commercial PCR Kits with Routine In-House Simplex PCR Assays. *Microorganisms* **2021**, *9*, 2325. [[CrossRef](#)]
14. Samie, A.; Tanih, N.F.; Seisa, I.; Seheri, M.; Mphahlele, J.; ElBakri, A.; Mbatı, P. Prevalence and genetic characterization of *Giardia lamblia* in relation to diarrhea in Limpopo and Gauteng provinces, South Africa. *Parasite Epidemiol. Control* **2020**, *9*, e00140. [[CrossRef](#)]
15. Thompson, R.C.A.; Ash, A. Molecular epidemiology of *Giardia* and *Cryptosporidium* infections—What’s new? *Infect. Genet. Evol.* **2019**, *75*, 103951. [[CrossRef](#)]

16. Li, D.; Craik, S.A.; Smith, D.W.; Belosevic, M. Survival of *Giardia lamblia* trophozoites after exposure to UV light. *FEMS Microbiol. Lett.* **2008**, *278*, 56–61. [[CrossRef](#)]
17. Linden, K.G.; Shin, G.A.; Faubert, G.; Cairns, W.; Sobsey, M.D. UV disinfection of *Giardia lamblia* cysts in water. *Environ. Sci. Technol.* **2002**, *36*, 2519–2522. [[CrossRef](#)]
18. Adeyemo, F.E.; Singh, G.; Reddy, P.; Bux, F.; Stenström, T.A. Efficiency of chlorine and UV in the inactivation of *Cryptosporidium* and *Giardia* in wastewater. *PLoS ONE* **2019**, *14*, e0216040. [[CrossRef](#)]
19. Rahdar, M.; Daylami, O. The comparison of chlorine and ultra violet effects against *Giardia lamblia* cyst in drinking water. *Biochem. Cell. Arch.* **2016**, *16*, 369–372.
20. Einarsson, E.; Svärd, S.G.; Troell, K. UV irradiation responses in *Giardia intestinalis*. *Exp Parasitol.* **2015**, *154*, 25–32. [[CrossRef](#)]
21. Utaaker, K.S.; Skjerve, E.; Robertson, L.J. Keeping it cool: Survival of *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts on lettuce leaves. *Int. J. Food Microbiol.* **2017**, *255*, 51–57. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Wickramanayake, G.B.; Rubin, A.J.; Sproul, O.J. Effects of Ozone and Storage Temperature on *Giardia* Cysts. *J. Am. Water Work. Assoc.* **1985**, *77*, 74–77. [[CrossRef](#)]
23. Bingham, A.K.; Jarroll, E.L., Jr.; Meyer, E.A.; Radulescu, S. *Giardia* sp.: Physical factors of excystation in vitro, and excystation vs eosin exclusion as determinants of viability. *Exp. Parasitol.* **1979**, *47*, 284–291. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. El Mansoury, S.T.; Abou El Naga, I.F.; Negm, A.Y.; Amer, E.E. Influence of temperature and salinity on the viability and infectivity of *Giardia lamblia* and *Cryptosporidia parvum*. *J. Egypt Soc. Parasitol.* **2004**, *34*, 161–172. [[PubMed](#)]
25. Jarroll, E.L.; Bingham, A.K.; Meyer, E.A. Effect of chlorine on *Giardia lamblia* cyst viability. *Appl. Environ. Microbiol.* **1981**, *41*, 483–487. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Kim, K.; Hong, W.; Lee, K. Disinfection characteristics of waterborne pathogenic protozoa *Giardia lamblia*. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* **2001**, *6*, 95–99. [[CrossRef](#)]
27. Kuk, S.; Yazar, S.; Cetinkaya, U. Stool sample storage conditions for the preservation of *Giardia intestinalis* DNA. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **2012**, *107*, 965–968. [[CrossRef](#)]
28. Bezagio, R.C.; Colli, C.M.; Romera, L.I.L.; de Almeida, C.R.; Ferreira, É.C.; Mattia, S.; Gomes, M.L. Improvement in cyst recovery and molecular detection of *Giardia duodenalis* from stool samples. *Mol. Biol. Rep.* **2020**, *47*, 1233–1239. [[CrossRef](#)]
29. Marchin, G.L.; Fina, L.R.; Lambert, J.L.; Fina, G.T. Effect of resin disinfectants-I3 and -I5 on *Giardia muris* and *Giardia lamblia*. *Appl. Environ. Microbiol.* **1983**, *46*, 965–969. [[CrossRef](#)]
30. Feely, D.E.; Gardner, M.D.; Hardin, E.L. Excystation of *Giardia muris* induced by a phosphate-bicarbonate medium: Localization of acid phosphatase. *J. Parasitol.* **1991**, *77*, 441–448. [[CrossRef](#)]
31. Rice, E.W.; Schaefer, F.W. Improved in vitro excystation procedure for *Giardia lamblia* cysts. *J. Clin. Microbiol.* **1981**, *14*, 709–710. [[CrossRef](#)]
32. Wilke, H.; Robertson, L.J. Preservation of *Giardia* cysts in stool samples for subsequent PCR analysis. *J. Microbiol. Methods* **2009**, *78*, 292–296. [[CrossRef](#)]
33. Lee, M.F.; Lindo, J.F.; Auer, H.; Walochnik, J. Successful extraction and PCR amplification of *Giardia* DNA from formalin-fixed stool samples. *Exp. Parasitol.* **2019**, *198*, 26–30. [[CrossRef](#)]
34. Hykin, S.M.; Bi, K.; McGuire, J.A. Fixing Formalin: A Method to Recover Genomic-Scale DNA Sequence Data from Formalin-Fixed Museum Specimens Using High-Throughput Sequencing. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0141579. [[CrossRef](#)]
35. Fischer, M.; Renevey, N.; Thür, B.; Hoffmann, D.; Beer, M.; Hoffmann, B. Efficacy Assessment of Nucleic Acid Decontamination Reagents Used in Molecular Diagnostic Laboratories. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0159274. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

PUBLIKACJA 3

Smoguła Małgorzata, Pawłowska Marta, Wesołowski Roland, Szewczyk-Golec Karolina, Mila-Kierzenkowska Celestyna. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in people at an increased risk of HIV infection – a pilot study. *Diagnostyka Laboratoryjna* 2022; 58 (1): 9-14. <https://doi.org/10.5604/01.3001.0016.0045>

W badaniach oceniono miano przeciwciał przeciwko pasożytowi *Toxoplasma gondii* w surowicy osób o wysokim ryzyku zakażenia wirusem HIV, będących mieszkańcami województwa kujawsko-pomorskiego. Próbkę pochodziły od pacjentów Punktu Konsultacyjno-Diagnostycznego Krajowego Centrum ds. AIDS w Bydgoszczy.

Sytuacja ryzykowna, która sugerowała ryzyko zakażenia wirusem HIV, to w większości przypadków kontakt seksualny z osobą zakażoną (79,07%).

W badanej populacji stwierdzono występowanie przeciwciał IgG przeciwko *T. gondii* w 23 próbach na 43 (53,5%), natomiast badanie w kierunku swoistych przeciwciał IgM było ujemne. Wysoki wskaźnik awidności przeciwciał IgG uzyskano w 18 (94,7%) próbkach seropozytywnych. Wśród badanych próbek, 30 z nich (69,77%) pochodziło od kobiet, natomiast 13 (30,23%) od mężczyzn. Wśród mężczyzn wirus HIV został wykryty w 1 przypadku (dodatni wynik na obecność wirusa HIV dotyczył osoby w wieku 24 lat), a przeciwciała przeciwko *T. gondii* w klasie IgG w 7 próbkach. Z kolei u kobiet stwierdzono obecność przeciwciał przeciwko *T. gondii* w klasie IgG w 16 przypadkach. Obecność przeciwciał przeciwko *T. gondii* w klasie IgG stwierdzano u osób w różnym wieku (u kobiet w wieku $38,44 \pm 13,00$ lat i u mężczyzn w wieku $29,29 \pm 10,86$ lat).

Wyniki badań dowodzą wysokiej seroprewalencji *T. gondii* wśród badanych osób z grupy wysokiego ryzyka zakażenia wirusem HIV. Kontynuacja badań i obserwacja epidemiologii toksoplazmozy wydaje się niezwykle ważna, ponieważ wczesne wykrycie zarażenia pasożytem u pacjentów z HIV/AIDS może zapobiec rozwojowi ciężkiej postaci toksoplazmozy.

Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in people at an increased risk of HIV infection – a pilot study

Seroprewalencja *Toxoplasma gondii* u osób ze zwiększonym ryzykiem zakażenia wirusem HIV. Badanie pilotażowe na populacji województwa kujawsko-pomorskiego w Polsce

Małgorzata Smogula, Marta Pawłowska, Roland Wesołowski, Karolina Szewczyk-Golec, Celestyna Mila-Kierzenkowska

Department of Biology and Medical Biochemistry, Ludwik Rydygier Collegium Medicum in Bydgoszcz, Nicolaus Copernicus University in Toruń, Toruń, Poland

Abstract

Introduction: The observation of the epidemiology of toxoplasmosis may prevent the development of a severe form of the disease in HIV patients.

Aim: The aim of the study was to evaluate the seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in the population of the Kuyavian-Pomeranian Voivodeship at high risk of contracting HIV.

Material and methods: Blood serum samples of 43 patients of the Consulting and Diagnostic AIDS Center were tested for the presence of anti-HIV-1/HIV-2 antibodies and p24 antigen, and for the presence of anti-toxoplasma IgM and IgG antibodies.

Results: Anti-toxoplasma IgG antibody prevalence of 53.5% (23/43) was found in the study population, while the examination of specific IgM antibodies was negative. A high IgG antibody avidity index was obtained in 18 (94.7%) seropositive samples. Thirty (69.77%) of the samples were female, and 13 (30.23%) were male. Among men, HIV was detected in 1 (7.69%), and IgG antibodies against *T. gondii* in 7 (53.85%) samples. IgG antibodies against *T. gondii* were found in 16 (53.33%) women. The HIV-positive individual was 24 years old. The presence of antibodies against *T. gondii* in the IgG class was found in people of different ages (in women aged 38.44 ± 13.00 years old and in men aged 29.29 ± 10.86 years old). The risky situation that could cause HIV infection is in most cases sexual contacts (79.07%).

Conclusions: High seroprevalence of *T. gondii* was found among the studied subjects at a high risk of HIV infection. Further research is required on a larger study group.

Keywords: antibodies, HIV, seroprevalence, *Toxoplasma gondii*

Streszczenie

Wstęp: Obserwacja epidemiologii toksoplazmozy może zapobiec rozwojowi ciężkiej postaci choroby u pacjentów z HIV.

Cel: Celem pracy była ocena seroprewalencji *Toxoplasma gondii* w populacji województwa kujawsko-pomorskiego o wysokim ryzyku zarażenia wirusem HIV.

Materiał i metody: Przebadano 43 próbki surowicy krwi pobrane od pacjentów Punktu Konsultacyjno-Diagnostycznego Krajowego Centrum ds. AIDS w kierunku obecności przeciwciał anti-HIV-1/HIV-2 i antygenu p24 oraz przeciwciał w klasie IgM i IgG przeciwko toksoplazmie.

Received: 15.03.2022

Accepted: 20.06.2022

Published: 23.09.2022

DOI: 10.5604/01.3001.0016.0045

Corresponding author:

Małgorzata Smogula MSc, 85-092 Bydgoszcz, Karłowicza 24, phone: +48 52 585 37 37, e-mail: malgorzata.smogula@gmail.com

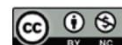
Cite the article as:

Smogula M., Pawłowska M., Wesołowski R., Szewczyk-Golec K., Mila-Kierzenkowska C.: Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in people at an increased risk of HIV infection – a pilot study. *Diagn Lab.* 2022; 58(1): 9–14



Open access

The content of the journal is available in Open Access formula which means free access to scientific data for researchers and readers.



Copyright

This material is available under the Creative Commons – Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0). The full terms of this license are available on: <https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/legalcode>

Licence

Some right reserved: Polish Society of Laboratory Diagnostics. Published by Index Copernicus Sp. z o.o.

Conflict of interests

The authors declare that they have no competing interests.

Author contribution

The authors submitted a form to the editorial office specifying their contribution to the work.



Wyniki: W badanej populacji stwierdzono występowanie przeciwciał IgG przeciwko toksoplazmie na poziomie 53,5% (23/43), natomiast badanie w kierunku swoistych przeciwciał IgM było ujemne. Wysoki wskaźnik awidności przeciwciał IgG uzyskano w 18 (94,7%) próbkach seropozytywnych. 30 (69,77%) próbek pochodziło od kobiet, natomiast 13 (30,23%) od mężczyzn. Wśród mężczyzn wirus HIV został wykryty w 1 (7,69%), a przeciwciała przeciwko *T. gondii* w klasie IgG w 7 (53,85%) próbkach. U 16 (53,33%) kobiet stwierdzono obecność przeciwciał przeciwko *T. gondii* w klasie IgG. Dodatni wynik na obecność wirusa HIV dotyczył osoby w wieku 24 lat. Obecność przeciwciał przeciwko *T. gondii* w klasie IgG stwierdzano u osób w różnym wieku (u kobiet w wieku $38,44 \pm 13,00$ lat i u mężczyzn w wieku $29,29 \pm 10,86$ lat). Sytuacja ryzykowna, która mogła spowodować zakażenie wirusem HIV, to w większości przypadków kontakty seksualne (79,07%).

Wnioski: Stwierdzono wysoką seroprewalencję *T. gondii* wśród badanych osób z grupy wysokiego ryzyka zakażenia wirusem HIV. Wymagane są dalsze badania na większej grupie badawczej.

Słowa kluczowe: HIV, przeciwciała, seroprewalencja, *Toxoplasma gondii*

INTRODUCTION

Toxoplasma gondii is a protozoan that causes toxoplasmosis, a zoonotic disease in humans. Chronic infection with this parasite affects approximately one-third of the human population worldwide [1]. *T. gondii* can be transmitted to humans via different ways, including consuming raw or undercooked meat, ingesting cat shed oocysts via contaminated soil, food or water, or congenitally by transplacental transmission of tachyzoites [2]. *T. gondii* infection can also occur through blood transfusion or organ transplantation [3]. The diagnosis of *Toxoplasma* infection is most commonly made by the detection of specific immunoglobulins, including immunoglobulins M (IgM) and immunoglobulins G (IgG) [4]. IgM antibodies are detectable about one week after the infection and remain high for several months or years, while the presence of IgG antibodies suggests the occurrence of infection,

but does not provide any information about the timing of the infection [1]. Thus, an anti-toxoplasma IgG avidity assay is used for improved estimation of infection acquisition. Low IgG avidity usually specifies the first few months of the infection, whereas high avidity specifies nonprimary infections [5].

Toxoplasmosis is usually benign or asymptomatic in immunocompetent subjects, but it can have severe consequences if it occurs in immunodeficient subjects or fetuses [6]. In HIV-positive individuals, it causes severe opportunistic infections, which is of major public health concern as it results in physical and psychological disabilities [7]. *T. gondii* may cause progressive and recurring necrotizing retinochoroiditis and is the most common cause of infectious uveitis worldwide [8]. Ocular and cerebral toxoplasmosis is a particular problem in AIDS patients and may even be an AIDS-defining condition [9]. Hence, an early diagnosis of *T. gondii*

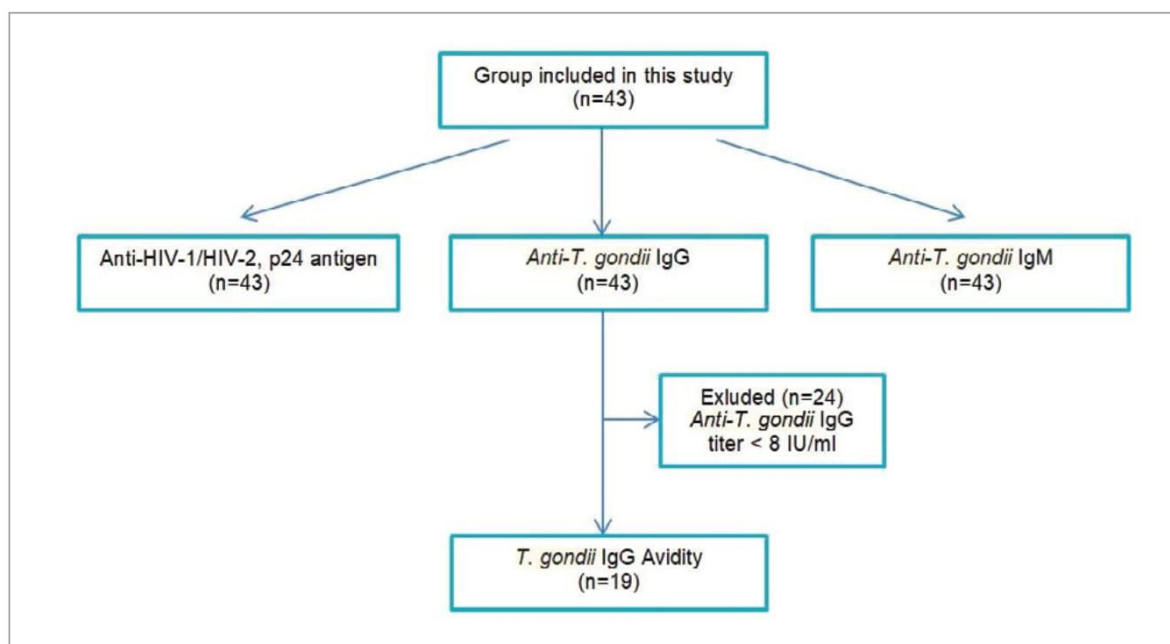


Figure 1. Enrollment scheme study group selection.



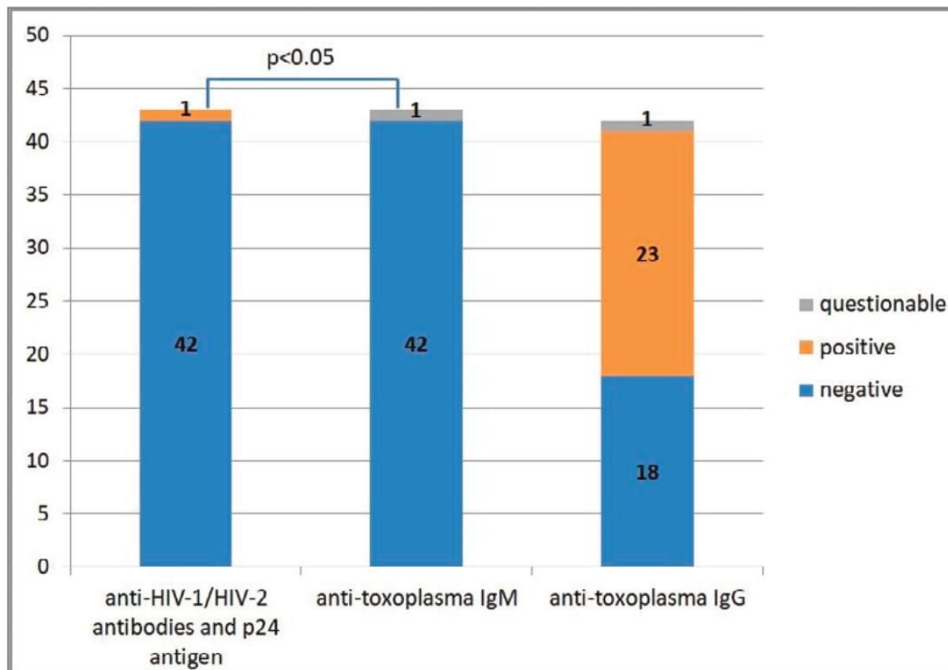


Figure 2. The number of results obtained for the detection of anti-HIV-1/HIV-2 antibodies and p24 antigen, as well as anti-toxoplasma IgM and IgG antibodies in the studied blood serum samples.

infection is important in all HIV-positive individuals to prevent complications of central nervous system (CNS) toxoplasmosis.

The prevalence of *Toxoplasma gondii* infection in HIV patients is approximately 35.8% and in high-income countries it is approximately 26.3%. The clinical presentation of cerebral toxoplasmosis is nonspecific. In the course of toxoplasmosis, rapidly progressive and diffuse encephalitis, ventricular inflammation, and symptoms resembling a cerebrovascular accident may occur. The most common symptoms include headache, fever, seizures, focal neurological defects, palsy of the cranial nerves, visual disturbances, confusion, and psychomotor or behavioral changes. With delayed treatment, it can develop into dementia, coma, and death [10].

In Poland, within the framework of the National AIDS Center, there are many Consulting and Diagnostic Centers, where HIV tests can be performed free of charge, anonymously and without a referral, combined with post-test counseling. The tests are preceded by an interview with a certified HIV/AIDS adviser, who explains the possible results, helps to estimate the risk, and answers any questions [11]. Although much is known about the HIV/AIDS epidemic in Poland, data concerning toxoplasmosis prevalence among those patients is limited.

AIM

The aim of the study was to detect anti-toxoplasma IgM and IgG antibodies in blood samples of people from the population of

the Kuyavian-Pomeranian Voivodeship, tested for HIV presence. To the best of our knowledge, this is one of the few studies to estimate the prevalence of *Toxoplasma gondii* infection in people at high risk of contracting HIV in Poland.

MATERIAL AND METHODS

Forty-three blood serum samples were tested for the presence of both anti-HIV-1/HIV-2 antibodies and p24 antigen, as well as for the presence of anti-toxoplasma IgM and IgG antibodies. The samples were taken from people (women aged 37.53 ± 12.35 years old and men aged 33.46 ± 12.02 years old) reporting to the HIV Consulting and Diagnostic Center at the Provincial Sanitary-Epidemiological Station in Bydgoszcz, Poland. Figure 1 presents the enrollment scheme study group selection. Among the studied samples, 30 (69.77%) were taken from females and 13 (30.23%) from males. Blood serum samples were separated after centrifugation of blood samples (collected for a clot). Laboratory diagnostics was performed using the ELFA technique (Enzyme Linked Fluorescent Assay) on the VIDAS instrument by bioMérieux (France). The commercial tests, including VIDAS HIV DUO Quick kit (HIV6), VIDAS TOXO IgM kit (TXM), and VIDAS TOXO IgG II kit (TXG), were used. After the initial detection of anti-toxoplasma IgG, an avidity index was determined with the use of VIDAS TOXO IgG AVIDITY (TXGA) kit.

Each kit includes SPR pipettes and test strips. An SPR (Solid Phase Receptacle) pipette serves as a solid phase as well as a pipetting device during the assay. The avidity determination

Table I. The percentage of the detection of anti-HIV-1/HIV-2 antibodies and p24 antigen, as well as anti-toxoplasma IgM and IgG depending on sex in the tested patients.

SEX	PARAMETER	NEGATIVE RESULTS	POSITIVE RESULTS	QUESTIONABLE RESULTS	PERCENTAGE OF POSITIVE RESULTS [%]
Female (n = 30)	anti-HIV-1/ HIV-2 antibodies and p24 antigen	30	0	0	0
	anti-toxoplasma IgM	29	0	1	0
	anti-toxoplasma IgG	13	16	1	53.33
Male (n = 13)	anti-HIV-1/ HIV-2 antibodies and p24 antigen	12	1	0	7.69
	anti-toxoplasma IgM	13	0	0	0
	anti-toxoplasma IgG	6	7	0	53.85

uses a double strip consisting of a reference strip and a test strip. All determination steps are carried out automatically by the device. The reaction medium is repeatedly introduced and discharged from the SPR pipette. The fluorescence of the product obtained is measured at a wavelength of 450 nm. The intensity of the fluorescence is proportional to the concentration of antibody and/or antigen present in the sample. At the end of the determination, the results are automatically calculated by the device against a standard and then printed. In the case of avidity determination, the ratio between the amount of high avidity antibodies (test strip) and the total amount of antibodies (reference strip) is a factor that indicates the avidity of the antibodies in the test sample. Avidity samples were tested for the presence of IgG antibodies and found positive (titer ≥ 8 IU/ml). Samples with antibody concentrations greater than 300 IU/ml were re-tested after prior dilution to bring the titer to 15 IU/ml.

There is a Microsoft Excel spreadsheet for data analysis. The performed tests were qualitative research. The statistical analysis was performed using Statistica 12.0 software (StatSoft, Inc.). The Mann-Whitney test was used to detect significant differences ($P < 0.05$) in three types of parameters.

RESULTS

Patients of Consulting and Diagnostic Centers do the tests anonymously. Only a short questionnaire is completed, including: password, year of birth, gender, province, possible route of HIV infection and sexual orientation.

Among 43 serum samples tested, the presence of anti-HIV-1/HIV-2 antibodies and p24 antigen was found only in 1 (2.33%) sample. According to the completed questionnaires, sexual contact was a risk situation which could result in HIV infection in

34 (79.07%) cases, while 9 (20.93%) subjects indicated occupational exposure. No positive result for anti-toxoplasma IgM antibodies was obtained, while a diagnostic level of anti-toxoplasma IgG antibodies was observed in 23 (53.49%) serum samples. There was one questionable result for the presence of IgM antibodies and one questionable result for the presence of IgG antibodies (according to the cut-off values and the interpretation of the test manufacturer's results for questionable samples' index: < 0.55 and < 0.65 , respectively). The number of negative, positive and questionable results obtained for the studied parameters is presented in figure 2. The avidity of IgG antibodies was assessed in all 23 seropositive samples. A high IgG antibody avidity index was obtained in 21 (91.3%) samples, while the avidity index was low in 2 (8.7%) samples.

The positive HIV test result was detected in one person aged 24 years old, who had also anti-toxoplasma IgG antibodies found. The presence of anti-toxoplasma IgG and IgM antibodies was indicated in women aged 38.44 ± 13.00 years and in men aged 29.29 ± 10.86 years. Considering sex, HIV was detected in one sample (7.69%) among men and none among women. Anti-toxoplasma IgG antibodies were found in 7 samples obtained from males and 16 samples obtained from females. The questionable results for the detection of IgM and IgG antibodies concerned 2 women. Table I shows the percentage of positive results by sexes.

The risky situation that could cause HIV infection is in most cases sexual contacts (79.07%). In turn, the occupational exposure concerned 9 people. The study participants included people with different sexual orientation: hetero – 32 (74.42%) people, bisex – 7 (16.28%) people, msm – 4 (9.30%) people. The HIV virus was detected in a group of bisexual people, while the presence of IgG antibodies against *T. gondii* was detected in people of different sexual orientation.



DISCUSSION

Toxoplasmosis has historically been considered one of the most important opportunistic infections detected in HIV/AIDS patients. It has been estimated that approximately 30% of AIDS patients who have anti-toxoplasma antibodies will develop CNS toxoplasmosis, which is the most common cause of expansive brain lesions and has high morbidity and mortality in subjects with advanced immunosuppression [12]. Thus, *Toxoplasma* screening programs should be recommended for all newly diagnosed HIV-positive patients.

In the present study, the appearance of anti-toxoplasma IgM and IgG antibodies in blood serum was investigated in the selected population of the Kuyavian-Pomeranian Voivodeship, tested for HIV infection because of the increased risk of contracting HIV. However, only IgG antibodies of high avidity were detected in the studied individuals (53.49%), which proves the past toxoplasmosis and the absence of active *Toxoplasma* infections. Moreover, only one HIV-positive result was obtained and this individual also had anti-toxoplasma IgG antibodies found. According to the present study, up to 50% of seropositive individuals with the presence of anti-toxoplasma IgG antibodies could be reported in the Polish population. The anti-toxoplasma IgG antibodies of high avidity, found in the studied subjects, are in low (so-called environmental) concentration and may persist practically until the end of the individual life [13]. The estimated seroprevalence in Poland (up to 50%) is in accordance with many reports from other countries [7]. In the studies by Pawełczyk et al. of 152 HIV-infected patients tested for *T. gondii*-specific IgM and IgG, 6 (3.9%) and 50 (32.9%) were positive, respectively. Of 168 serum samples from blood donors, 1 (0.6%) and 49 (29.2%) were positive for IgM and IgG, respectively. In HIV-infected patients, low avidity index (<45%) was observed in 3 cases, equivocal avidity (45-60%) in 4, while in the remaining 43 samples, the avidity values were high (>63.2%). High avidity (>65%) was found in all 49 IgG-positive samples from blood donors [14]. In the PCR tests carried out in 2009-2010 at the Department of Medical Parasitology of the National Institute of Public Health – National Institute of Hygiene in Warsaw, no *Toxoplasma gondii* infection was found in patients infected with HIV. However, among 20 studied samples, only three samples were HIV-positive [15].

Across the world, the prevalence rate of *Toxoplasma* infection among HIV-positive individuals has been found to vary from 3%

to 97% [16]. In the studies in the Ethiopian population, the prevalence of toxoplasmosis for HIV/AIDS patients was 60% [17], while in Brazil 80%, with a history of neurotoxoplasmosis in 4.8% and of ocular toxoplasmosis in 1.6% of the patients [18]. In contrast, the seroprevalence of toxoplasmosis among HIV/AIDS patients from southern Iran was only 18.2% with 10.4% and 89.6% of subjects with and without *Toxoplasma* encephalitis, respectively [19].

Considering the age of the individuals, no relationship between age and *toxoplasma* infection was revealed in the present study, as anti-toxoplasma IgGs were found in women aged 38.44 ± 13.00 years old and in men aged 29.29 ± 10.86 years old. Those results are in contrary to the studies of Wilking et al. [20], who demonstrated an increase in seroprevalence from 20% in the 18-29 age group to 77% in the 70-79 age group in the German population. The highest prevalence in the third and fourth decade of life was also shown by other authors [7]. The higher prevalence rate found in older people may be due to an increased risk of exposure to infection with age [7]. Elsheikha et al. [21] imply the particular importance of prophylaxis to reduce the risk of serious disease caused by *toxoplasma* in immunocompromised people. Eating of raw or undercooked meat and drinking of untreated water must be avoided. Vegetables should be washed thoroughly before eating because they may have been contaminated with cat feces. During gardening and any other contact with soil or sand, which may be contaminated with cat feces, protective gloves should be worn and hands should be washed with soap and water after the contact [6]. Moreover, a great number of authors suggest that all HIV-infected individuals should be tested for baseline IgG antibodies and counseled regarding exposure to *Toxoplasma gondii* infections [16-19].

CONCLUSIONS

Concluding, in the present study, the high prevalence of *T. gondii* infection was found in the group of people at high risk of contracting HIV from the Kuyavian-Pomeranian Voivodeship in Poland. However, the research was conducted on a small study group, so the data may be underestimated. It should be noted that it is a pilot study and further research is planned on a larger study group. Continuing the research and observation of the epidemiology of toxoplasmosis seem to be extremely important, because an early detection of the parasite infection in HIV/AIDS patients may prevent the development of a severe form of the disease.

REFERENCES

1. Liu Q, Wang ZD, Huang SY, et al. Diagnosis of toxoplasmosis and typing of *Toxoplasma gondii*. Parasit Vectors. 2015; 28(8): 292. <https://doi.org/10.1186/s13071-015-0902-6>.
2. Pinto-Ferreira F, Caldart ET, Pasquali AK, et al. Patterns of Transmission and Sources of Infection in Outbreaks of Human Toxoplasmosis. Emerg Infect Dis. 2019; 25(12): 2177–2182. <https://doi.org/10.3201/eid2512.181565>.
3. Velázquez-Hernández N, Avilés Ávila AY, Rivas-González MA, et al. Knowledge and practices regarding toxoplasmosis in housewives: A cross sectional study in a northern Mexican city. PLoS ONE 2019; 14(9): e0222094. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0222094>.
4. Kaul R, Chen P, Binder SR. Detection of Immunoglobulin M Antibodies Specific for *Toxoplasma gondii* with Increased Selectivity for Recently Acquired Infections. J Clin Microbiol. 2004; 42(12): 5705–5709. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.12.5705-5709.2004>.
5. Teimouri A, Mohtasebi S, Kazemirad E, et al. Role of *Toxoplasma gondii* IgG avidity testing in discriminating between acute and chronic toxoplasmosis in pregnancy. J Clin Microbiol 2020; 58: e00505-20. <https://doi.org/10.1128/JCM.00505-20>.



6. Hill D, Dubey JP. *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention. *Clin Microbiol Infect*. 2002; 8: 634–640. <https://doi.org/10.1046/j.1469-0691.2002.00485.x>.
7. Basavaraju A. Toxoplasmosis in HIV infection: An overview. *Trop Parasitol*. 2016; 6(2): 129–135. <https://doi.org/10.4103/2229-5070.190817>.
8. McDermott DH, Heusinkveld LE, Zein WM, et al. Case Report: Ocular toxoplasmosis in a WHIM syndrome immunodeficiency patient. *F1000Res*. 2019; 8: 2. <https://doi.org/10.12688/f1000research.16825.2>.
9. Hiv-Pomeroy C, Noble R, McCormick M, et al. Ocular toxoplasmosis as the presenting manifestation of human immunodeficiency virus infection. *Clin Infect Dis*. 1997; 24(4): 745–746. <https://doi.org/10.1093/clind/24.4.745a>.
10. Marcus C, Feizi P, Hogg J, et al. Imaging in Differentiating Cerebral Toxoplasmosis and Primary CNS Lymphoma With Special Focus on FDG PET/CT. *AJR Am J Roentgenol*. 2021; 216(1): 157–164. doi: 10.2214/AJR.19.22629.
11. National Programme for Preventing HIV Infections and Combating AIDS for 2017-2021. Agenda of the Ministry of Health (Poland), <https://aids.gov.pl/pkd/>.
12. Vidal JE. HIV-related cerebral toxoplasmosis revisited: current concepts and controversies of an old disease. *J Int Assoc Provid AIDS Care*. 2019; 18: 2325958219867315. <https://doi.org/10.1177/2325958219867315>.
13. Wesołowska M, Czarnecki M, Knysz B. Parasitic opportunistic infections in HIV-infected individuals [Pasożytnicze zakażenia oportunistyczne u osób zakażonych HIV] In: Horban A, Podlasiński R, Cholewińska G, et al., (eds). *Zasady opieki nad osobami zakażonymi HIV. Zalecenia PTN AIDS. Polskie Towarzystwo Naukowe AIDS, Warszawa–Wrocław*. 2014: 169.
14. Pawelczyk A, Bednarska M, Caraballo Cortés K, et al. Seronegative Infection with *Toxoplasma gondii* in Asymptomatic Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1)-Infected Patients and in Blood Donors. *J Clin Med*. 2022; 11(3): 638. doi: 10.3390/jcm11030638.
15. Rożej-Bielicka W, Waloch M, Gołąb E. Cases of *Toxoplasma gondii* infection in foetus's and toxoplasmic encephalitis in immunosuppressed patients confirmed by PCR method in NIPH – NIH, 2009–2010. *Przegl Epidemiol*. 2011; 65: 593–597.
16. Tegegne M, Abdurahaman M, Mosissa T, et al. Anti-Toxoplasma antibodies prevalence and associated risk factors among HIV patients. *Asian Pac J Trop Med*. 2016; 9(5): 460–464. <https://doi.org/10.1016/j.apjtm.2016.03.034>.
17. Yesuf KM, Melese ZT. Prevalence of Toxoplasmosis in HIV/AIDS Patients in Mettu Karl Hospital. *Am J Health Res*. 2015; 3(3): 183–188. <https://doi.org/10.11648/j.ajhr.20150303.23>.
18. Xavier GA, Cademartori BG, Cunha Filho NA, et al. Evaluation of seroepidemiological toxoplasmosis in HIV/AIDS patients in the south of Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2013; 55(1): 25–30. <https://doi.org/10.1590/S0036-46652013000100005>.
19. Rezaezhad H., Sayadi F, Shadmand E. et al. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* among HIV Patients in Jahrom, Southern Iran. *Korean J Parasitol*. 2017; 55(1): 99–103. <https://doi.org/10.3347/kjp.2017.55.1.99>.
20. Wilking H, Thamm M, Stark K, et al. Prevalence, incidence estimations, and risk factors of *Toxoplasma gondii* infection in Germany: a representative, cross-sectional, serological study. *Sci Rep*. 2016; 6(22551): 1–9. <https://doi.org/10.1038/srep22551>.
21. Elsheikha HM, Marra CM, Zhu X-Q. Epidemiology, pathophysiology, diagnosis, and management of cerebral toxoplasmosis. *Clin Microbiol Rev* 2020; 34(1): e00115-19. <https://doi.org/10.1128/CMR.00115-19>.



PUBLIKACJA 4

Wesołowski Roland, Pawłowska Marta, Smoguła Małgorzata, Szewczyk-Golec Karolina. Advances and Challenges in Diagnostics of Toxoplasmosis in HIV-Infected Patients. *Pathogens* 2023, 12(1):110. <https://doi.org/10.3390/pathogens12010110>

W pracy dokonano przeglądu metod diagnostycznych mających zastosowanie w wykrywaniu zarażeń *Toxoplasma gondii* u ludzi, ze szczególnym uwzględnieniem pacjentów zakażonych wirusem HIV. Pacjenci Ci są bowiem bardziej narażeni na koinwazję *T. gondii*.

Na podstawie przeglądu literatury wykazano, że metody serologiczne i molekularne są bardziej czułe i wiarygodne niż identyfikacja *T. gondii* na podstawie mikroskopii świetlnej. W pracy szczegółowo przedstawiono metody serologiczne stosowanych obecnie w diagnostyce toksoplazmozy u ludzi. W opisie metod zwrócono uwagę na potencjalne możliwości ich wykorzystania w praktyce diagnostycznej oraz na ich zalety i ograniczenia. „Złotym standardem” serologicznego wykrywania przeciwciał anti-*Toxoplasma* IgG i IgM jest test barwnikowy Sabina-Feldmana (SFDT). Test ten bada zmiany w cytoplazmie żywych trofozoitów *T. gondii* wywołane działaniem przeciwciał obecnych w surowicy krwi zarażonego człowieka.

Wykazano ponadto, że metody biologii molekularnej pozwalają na wykrycie DNA pasożyta w różnych próbkach biologicznych, w tym krwi pełnej, płynie mózgowo-rdzeniowym, moczu, płynie oskrzelowo-pęcherzykowym, płynie owodniowym, krwi pępowinowej, tkankach łożyska i mózgu oraz innych próbkach, w których pasożyt może być obecny. W metodzie ilościowej PCR (qPCR) wykrywanie sekwencji powtórzonej w postaci fragmentu Rep529 ma wyższą czułość niż wykrywanie wcześniej stosowanego genu B1-PCR (odpowiednio 100% vs. 82,7–90%) ze względu na większą liczbę powtórzeń w genomie pasożyta. Zalecana jako doskonała metoda wykrywania zarażenia *T. gondii* jest także metoda nested PCR z wykorzystaniem genu rekombinowanego antygeny gęstej ziarnistości 7 (GRA7). GRA7 ulega ekspresji zarówno w bradyzoitach, jak i tachyzoitach, merozoitach oraz sporozoitach. Amplifikacja konserwatywnych regionów w genie GRA7 charakteryzuje się swoistością i czułością zbliżoną do amplifikacji fragmentu Rep529 i jest bardziej czuła, niż w przypadku genu B1.


W publikacji zwrócono uwagę, że u pacjentów zakażonych wirusem HIV odpowiedź komórkowa jest całkowicie zmieniona. Ze względu na zmniejszenie liczby limfocytów pomocniczych T (komórek CD4+), zmniejszoną aktywność cytotoksycznych limfocytów T CD8+ oraz zmniejszoną produkcję cytokin typu 1, pacjenci zakażeni HIV są bardziej narażeni na rozwój różnych zakażeń i zarażeń oportunistycznych, w tym zarażeń *Toxoplasma gondii*.

Powszechnym testem potwierdzającym różnicowanie ostrej i przewlekłej fazy zarażenia jest test awidności przeciwciał klasy IgG, jednak test ten nie jest wystarczająco swoisty u pacjentów z obniżoną odpornością. Testy serologiczne mogą nie wykryć choroby u pacjentów z obniżoną odpornością, ponieważ miana przeciwciał przeciwko *Toxoplasma* mogą nie wzrosnąć ze względu na opóźnioną reakcję tworzenia przeciwciał. Z tego powodu u pacjentów z zaawansowaną chorobą AIDS wskazane jest wykrywanie DNA pasożytów.

Na podstawie analizy dostępnej literatury w pracy wnioskowano, iż w diagnostyce *T. gondii* niezbędne jest stosowanie nowoczesnych, czułych i specyficznych metod, które pozwalają na właściwe monitorowanie przebiegu choroby, zwłaszcza u pacjentów zakażonych wirusem HIV. Tradycyjna diagnostyka oparta na oznaczaniu miana przeciwciał może być bowiem niewystarczająca.

Review

Advances and Challenges in Diagnostics of Toxoplasmosis in HIV-Infected Patients

Roland Wesołowski , Marta Pawłowska * , Małgorzata Smogula  and Karolina Szewczyk-Golec 

Department of Medical Biology and Biochemistry, Ludwik Rydygier Collegium Medicum in Bydgoszcz, Nicolaus Copernicus University in Toruń, 87-100 Toruń, Poland

* Correspondence: marta.pawlowska@cm.umk.pl; Tel.: +48-52-585-38-22

Abstract: *Toxoplasma gondii* is a worldwide distributed protozoan parasite. This apicomplexan parasite infects one-third of the population worldwide, causing toxoplasmosis, considered one of the neglected parasitic infections. In healthy humans, most infections are asymptomatic. However, in immunocompromised patients, the course of the disease can be life-threatening. Human immunodeficiency virus (HIV)-infected patients have a very high burden of *Toxoplasma gondii* co-infection. Thus, it is essential to use modern, sensitive, and specific methods to properly monitor the course of toxoplasmosis in immunodeficient patients.

Keywords: toxoplasmosis; HIV; diagnostics; *Toxoplasma gondii*



Citation: Wesołowski, R.; Pawłowska, M.; Smogula, M.; Szewczyk-Golec, K. Advances and Challenges in Diagnostics of Toxoplasmosis in HIV-Infected Patients. *Pathogens* **2023**, *12*, 110. <https://doi.org/10.3390/pathogens12010110>

Received: 28 November 2022

Revised: 31 December 2022

Accepted: 8 January 2023

Published: 9 January 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Toxoplasma gondii is an obligate intracellular protozoan parasite of 300 species of mammals and more than 30 species of birds [1]. The parasite occurs worldwide, infecting one-third of the population worldwide [2–4]. *T. gondii* is a pathogen of relevant medical and veterinary significance [3]. It is a unique parasite whose interesting development cycle makes it possible to infect humans in various ways, mainly by consuming raw meat containing tissue cysts and accidentally ingesting oocysts in food, water, or soil contaminated with cat feces. The parasite can also penetrate through the placenta from an infected mother, by organ transplantation, or by blood transfusion [1,4,5]. Pinto-Ferreira et al. [6] noticed that transmission routes of *T. gondii* varied by decade. In the 1960s and 1990s, the ingestion of cysts in meat and meat derivatives was the primary source of the parasite. In the 1980s, outbreaks occurred mainly through milk contaminated with tachyzoites. Interestingly, in the 2000s, the parasite spread among humans mainly through oocysts found in water, sand, and soil, while in the 2010s its spread was mainly due to oocysts present in raw fruits and vegetables [6]. The authors noticed that over the years meat became safer due to improved management and reduced pathogenic animal infections as a result of the development of livestock farming technology. They also suggested that, in the past 20 years, consumption of healthy types of food, such as vegetables, increased (among others, through efforts to introduce healthy eating habits to combat obesity and other metabolic diseases). Toxoplasmosis infections related to consuming vegetables occurred mainly as a result of the contamination during production, but also during processing and consumption [6]. Due to their scavenging eating habits, free-range chickens play a substantial role in the epidemiology of toxoplasmosis [7]. Therefore, chicken meat appears to be a significant source of infection for both cats and humans. Balbino et al. [8] suggested that fruits and vegetables contaminated with oocysts were the most described transmission routes in outbreaks of toxoplasmosis in Brazil. It seems that contact with cats can no longer be considered a significant risk factor for *Toxoplasma gondii* infection in urban areas [9]. Recent papers suggest that there is also a possible sexual transmission of toxoplasmosis [10–12]. Tong et al. [11] demonstrated the presence of *T. gondii* cysts in the ejaculate. Moreover,

Kaňková et al. [12] hypothesized that transmission of the parasite is possible by oral sex, particularly when infected sperm is swallowed by an uninfected person.

Even though toxoplasmosis has been known since 1908 [1], an effective vaccine for humans against this disease has not been yet developed. Nevertheless, vaccine development research is ongoing, and several vaccine candidates have been examined in different animal models, which undoubtedly brings us closer to achieving the goal. A live-attenuated vaccine based on tachyzoites of *T. gondii* with a very short shelf life of 10 days is available, but its administration is restricted to veterinary use only [13–15].

Although prevalence and mortality of toxoplasmosis have decreased over the past 20 years, the national public health agency of the United States, namely the Centers for Disease Control and Prevention (CDC), considers this disease a neglected parasitic infection demanding public health action [16]. Clinical symptoms of toxoplasmosis are mild and self-limiting in immunocompetent humans [1]. However, the disease's oligosymptomatic course is characterized by malaise, lymphadenopathy, and fever. Although most toxoplasmosis cases in immunocompetent humans have been reported as asymptomatic, there are groups of risk in which the course of the infection can be symptomatic and even severe. High-risk groups for the severe course of the disease include immunocompromised patients (i.e., people suffering from acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) or cancer), immunosuppressed organ transplant recipients, and fetuses in the case of congenital infection [17,18]. In immunocompromised patients, symptoms can be severe and associated with more complications, including fulminant myocarditis with heart failure, encephalitis, splenomegaly, retinochoroiditis, and pneumonitis [18–20].

Toxoplasmosis has been reported as the most common opportunistic cerebral infection in human immunodeficiency virus (HIV)-infected patients [21]. Moreover, it is considered a frequent cause of mortality amongst severely immunosuppressed HIV patients. Ocular and cerebral toxoplasmosis are fundamental problems in AIDS patients and may be considered factors suggesting AIDS infection [4]. In the meta-analysis, Wang et al. [13] indicated that HIV patients are characterized by a very high burden of *T. gondii* co-infection, with the highest percentage in sub-Saharan Africa (about 87.5%). Therefore, they highlighted the importance of routine testing for the presence of *T. gondii* in all people with HIV infection.

Since immunocompromised patients are a particular risk group, knowledge of traditional and new diagnostic techniques is crucial for the selection of an appropriate diagnostic method enabling rapid and accurate diagnosis as well as timely and effective treatment [22]. Clinical manifestation of toxoplasmosis is non-specific and often unreliable. Thus, the disease diagnosis is traditionally based on laboratory testing. Accurate and early diagnosis is pivotal for the prevention and treatment of the severe course of toxoplasmosis. This requires using specific and sensitive diagnostic tests to help detect the infection efficiently. Serological methods based on detecting anti-*Toxoplasma* antibodies are commonly used in routine diagnostics [22]. In this review, we discuss currently available data on serological and molecular methods used in the diagnosis of toxoplasmosis with emphasis on HIV-infected patients as a group at risk of severe complications of this opportunistic disease.

2. The Course of Toxoplasma Infection

Toxoplasma has a complex life cycle consisting of sexual reproduction, namely sporogony in definitive hosts (felines), and asexual reproduction, namely schizogony in intermediate hosts (warm-blooded animals, including humans) [1,23]. In intermediate hosts, parasites released during the rupture of oocysts or tissue cysts (containing bradyzoite stages) infect enterocytes and transform into fast-replicating tachyzoite stages. Then tachyzoites proliferate intracellularly inside a parasitophorous vacuole, which separates the parasite from the cytoplasm of the host cell [23,24]. The parasite primarily attacks nervous and lymphatic tissues, heart, and lungs [25]. Tachyzoites can transform into metabolically inactive bradyzoites and persist intracellularly in tissue cysts. Sporadically, tissue cysts may rupture to release bradyzoites, which can be killed in immunocompetent hosts. In im-

munocompromised hosts, e.g., HIV-infected patients, released bradyzoites may proliferate locally and invade other organs [1]. Bradyzoite-containing brain cysts may revert into cytotoxic tachyzoites and cause toxoplasmic encephalitis (TE) [24]. Toxoplasma infection may occur in patients after solid organ or hematopoietic stem cell transplantation as a result of the reactivation of pre-existing latent infection, a newly acquired food-borne infection, or the presence of tissue cysts in the transplanted organ [25].

3. HIV Infection and Toxoplasmosis

HIV infection is one of the major causes of morbidity and mortality worldwide, with most cases occurring in sub-Saharan Africa. Over 75 million people have been infected with HIV worldwide, and around 37 million live with this infection [26]. HIV is a retrovirus with a long latency period of slowly progressing course of the disease. Two main types of the HIV, namely HIV-1 and HIV-2, exist. HIV-1 is the prevalent and most infectious strain responsible for the global HIV/AIDS epidemic [27]. It primarily attacks CD4⁺ T cells, which allows the virus to destroy completely the immune defense of the organism [26,28]. The virus has also been revealed in macrophages in diverse anatomic locations [26]. After the infection, the HIV envelope glycoprotein gp120 binds to the CD4⁺ T-cell receptor (TCR). It then binds to a co-receptor, most frequently either CCR5 (C-C chemokine receptor type 5) or CXCR4 (C-X-C chemokine receptor type 4) [29]. In the next step, HIV reverse transcriptase produces DNA from the virus RNA and HIV integrase inserts this DNA into the host cell genome [30,31]. Once transmitted, HIV takes hold in the mucous membranes and spreads to the lymphatic organs within a few days. Around the 10th day, detecting the virus in the blood is possible. Next, the virus spreads exponentially over several weeks, peaking around day 30 [26]. Then, antibodies against HIV become detectable. The more virus particles in the bloodstream, the more host cells are attacked, resulting in a decrease in the number of CD4⁺ T cells. The increase in viral load is associated with a gradual decrease in the CD4⁺ cell count. As a result, the organism's immune response weakens usually over several years. The CD4⁺ cell count applies in monitoring the course of the disease. The decrease of CD4⁺ cell count below 200 cells/mm³ results in severe dysfunction of the immune system, and then a diagnosis of AIDS is made. At this stage of the disease, untreated people usually develop opportunistic infections, such as toxoplasmosis [30,31]. Kodym et al. [32] suggested that the reactivation of toxoplasmosis can occur in HIV and *T. gondii* co-infected subjects with not only the lowest CD4⁺ count but also with decreased number of CD8⁺ and NK cells. These results are consistent with recent research reporting the pivotal role of CD8⁺ in controlling parasite reactivation during HIV infection [33,34]. CD4⁺ cells provide essential help with the induction of the primary cell response of CD8⁺ cells. They help CD8⁺ cells mainly by facilitating the presentation of antigens and up-regulation of costimulatory molecules on dendritic cells to levels optimal for the induction of a robust CD8⁺ cell response [34]. Since both CD4⁺ and CD8⁺ cells are essential in the humoral response to the presence of the parasite, the depletion of both cell types results in increased susceptibility to toxoplasmosis. This is particularly important in the late phase of HIV infection when patients are most deficient in CD8⁺ cells [34].

The original TORCH complex describes congenital infections caused by *Toxoplasma gondii*, Rubella virus, Cytomegalovirus (CMV), and the Herpes Simplex Virus types 1 and 2 (HSV-1, HSV-2). In the case of HIV-positive patients, the pathogens mentioned above can also cause severe, life-threatening infections. Some of them are preventable, and some can be cured to some extent. Singh et al. [35] indicated that monitoring HIV-positive patients for these infections is extremely important. They emphasized that TORCH follow-up in HIV/AIDS cases can reduce overall morbidity and mortality. Thus, the immune profile of TORCH in HIV-infected patients has an excellent prognostic significance [35]. In immunocompromised hosts, the latent toxoplasmic infection may be reactivated due to the conversion of bradyzoites to tachyzoites. Infection in this group of patients can cause severe disability or be life-threatening [36]. It should be emphasized that the infection can take place despite the history of toxoplasmosis in the past and the presence of IgG antibodies.

This makes immunocompromised patients vulnerable to developing the disease anyway. It has been indicated that regular monitoring (and treatment if indicated) is necessary for these individuals. It is also reasonable to use other diagnostic methods because monitoring changes in antibody titer gives a delayed picture of disease activity.

Toxoplasmosis in HIV-positive patients is usually a consequence of the reactivation of parasite tissue cysts, leading to TE, headache, confusion, seizure, lethargy, and focal neurological symptoms [37]. TE is the most frequent clinical manifestation of toxoplasmosis in HIV-infected people [30]. In patients coinfecting with HIV and toxoplasmosis, the risk of TE ranges from 30 to 40% [38]. Some TE patients can also exhibit the symptoms of neuropsychiatric disorders, including dementia, anxiety, psychosis, and personality disorders [21]. Moreover, in HIV-positive patients, toxoplasmosis can increase susceptibility to opportunistic infections by various mechanisms, including the depletion of CD4⁺ lymphocytes, decreased production of type 1 cytokines, as well as reduced activity of cytotoxic lymphocytes [39]. Moreover, cases of disseminated toxoplasmosis with fever, disseminated intravascular coagulation, sepsis-like syndrome with hypotension, and elevated lactate dehydrogenase and pulmonary dehydrogenase may occur [21].

Wu et al. [30] emphasized that poorer cognitive function may accompany toxoplasma seropositivity. They noticed mild to moderate neurocognitive impairment in nearly half of HIV-infected people. They suggested that coinfection with HIV and toxoplasma should be considered in the differential diagnosis of young patients with rapidly progressive memory loss. HIV-infected individuals with peripheral blood CD4⁺ T cell count lower than 200/ μ L, who are toxoplasma IgG-seropositive, and do not receive trimethoprim-sulfamethoxazole treatment are at particular risk of TE [30,31]. TE generally follows the reactivation of latent infection [30]. Administration of antiretroviral therapy can reduce the risk of developing TE two-fold. Thus, primary antiretroviral treatment is recommended for HIV-infected *Toxoplasma* IgG-seropositive patients with peripheral blood CD4⁺ T cell levels below 100/ μ L [31]. TE can be diagnosed in AIDS patients by examination of cerebrospinal fluid (CSF) or serum anti-*Toxoplasma* IgG and/or IgM extended by imaging examinations of brain structures for the presence of lesions in magnetic resonance imaging (MRI) [30]. However, it should be taken under consideration that the parasite is present in CSF only intermittently, so a negative CSF result does not exclude TE and should be confirmed by repeated tests [30].

4. Diagnostics of Toxoplasmosis

The detection of *T. gondii* in fecal, tissue, water, and environmental samples has traditionally been accomplished by microscope examination. However, serological and molecular methods are more sensitive and reliable than identification based on light microscopy [40]. Table 1 presents serological methods used in the diagnosis of toxoplasmosis in humans [22,41].

Table 1. Serological methods used in the diagnostics of *Toxoplasma gondii* infection.

Abbreviation	Test Name	Refs
CLIA	chemiluminescence assay	[22,42]
DELAA	direct enzyme-linked aptamer assay	[43,44]
ELFA	enzyme-linked fluorescence assay	[22,45]
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay	[41,46]
ICT	immunochromatographic test	[40,47]
IFAT	indirect fluorescent antibody test	[40,48]
IgG avidity	immunoglobulin G (IgG) avidity test	[40,49]
IHA	indirect hemagglutination test	[40,50]
ISAGA	immunosorbent agglutination assay	[40,51]
LAT	latex agglutination test	[40,52]
MAT	modified agglutination test	[48,50]
SFDT	Sabin Feldman dye test	[40,53]
WB	western blotting	[46,53]

Immunological methods are based on detecting parasite surface antigens by host-specific immunoglobulins. Serological methods were preferentially used for diagnostics of toxoplasmosis in past decades. However, in addition to undoubted advantages, these tests have significant limitations [22,41]. The Sabin–Feldman dye test (SFDT) is a “gold standard” for the serological detection of anti-*Toxoplasma* IgG and IgM antibodies. The test explores changes in the cytoplasm of living toxoplasma trophozoites caused by the action of antibodies present in the blood serum of the infected individual; these changes become clearly visible after staining the toxoplasma with a strong solution of methyl blue [40,53]. However, the use of live tachyzoites is required in this method, which is not possible in most laboratories [54]. Therefore, an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) remains the most common method used in clinical laboratories [22,41]. Chemiluminescence assay (CLIA) and enzyme-linked fluorescence assay (ELFA) are variations of the standard ELISA. These methods have several benefits, including cost-effectiveness and fast and precise measurement of antibody levels. Furthermore, CLIA is especially useful in determining the IgG avidity index [22]. Moreover, indirect fluorescent antibody test (IFAT), indirect hemagglutination assay (IHA), immunosorbent agglutination assay (ISAGA), and modified agglutination test (MAT) have also been used [55]. Serological diagnosis of toxoplasmosis takes advantage of the persistent presence of specific antibodies in serum following exposure to the parasite [41]. Toxoplasmosis is primarily diagnosed by serological detection of IgM and IgG antibodies, and sometimes IgA directed against parasitic protein antigens (see Figure 1) [41,55]. Upon primary exposure to the parasite, in response to the parasite’s presence, antibodies in the M class are first formed. Thus, the presence of IgM antibodies may indicate a recently acquired, acute infection [55]. Subsequently, IgG immunoglobulins are formed, and they persist for years [41]. Because IgM antibodies sometimes persist in the blood serum for months or years after the initial infection, the use of IgG avidity assay has enabled a better estimation of the time of infection acquisition and identification of the primary infection with *T. gondii* [49]. Avidity is the aggregate strength by which a mixture of polyclonal IgG molecules reacts with multiple epitopes of the proteins. The IgG avidity increases progressively after immunities from infections and is referred to as maturation of the humoral immune responses. Low IgG avidity indices are usually characteristic of the first few months of primary infections, while high-avidity indices specify nonprimary infections [49]. The ELISA method can use both native antigens and recombinant and chimeric ones. In the recently developed approach to improving the diagnosis of *T. gondii* infection, the ELISA method increasingly relies on recombinant antigens instead of native antigens [41].

An alternative method for the diagnosis of toxoplasma infection is to examine circulating antigens. Surface antigen 1 (SAG1) is the most explored and used tachyzoite stage-specific antigen of *T. gondii* for serological test development (see Figure 1) [43]. SAG1 is a significant parasite surface protein which plays a role as a critical virulence factor. This protein induces both humoral and cellular host immune responses [14]. DELAA is one of the novel methods developed to detect SAG1 [43]. This method uses aptamers, termed “chemical antibodies”, which characterize high binding affinity and specificity [45]. Additionally, a real-time polymerase chain reaction (real-time PCR) assay using a set of primers targeting the SAG1 gene showed a high sensitivity for the fast and specific detection of parasites [43].

Bead-based multiplex assays (BBMAs), which use color-coded beads that carry the antigen of interest, are high throughput methods for the simultaneous detection and quantification of multiple analytes in a sample [56]. Garg et al. [55] used a BBMA containing a synthetic phosphoglycan portion of the *Toxoplasma gondii* glycosylphosphatidylinositol 1 (GPI1) to detect GPI1-specific antibodies in human sera. The glycan was conjugated to beads at the lipid site to retain its natural orientation and its immunogenic groups. The authors demonstrated that GPI1 was a more reliable predictor for parasite-specific IgM response than SAG1, indicating that BBMA using GPI1 in combination with SAG1 may strengthen *Toxoplasma gondii* serology diagnostics.

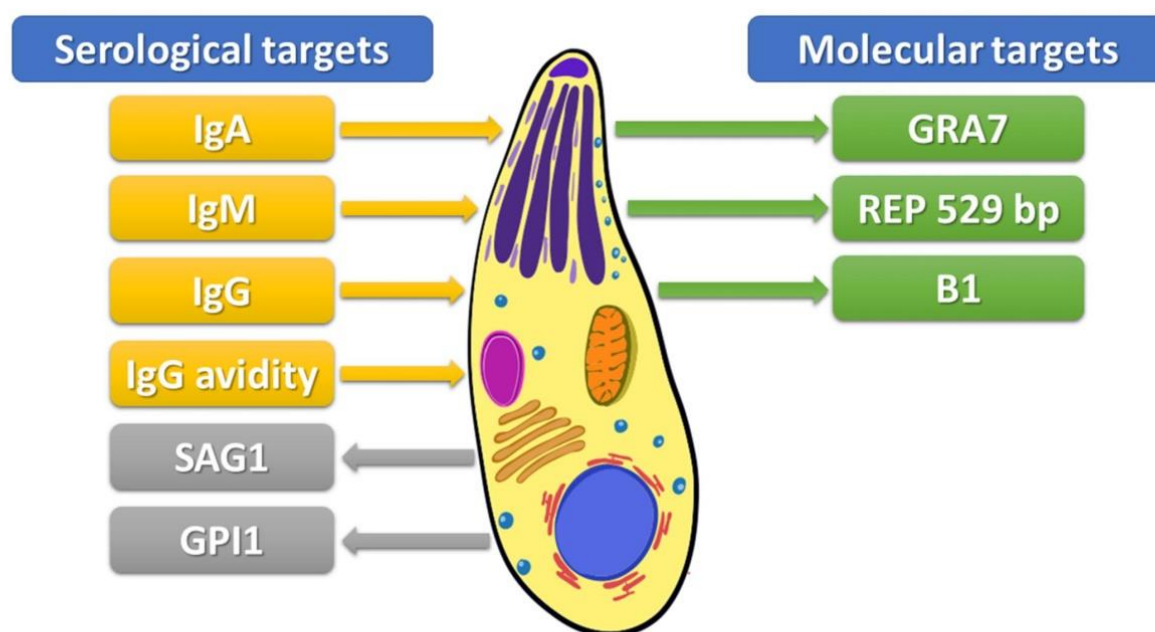


Figure 1. Targets to detect *Toxoplasma gondii* infection. IgA–Immunoglobulin A, IgM–Immunoglobulin M, IgG–Immunoglobulin G, IgG avidity–avidity of immunoglobulin G, SAG1–surface antigen 1, GPI1–glycosylphosphatidylinositol 1 antibody, GRA7–recombinant dense granule antigen 7 gene, REP 529–529-bp repeat element, B1–35-fold repetitive B1 gene.

A wide range of DNA-based detection assays has been developed for the parasite detection. Molecular biology methods allow the detection of the parasite DNA in various biological samples, including whole blood, CSF, urine, bronchoalveolar fluid, amniotic fluid, aqueous humor, cord blood, placental and brain tissues, and other samples where the parasite may be present [22,40]. Amplification of *T. gondii* DNA by quantitative polymerase chain reaction (qPCR) has been performed in different biological materials, including blood and tissue samples, amniotic fluid, and CSF. The B1 gene (35 copies) and the 529-bp repeat element (REP 529, more than 300 copies) have been extensively explored as targets for PCR detection [57]. The rep529-PCR has a higher sensitivity than B1-PCR (100% vs. 82.7–90%, respectively) due to higher repeat numbers in the parasite genome [58]. Nested PCR utilizing the recombinant dense granule antigen 7 (GRA7) gene has been recommended as an excellent method to detect *T. gondii* infection. GRA7 has an important function in the parasitophorous vacuole. It is involved in the sequestration of host endolysosomes and is expressed in all infectious stages, including bradyzoite, tachyzoite, merozoite, and sporozoite. Amplification of conserved regions in the GRA7 gene is characterized by specificity and sensitivity similar to the 529-bp fragment and is more sensitive than the B1 gene [33].

An isothermal nucleic acid amplification technology (INAAT) may also be useful in the diagnostics of toxoplasmosis. It allows DNA amplification to be performed rapidly. Two INAAT methods, namely Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) and Nucleic Acid Sequence-Based Amplification (NASBA), have been used for the rapid detection of *Toxoplasma gondii* [33,59]. LAMP is based upon the amplification of DNA (or RNA if combined with a retro-transcription step) under isothermal conditions (63–65 °C) [43]. This method, initially developed by Notomi et al. in 2000 [60], is based on the reaction of DNA polymerase with strand displacement activity and a set of two specially designed inner primers (forward inner primer, FIP, and backward inner primer, BIP) and two outer primers (forward primer F3 and backward primer B3) that amplifies DNA rapidly with high efficiency and specificity. The LAMP method can amplify a few copies of genetic

material to 10⁹ copies in less than an hour [61]. The advantage of this technique is that DNA amplification can be easily detected by visual inspection of the turbidity or fluorescence of the reaction mixture or by a Loopamp real-time turbidimeter [62]. During the reaction, pyrophosphate ions released from deoxyribonucleotide triphosphates (dNTPs) as by-products react with magnesium ions, forming a white precipitate of magnesium pyrophosphate. As a result, a positive reaction can be visually inspected immediately or by observing the color change after the post-addition of DNA intercalating fluorescent dye SYBR green I or pre-addition of the colorimetric indicator hydroxynaphthol blue (HNB) to the reaction mixture. The color change is permanent, and thus, it can be kept for record purposes. The use of gel electrophoresis in this technique is not mandatory, and thus the risk of carry-over contamination is reduced [61]. Fallahi et al. [62] determined that the LAMP assay targeting the RE and B1 genes had superior sensitivity and specificity than the conventional PCR technique based on the same genomic targets for the detection of the *T. gondii* DNA from both mice-obtained tachyzoites and clinical samples of leukemic patients. The NASBA method involves the simultaneous use of three enzymes, namely avian myeloblastosis virus reverse transcriptase (AMV-RT), RNase H, and T7 RNA polymerase, under isothermal conditions (41 °C). The final amplification product includes a single-stranded RNA of the opposite sense of the original target [63]. What is important is that NASBA does not require a thermocycler. A constant temperature throughout the amplification reaction enables each reaction step to proceed when intermediate amplification becomes available, so the NASBA reaction is more efficient than DNA methods that are limited to binary increases per cycle [63].

Because many pathogens that threaten human health are foodborne parasites, in addition to the diagnostic methods mentioned above, there is also a need to test food for contamination by parasites. Detection of *T. gondii* infection in animals or animal products has been reported in numerous publications [63–71]. It has been indicated that, in the USA, adult sheep and lambs had high *T. gondii* seroprevalence, and thus they should be considered a significant source of the parasite for humans [72]. Temesgen et al. [73] developed and evaluated novel multiplex qPCR for simultaneous detection of *T. gondii*, *Echinococcus multilocularis*, and *Cyclospora cayentanensis* in berry fruits. The proposed method is characterized by high specificity and precision, with the detection limit of *T. gondii* equal to 10 oocysts in 30 g of berries.

5. Diagnostics of Toxoplasmosis in HIV-Infected Patients

Cerebral toxoplasmosis is one of the most common causes of focal brain damage in HIV patients. MRI plays an essential role in diagnosing and treating cerebral toxoplasmosis [74,75]. Imaging techniques cannot distinguish toxoplasmosis from other neurological opportunistic infections. Thus, early laboratory diagnosis and prompt treatment of cerebral toxoplasmosis in HIV patients could reduce the risk of neurological damage and mortality [36].

The serological diagnosis is the first and the most frequently used approach to determining the stage of infection. The detection of IgG, IgM, IgA, and IgG avidity by different methods offers this opportunity [76]. The IgG avidity test is a qualitative test that differentiates chronic toxoplasmosis caused by a recent infection and determines the status of toxoplasma infection. High IgG avidity indicates chronic or reactivated infection, while low IgG avidity suggests acute infection [77]. Lui et al. [78] noticed that AIDS/HIV patients have higher seroprevalence of *T. gondii* than HIV-negative individuals. Smogula et al. [4] also observed higher seroprevalence of *T. gondii* in subjects at increased risk of HIV infection. Singh et al. [35] described higher seroprevalence (21.94%) of IgM antibodies and lower (11.11%) IgG antibodies against *T. gondii* among HIV/AIDS patients in India. However, Zhou et al. [79] pointed out that the reactivation of latent toxoplasmosis is more common than primary infection in patients with HIV. Nourollahpour Shiadeh et al. [80] analyzed the prevalence of acute (AT) and latent toxoplasmosis (LT) in HIV-infected pregnant women. They estimated AT in 1.1% and LT in 45.7% of pregnant women. It should be

considered that, in HIV-infected patients, the cellular response is totally altered. Due to the depletion of T-helper lymphocytes (CD4⁺ cells), reduced activity of CD8⁺ cytotoxic T cells, and decreased production of type 1 cytokines, HIV-infected patients are at greater risk of developing opportunistic infections [80]. Th1/Th2 imbalance and a decrease in CD4⁺ T cells (CD4⁺ T-lymphocyte counts below 100 cells/ μ L) can cause the reactivation of latent toxoplasmosis in HIV patients due to the failure of antiparasitic CD4⁺ T-cell response [36].

It has been proven that *T. gondii* can be transmitted through the transfusion of whole blood or leukocytes. The parasite could stay alive in the citrated blood sample at 5 °C for more than 50 days. Thus, the refrigeration of blood specimens during storage cannot prevent toxoplasma transmission by transfusion [38]. Toxoplasmosis could be a lethal opportunistic infection after allogeneic hematopoietic cell transplantation [58]. Therefore, using both serologic and molecular methods in blood donors would be highly important for safe blood donations [81]. To prevent toxoplasmosis, serological screening of donors and recipients before transplantation is of primary importance to identify patients at high risk of toxoplasmosis, i.e., seropositive hematopoietic stem cell transplant recipients and mismatched (seropositive donor/seronegative recipients) solid organ transplant recipients. Preventing toxoplasmosis disease in those patients presently relies on prophylaxis via the prescription of co-trimoxazole [82]. Foroutan et al. [83] analyzed studies on *T. gondii* seroprevalence in hemodialysis patients. They observed specific IgG antibodies in 58% and specific IgM antibodies in 2% of hemodialysis patients, respectively, and 40% and 0% in controls. Furthermore, the authors suggested that hemodialysis patients, as well as HIV patients, should be screened periodically for *T. gondii* infections due to their reduced immunity.

The antibody-based methods are not always appropriate for differentiation between acute and reactivated toxoplasmosis. High antibody titers may indicate active disease (i.e., positive IgM or low avidity of IgG) or may point to a higher risk of developing the disease (permanently positive IgG) [43]. Routine anti-*T. gondii* IgM diagnostic tests show limited value in diagnosing HIV patients because they have limitations such as their inefficiency for confirmation of the parasite infection in immunocompromised subjects [22,77]. The IgG avidity test is a confirmatory test for differentiating between acute and chronic phases of the infection but is not specific enough in immunocompromised patients [84]. Serological tests may fail to detect the disease in immunocompromised patients because the titers of anti-*Toxoplasma* antibodies may fail to rise [63]. Thus, it is recommendable to detect parasite DNA in patients with advanced HIV disease [81]. It should be emphasized that molecular diagnostics do not depend on the immunological condition of the host. Thus, molecular methods would be the best option for immunocompromised patients [83]. The direct demonstration of the presence of parasites in tissues or body fluids would be a breakthrough for the diagnosis of toxoplasmosis. Therefore, molecular methods are considered important diagnostic tools for detecting toxoplasma infection in immunosuppressed hosts [77].

Nowadays, the use of the PCR method has been helpful in the improvement of diagnostic procedures, especially acute toxoplasmosis diagnosis [39]. Real-time PCR methods can detect fewer copies of the parasite genome compared to conventional PCR methods [85]. Currently, in Poland, according to the recommendations of the Polish AIDS Society, all symptomatic patients should be tested with PCR for the presence of parasite DNA in CSF [86]. Primary anti-parasitic treatment of toxoplasmosis in HIV patients should be continued for more than 6 weeks. Moreover, the maintenance treatment should be continued until the CD4⁺ T cell count reaches more than 200 cells/ μ L in two tests repeated 6 months apart and after the symptoms of the acute disease subside [86]. These recommendations are generally in line with "Guidelines for the Prevention and Treatment of Opportunistic Infections in Adults and Adolescents with HIV", available at <https://clinicalinfo.hiv.gov/en> (accessed on 27 November 2022) [87]. The qPCR assay is currently the state-of-the-art molecular technique in toxoplasmosis diagnostics in HIV patients. This technique allows rapid parasite DNA detection with little risk of laboratory contamination with amplicons [88]. There are also promising studies indicating the potential use of micro-RNA (miRNA) and circulating RNA (circRNA), especially miR-21-5p and miR-146a-

5p molecules, in the diagnosis of HIV/cerebral toxoplasmosis co-infections. Still, their implementation as diagnostic targets requires further research [89,90].

In our opinion, there is a need to constantly search for new, effective, high-sensitive, and high-specific diagnostic methods that detect the parasite's infection. Therefore, molecular biology methods have great diagnostic potential. Although most molecular methods generate high costs, the LAMP method seems to be an interesting alternative. This method is relatively inexpensive and fast and, at the same time, based on a portable and cost-effective device. In recent years, LAMP has been applied in the diagnosis of other parasitic diseases, such as malaria, trypanosomiasis, schistosomiasis, or leishmaniasis [91–94].

6. Conclusions

In conclusion, the different serology and molecular methods used in detecting toxoplasma infection have their advantages and limitations. It is crucial to use appropriate, combined diagnostic methods depending on the needs of specific clinical cases. Timely and appropriate diagnosis is extremely important for the health of people infected with HIV, especially regarding the risk of toxoplasmic encephalitis. As HIV-positive people, despite a history of toxoplasmosis, are still at risk of developing an acute course of the disease, regular monitoring for potential reactivation of the infection is necessary. Therefore, it is essential to use modern, sensitive, and specific methods that allow proper monitoring of the course of the disease. Traditional diagnostics based on antibody titer determination may be inappropriate due to the delayed reaction of antibody formation. Undoubtedly, modern techniques of molecular biology should be recommended to improve the diagnosis of toxoplasma, particularly in HIV patients.

Author Contributions: Conceptualization, R.W.; writing—original draft preparation, R.W., M.P. and M.S.; writing—review and editing, R.W., M.P. and K.S.-G.; visualization, R.W. and M.P.; supervision, K.S.-G. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This review received no external funding.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request from the corresponding author. The data are not publicly available due to privacy or ethical restrictions.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Szewczyk-Golec, K.; Pawłowska, M.; Wesołowski, R.; Wróblewski, M.; Mila-Kierzenkowska, C. Oxidative Stress as a Possible Target in the Treatment of Toxoplasmosis: Perspectives and Ambiguities. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 5705. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Mizani, A.; Alipour, A.; Sharif, M.; Sarvi, S.; Amouei, A.; Shokri, A.; Rahimi, M.-T.; Hosseini, S.A.; Daryani, A. Toxoplasmosis Seroprevalence in Iranian Women and Risk Factors of the Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Trop. Med. Health* **2017**, *45*, 7. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Chen, J.; Xue, L.; Hu, H.; Yin, X.; Cao, H.; Shen, B. MIC17A Is a Novel Diagnostic Marker for Feline Toxoplasmosis. *Anim. Dis.* **2022**, *2*, 20. [[CrossRef](#)]
4. Smogula, M.; Pawłowska, M.; Wesołowski, R.; Szewczyk-Golec, K.; Mila-Kierzenkowska, C. Seroprevalence of Toxoplasma gondii in People at an Increased Risk of HIVinfection—A Pilot Study. *Diagn. Lab.* **2022**, *58*, 9–14. [[CrossRef](#)]
5. Dard, C.; Fricker-Hidalgo, H.; Brenier-Pinchart, M.-P.; Pelloux, H. Relevance of and New Developments in Serology for Toxoplasmosis. *Trends Parasitol.* **2016**, *32*, 492–506. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Pinto-Ferreira, F.; Caldart, E.T.; Pasquali, A.K.S.; Mitsuka-Breganó, R.; Freire, R.L.; Navarro, I.T. Patterns of Transmission and Sources of Infection in Outbreaks of Human Toxoplasmosis. *Emerg. Infect. Dis.* **2019**, *25*, 2177–2182. [[CrossRef](#)]
7. Nzelu, I.N.; Kwaga, J.K.P.; Kabir, J.; Lawal, I.A.; Beazley, C.; Evans, L.; Blake, D.P. Detection and Genetic Characterisation of Toxoplasma Gondii Circulating in Free-Range Chickens, Pigs and Seropositive Pregnant Women in Benue State, Nigeria. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2021**, *15*, e0009458. [[CrossRef](#)]
8. Balbino, L.S.; Bernardes, J.C.; Ladeia, W.A.; Martins, F.D.C.; Nino, B.D.S.L.; Mitsuka-Breganó, R.; Navarro, I.T.; Pinto-Ferreira, F. Epidemiological Study of Toxoplasmosis Outbreaks in Brazil. *Transbound. Emerg. Dis.* **2022**, *69*, 2021–2028. [[CrossRef](#)]

9. Hoshina, T.; Horino, T.; Saiki, E.; Aonuma, H.; Sawaki, K.; Miyajima, M.; Lee, K.; Nakaharai, K.; Shimizu, A.; Hosaka, Y.; et al. Seroprevalence and Associated Factors of *Toxoplasma Gondii* among HIV-Infected Patients in Tokyo: A Cross Sectional Study. *J. Infect. Chemother.* **2020**, *26*, 33–37. [[CrossRef](#)]
10. Hlaváčová, J.; Flegr, J.; Řežábek, K.; Calda, P.; Kaňková, Š. Male-to-Female Presumed Transmission of Toxoplasmosis Between Sexual Partners. *Am. J. Epidemiol.* **2021**, *190*, 386–392. [[CrossRef](#)]
11. Tong, W.H.; Hlaváčová, J.; Abdulai-Saiku, S.; Kaňková, Š.; Flegr, J.; Vyas, A. Presence of *Toxoplasma Gondii* Tissue Cysts in Human Semen: Toxoplasmosis as a Potential Sexually Transmissible Infection. *J. Infect.* **2022**, *86*, 60–65. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Kaňková, Š.; Hlaváčová, J.; Flegr, J. Oral Sex: A New, and Possibly the Most Dangerous, Route of Toxoplasmosis Transmission. *Med. Hypotheses* **2020**, *141*, 109725. [[CrossRef](#)]
13. Wang, J.-L.; Zhang, N.-Z.; Li, T.-T.; He, J.-J.; Elsheikha, H.M.; Zhu, X.-Q. Advances in the Development of Anti-*Toxoplasma Gondii* Vaccines: Challenges, Opportunities, and Perspectives. *Trends Parasitol.* **2019**, *35*, 239–253. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Pagheh, A.S.; Sarvi, S.; Sharif, M.; Rezaei, F.; Ahmadpour, E.; Dodangeh, S.; Omidian, Z.; Hassannia, H.; Mehrzadi, S.; Daryani, A. *Toxoplasma Gondii* Surface Antigen 1 (SAG1) as a Potential Candidate to Develop Vaccine against Toxoplasmosis: A Systematic Review. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* **2020**, *69*, 101414. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Chu, K.-B.; Quan, F.-S. Advances in *Toxoplasma Gondii* Vaccines: Current Strategies and Challenges for Vaccine Development. *Vaccines* **2021**, *9*, 413. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Ben-Harari, R.R.; Connolly, M.P. High Burden and Low Awareness of Toxoplasmosis in the United States. *Postgrad. Med.* **2019**, *131*, 103–108. [[CrossRef](#)]
17. Fang, E.E.; Nyasa, R.B.; Ndi, E.M.; Zofou, D.; Kwenti, T.E.; Lepezeu, E.P.; Titanji, V.P.K.; Ndi, R.N. Investigating the Risk Factors for Seroprevalence and the Correlation between CD4+ T-Cell Count and Humoral Antibody Responses to *Toxoplasma Gondii* Infection amongst HIV Patients in the Bamenda Health District, Cameroon. *PLoS ONE* **2021**, *16*, e0256947. [[CrossRef](#)]
18. Mahmoudi, M.R.; Rahmati, B. Coinfection of *Toxoplasma Gondii* and Intestinal Parasites among Elderly Immunocompromised Patients. *Elder. Health J.* **2020**, *6*, 31–35. [[CrossRef](#)]
19. Henaio-Martínez, A.F.; Franco-Paredes, C.; Palestine, A.G.; Montoya, J.G. Symptomatic Acute Toxoplasmosis in Returning Travelers. *Open Forum Infect. Dis.* **2018**, *5*, ofy058. [[CrossRef](#)]
20. Pastorello, R.G.; Costa, A.D.C.L.; Sawamura, M.V.Y.; Nicodemo, A.C.; Duarte-Neto, A.N. Disseminated Toxoplasmosis in a Patient with Advanced Acquired Immunodeficiency Syndrome. *Autops. Case Rep.* **2018**, *8*, e2018012. [[CrossRef](#)]
21. Basavaraju, A. Toxoplasmosis in HIV Infection: An Overview. *Trop. Parasitol.* **2016**, *6*, 129. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Rostami, A.; Karanis, P.; Fallahi, S. Advances in Serological, Imaging Techniques and Molecular Diagnosis of *Toxoplasma Gondii* Infection. *Infection* **2018**, *46*, 303–315. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Mukhopadhyay, D.; Arranz-Solis, D.; Saeij, J.P.J. Influence of the Host and Parasite Strain on the Immune Response During *Toxoplasma* Infection. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2020**, *10*, 580425. [[CrossRef](#)]
24. Schlüter, D.; Barragan, A. Advances and Challenges in Understanding Cerebral Toxoplasmosis. *Front. Immunol.* **2019**, *10*, 242. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Pleyer, U.; Groß, U.; Schlüter, D.; Wilking, H.; Seeber, F. Toxoplasmosis in Germany: Epidemiology, Diagnosis, Risk Factors, and Treatment. *Dtsch. Ärzteblatt Int.* **2019**, *116*, 435–444. [[CrossRef](#)]
26. Deeks, S.G.; Overbaugh, J.; Phillips, A.; Buchbinder, S. HIV Infection. *Nat. Rev. Dis. Primers* **2015**, *1*, 15035. [[CrossRef](#)]
27. Saha, M.; Bhattacharya, S. A Brief Overview on HIV Infection, Diagnosis and Treatment. *Curr. Top. Med. Chem.* **2019**, *19*, 2739–2741. [[CrossRef](#)]
28. Vidya Vijayan, K.K.; Karthigeyan, K.P.; Tripathi, S.P.; Hanna, L.E. Pathophysiology of CD4+ T-Cell Depletion in HIV-1 and HIV-2 Infections. *Front. Immunol.* **2017**, *8*, 580. [[CrossRef](#)]
29. Lau, C.-Y.; Adan, M.; Maldarelli, F. Why the HIV Reservoir Never Runs Dry: Clonal Expansion and the Characteristics of HIV-Infected Cells Challenge Strategies to Cure and Control HIV Infection. *Viruses* **2021**, *13*, 2512. [[CrossRef](#)]
30. Wu, J.; Luo, X.; Huang, N.; Li, Y.; Luo, Y. Misdiagnosis of HIV With Toxoplasmosis Encephalopathy with Progressive Memory Loss as the Initial Symptom: A Case Report. *Front. Neurol.* **2022**, *13*, 809811. [[CrossRef](#)]
31. Marra, C.M. Central Nervous System Infection with *Toxoplasma Gondii*. In *Handbook of Clinical Neurology*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2018; Volume 152, pp. 117–122. ISBN 978-0-444-63849-6.
32. Kodym, P.; Malý, M.; Beran, O.; Jilich, D.; Rozsypal, H.; Machala, L.; Holub, M. Incidence, Immunological and Clinical Characteristics of Reactivation of Latent *Toxoplasma Gondii* Infection in HIV-Infected Patients. *Epidemiol. Infect.* **2015**, *143*, 600–607. [[CrossRef](#)]
33. Khan, A.H.; Noordin, R. Serological and Molecular Rapid Diagnostic Tests for *Toxoplasma* Infection in Humans and Animals. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **2020**, *39*, 19–30. [[CrossRef](#)]
34. Khan, I.A.; Hwang, S.; Moretto, M. *Toxoplasma Gondii*: CD8 T Cells Cry for CD4 Help. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2019**, *9*, 136. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Singh, L.; Mishra, S.; Prasanna, S.; Cariappa, M.P. Seroprevalence of TORCH Infections in Antenatal and HIV Positive Patient Populations. *Med. J. Armed Forces India* **2015**, *71*, 135–138. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Pereira, I.D.S.; Maia, M.M.; da Cruz, A.B.; Telles, J.P.M.; Vidal, J.E.; Gava, R.; Meira-Strejevitch, C.S.; Pereira-Chioccola, V.L. Plasma Extracellular MicroRNAs Are Related to AIDS/Cerebral Toxoplasmosis Co-infection. *Parasite Immunol.* **2020**, *42*, e12696. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

37. Hosseini, S.A.; Sharif, M.; Sarvi, S.; Abediankenari, S.; Hashemi-Soteh, M.B.; Amouei, A.; Montazeri, M.; Aghayan, S.A.; Gholami, S.; Shaker, D.; et al. Genetic Characterization of *Toxoplasma Gondii* in Iranian HIV Positive Patients Using Multilocus Nested-PCR-RFLP Method. *Parasitology* **2020**, *147*, 322–328. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Mohammed, E.; Yassin, M.; Anan, K.; Omer, A.; Elsir, M.A.; ElHussein, A.M.; Abdalkareem, A.; Mansour, O. Sero-Molecular Detection of *Toxoplasma Gondii* Infection among HIV-Positive Patients in Khartoum: A Cross Sectional Study. *Int. J. Sci. Res. Sci. Technol.* **2021**, 125–131. [[CrossRef](#)]
39. Hosseini, S.A.; Amouei, A.; Sharif, M.; Sarvi, S.; Galal, L.; Javidnia, J.; Pagheh, A.S.; Gholami, S.; Mizani, A.; Daryani, A. Human Toxoplasmosis: A Systematic Review for Genetic Diversity of *Toxoplasma Gondii* in Clinical Samples. *Epidemiol. Infect.* **2019**, *147*, e36. [[CrossRef](#)]
40. Liu, Q.; Wang, Z.-D.; Huang, S.-Y.; Zhu, X.-Q. Diagnosis of Toxoplasmosis and Typing of *Toxoplasma Gondii*. *Parasites Vectors* **2015**, *8*, 292. [[CrossRef](#)]
41. Liyanage, K.L.D.T.D.; Wiethoelter, A.; Hufschmid, J.; Jabbar, A. Descriptive Comparison of ELISAs for the Detection of *Toxoplasma Gondii* Antibodies in Animals: A Systematic Review. *Pathogens* **2021**, *10*, 605. [[CrossRef](#)]
42. Holec-Gasior, L.; Ferra, B.; Czechowska, J.; Serdiuk, I.E.; Krzysiński, K. A Novel Chemiluminescent Immunoassay Based on Original Acridinium Ester Labels as Better Solution for Diagnosis of Human Toxoplasmosis than Conventional ELISA Test. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **2018**, *91*, 13–19. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Cui, W.; Shen, X.; Wang, C.; Bibi, A.; Cudjoe, O.; Zhao, L.; Yu, L.; Du, J.; Xu, Y.; Chen, X.; et al. Direct Enzyme-Linked Aptamer Assay (DELAA) for Diagnosis of Toxoplasmosis by Detection of SAG1 Protein in Mice and Humans. *Acta Trop.* **2022**, *226*, 106255. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Shen, X.; Cui, W.; Wang, C.; Cudjoe, O.; Zhao, L.; Tao, Q.; Yu, L.; Du, J.; Wang, W.; Shen, J. SELEX-Based Direct Enzyme-Linked Aptamer Assay (DELAA) for Diagnosis of Toxoplasmosis by Detection of SAG1 Antigen in Sera of Mice and Humans. *Res. Square* **2021**, 2021, 1–23. [[CrossRef](#)]
45. Plazas, M.I.; Salamanca-Marin, J.; Torres-Morales, E.; Londoño, J.C.; Celis-Giraldo, D.; Gomez-Marin, J.E. Frequency of Natural Antibodies and Concordance Analysis for Anti-TOXOPLASMA IgM Tests in Colombian Sera of Pregnant Women. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **2022**, *103*, 115733. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Galván-Ramírez, M.D.L.L.; Charles-Niño, C.; Pedroza-Roldán, C.; Salazar-Reveles, C.; Ocampo-Figueroa, K.L.; Rodríguez-Pérez, L.R.; Paez-Magallán, V.M. Prevalence of *Toxoplasma Gondii* Measured by Western Blot, ELISA and DNA Analysis, by PCR, in Cats of Western Mexico. *Pathogens* **2022**, *11*, 109. [[CrossRef](#)]
47. Wassef, R. Validity of a New Immunochromatographic Test in Detection of *Toxoplasma Gondii* in Cancer Patients. *J. Parasit. Dis.* **2019**, *4*, 83–86. [[CrossRef](#)]
48. Macri, G.; Sala, M.; Linder, A.M.; Pettirossi, N.; Scarpulla, M. Comparison of Indirect Fluorescent Antibody Test and Modified Agglutination Test for Detecting *Toxoplasma Gondii* Immunoglobulin G Antibodies in Dog and Cat. *Parasitol. Res.* **2009**, *105*, 35–40. [[CrossRef](#)]
49. Teimouri, A.; Mohtasebi, S.; Kazemirad, E.; Keshavarz, H. Role of *Toxoplasma Gondii* IgG Avidity Testing in Discriminating between Acute and Chronic Toxoplasmosis in Pregnancy. *J. Clin. Microbiol.* **2020**, *58*, e00505-20. [[CrossRef](#)]
50. Fernandes, S.; Brilhante-Simões, P.; Coutinho, T.; Cardoso, L.; Dubey, J.P.; Lopes, A.P. Comparison of Indirect and Modified Agglutination Tests for Detection of Antibodies to *Toxoplasma Gondii* in Domestic Cats. *J. Vet. Diagn. Investig.* **2019**, *31*, 774–777. [[CrossRef](#)]
51. Avignon, M.; Lévêque, M.F.; Guemas, E.; Sasso, M.; Albaba, S.; Lachaud, L.; Fillaux, J. Diagnosis of Congenital Toxoplasmosis: Performance of Four IgG and IgM Automated Assays at Birth in a Tricentric Evaluation. *J. Clin. Microbiol.* **2022**, *60*, e00115-22. [[CrossRef](#)]
52. Sarfraz-ur-Rahman; Akbar, H.; Shabbir, M.Z.; Ullah, U.; Rashid, M.I. Development of Human Toxo IgG ELISA Kit, and False-Positivity of Latex Agglutination Test for the Diagnosis of Toxoplasmosis. *Pathogens* **2021**, *10*, 1111. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Ybañez, R.H.D.; Ybañez, A.P.; Nishikawa, Y. Review on the Current Trends of Toxoplasmosis Serodiagnosis in Humans. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2020**, *10*, 204. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Elsheikha, H.M.; Marra, C.M.; Zhu, X.-Q. Epidemiology, Pathophysiology, Diagnosis, and Management of Cerebral Toxoplasmosis. *Clin. Microbiol. Rev.* **2020**, *34*, e00115-19. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Garg, M.; Stern, D.; Groß, U.; Seeberger, P.H.; Seeber, F.; Varón Silva, D. Detection of Anti-*Toxoplasma Gondii* Antibodies in Human Sera Using Synthetic Glycosylphosphatidylinositol Glycans on a Bead-Based Multiplex Assay. *Anal. Chem.* **2019**, *91*, 11215–11222. [[CrossRef](#)]
56. Fabian, B.T.; Hedar, F.; Koethe, M.; Bangoura, B.; Maksimov, P.; Conraths, F.J.; Villena, I.; Aubert, D.; Seeber, F.; Schares, G. Fluorescent Bead-Based Serological Detection of *Toxoplasma Gondii* Infection in Chickens. *Parasites Vectors* **2020**, *13*, 388. [[CrossRef](#)]
57. Gutierrez-Loli, R.; Ferradas, C.; Diestra, A.; Traianou, A.; Bowman, N.; Bok, J.; Reimer-McAtee, M.; Ramal, C.; Ticona, E.; Steinberg, H.; et al. Development of a Novel Protocol Based on Blood Clot to Improve the Sensitivity of QPCR Detection of *Toxoplasma Gondii* in Peripheral Blood Specimens. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2019**, *100*, 83–89. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Rauwolf, K.K.; Floeth, M.; Kerl, K.; Schaumburg, F.; Groll, A.H. Toxoplasmosis after Allogeneic Haematopoietic Cell Transplantation—Disease Burden and Approaches to Diagnosis, Prevention and Management in Adults and Children. *Clin. Microbiol. Infect.* **2021**, *27*, 378–388. [[CrossRef](#)]

59. Durand, L.; La Carbona, S.; Geffard, A.; Possenti, A.; Dubey, J.P.; Lalle, M. Comparative Evaluation of Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) vs QPCR for Detection of *Toxoplasma Gondii* Oocysts DNA in Mussels. *Exp. Parasitol.* **2020**, *208*, 107809. [[CrossRef](#)]
60. Notomi, T. Loop-Mediated Isothermal Amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.* **2000**, *28*, 63e–663. [[CrossRef](#)]
61. Hegazy, M.K.; Awad, S.I.; Saleh, N.E.; Hegazy, M.M. Loop Mediated Isothermal Amplification (LAMP) of *Toxoplasma* DNA from Dried Blood Spots. *Exp. Parasitol.* **2020**, *211*, 107869. [[CrossRef](#)]
62. Fallahi, S.; Seyyed Tabaei, S.J.; Pournia, Y.; Zebardast, N.; Kazemi, B. Comparison of Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) and Nested-PCR Assay Targeting the RE and B1 Gene for Detection of *Toxoplasma Gondii* in Blood Samples of Children with Leukaemia. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **2014**, *79*, 347–354. [[CrossRef](#)]
63. Norouzi, R. Comparison of a Nucleic Acid Sequence-Based Amplification (NASBA) and Real-Time Reverse Transcriptase PCR Methods for Detection of *Toxoplasma Gondii* in Rat Blood Samples. *J. Zoonotic Dis.* **2016**, *1*, 10.
64. Dong, H.; Su, R.; Lu, Y.; Wang, M.; Liu, J.; Jian, F.; Yang, Y. Prevalence, Risk Factors, and Genotypes of *Toxoplasma Gondii* in Food Animals and Humans (2000–2017) From China. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 2108. [[CrossRef](#)]
65. Luna, J.C.; Zamora, A.; Hernández-Arango, N.; Muñoz-Sánchez, D.; Pinzón, M.I.; Cortés-Vecino, J.A.; Lora-Suarez, F.; Gómez-Marín, J.E. Food Safety Assessment and Risk for Toxoplasmosis in School Restaurants in Armenia, Colombia. *Parasitol. Res.* **2019**, *118*, 3449–3457. [[CrossRef](#)]
66. Liu, Y.-M.; Zhang, Y.-Y.; Wang, L.; Wang, H.-Y.; Li, C.-H.; Jiang, Y.-H.; Sun, W.-W. *Toxoplasma Gondii* Antibodies in Raw Milk and Sera of Cows in China. *Pathogens* **2022**, *11*, 1079. [[CrossRef](#)]
67. Li, G.; Zheng, W.; Yang, J.; Qi, T.; He, Y.; Chen, W.; Ma, H.; Sun, Y.; Li, Y.; Kang, M.; et al. Seroprevalence and Epidemiology of *Toxoplasma Gondii* in Animals in the Qinghai-Tibetan Plateau Area, China. *Pathogens* **2021**, *10*, 432. [[CrossRef](#)]
68. Razooqi, M.A.; Gharban, H.A.; Al-Kaabi, M.A. Molecular and Seroprevalence of Toxoplasmosis in Goats' Blood and Milk in Iraq. *Arch. Razi Inst.* **2022**, *77*, 1749–1755. [[CrossRef](#)]
69. Saad, N.M.; Hussein, A.A.A.; Ewida, R.M. Occurrence of *Toxoplasma Gondii* in Raw Goat, Sheep, and Camel Milk in Upper Egypt. *Vet. World* **2018**, *11*, 1262–1265. [[CrossRef](#)]
70. Marín-García, P.-J.; Planas, N.; Llobat, L. *Toxoplasma Gondii* in Foods: Prevalence, Control, and Safety. *Foods* **2022**, *11*, 2542. [[CrossRef](#)]
71. Puchalska, M.; Wiśniewski, J.; Klich, D.; Gołab, E.; Jańczak, D.; Sokołowska, J.; Urbańska, K.; Anusz, K. A Serological Survey of *Toxoplasma Gondii* in Polish Pigs from Organic Farms, Other Housing Systems and in Pigs of Different Age Groups. *Acta Vet. Scand.* **2022**, *64*, 3. [[CrossRef](#)]
72. Mao, F.; Yang, Y.; Chen, Y.; Zhang, Q.; Ding, X.; Ni, B.; Xu, X.; Jin, X.; Dai, Y. Seroprevalence and Risk Factors of *Toxoplasma Gondii* Infection Among High-Risk Populations in Jiangsu Province, Eastern China. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2021**, *11*, 783654. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
73. Temesgen, T.T.; Robertson, L.J.; Tysnes, K.R. A Novel Multiplex Real-Time PCR for the Detection of *Echinococcus Multilocularis*, *Toxoplasma Gondii*, and *Cyclospora Cayetanensis* on Berries. *Food Res. Int.* **2019**, *125*, 108636. [[CrossRef](#)]
74. Roche, A.D.; Rowley, D.; Brett, F.M.; Looby, S. Concentric and Eccentric Target MRI Signs in a Case of HIV-Associated Cerebral Toxoplasmosis. *Case Rep. Neurol. Med.* **2018**, *2018*, 1–3. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Kadri, A.; Yandra, E. Demographic, Clinical, and Laboratory Characteristics of HIV Patients with Cerebral Toxoplasmosis at Haji Adam Malik General Hospital Medan. *J. Kedokt. Brawijaya* **2022**, *32*, 4. [[CrossRef](#)]
76. Sensini, A. *Toxoplasma Gondii* Infection in Pregnancy: Opportunities and Pitfalls of Serological Diagnosis. *Clin. Microbiol. Infect.* **2006**, *12*, 504–512. [[CrossRef](#)]
77. Bavand, A. Prevalence of *Toxoplasma Gondii* Antibodies and DNA in Iranian HIV Patients. *Iran. J. Pathol.* **2018**, *14*, 68–75. [[CrossRef](#)]
78. Liu, L.; Liu, L.-N.; Wang, P.; Lv, T.-T.; Fan, Y.-G.; Pan, H.-F. Elevated Seroprevalence of *Toxoplasma Gondii* in AIDS/HIV Patients: A Meta-Analysis. *Acta Trop.* **2017**, *176*, 162–167. [[CrossRef](#)]
79. Zhou, Y.; Liu, Y.; Wen, Y. Primary *Toxoplasma Gondii* Infection-Associated with Hemophagocytic Syndrome in a Man with HIV Infection: A Case Report. *BMC Infect. Dis.* **2022**, *22*, 35. [[CrossRef](#)]
80. Nourollahpour Shideh, M.; Esfandyari, S.; Ashrafmansouri, M.; Mirzapour, A.; Taghipour, A.; Spotin, A.; Arefkhan, N.; Gamble, R.; Safa, A.; Rostami, A. The Prevalence of Latent and Acute Toxoplasmosis in HIV-Infected Pregnant Women: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Microb. Pathog.* **2020**, *149*, 104549. [[CrossRef](#)]
81. Pawełczyk, A.; Bednarska, M.; Caraballo Cortés, K.; Glamkowska-Sady, M.; Kowalska, J.; Uszyńska-Kałuża, B.; Radkowski, M.; Welc-Fałęciak, R. Seronegative Infection with *Toxoplasma Gondii* in Asymptomatic Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1)-Infected Patients and in Blood Donors. *J. Clin. Med.* **2022**, *11*, 638. [[CrossRef](#)]
82. Derouin, F.; Pelloux, H. Prevention of Toxoplasmosis in Transplant Patients. *Clin. Microbiol. Infect.* **2008**, *14*, 1089–1101. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
83. Foroutan, M.; Rostami, A.; Majidani, H.; Riahi, S.M.; Khazaei, S.; Badri, M.; Yousefi, E. A Systematic Review and Meta-Analysis of the Prevalence of Toxoplasmosis in Hemodialysis Patients in Iran. *Epidemiol. Health* **2018**, *40*, e2018016. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
84. Mousavi, P.; Mirhendi, H.; Mohebbi, M.; Shojae, S.; Valian, H.K.; Fallahi, S.; Mamishi, S. Detection of *Toxoplasma Gondii* in Acute and Chronic Phases of Infection in Immunocompromised Patients and Pregnant Women with Real-Time PCR Assay Using TaqMan Fluorescent Probe. *Iran. J. Parasitol.* **2018**, *13*, 9.

85. Hosseini-Safa, A.; Shojaee, S.; Salami, S.A.; Mohebbali, M.; Hantoushzadeh, S.; Mousavi, P.; Dehghan Manshadi, S.A.; Keshavarz Valian, H. Development of High Resolution Melting Analysis as a Diagnostic Tool for Molecular Detection of Toxoplasma Infection in Pregnant Women and HIV Positive Cases. *Iran. J. Public Health* **2020**, *49*, 1983–1991. [CrossRef]
86. Zalecenia Polskiego Towarzystwa Naukowego AIDS [Recommendations of the Polish AIDS Scientific Society] 2022. Available online: http://www.ptnaids.pl/images/pliki/zalecenia_2022_internet_OK.pdf (accessed on 27 November 2022).
87. Guidelines for the Prevention and Treatment of Opportunistic Infections in Adults and Adolescents with HIV: Toxoplasma Gondii Encephalitis by NIH Clinical Info.gov 2022. Available online: <https://clinicalinfo.hiv.gov/en/guidelines/hiv-clinical-guidelines-adult-and-adolescent-opportunistic-infections/toxoplasma-gondii> (accessed on 28 December 2022).
88. Vidal, J.E. HIV-Related Cerebral Toxoplasmosis Revisited: Current Concepts and Controversies of an Old Disease. *J. Int. Assoc. Provid. AIDS Care* **2019**, *18*, 232595821986731. [CrossRef]
89. Zhou, C.-X.; Ai, K.; Huang, C.-Q.; Guo, J.-J.; Cong, H.; He, S.-Y.; Zhu, X.-Q. MiRNA and CircRNA Expression Patterns in Mouse Brain during Toxoplasmosis Development. *BMC Genom.* **2020**, *21*, 46. [CrossRef]
90. Dian, S.; Ganiem, A.R.; Ekawardhani, S. Cerebral Toxoplasmosis in HIV-Infected Patients: A Review. *Pathog. Glob. Health* **2022**, *2022*, 1–10. [CrossRef]
91. García-Bernalt Diego, J.; Fernández-Soto, P.; Febrer-Sendra, B.; Crego-Vicente, B.; Muro, A. Loop-Mediated Isothermal Amplification in Schistosomiasis. *J. Clin. Med.* **2021**, *10*, 511. [CrossRef]
92. Morris, U.; Aydin-Schmidt, B. Performance and Application of Commercially Available Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) Kits in Malaria Endemic and Non-Endemic Settings. *Diagnostics* **2021**, *11*, 336. [CrossRef]
93. Kumar, B.; Maharana, B.R.; Brahmhatt, N.N.; Thakre, B.J.; Parmar, V.L. Development of a Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay Based on RoTat1.2 Gene for Detection of Trypanosoma Evansi in Domesticated Animals. *Parasitol. Res.* **2021**, *120*, 1873–1882. [CrossRef]
94. Ruang-areerate, T.; Saengsawang, N.; Ruang-areerate, P.; Ratnarathorn, N.; Thita, T.; Leelayoova, S.; Siripattanapipong, S.; Choowongkamon, K.; Dungchai, W. Distance-Based Paper Device Using Combined SYBR Safe and Gold Nanoparticle Probe LAMP Assay to Detect Leishmania among Patients with HIV. *Sci. Rep.* **2022**, *12*, 14558. [CrossRef] [PubMed]

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

V. PODSUMOWANIE I WNIOSKI

Choroby pasożytnicze stanowią istotny aspekt ochrony zdrowia ludzi i mimo stosunkowo dobrze rozwiniętej diagnostyki parazytologicznej, zarówno w Polsce, jak i w innych krajach, problemem pozostaje nadal niska wykrywalność pasożytów. Niska prewalencja zarażeń *Giardia intestinalis* obserwowana w ramach badań prezentowanych w niniejszej pracy może być odzwierciedleniem ograniczonej liczby wykonywanych badań w kierunku zarażenia tym pasożytem. Podobnie, w przypadku *Toxoplasma gondii* bardzo istotne jest wykonywanie badań z odpowiednią częstością, ze względu na poważne następstwa zarażenia, zwłaszcza u osób immunoniekompetentnych, w tym zakażonych wirusem HIV. Ze względu na swoją wysoką czułość, metody molekularne powinny być rutynowo stosowane w laboratoriach diagnostycznych. Rozwój tych metod umożliwia wykrywanie materiału genetycznego pierwotniaków ze znacznie większą dokładnością, a tym samym obniża ryzyko uzyskiwania wyników fałszywie negatywnych.

Na podstawie przeprowadzonych badań, które opisano w cyklu publikacji sformułowano następujące wnioski:

1. Metody mikroskopowe i immunoenzymatyczne mogą być w równej mierze stosowane w diagnostyce klinicznej do wykrywania obecności *Giardia intestinalis* w próbkach kału, a obecność innych mikroorganizmów nie ma wpływu na wynik badania diagnostycznego.
2. Kwas cytrynowy zmniejsza wykrywalność *Giardia intestinalis* metodą mikroskopową i immunoenzymatyczną, co sugeruje, że zmniejsza przeżywalność pasożyta i po dodaniu do żywności może zwiększać jej bezpieczeństwo.
3. Wybrane czynniki fizyczne i chemiczne zmniejszają przeżywalność *Giardia intestinalis* ocenianą za pomocą metody mikroskopowej, ale nie zmniejszają wykrywalności DNA pasożyta metodą real-time PCR. Stanowi to potwierdzenie, że stosowanie molekularnych metod diagnostycznych, opartych na wykrywanie materiału genetycznego, zwiększa czułość detekcji pasożytów.
4. U osób badanych w kierunku obecności wirusa HIV, z powodu podejrzenia zakażenia tym wirusem, wykryto przeciwciała przeciwko *Toxoplasma gondii* wyłącznie w klasie IgG, co świadczy o braku aktywnych zarażeń tym pasożytniczym pierwotniakiem w badanej grupie osób będących mieszkańcami województwa kujawsko-pomorskiego.

VI. STRESZCZENIE

Giardia intestinalis należy do najczęściej spotykanych pierwotniaków pasożytniczych człowieka. Źródłem zarażenia tym pasożytem są głównie zanieczyszczona żywność oraz woda. Pasożyty, takie jak *G. intestinalis*, zaliczane są obecnie do jednych z ważniejszych zagrożeń bezpieczeństwa żywności, a zatem istotna jest ich skuteczna eliminacja, a także systematyczna i efektywna kontrola żywności. Ocena wrażliwości patogenów na czynniki fizyczne i chemiczne może być podstawą do opracowania skutecznych działań zwiększających bezpieczeństwo żywności i ograniczających występowanie zarażeń pasożytniczych wśród ludzi.

Toksoplazmoza jest chorobą wywoływaną przez pasożytniczego pierwotniaka *Toxoplasma gondii*. Przebieg toksoplazmozy jest zwykle łagodny lub bezobjawowy u osób immunokompetentnych, ale może mieć poważne konsekwencje, jeśli występuje u osób z niedoborem odporności. Wczesne rozpoznanie zarażenia *Toxoplasma gondii* jest bardzo ważne u wszystkich osób zakażonych HIV, gdyż pozwala zapobiegać ciężkim postaciom choroby, w tym powikłaniom toksoplazmozy ośrodkowego układu nerwowego.

Celem pracy było określenie prewalencji chorób wywoływanych przez pierwotniaki pasożytnicze oraz ocena wpływu wybranych czynników fizycznych, chemicznych oraz biologicznych na przeżywalność i wykrywanie pasożytów na przykładzie *Giardia intestinalis* i *Toxoplasma gondii*.

Analizę prewalencji *Giardia intestinalis* przeprowadzono z wykorzystaniem danych z badań parazytologicznych prowadzonych w latach 2000-2020 w Wojewódzkiej Stacji Sanitarno-Epidemiologicznej w Bydgoszczy. W przypadku oceny wpływu wybranych czynników biologicznych i chemicznych na przeżywalność i wykrywalność cyst pierwotniaków *Giardia intestinalis* z zastosowaniem metody mikroskopowej oraz immunoenzymatycznej, materiał do badań stanowiło 20 archiwizowanych próbek kału, w których potwierdzono obecność *Giardia intestinalis*. Z kolei ocenę wpływu wybranych czynników fizycznych i chemicznych na wykrywalność *Giardia intestinalis* metodą mikroskopową oraz metodą real-time PCR wykonano z zastosowaniem pasożytów pochodzących z hodowli aksenicznej.

Ocenę miana przeciwciał przeciwko *Toxoplasma gondii* w surowicy osób badanych w kierunku wirusa HIV, z powodu podejrzenia zakażenia tym wirusem, wśród mieszkańców województwa kujawsko-pomorskiego wykonano z wykorzystaniem 43 próbek krwi pobranych od osób zgłaszających się do Punktu Konsultacyjno-Diagnostycznego HIV

w Bydgoszczy. Próbkę badano w kierunku obecności przeciwciał anty-HIV-1/HIV-2 i antygenu p24 oraz przeciwciał w klasie IgM i IgG przeciwko *Toxoplasma* z wykorzystaniem metody enzymoimmunofluorescencyjnej (ELFA).

Prewalencja *Giardia intestinalis* w latach 2000-2018 w populacji osób będących mieszkańcami województwa kujawsko-pomorskiego wynosiła 0,16% - 0,85%. W latach 2019-2020 nie odnotowano żadnego dodatniego wyniku na obecność tego pierwotniaka.

W przeprowadzonych badaniach dotyczących wpływu wybranych czynników biologicznych i chemicznych na przeżywalność i wykrywalność cyst pierwotniaków *Giardia intestinalis*, w teście ELISA wykrywającym antygen tego pasożyta, wynik pozytywny otrzymano w 20 próbkach po dodaniu *Salmonella* Enteritidis (ATCC 13076), *Shigella sonnei* (ATCC 9290), *Yersinia enterocolitica* (ATCC 23715) oraz po dodaniu norowirusów do próbek kału. Analiza wyników w przypadku substancji dodawanych do żywności, wykazała, iż po dodaniu sorbinianu potasu wykryto antygen *Giardia intestinalis* w 90% próbek. W przypadku gumy guar oraz glutaminianu monosodowego we wszystkich próbkach odnotowano dodatni wynik testu immunoenzymatycznego. Z kolei dodanie kwasu cytrynowego pozwoliło na wykrycie antygenu pierwotniaka tylko w 25% próbek. *G. intestinalis* wykrywano metodą mikroskopową i immunoenzymatyczną z taką samą czułością.

Analizując wpływ wybranych czynników fizycznych i chemicznych na przeżywalność trofozycytów *Giardia intestinalis* zaobserwowano, że 5 substancji, tj.: maltodekstryna, cytrynian sodu E331, mleczan wapnia E327, glikol propylenowy i wodorowęglan sodu nie miało wpływu na wynik badania metodą mikroskopową. Z kolei oceniając wpływ tych samych czynników fizycznych i chemicznych na wykrywanie DNA *Giardia intestinalis* metodą real-time PCR stwierdzono, że wpływ na wynik badania miały jedynie 3 substancje. Dodanie podchlorynu sodu, formaliny i wodorowęglanu sodu spowodowało, że nie wykazano obecności DNA *Giardia*.

Badania seroprewalencji *Toxoplasma gondii* wykazały, że w badanej populacji stwierdzono występowanie przeciwciał IgG przeciwko *Toxoplasma* z częstością 53,5%, natomiast badanie w kierunku swoistych przeciwciał IgM było ujemne. Wysoki wskaźnik awidności przeciwciał IgG uzyskano w 18 próbkach seropozytywnych. 30 próbek pochodziło od kobiet, natomiast 13 od mężczyzn. Wśród mężczyzn wirus HIV został wykryty w 1 próbce,

a przeciwciała przeciwko *T. gondii* w klasie IgG w 7 próbkach. U 16 kobiet stwierdzono obecność przeciwciał przeciwko *T. gondii* w klasie IgG.

W niniejszej pracy wykazano, że metoda mikroskopowa i immunoenzymatyczna mogą być w równej mierze stosowane w diagnostyce klinicznej do wykrywania obecności *Giardia intestinalis* w próbkach kału. Większość badanych czynników biologicznych i chemicznych wpłynęła na przeżywalność *Giardia intestinalis* w materiale biologicznym diagnozowanym metodą mikroskopową. Na tej podstawie można wnioskować, że standardowe metody dezynfekcji przy użyciu UV, etanolu lub różnych środków dezynfekujących są wystarczające do zmniejszenia przeżywalności *G. intestinalis*. Przyczyniać się do tego może również używanie konserwantów, takich jak kwas cytrynowy. Zmniejsza on wykrywalność *Giardia intestinalis* metodą mikroskopową i immunoenzymatyczną, co sugeruje, że zmniejsza przeżywalność pasożyta i po dodaniu do żywności może zwiększać jej bezpieczeństwo. Wybrane czynniki fizyczne i chemiczne zmniejszają przeżywalność *Giardia intestinalis* ocenianą za pomocą metody mikroskopowej, ale nie zmniejszają wykrywalności DNA pasożyta metodą real-time PCR, co potwierdza, że stosowanie molekularnych metod diagnostycznych, opartych na wykrywaniu materiału genetycznego, zwiększa czułość detekcji pasożytów.

U osób badanych w kierunku obecności wirusa HIV, z powodu podejrzenia zakażenia tym wirusem, wykryto przeciwciała przeciwko *Toxoplasma gondii* wyłącznie w klasie IgG, co świadczy o braku aktywnych zarażeń tym pasożytniczym pierwotniakiem w badanej grupie osób będących mieszkańcami województwa kujawsko-pomorskiego. Podobnie, jak w przypadku *G. intestinalis*, w diagnostyce *Toxoplasma gondii* konieczne może być stosowanie metod molekularnych ze względu na ich wysoką czułość. Wczesne wykrycie zarażenia *T. gondii*, zwłaszcza u osób immunoniekompetentnych, w tym zakażonych HIV, może zapobiegać rozwojowi ciężkiej postaci toksoplazmozy u tych chorych.

Słowa kluczowe: *Giardia intestinalis*, metody diagnostyczne, *Toxoplasma gondii*

VII. ABSTRACT

The prevalence of diseases caused by parasitic protozoans and the impact of selected factors on their survival and detection on the example of Giardia intestinalis and Toxoplasma gondii

Giardia intestinalis is one of the most common parasitic protozoans in humans. Contaminated food and water are the main sources of infection. Food-borne parasites, like *G. intestinalis*, are contemporary among the threats to food safety, hence their effective elimination and the systematic and effective control of food is very important. The sensitivity of pathogens to physical and chemical factors can be the basis for developing measures to improve the safety of food and reduce the occurrence of parasitic infections among humans.

Toxoplasmosis is the disease caused by parasitic protozoan *Toxoplasma gondii*. The course of toxoplasmosis is usually mild or asymptomatic in immunocompetent individuals, but it can have serious consequences if it occurs in immunodeficient individuals. Therefore, early diagnosis of *T. gondii* infection is important in all HIV-infected individuals to prevent a severe form of the disease, including complications of central nervous system toxoplasmosis.

The aim of the study was to determine the prevalence of diseases caused by parasitic protozoan and to determine the impact of selected physical, chemical and biological factors on their survival and detection on the example of *Giardia intestinalis* and *Toxoplasma gondii*.

The prevalence analysis of *Giardia intestinalis* was carried out using data from parasitological studies conducted in the years 2000-2020 at the Provincial Sanitary and Epidemiological Station in Bydgoszcz. In the case of the assessment of the impact of selected biological and chemical factors on the survival and detection of *Giardia intestinalis* cysts using the microscopic and immunoenzymatic methods, the research material consisted of 20 archived faeces samples in which the presence of *Giardia intestinalis* was found. The assessment of the impact of selected physical and chemical factors on the detection of *Giardia intestinalis* by the microscopic method and the real-time PCR method was performed using parasites from an axenic culture.

To test the titre of antibodies against *Toxoplasma gondii* in the serum of people tested for HIV, due to the suspected infection, among the inhabitants of the Kuyavian-Pomeranian Voivodeship, 43 blood samples collected from people reporting to the HIV

Consultation and Diagnostic Center in Bydgoszcz were used. The samples were tested for the presence of anti-HIV-1/HIV-2 antibodies and p24 antigen as well as IgM and IgG antibodies against *Toxoplasma* using the enzyme-linked fluorescent assay (ELFA).

The prevalence of *Giardia intestinalis* in the years 2000-2018 among a selected population of inhabitants of the Kuyavian-Pomeranian Voivodeship was 0.16% - 0.85%. In 2019-2020, no positive result for this protozoan was recorded.

In the presented studies on the impact of selected biological and chemical factors on the survival and detection of *Giardia intestinalis* cysts, positive result in the ELISA test detecting the antigen of parasite was obtained at 20 samples after adding *Salmonella* Enteritidis (ATCC 13076), *Shigella sonnei* (ATCC 9290), *Yersinia enterocolitica* (ATCC 23715) and after adding noroviruses to faecal samples containing *Giardia intestinalis*. The analysis of the results in the case of substances added to food showed that after adding potassium sorbate, the *Giardia intestinalis* antigen was detected in 90% samples. In the case of guar gum and monosodium glutamate, all samples showed a positive result in the enzyme immunoassay. On the other hand, the addition of citric acid allowed the detection of protozoan antigen in only 25% of samples. *Giardia intestinalis* was detected by both microscopic and immunoenzymatic methods with the same sensitivity.

Analysis of the impact of selected physical and chemical factors on the survival of *Giardia intestinalis* revealed no effect in the microscopic method for 5 substances: maltodextrin, sodium citrate E331, calcium lactate E327, propylene glycol and sodium bicarbonate. In turn, when assessing the impact of all factors on the detection of *Giardia intestinalis* DNA by real-time PCR, only 3 substances had an impact on the detection of the presence of protozoan genetic material. The addition of sodium hypochlorite, formalin and sodium bicarbonate resulted in no evidence of *Giardia* DNA.

The analysis of *Toxoplasma gondii* seroprevalence showed that in the study population the presence of IgG antibodies against *Toxoplasma* was found at the level of 53.5%, while the test for specific IgM antibodies was negative. A high avidity index of IgG antibodies was obtained in 18 seropositive samples. Among studied samples, 30 were from women and 13 from men. HIV was detected in 1 sample and antibodies against *T. gondii* in the IgG class in 7 samples in the group of men. Antibodies against *T. gondii* in the IgG class were found in 16 women.

In this study, it was shown that the microscopic and immunoenzymatic method can be equally used in clinical diagnostics to detect the presence of *Giardia intestinalis* in stool samples. Most of the studied factors influenced on the survival rate of *Giardia intestinalis* in biological material diagnosed with the microscopic method. Based on this, it can be concluded that standard disinfection methods using UV, ethanol or various disinfectants are sufficient to reduce the survival rate of *G. intestinalis*. The use of preservatives, such as citric acid, which reduces the detection of *Giardia intestinalis* by microscopic and immunoenzymatic methods, may also contribute to this, which suggests that it reduces the survival of the parasite. When added to food, citric acid may increase its safety. Selected physical and chemical factors reduce the survival of *Giardia intestinalis* assessed using the microscopic method, but do not reduce the detection of parasite DNA by real-time PCR, which confirms that the use of molecular diagnostic methods based on the detection of genetic material increases the sensitivity of parasite detection. Detection of DNA in most samples may suggest the need to, for example, extend the period of exposure to a specific factor.

In people tested for the presence of HIV, due to the suspicion of infection with this virus, antibodies to *Toxoplasma gondii* were detected only in the IgG class, which proves the lack of active infections with this parasitic protozoan in the tested group of people who are residents of the Kuyavian-Pomeranian Voivodeship. As in the case of *G. intestinalis*, it may be necessary to use molecular methods in the diagnosis of *Toxoplasma gondii* due to their high sensitivity. Early detection of *T. gondii* infection, especially in immunodeficient individuals, including those infected with HIV, may prevent the development of severe toxoplasmosis in these patients.

Key words: *Giardia intestinalis*, diagnostic methods, *Toxoplasma gondii*

VIII. PIŚMIENNICTWO

1. Momčilović S, Cantacessi C, Arsić-Arsenijević V, Otranto D, Tasić-Otašević S. Rapid diagnosis of parasitic diseases: current scenario and future needs. *Clin Microbiol Infect.* 2019; 25(3):290-309. doi: 10.1016/j.cmi.2018.04.028.
2. Saheb EJ. The prevalence of parasitic protozoan diseases in Iraq, 2016. *Karbala International Journal of Modern Science.* 2018; 4(1): 21-25. doi:10.1016/j.kijoms.2017.10.002.
3. Walzer, P.D., & Genta, R.M. (1988). *Parasitic Infections in the Compromised Host* (1st ed.). CRC Press. doi: 10.1201/9781003066026.
4. Solarczyk P, Majewska AC. Implikacje kontrowersji taksonomicznych i genetycznego zróżnicowania *Giardia*. *Probl Hig Epidemiol.* 2015; 96(3): 540-546.
5. Adam RD. *Giardia duodenalis*: Biology and Pathogenesis. *Clin Microbiol Rev.* 2021; 15;34(4):e0002419. doi: 10.1128/CMR.00024-19.
6. Certad G, Viscogliosi E, Chabé M, Cacciò SM. Pathogenic Mechanisms of *Cryptosporidium* and *Giardia*. *Trends Parasitol.* 2017; 33(7):561-576. doi: 10.1016/j.pt.2017.02.006.
7. Berhe B, Mardu F, Tesfay K, Legese H, Adhanom G, Hailelasie H, Gebremichail G, Tesfanchal B, Shishay N, Negash H. More Than Half Prevalence of Protozoan Parasitic Infections Among Diarrheic Outpatients in Eastern Tigray, Ethiopia, 2019; A Cross-Sectional Study. *Infect Drug Resist.* 2020; 13:27-34. doi: 10.2147/IDR.S238493.
8. Dixon BR. *Giardia duodenalis* in humans and animals - Transmission and disease. *Res Vet Sci.* 2021; 135:283-289. doi: 10.1016/j.rvsc.2020.09.034.
9. Kitowska W, Milczarek M, Sadkowska-Todys M. Giardiasis (lambliasis) in Poland in 2017. *Przegl Epidemiol.* 2019; 73(4):499-509. doi: 10.32394/pe.73.47.
10. Belkessa S, Ait-Salem E, Laatamna A, Houali K, Sönksen UW, Hakem A, Bouchene Z, Ghalmi F, Stensvold CR. Prevalence and Clinical Manifestations of *Giardia intestinalis* and Other Intestinal Parasites in Children and Adults in Algeria. *Am J Trop Med Hyg.* 2021; 18;104(3):910-916. doi: 10.4269/ajtmh.20-0187.
11. Wang Y, Gonzalez-Moreno O, Roellig DM, Oliver L, Huguet J, Guo Y, Feng Y, Xiao L. Epidemiological distribution of genotypes of *Giardia duodenalis* in humans in Spain. *Parasit Vectors.* 2019; 6;12(1):432. doi: 10.1186/s13071-019-3692-4.
12. Mahdavi F, Shams M, Sadrebazzaz A, Shamsi L, Omidian M, Asghari A, Hassanipour S, Salemi AM. Global prevalence and associated risk factors of diarrheagenic *Giardia*

- duodenalis* in HIV/AIDS patients: A systematic review and meta-analysis. *Microb Pathog.* 2021; 160:105202. doi: 10.1016/j.micpath.2021.105202.
13. Horton B, Bridle H, Alexander CL, Katzer F. *Giardia duodenalis* in the UK: current knowledge of risk factors and public health implications. *Parasitology.* 2019; 146(4):413-424. doi: 10.1017/S0031182018001683.
14. Dunn N, Juergens AL. Giardiasis. 2022. In: StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls.
15. Lagunas-Rangel FA, Bermúdez-Cruz RM. Epigenetics in the early divergent eukaryotic *Giardia duodenalis*: An update. *Biochimie.* 2019; 156:123-128. doi: 10.1016/j.biochi.2018.10.008.
16. Cernikova L, Faso C, Hehl AB. Five facts about *Giardia lamblia*. *PLoS Pathog.* 2018; 27;14(9):e1007250. doi: 10.1371/journal.ppat.1007250.
17. Shalaby NM, Wakid MH. Giardiasis in Man: Review and Updates. *JKAU: Med. Sci.* 2014; Vol. 21 No. 1, 81-94. doi: 10.4197/Med. 21-1.6.
18. Carranza PG, Lujan HD. New insights regarding the biology of *Giardia lamblia*. *Microbes Infect.* 2010; 12(1):71-80. doi: 10.1016/j.micinf.2009.09.008.
19. Ankarklev, J., Jerlström-Hultqvist, J., Ringqvist, E. et al. Behind the smile: cell biology and disease mechanisms of *Giardia* species. *Nat Rev Microbiol.* 2010; 8, 413–422. doi: 10.1038/nrmicro2317.
20. Lagunas-Rangel FA, Yee J, Bermúdez-Cruz RM. An update on cell division of *Giardia duodenalis* trophozoites. *Microbiol Res.* 2021; 250:126807. doi: 10.1016/j.micres.2021.126807.
21. Benchimol M, de Souza W. *Giardia intestinalis* and its endomembrane system. *J Eukaryot Microbiol.* 2022; 69(6):e12893. doi: 10.1111/jeu.12893.
22. Ortega-Pierres MG, Jex AR, Ansell BRE, Svärd SG. Recent advances in the genomic and molecular biology of *Giardia*. *Acta Trop.* 2018; 184:67-72. doi: 10.1016/j.actatropica.2017.09.004.
23. <https://www.cdc.gov/dpdx/giardiasis/index.html>
24. Singer SM, Fink MY, Angelova VV. Recent insights into innate and adaptive immune responses to *Giardia*. *Adv Parasitol.* 2019; 106:171-208. doi: 10.1016/bs.apar.2019.07.004.
25. Reses HE, Gargano JW, Liang JL, Cronquist A, Smith K, Collier SA, Roy SL, Vanden Eng J, Bogard A, Lee B, Hlavsa MC, Rosenberg ES, Fullerton KE, Beach MJ, Yoder JS. Risk factors

- for sporadic *Giardia* infection in the USA: a case-control study in Colorado and Minnesota. *Epidemiol Infect.* 2018; 146(9):1071-1078. doi: 10.1017/S0950268818001073.
26. Samie A, Tanih NF, Seisa I, Seheri M, Mphahlele J, ElBakri A, Mbatl P. Prevalence and genetic characterization of *Giardia lamblia* in relation to diarrhea in Limpopo and Gauteng provinces, South Africa. *Parasite Epidemiol Control.* 2020; 9:e00140. doi: 10.1016/j.parepi.2020.e00140.
27. Cantey PT, Roy S, Lee B, Cronquist A, Smith K, Liang J, Beach MJ. Study of nonoutbreak giardiasis: novel findings and implications for research. *Am J Med.* 2011; 124(12):1175.e1-8. doi: 10.1016/j.amjmed.2011.06.012.
28. Adeyemo FE, Singh G, Reddy P, Stenström TA. Methods for the detection of *Cryptosporidium* and *Giardia*: From microscopy to nucleic acid based tools in clinical and environmental regimes. *Acta Trop.* 2018; 184:15-28. doi: 10.1016/j.actatropica.2018.01.011.
29. Hooshyar H, Rostamkhani P, Arbabi M, Delavari M. *Giardia lamblia* infection: review of current diagnostic strategies. *Gastroenterol Hepatol Bed Bench.* 2019; 12(1):3-12.
30. Uchôa FFM, Sudré AP, Campos SDE, Almosny NRP. Assessment of the diagnostic performance of four methods for the detection of *Giardia duodenalis* in fecal samples from human, canine and feline carriers. *J Microbiol Methods.* 2018; 145:73-78. doi: 10.1016/j.mimet.2018.01.001.
31. Łanocha A, Łanocha-Arendarczyk N, Wilczyńska D, Zdziarska B, Kosik-Bogacka D. Protozoan Intestinal Parasitic Infection in Patients with Hematological Malignancies. *J Clin Med.* 2022; 11(10):2847. doi: 10.3390/jcm11102847.
32. Hijjawi N, Yang R, Hatmal M, Yassin Y, Mharib T, Mukbel R, Mahmoud SA, Al-Shudifat AE, Ryan U. Comparison of ELISA, nested PCR and sequencing and a novel qPCR for detection of *Giardia* isolates from Jordan. *Exp Parasitol.* 2018; 185:23-28. doi: 10.1016/j.exppara.2018.01.011.
33. Silva ACDS, Martins FDC, Ladeia WA, Kakimori MTA, Lucas JI, Sasse JP, Martins TA, Macedo VFR, Murad VA, de Barros LD, Garcia JL. First report of *Giardia duodenalis* assemblage F in humans and dogs in southern Brazil. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 2022; 89:101878. doi: 10.1016/j.cimid.2022.101878.

34. Ahmad AA, El-Kady AM, Hassan TM. Genotyping of *Giardia duodenalis* in children in upper Egypt using assemblage-specific PCR technique. PLoS One. 2020; 15(10):e0240119. doi: 10.1371/journal.pone.0240119.
35. Lalle M, Hanevik K. Treatment-refractory giardiasis: challenges and solutions. Infect Drug Resist. 2018; 11:1921-1933. doi: 10.2147/IDR.S141468.
36. Lodoen MB, Smith NC, Soldati-Favre D, Ferguson DJP, van Dooren GG. Nanos gigantium humeris insidentes: old papers informing new research into *Toxoplasma gondii*. Int J Parasitol. 2021; 51(13-14):1193-1212. doi: 10.1016/j.ijpara.2021.10.004.
37. Molan A, Nosaka K, Hunter M, Wang W. Global status of *Toxoplasma gondii* infection: systematic review and prevalence snapshots. Trop Biomed. 2019; 36(4):898-925.
38. Rafique A, Mahmood MS, Ashraf A, Luqman M, Abbas RZ. Toxoplasmosis in public health. Veterinary Pathobiology and Public Health. 2021 (1), 76-83.
39. <https://www.cdc.gov/dpdx/toxoplasmosis/index.html>
40. Mustafa M, Fathy F, Mirghani A, Mohamed MA, Muneer MS, Ahmed AE, Ali MS, Omer RA, Siddig EE, Mohamed NS, Abd Elkareem AM. Prevalence and risk factors profile of seropositive *Toxoplasmosis gondii* infection among apparently immunocompetent Sudanese women. BMC Res Notes. 2019; 12(1):279. doi: 10.1186/s13104-019-4314-0.
41. Dong H, Su R, Lu Y, Wang M, Liu J, Jian F, Yang Y. Prevalence, Risk Factors, and Genotypes of *Toxoplasma gondii* in Food Animals and Humans (2000-2017) From China. Front Microbiol. 2018; 9:2108. doi: 10.3389/fmicb.2018.02108.
42. Al-Adhroey AH, Mehrass AAO, Al-Shammakh AA, Ali AD, Akabat MYM, Al-Mekhlafi HM. Prevalence and predictors of *Toxoplasma gondii* infection in pregnant women from Dhamar, Yemen. BMC Infect Dis. 2019; 19(1):1089. doi: 10.1186/s12879-019-4718-4.
43. Dubois DJ, Soldati-Favre D. Biogenesis and secretion of micronemes in *Toxoplasma gondii*. Cell Microbiol. 2019; 21(5):e13018. doi: 10.1111/cmi.13018.
44. Carmeille R, Schiano Lomoriello P, Devarakonda PM, Kellermeier JA, Heaslip AT. Actin and an unconventional myosin motor, TgMyoF, control the organization and dynamics of the endomembrane network in *Toxoplasma gondii*. PLoS Pathog. 2021; 17(2):e1008787. doi: 10.1371/journal.ppat.1008787.
45. Venugopal K, Marion S. Secretory organelle trafficking in *Toxoplasma gondii*: A long story for a short travel. Int J Med Microbiol. 2018; 308(7):751-760. doi: 10.1016/j.ijmm.2018.07.007.

46. Deffieu MS, Alayi TD, Slomianny C, Tomavo S. The *Toxoplasma gondii* dense granule protein TgGRA3 interacts with host Golgi and dysregulates anterograde transport. *Biol Open*. 2019; 8(3):bio039818. doi: 10.1242/bio.039818.
47. Attias M, Teixeira DE, Benchimol M, Vommaro RC, Crepaldi PH, De Souza W. The life-cycle of *Toxoplasma gondii* reviewed using animations. *Parasit Vectors*. 2020; 13(1):588. doi: 10.1186/s13071-020-04445-z.
48. Dumètre A, Dardé ML. How to detect *Toxoplasma gondii* oocysts in environmental samples? *FEMS Microbiol Rev*. 2003; 27(5):651-61. doi: 10.1016/S0168-6445(03)00071-8
49. Kochanowsky JA, Koshy AA. *Toxoplasma gondii*. *Curr Biol*. 2018; 28(14):R770-R771. doi: 10.1016/j.cub.2018.05.035.
50. Martorelli Di Genova B, Knoll LJ. Comparisons of the Sexual Cycles for the Coccidian Parasites *Eimeria* and *Toxoplasma*. *Front Cell Infect Microbiol*. 2020; 10:604897. doi: 10.3389/fcimb.2020.604897.
51. S Al-Malki E. Toxoplasmosis: stages of the protozoan life cycle and risk assessment in humans and animals for an enhanced awareness and an improved socio-economic status. *Saudi J Biol Sci*. 2021; 28(1):962-969. doi: 10.1016/j.sjbs.2020.11.007.
52. Weiss LM, Kim K. The development and biology of bradyzoites of *Toxoplasma gondii*. *Front Biosci*. 2000; 5:D391-405. doi: 10.2741/Weiss.
53. Vargas-Villavicencio JA, Cañedo-Solares I, Correa D. Anti-*Toxoplasma gondii* IgM Long Persistence: What Are the Underlying Mechanisms? *Microorganisms*. 2022; 10(8):1659. doi: 10.3390/microorganisms10081659.
54. Kruszewski J, Miller A. Epidemie XXI wieku – Toksoplazmoza. *Alergia*. 2004; 2: 30-37.
55. Smith NC, Goulart C, Hayward JA, Kupz A, Miller CM, van Dooren GG. Control of human toxoplasmosis. *Int J Parasitol*. 2021; 51(2-3):95-121. doi: 10.1016/j.ijpara.2020.11.001.
56. Vidal JE. HIV-Related Cerebral Toxoplasmosis Revisited: Current Concepts and Controversies of an Old Disease. *J Int Assoc Provid AIDS Care*. 2019; 18:2325958219867315. doi: 10.1177/2325958219867315.
57. Milne G, Webster JP, Walker M. *Toxoplasma gondii*: An Underestimated Threat? *Trends Parasitol*. 2020; 36(12):959-969. doi: 10.1016/j.pt.2020.08.005.
58. Zhang Y, Lin X, Lu F. Current treatment of ocular toxoplasmosis in immunocompetent patients: a network meta-analysis. *Acta Trop*. 2018; 185:52-62. doi: 10.1016/j.actatropica.2018.04.026.

59. Ismael SS. Diagnostic methods and protocols used in investigating *Toxoplasma gondii* in humans: A review. *Baghdad Journal of Biochemistry and Applied Biological Sciences*, 2021; 2(04):181-186. doi: bjbabs.v2i04.72.
60. Nasiru Wana M, Mohd Moklas MA, Watanabe M, Nordin N, Zasmy Unyah N, Alhassan Abdullahi S, Ahmad Issa Alapid A, Mustapha T, Basir R, Abd Majid R. A Review on the Prevalence of *Toxoplasma gondii* in Humans and Animals Reported in Malaysia from 2008-2018. *Int J Environ Res Public Health*. 2020; 17(13):4809. doi: 10.3390/ijerph17134809.
61. Wang JL, Zhang NZ, Li TT, He JJ, Elsheikha HM, Zhu XQ. Advances in the Development of Anti-*Toxoplasma gondii* Vaccines: Challenges, Opportunities, and Perspectives. *Trends Parasitol*. 2019; 35(3):239-253. doi: 10.1016/j.pt.2019.01.005.
62. Li Y, Zhou H. Moving towards improved vaccines for *Toxoplasma gondii*. *Expert Opin Biol Ther*. 2018; 18(3):273-280. doi: 10.1080/14712598.2018.1413086.
63. Dunay IR, Gajurel K, Dhakal R, Liesenfeld O, Montoya JG. Treatment of Toxoplasmosis: Historical Perspective, Animal Models, and Current Clinical Practice. *Clin Microbiol Rev*. 2018; 31(4):e00057-17. doi: 10.1128/CMR.00057-17.
64. https://www.cdc.gov/parasites/toxoplasmosis/health_professionals/index.html#tx
65. Olariu TR, Press C, Talucod J, Olson K, Montoya JG. Congenital toxoplasmosis in the United States: clinical and serologic findings in infants born to mothers treated during pregnancy. *Parasite*. 2019; 26:13. doi: 10.1051/parasite/2019013.
66. Dian S, Ganiem AR, Ekawardhani S. Cerebral toxoplasmosis in HIV-infected patients: a review. *Pathog Glob Health*. 2023; 117(1):14-23. doi: 10.1080/20477724.2022.2083977.

SPIS TABEL

Tabela 1. Podział toksoplazmozy	20
--	----

SPIS RYCIN

Ryc. 1. Schemat budowy trofozoitu i cysty <i>Giardia intestinalis</i>	10
Ryc. 2. Cykl rozwojowy <i>Giardia intestinalis</i>	11
Ryc. 3. Formy rozwojowe <i>Toxoplasma gondii</i>	17
Ryc. 4. Cykl życiowy <i>Toxoplasma gondii</i>	19
Ryc. 5. Prewalencja <i>Giardia intestinalis</i> w wybranej populacji województwa kujawsko-pomorskiego w latach 2000-2020	29
Ryc. 6. Odsetek dodatnich wyników badań w kierunku <i>Giardia intestinalis</i> w wybranej populacji województwa kujawsko-pomorskiego w latach 2000-2020	30

ZAŁĄCZNIK NR 1. OŚWIADCZENIA WSPÓŁAUTORÓW

Bydgoszcz, 27.03.2023 r.

dr hab. n. med. Celestyna Mila-Kierzenkowska, prof. UMK

Katedra Biologii i Biochemii Medycznej

Collegium Medicum UMK

ul. Karłowicza 24, 85-092 Bydgoszcz

OŚWIADCZENIE

Jako współautor prac:

1. Smoguła M., Pawłowska M., Wesołowski R., Szewczyk-Golec K., Mila-Kierzenkowska C. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in people at an increased risk of HIV infection – a pilot study. *Diagnostyka Laboratoryjna*. 2022; 58(1): 9-14.
2. Smoguła M., Wesołowski R., Pawłowska M., Mila-Kierzenkowska C. Influence of Selected Factors on the Survival Assessment and Detection of *Giardia intestinalis* DNA in Axenic Culture. *Pathogens*. 2023; 12(2): 316.
3. Smoguła M., Mila-Kierzenkowska C., Szewczyk-Golec K.. The Influence of Selected Factors on the Detection of *Giardia intestinalis* by Microscopic and Immunoenzymatic Methods. *Iranian Journal of Parasitology*. 2023; 18(1): 30-37.

oświadczam, że mój wkład w powstanie w/w prac polegał na:

- Ad. 1 – współudziało w opracowaniu koncepcji i projektu badania, w napisaniu artykułu oraz w ostatecznym zatwierdzeniu artykułu;
- Ad. 2 – udziało w opracowaniu koncepcji badania oraz współudziało w opracowaniu metodyki, analizie uzyskanych wyników, w przygotowaniu manuskryptu i pracy nad ostateczną wersją manuskryptu;
- Ad. 3 – współudziało w opracowaniu koncepcji i projektu badania, w napisaniu artykułu oraz w ostatecznym zatwierdzeniu artykułu.

Oświadczam, że udostępnienie artykułów nie będzie naruszać praw autorskich osób trzecich.

KATEDRA BIOLOGII I BIOCHEMII MEDYCZNEJ
C. Mila-Kierzenkowska
dr hab. Celestyna Mila-Kierzenkowska, prof. UMK

Bydgoszcz, 27.03.2023 r.

dr hab. n. med. Karolina Szewczyk-Golec, prof. UMK

Katedra Biologii i Biochemii Medycznej

Collegium Medicum UMK

ul. Kartowicza 24, 85-092 Bydgoszcz

OŚWIADCZENIE

Jako współautor prac:

1. Smoğuła M., Pawłowska M., Wesołowski R., Szewczyk-Golec K., Miła-Kierzenkowska C. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in people at an increased risk of HIV infection – a pilot study. *Diagnostyka Laboratoryjna*. 2022; 58(1): 9-14.
2. Wesołowski R., Pawłowska M., Smoğuła M., Szewczyk-Golec K. Advances and Challenges in Diagnostics of Toxoplasmosis in HIV-Infected Patients. *Pathogens*. 2023; 12(1): 110.
3. Smoğuła M., Miła-Kierzenkowska C., Szewczyk-Golec K.. The Influence of Selected Factors on the Detection of *Giardia intestinalis* by Microscopic and Immunoenzymatic Methods. *Iranian Journal of Parasitology*. 2023; 18(1): 30-37.

oświadczam, że mój wkład w powstanie w/w prac polegał na:

- Ad. 1 – współudziałe w napisaniu artykułu oraz w ostatecznym zatwierdzeniu artykułu;
- Ad. 2 – współudziałe w pracy nad ostateczną wersją manuskryptu i pełnieniu nadzoru;
- Ad. 3 – współudziałe w napisaniu artykułu oraz w ostatecznym zatwierdzeniu artykułu.

Oświadczam, że udostępnienie artykułów nie będzie naruszać praw autorskich osób trzecich.

KATEDRA BIOLOGII I BIOCHEMII MEDYCZNEJ
Karolina Szewczyk-Golec
dr hab. Karolina Szewczyk-Golec, prof. UMK

Bydgoszcz, 27.03.2023 r.

dr n. med. Marta Pawłowska

Katedra Biologii i Biochemii Medycznej

Collegium Medicum UMK

ul. Karłowicza 24, 85-092 Bydgoszcz

OŚWIADCZENIE

Jako współautor prac:

1. Smoğuła M., Pawłowska M., Wesołowski R., Szewczyk-Golec K., Mila-Kierzenkowska C. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in people at an increased risk of HIV infection – a pilot study. *Diagnostyka Laboratoryjna*. 2022; 58(1): 9-14.
2. Smoğuła M., Wesołowski R., Pawłowska M., Mila-Kierzenkowska C. Influence of Selected Factors on the Survival Assessment and Detection of *Giardia intestinalis* DNA in Axenic Culture. *Pathogens*. 2023, 12(2): 316.
3. Wesołowski R., Pawłowska M., Smoğuła M., Szewczyk-Golec K. Advances and Challenges in Diagnostics of Toxoplasmosis in HIV-Infected Patients. *Pathogens*. 2023; 12(1): 110.

oświadczam, że mój wkład w powstanie w/w prac polegał na:

- Ad. 1 – współudziałe w analizie i interpretacji danych oraz w ostatecznym zatwierdzeniu artykułu;
- Ad. 2 – współudziałe w przeprowadzeniu badania;
- Ad. 3 – udziałe w opracowaniu koncepcji badania, współudziałe w przygotowaniu manuskryptu, pracy nad ostateczną wersją manuskryptu oraz wizualizacji danych.

Oświadczam, że udostępnienie artykułów nie będzie naruszać praw autorskich osób trzecich.



Bydgoszcz, 27.03.2023 r.

dr n. med. Roland Wesołowski

Katedra Biologii i Biochemii Medycznej

Collegium Medicum UMK

ul. Karłowicza 24, 85-092 Bydgoszcz

OŚWIADCZENIE

Jako współautor prac:

1. Smoğuła M., Pawłowska M., Wesołowski R., Szewczyk-Golec K., Mila-Kierzenkowska C. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in people at an increased risk of HIV infection – a pilot study. *Diagnostyka Laboratoryjna*. 2022; 58(1): 9-14.
2. Smoğuła M., Wesołowski R., Pawłowska M., Mila-Kierzenkowska C. Influence of Selected Factors on the Survival Assessment and Detection of *Giardia intestinalis* DNA in Axenic Culture. *Pathogens*. 2023; 12(2): 316.
3. Wesołowski R., Pawłowska M., Smoğuła M., Szewczyk-Golec K. Advances and Challenges in Diagnostics of Toxoplasmosis in HIV-Infected Patients. *Pathogens*. 2023; 12(1): 110.

oświadczam, że mój wkład w powstanie w/w prac polegał na:

- Ad. 1 – współudziałe w analizie i interpretacji danych oraz w ostatecznym zatwierdzeniu artykułu;
- Ad. 2 – współudziałe w przeprowadzeniu badania;
- Ad. 3 – udziałe w konceptualizacji, współudziałe w przygotowaniu manuskryptu, pracy nad ostateczną wersją manuskryptu oraz wizualizacji danych.

Oświadczam, że udostępnienie artykułów nie będzie naruszać praw autorskich osób trzecich.



ZAŁĄCZNIK NR 2. ZGODA KOMISJI BIOETYCZNEJ

Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu
Collegium Medicum im L. Rydygiera w Bydgoszczy
KOMISJA BIOETYCZNA

Ul. M. Skłodowskiej-Curie 9, 85-094 Bydgoszcz, tel.(052) 585-35-63, fax.(052) 585-38-11

KB 769/2018

Bydgoszcz, 20.11.2018r.

Działając na podstawie art.29 Ustawy z dnia 5 grudnia 1996 roku o zawodzie lekarza (Dz.U. z 1997 r. Nr 28 poz. 152 (wraz z późniejszymi zmianami), zarządzenia Ministra Zdrowia i Opieki Społecznej z dnia 11 maja 1999 r. w sprawie szczegółowych zasad powoływania i finansowania oraz trybu działania komisji bioetycznych (Dz.U.Nr 47 poz.480) oraz Zarządzeniem Nr 21 Rektora UMK z dnia 4 marca 2009 r. z późn. zm. w sprawie powołania oraz zasad działania Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu przy Collegium Medicum im Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy oraz zgodnie z zasadami zawartymi w ICH – GCP

Komisja Bioetyczna przy UMK w Toruniu, Collegium Medicum w Bydgoszczy

(skład podano w załączeniu), na posiedzeniu w dniu **20.11.2018 r.** przeanalizowała wniosek, który złożyła kierownik badania:

dr hab. n. med. Celestyna Mila-Kierzenkowska
Katedra Biologii i Biochemii Medycznej
Collegium Medicum w Bydgoszczy

z zespołem w składzie

- **dr hab. n. med. Celestyna Mila-Kierzenkowska, dr hab. n. med. Karolina Szewczyk-Golec, dr n. med. Paweł Sutkowy, mgr Roland Wesołowski, mgr Marta Pawłowska, mgr Małgorzata Smogula,**

w sprawie badania:

„Prewalencja chorób pasożytniczych wywołanych przez pierwotniaki oraz wpływ wybranych czynników na ich przeżywalność.”

Po zapoznaniu się ze złożonym wnioskiem i w wyniku przeprowadzonej dyskusji oraz głosowania Komisja podjęła

Uchwałę o pozytywnym zaopiniowaniu wniosku

w sprawie przeprowadzenia badań, w zakresie określonym we wniosku pod warunkiem:

- poinformowania uczestników badania o celu oraz zakresie badań i uzyskania od każdego z nich osobnej, pisemnej, świadomej zgody na udział w badaniu, zgodnie z obowiązującymi przepisami, datowanej najpóźniej na moment rozpoczęcia badania a nie wcześniej niż data uzyskania z Komisji Bioetycznej zgody na takie badanie;
- zachowania tajemnicy wszystkich danych, w tym danych osobowych pacjentów, umożliwiających ich identyfikację w ewentualnych publikacjach;
- zapewnienia, że osoby uczestniczące w eksperymencie badawczym nie są ubezwłasnowolnione, nie są żołnierzami służby zasadniczej, nie są osobami pozbawionymi wolności, nie pozostają w zależności służbowej, dydaktycznej lub innej z prowadzącym badanie;
- sugerujemy uzyskanie podpisu uczestnika badania pod informacją o badaniu, lub sporządzenie formularza informacji i świadomej zgody na udział w badaniu na jednej kartce.

Jednocześnie informujemy, iż „Zgoda na udział w badaniu” winna zawierać m.in.: imię i nazwisko badanej osoby; Nr historii choroby pacjenta (L.ks.gł. Oddziału/Poradni) oraz datę i podpis badanej osoby, a także

2

klauzule, że uczestnik badania wyraża zgodę na przetwarzanie danych osobowych dotyczących realizacji tematu badawczego, z wyjątkiem publikacji danych osobowych.

Kierownik badania zobowiązany jest do przechowywania wszystkich dokumentów dotyczących badania przez okres dwudziestu lat.

Zgoda obowiązuje od daty posiedzenia (20.11.2018 r.) do końca 2022 r.

Wydana opinia dotyczy tylko rozpatrywanego wniosku z uwzględnieniem przedstawionego projektu; każda zmiana i modyfikacja wymaga uzyskania odrębnej opinii. Wnioskodawca zobowiązany jest do informowania o wszelkich poprawkach, które mogłyby mieć wpływ na opinię Komisji oraz poinformowania o zakończeniu badania.

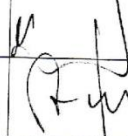
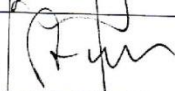
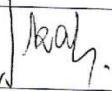
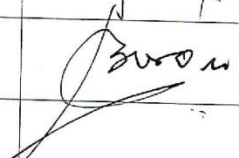

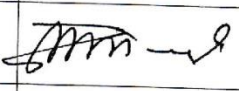
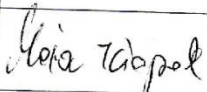
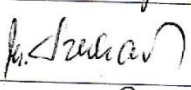
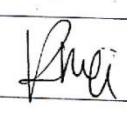
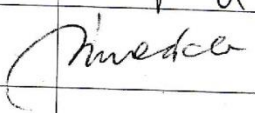
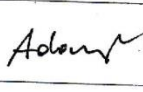
Od niniejszej uchwały podmiot zamierzający przeprowadzić eksperyment medyczny, kierownik zakładu opieki zdrowotnej, w której eksperyment medyczny ma być przeprowadzony, mogą wnieść odwołanie do Odwoławczej Komisji Bioetycznej przy Ministrze Zdrowia, za pośrednictwem Komisji Bioetycznej przy Collegium Medicum im. L. Rydygiera w Bydgoszczy, w terminie 14 dni od daty otrzymania niniejszej Uchwały.

Prof. dr hab. med. Karol Śliwka

Przewodniczący Komisji Bioetycznej

Otrzymuje:
dr hab. n. med. Celestyna Mila-Kierzenkowska
Katedra Biologii i Biochemii Medycznej
Collegium Medicum w Bydgoszczy

Lista obecności
na posiedzeniu Komisji Bioetycznej
w dniu 20.11.2018 r.

Lp.	Imię i nazwisko	Funkcja	Podpis
1.	Prof. dr hab. med. Karol Śliwka	Przewodniczący	
2.	Mgr prawa Joanna Połetek-Żygas	Z-ca przewodniczącego	
3.	Prof. dr hab. med. Mieczysława Czerwionka-Szaflarska		
4.	Prof. dr hab. med. Anna Balcar-Boroń		
5.	Prof. dr hab. med. Marek Grabiec		
6.	Prof. dr hab. med. Zbigniew Włodarczyk		
7.	Dr hab. n. med. Katarzyna Pawlak-Osińska, prof. UMK		
8.	Dr hab. n. med. Maria Kłopocka		
9.	Ks. dr hab. Wojciech Szukalski, prof. UAM		
10.	Dr n. med. Radosława Staszak-Kowalska		
11.	Mgr prawa Patrycja Brzezicka		
12.	Mgr farm. Aleksandra Adamczyk		
13.	Mgr Lidia Iwińska-Tarczykowska		